

朱砂莲中马兜铃酸类成分的UPLC-QTOF-MS/MS 定性与定量分析

郭宁^{1,2}, 赵雍², 孙奕^{2*}, 王安琪², 徐凌川^{1*}, 梁爱华²

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立朱砂莲块根中马兜铃酸类成分的定性与定量测定方法。方法:采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS)对朱砂莲块根进行定性与定量分析,检测条件ACQUITY UPLC-BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱(0~1 min, 10%B; 1~9 min, 10%~30%B; 9~11 min, 30%~50%B; 11~15 min, 50%~90%B),流速0.45 mL·min⁻¹,柱温35 °C,检测波长250 nm;电喷雾电离源(ESI),正离子模式检测。同时,建立了21批朱砂莲样品中马兜铃酸类成分的UPLC指纹图谱,根据指纹图谱分析结果,测定了不同产地和不同采收期朱砂莲样品中5个马兜铃酸类成分的含量。结果:结合文献信息和质谱数据,一共鉴定了朱砂莲中17个马兜铃酸类化合物,包括8个马兜铃酸,7个马兜铃内酰胺和2个4,5-二巯基阿朴菲类生物碱。UPLC指纹图谱中指认了10个共有峰,分别为朱砂莲苷,马兜铃内酰胺 I a-N-β-D-葡萄糖苷,马兜铃酸 IV a-O-β-D-葡萄糖苷,马兜铃内酰胺 III a-N-β-D-葡萄糖苷,马兜铃内酰胺 I -N-β-D-葡萄糖苷,马兜铃酸 C,马兜铃酸 D,马兜铃酸 II,马兜铃内酰胺 I,马兜铃酸 I。定量分析结果显示,马兜铃酸 I, II, C, D及马兜铃内酰胺 I 在线性范围内呈良好的线性关系,精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<3.0%,加样回收率范围在97.06%~101.84%(RSD<3.0%)。21批朱砂莲中马兜铃酸 I,马兜铃酸 II,马兜铃酸 C,马兜铃酸 D,马兜铃内酰胺 I 的质量分数范围分别为0.938 6~3.567 5, 1.377 6~3.688 1, 0.056 3~0.527 7, 0.108 8~0.305 5, 0.021 0~0.081 7 mg·g⁻¹。结论:朱砂莲中马兜铃酸类成分的含量存在一定差异,马兜铃酸 I 和 II 的含量要高于其他马兜铃酸类成分。建立的分析方法快速简便、准确可靠,可为朱砂莲的质量控制与评价提供参考。

[关键词] 朱砂莲; 马兜铃酸类成分; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS); 指纹图谱; 马兜铃内酰胺; 4,5-二巯基阿朴菲类生物碱

[中图分类号] R22;R917;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)11-0162-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210499

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210108.1450.003.html>

[网络出版日期] 2021-1-11 16:55

Qualitative and Quantitative Analysis of Aristolochic Acids in *Aristolochia cinnabarina* Dried Root Tubers by UPLC-QTOF-MS/MS

GUO Ning^{1,2}, ZHAO Yong², SUN Yi^{2*}, WANG An-qi², XU Ling-chuan^{1*}, LIANG Ai-hua²

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a qualitative and quantitative method for the determination of aristolochic acids in *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers. **Method:** The dried root tubers of *A. cinnabarina* was qualitative and quantitative analysis by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight

[收稿日期] 20201105(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004, 2018ZX09101-002);中国中医科学院自主选题(ZZ12-001)

[第一作者] 郭宁,在读硕士,从事中药质量控制与品质评价研究, Tel:010-64021051, E-mail: gnaha233@163.com

[通信作者] * 孙奕,研究员,从事中药化学与天然药物化学研究, Tel:010-64020151, E-mail: ysun@icmm.ac.cn;

* 徐凌川,教授,从事中药质量控制与品质评价、药用真菌学研究, E-mail: xulingchuan518@sina.com

tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS). The analysis was performed on Waters ACQUITY UPLC-BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with the mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-1 min, 10%B; 1-9 min, 10%-30%B; 9-11 min, 30%-50%B; 11-15 min, 50%-90%B). The flow rate was 0.45 mL·min⁻¹, column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 250 nm. Mass spectral data was acquired in positive mode of electrospray ionization (ESI). At the same time, the UPLC fingerprints of aristolochic acids in 21 batches of *A. cinnabarina* dried root tubers were established, and the contents of 5 aristolochic acids in *A. cinnabarina* dried root tubers from different producing areas and different harvesting periods were determined. **Result:** A total of 17 compounds, including 8 aristolochic acids, 7 aristololactams and 2 4,5-dioxoaporphine alkaloids, were identified from *A. cinnabarina* dried root tubers by mass spectrometry data and bibliographic information. Ten common peaks were identified in the UPLC fingerprint, and they were tuberosinone-*N*-β-*D*-glucoside, aristolactam I a-*N*-β-*D*-glucoside, aristolochic acid IV a-*O*-β-*D*-glucoside, aristolactam III a-*N*-β-*D*-glucoside, aristolactam I -*N*-β-*D*-glucoside, aristolochic acid III a, aristolochic acid IV a, aristolochic acid II, aristolactam I and aristolochic acid I. According to the quantitative analysis, the results exhibited that aristolochic acid III a, aristolochic acid IV a, aristolochic acid II, aristolactam I and aristolochic acid I had good linear relationships in the linear range. The relative standard deviations (RSDs) of precision, stability and reproducibility tests were all less than 3.0%, the recovery was 97.06%-101.84% (RSD<3.0%). The contents of aristolochic acid I, aristolochic acid II, aristolochic acid III a, aristolochic acid IV a, and aristolactam I in 21 batches of *A. cinnabarina* dried root tubers were 0.938 6-3.567 5, 1.377 6-3.688 1, 0.056 3-0.527 7, 0.108 8-0.305 5, 0.021 0-0.081 7 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The content of aristolochic acids in *A. cinnabarina* dried root tubers has a certain difference, the contents of aristolochic acid I and II are higher than other aristolochic acids. The established method is rapid, simple, accurate and reliable, which can provide reference for the quality control and evaluation of *A. cinnabarina* dried root tubers.

