

液相色谱-质谱串联法测定清血内消丸中马兜铃酸 A 含量

甘盛¹, 韩婷³, 刘华钢², 施晓光^{1*}, 吴超权¹

(1. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530012;

2. 广西壮族自治区食品药品监督管理局, 南宁 530022;

3. 河北联合大学基础医学院药理教研室, 河北 唐山 053009)

[摘要] 目的: 建立清血内消丸中马兜铃酸 A 的限量检查法。方法: 采用 1% 碳酸钠溶液多次加热溶解样品, 用三氯甲烷多次提取, 弃去三氯甲烷层, 碱水层用稀盐酸调 pH, 加三氯甲烷提取多次, 收集合并三氯甲烷层, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 精密吸取 1 mL, 置 20 mL 量瓶, 加乙腈-水(40:60)稀释至刻度, 以水(0.1% 甲酸 + 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵)/(%) 和乙腈(含 5% 水, 0.1% 甲酸 + 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵)/(%) 为流动相梯度洗脱, 应用高效液相色谱/电喷雾质谱多离子反应监测模式(MRM)测定。结果: 马兜铃酸 A 在 11.21 ~ 299.0 pg 进样量与马兜铃酸 A 峰面积呈良好的线性关系($r=0.9995$), 检测限 0.1 μg·L⁻¹, 定测限 0.3 μg·L⁻¹, 平均回收率 119.20%, RSD 4.0% ($n=9$)。结论: 方法准确, 快速, 简便, 重复性好, 干扰少, 特异性好, 能满足马兜铃酸 A 的痕量残留的检测要求。

[关键词] 清血内消丸; 马兜铃酸 A; 液相色谱-质谱串联; 限量; 检查

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0163-05

[doi] 10.11653/syfyj2013160163

Determination of Aristolochic Acid A in Qingxueneixiao Pills by LC-MS-MS

GAN Sheng¹, HAN Ting³, LIU Hua-gang², SHI Xiao-guang^{1*}, WU Chao-quan¹

(1. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530012, China;

2. Guangxi Food and Drug Administration, Nanning 530022, China;

[收稿日期] 20121209(004)

[第一作者] 甘盛, 博士, 主管药师, 从事食品药品检验及质量研究, Tel:15994436944, E-mail:gansheng@hotmail.com

[通讯作者] * 施晓光, 硕士, 主管药师, 从事食品药品检验及质量研究, Tel:13517681047, E-mail:shixiaoguang2007@126.com

- [5] 陈海明, 易宇阳, 彭绍忠, 等. 高效液相色谱法测定广藿香中广藿香酮的含量[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(6):645.
- [6] 易宇阳, 陈海明, 秦臻, 等. HPLC 法测定广藿香油中广藿香酮的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5):560.
- [7] 邹玉繁, 张健泓, 汪小根. 双指数方程拟合广藿香酮巴布剂体外透皮特性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):1.
- [8] 汪小根, 莫小路, 蔡岳文, 等. 组培广藿香与扦插广藿香中百秋里醇和广藿香酮的含量对比分析[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1):96.
- [9] 章军, 薛翠娟, 荆文光, 等. HPLC 测定葛根饮片中 5 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):108.
- [10] 李才堂, 文萍, 郭琦丽, 等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):47.
- [11] 毕赢, 刘军辉, 罗容, 等. HPLC 同时测定葶苈中胡椒碱和葶苈明宁碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):84.
- [12] 罗集鹏, 刘玉萍, 冯毅凡, 等. 广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响[J]. 药学学报, 2003, 38(4):307.
- [13] 罗集鹏, 冯毅凡, 郭晓玲. 不同采收期对广藿香产量及挥发油成分的影响[J]. 中药材, 2001, 24(5):316.

[责任编辑 顾雪竹]

3. *Ditactic and Research Room, Basic Medical College, Hebei United University, Tangshan 053009, China)*

[**Abstract**] **Objective:** To establish a method to examine the limited content of aristolochic acid A in Qingxueneixiao Pills. **Method:** 1% sodium carbonate solution is repeatedly heated to dissolve the sample, extracted with chloroform for several times. Discard the chloroform layer, adjusted the pH of the alkaline layer with dilute hydrochloric acid, and extracted with chloroform again for several times. Collect and evaporate the chloroform layer. The residue was dissolved in methanol, 1 mL of which was diluted to 20 mL, eluted with a gradient composed by acetonitrile-water (40:60), water (0.1% formic acid + 5 mmol · L⁻¹ ammonium formate)/(%) and acetonitrile (containing 5% water, 0.1% formic acid + 5 mmol · L⁻¹ ammonium formate)/(%), assayed in high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Result:** Aristolochic acid A was linear in the range of 11.21-299.0 pg ($r = 0.9995$). The average recovery was 119.2% ($n = 9$) and the RSD was 4.0%. **Conclusion:** This method is accurate, rapid, simple, reproducible, less interference and specific, appropriate to the trace detection for the Qingxueneixiao Pills.

[**Key words**] Qingxueneixiao Pills; aristolochic acid A; LC-MS-MS; limited content; inspection

清血内消丸收载于《中国药典》2010 年版一部^[1],为金银花、连翘、栀子(姜炙)、拳参、大黄、蒲公英等 19 味药经加工制成的丸剂,具舒筋活络、消肿止痛之功,用于跌打扭伤、风湿骨痛、无名肿毒、腮腺炎肿痛。处方中含有极少量的马兜铃酸 A,早在 1993 年,比利时公开披露了该国一些妇女因服含广防己的减肥丸导致肾病的不幸事件^[3]。随后含有马兜铃酸的中草药引起尿毒症的事件在国内外引起关注,现在已经证实马兜铃酸主要表现为“急性肾间质性纤维化”,病情多为不可逆性。2004 年 8 月,为保证人民群众用药安全,国家食品药品监督管理局根据对含马兜铃酸药材及其制剂不良反应的报道以及毒副作用研究和结果的分析,决定加强对含马兜铃酸药材及其制剂的监督管理^[4]。因此,为更好地控制清血内消丸的安全性,需要对处方中马兜铃酸 A 的毒性成分马兜铃酸 A 加强质量控制,研究增加其的含量限量检查指标,对保证清血内消丸的质量及用药安全具有重要的意义。

1 材料

Agilent 1200 型快速高分离液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司),配 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), Agilent 6460 Triple Quad LC-MS-MS 液相色谱-质谱联用仪,配电喷雾电离源(ESI); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); S40K 型 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。马兜铃酸 A 对照品(批号 171170-201103,中国药品生物制品检定所提供),供检查用,HPLC 检测纯度为 99.05%;清血内消丸由

广西花红药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取马兜铃酸 A 对照品适量,加乙腈-水(40:60)制成每 2 mg · L⁻¹ 的溶液,即得。

供试品溶液的制备:取装量差异项下的本品,精密吸取 25 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加 1% 碳酸钠溶液 40 mL 分多次加热溶解,溶液转移至 250 mL 分液漏斗中,放冷,加三氯甲烷振摇提取 4 次,每次 40 mL,弃去三氯甲烷液,碱水层用稀盐酸调 pH 至 2~4,加三氯甲烷振摇提取 4 次,每次 40 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇使溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL,置 20 mL 量瓶中,加乙腈-水(40:60)稀释至刻度摇匀,过 0.2 μm 滤膜,即得。

阴性样品干扰的考察:按清血内消丸处方制备不含马兜铃酸 A 的阴性样品,照 2.2 的方法制备阴性样品溶液,即得。

2.2 色谱条件 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),柱温 40 °C,进样量 10 μL,流速 0.3 mL · min⁻¹,流动相 A 相水 (0.1% 甲酸 + 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵), B 相乙腈 (含 5% 水, 0.1% 甲酸 + 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵)/(%),梯度洗脱程序见表 1。

2.3 质谱条件 采用电喷雾电离源(ESI),源电压 4 000 V,喷嘴电压 1 500 V 干燥气温度 350 °C,雾化器压力 40 Psi,干燥气流速 5 L · min⁻¹,鞘气流速 390 °C,鞘气流速 10 L · min⁻¹,正离子检测,多反应监测(MRM),见表 2。

表 1 液相色谱分离梯度洗脱程序

t/min	水(0.1%甲酸 + 5 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵)/%	乙腈(含 5%水, 0.1%甲酸 + 5 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵)/%
0	55	45
6	55	45
6.5	5	95
9.5	5	95
10	55	45
14	55	45

表 2 质谱各参数

母离子 /m/z	子离子 /m/z	驻留时间 /ms	碎裂电压 /V	碰撞能量 /V
359.1	324.0	40	61	9
359.1	296.1 定量离子	40	61	5
359.1	268.1	40	61	17

在上述质谱谱条件下,对照品,样品,阴性样品质谱图见 1~3,由图可见样品中其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察 精密称取马兜铃酸 A 对照品 10.48 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 3 mL,置 50 mL 量瓶中,甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 3 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取 25 mL,置 250 mL 量瓶中,加乙腈-水(40:60)使溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取 3.0,3.0,3.0,3.0,30.0,40.0 mL,分别置 100,50,25,10,50,50 mL 量瓶中,加乙腈-水(40:60)稀释至刻度,摇匀,制成分别为 1.0,2.0,5.0,10.0,20.0,30.0 μg·L⁻¹的对照品溶液,进样测定。以对照品进样量为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y)绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 69.268 8X - 30.612 0$ ($r = 0.999 5$),结果表明马兜铃酸 A 在进样量在 11.21~299.0 pg 线性关系良好。

2.5 检测限和定量限 按上述质谱条件,分别吸取质量浓度为 0.1,0.3 μg·L⁻¹的马兜铃酸 A 对照品溶液 10 μL,注入液质联用仪,结果 S/N 分别为 3:1,10:1。故检测限为 0.1 μg·L⁻¹,定量限为 0.3 μg·L⁻¹。

2.6 精密度试验 对同一批(批号 20100801)供试品溶液,按上述质谱条件的方法,连续测定 6 次,结果马兜铃酸 A 峰面积 RSD 3.4% ($n = 6$),结果表明仪器精密度良好。

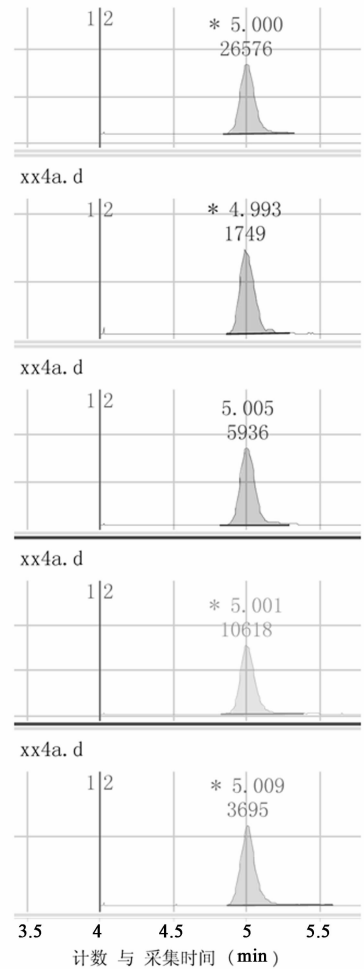


图 1 马兜铃酸 A 对照品 (10 μg·L⁻¹) MRM

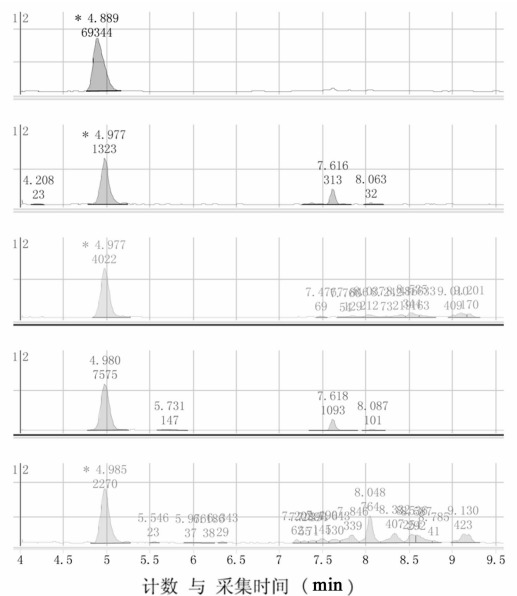


图 2 样品(批号 20100801) MRM

2.7 重复性试验 按 2.2 项下的方法制备供试品溶液,在上述质谱条件下测定,计算含量,结果马兜

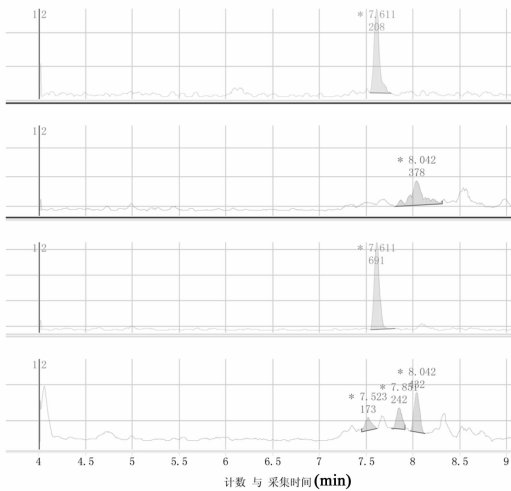


图 3 阴性样品(缺马兜铃酸 A)MRM

铃酸 A 含量的平均值为 $29.99 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 10.2% ($n=6$),表明本法重复性好。

2.8 稳定性试验 对同一批(批号 20100801)供试品溶液,分别在 0,2,4,6,9,12,15 h 按上述质谱条件测定峰面积,结果 6 次测定的马兜铃酸 A 峰面积的 RSD 5.0% ($n=6$),表明在 15 h 内被测物稳定。

2.9 加样回收率试验 精密吸取已知含量的本品(批号 20100801, 含量 $29.99 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 25 mL 共 9 份,置蒸发皿中,精密加入马兜铃酸 A 甲醇溶液($373.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)1,2,3 mL 水浴蒸干,残渣加 1% 碳酸钠溶液 40 mL 分多次加热溶解,溶液转移至 250 mL 分液漏斗中,放冷,加三氯甲烷振摇提取 4 次,每次 40 mL,弃去三氯甲烷液,碱水层用稀盐酸调 pH 2~4,加三氯甲烷振摇提取 4 次,每次 40 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇使溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL,置 20 mL 量瓶中,加乙腈-水(40:60)稀释至刻度,摇匀,过 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜,测定,计算回收率,结果见表 3。

2.10 样品测定 取本品 10 批样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样,测定,最高含量为 $29.04 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,最低含量为 $4.82 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,结果见表 4。清血内消丸 1 000 mL 含马兜铃酸 A 7.12 g;按《中国药典》2010 年版一部马兜铃酸 A 限度不得过 0.001% 进行折算,得本品的理论限度为 $71.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,因本品主要为外用制剂,故暂定本品每 1 mL 含马兜铃酸 A ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}$)不得过 70 ng。

2.11 验证结果 按本方法同时与我们实验室自拟定的高效液相色谱的方法^[5]做了比较,结果基本一致。见表 4。

表 3 马兜铃酸 A 加样回收率试验

No.	取样量 /mL	样品中含量 /ng	加入量 /ng	测得量 /ng	加样回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	25	749.8	373.7	1 153	107.83		
2	25	749.8	373.7	1 207	122.32		
3	25	749.8	373.7	1 204	121.66		
4	25	749.8	747.4	1 656	121.20		
5	25	749.8	747.4	1 654	120.93	119.2	4.0
6	25	749.8	747.4	1 675	123.78		
7	25	749.8	1 121.1	2 067	117.52		
8	25	749.8	1 121.1	2 101	120.52		
9	25	749.8	1 121.1	2 062	117.04		

表 4 10 批样品 HPLC 和 LC-MS 测定马兜铃酸 A 含量比较 ($n=2$)

样品批号	HPLC / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	HPLC-MS / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%
20101101	15.55	2.53	18.6	1.90
20081205	8.15	1.43	10.0	9.5
20090201	6.57	5.02	7.0	7.5
20090202	5.24	4.29	8.6	6.3
20100801	31.52	4.33	30.0	4.5
20100802	24.41	1.01	34.9	1.2
20100803	24.41	0.87	30.4	1.7
20100804	18.97	0.70	23.1	1.3
20080303	5.70	3.86	8.7	3.1
20080401	5.93	2.08	8.8	2.8

3 讨论

含马兜铃酸的中药材及其制剂已有马兜铃酸含量测定方法的文献报道,方法主要有 HPLC^[6-9], UPLC^[10], TLCS^[11], LC-MS^[12]等,其中以 HPLC 应用最多。HPLC 法存在灵敏度低,干扰峰多,较难分离,且前处理较繁琐的缺点。本品为复方制剂,成分复杂,干扰大,且马兜铃酸含量甚微,因此,本实验采用溶剂萃取后用液相色谱-质谱法测定,马兜铃酸峰与其他杂质峰分离良好,干扰少,缩短了分析时间,并显著提高了测定灵敏度与准确度。

在萃取过程中,比较了多种不同的溶剂,如甲醇,乙醇等,但样品用溶剂提取完后测定,流动相中有水与甲酸,所以不能只是考虑到提取率的问题,提取出来的有效成分多,杂质相应也可能增多,加大分析的难度。在尝试二氯甲烷,三氯甲烷与四氯化碳等溶剂后,发现三氯甲烷对样品的萃取效率比其他

好,待检测物属于极性有机物,ZORBAX Eclipse plus C₁₈柱允许液态有机溶剂冲洗,加样时三氯甲烷不会对柱子造成损害,故最终选定三氯甲烷作为萃取溶剂。

按照《中国药典》2010年版一部附录“中药质量标准分析方法验证指导原则”进行高效液相色谱-电喷雾质谱联用测定清血内消丸中马兜铃酸 A 限度方法学验证,结果表明该方法具有专属性强、稳定性、重复性好、方法准确度、灵敏度好。符合药物中痕量检测要求,可作为清血内消丸中马兜铃酸限量检查方法,也可用于其他中药及其制剂中马兜铃酸 A 限量含量的确证检测。

曾采用乙腈-0.1%乙酸(45:55)为流动相,结果基质效应较大,导致回收率低。后改为正文所提的液相色谱分离梯度洗脱程序,结果满意。

马兜铃酸 A 精确质量为 341.05,采集对照品溶液(2 μg·L⁻¹)的全扫描一级质谱图,可见[M+H]⁺:342.0,359.1,364.1,705.0,324.1,298.1与文献[13]报导一致。采集 m/z 359.1 的二级质谱图,可见 m/z 324.1,298.1,296.1,268.1,见图 4。其中 m/z 359.1→298.1 响应最大,但进样 10 批,部分样品 m/z 359.1→298.1 有杂峰干扰,故 MRM 参数选定为正文的表 2。

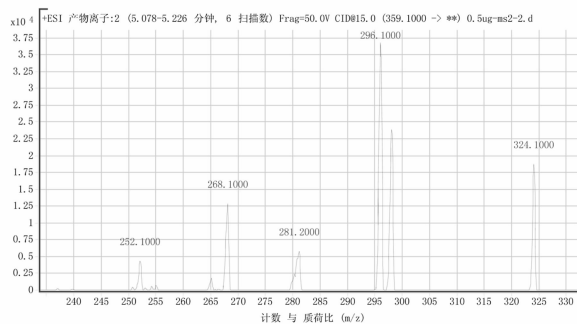


图 4 马兜铃酸 A m/z 359.1 二级质谱

使用 Agilent optimizer 质谱条件优化软件优化得参数见表 5。

表 5 质谱优化条件

分子	母离子	碎片离子	子离子	CE	丰度
MDLS	359.1	61	296.1	5	52 764
MDLS	359.1	61	298.1	5	95 154
MDLS	359.1	61	324	9	32 035
MDLS	359.1	61	268.1	17	14 602

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:214, 1030.
- [2] 任薇,李少华,龙彦纲,等. HPLC 法检查新生颗粒中马兜铃酸 A 的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(1):67.
- [3] 朱根华,万彦婷,卢珂,等. 三重四级杆液质联用法测定金樱子中白桦脂酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):55.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 关于加强广防己等 6 种药材及其 36 种制剂监督管理的通知[S]. 国食药监注[2004]397 号.
- [5] 唐秀玲,何颂华,谢谭芳,等. SPE-HPLC 法测定清血内消丸中马兜铃酸 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7):236.
- [6] 张兰桐,崔晓红,袁志芳,等. RP-HPLC 法测定中药材及其制剂中马兜铃酸 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3):215.
- [7] 王乃平,袁艳,江海燕,等. 液质联用法测定广山楂有机酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):77.
- [8] 胡一晨,吉琅,廖晴,等. 秦艽花液质联用的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):16.
- [9] 葛孝忠,张跃平,蔡旭萍,等. 辛芩颗粒中马兜铃酸 A 的 HPLC 法限度检查[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(8):604.
- [10] 薛燕,童湘晖,王峰,等. UPLC-UV 法测定细辛地上和地下部分的马兜铃酸 A[J]. 药学学报, 2008, 43(2):221.
- [11] 付桂香,赵世萍,陈文,等. 薄层扫描法测定龙胆泻肝丸中马兜铃酸的含量[J]. 药物分析杂志[J], 2002, 22(3):171.
- [12] 李伟,韩建平,高钧,等. 液相色谱-电喷雾质谱联用测定细辛及养血清脑颗粒中马兜铃酸 A[J]. 分析化学, 2007, 35(12):1798.
- [13] 韩凤梅,梁智军,陈勇,等. 马兜铃酸电喷雾质谱电离规律及其药材指纹图谱[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2006, 28(1):65.

[责任编辑 顾雪竹]