[Key words] *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers; aristolochic acids; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS); fingerprint; aristololactams; 4,5-dioxoaporphine alkaloids

朱砂莲始载于《蜀本草》，又名辟虺雷、辟蛇雷、牛血莲，主产于四川、广西、云南、贵州等地，为上述地区的习用药材，已有上千年的药用历史^[1-3]。朱砂莲性寒，味辛、苦，具有清热解毒、消肿止痛之功效，用于治疗肠炎、痢疾、十二指肠溃疡、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、痈疖肿毒、外伤出血等。《分类草药性》以朱砂莲为医治“跌打损伤、痧气腹痛、牙痛、吐血”之要药。《天宝本草》载其能“解热清心，安神定魄。主头晕，妇女白带，男子淋证”^[1]。现代药理研究表明，朱砂莲除镇痛作用外，还具有解热、抗炎等作用^[4-9]。

朱砂莲的主要成分为马兜铃酸 I (AA I)，马兜铃酸 II (AA II)，朱砂莲素，朱砂莲苷等马兜铃酸类化合物，尤以 AA I 和 AA II 的含量最高^[10-12]。然而，马兜铃酸类物质在人体内可蓄积毒性，大量或长期服用会产生肾毒性、肝毒性、致癌、致突变等不良反应，已被国际癌症研究机构(IARC)列为第一类致癌物^[13-23]。2017年，原国家食品药品监督管理总局公

布了24种可能含有马兜铃酸的马兜铃科药材及47种含马兜铃属药材已上市中成药品种，朱砂莲及其制剂保胃胶囊、金朱止泻片、朱砂莲胶囊等被列入其中。目前，朱砂莲及其制剂仍在市场上流通，但对其毒性成分的研究仅局限于对朱砂莲饮片及其制剂中 AA I 的含量分析。然而，除了 AA I 以外，AA II，马兜铃酸 C(AAC)，马兜铃酸 D(AAD) 和马兜铃内酰胺 I (AL I) 也广泛分布于朱砂莲、马兜铃、青木香、关木通等多种马兜铃科植物中，且均具有一定毒性，这使得朱砂莲的临床用药安全仍具有诸多不确定性^[24]。

综上所述，本实验采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS)对朱砂莲中的马兜铃酸类成分进行定性分析，建立此类成分的指纹图谱，指认出21批朱砂莲中的10个马兜铃酸类共有峰；针对毒性马兜铃酸类成分在朱砂莲中含量较高的问题，对不同来源和不同采收期的

朱砂莲样品中 AA I, AA II, AAC, AAD 及 AL I 进行了含量测定, 以期为朱砂莲的安全性评价提供实验依据。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相系统和 Vion QToF 型高分辨质谱仪(美国 Waters 公司), AUW120 型电子分析天平(日本岛津公司)。AA I (批号 PS010645, 纯度 >98.0%), AA II (批号 PS010031, 纯度 >98.0%), AAC (批号 PS010029, 纯度 >98.0%), AAD (批号 PS010039, 纯度 >99.0%),

AL I (批号 PS010658, 纯度 >98.0%) 对照品均购自成都普思生物科技股份有限公司; 7-羟基马兜铃酸 A 对照品(云南西力生物技术股份有限公司, 批号 CFS201802, 纯度 ≥98.0%), 水为娃哈哈纯净水或屈臣氏饮用水, 甲醇、乙腈为质谱纯, 其他试剂均为分析纯。朱砂莲药材购自四川和云南, 经山东中医药大学药学院徐凌川教授鉴定为马兜铃科植物朱砂莲 *Aristolochia cinnabarina* 的干燥块根; 药材标本存放于中国中医研究院中药研究所整合中药学中心, 样品信息详见表 1。

表 1 朱砂莲药材的样品信息

Table 1 Sample information of *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers

编号	产地	批号	采收时间	质量分数/mg·g ⁻¹				
				AA I	AA II	AAC	AAD	AL I
S1	四川峨眉山	20190201	2018-10	2.094 5	1.530 6	0.388 2	0.254 3	0.067 5
S2	四川峨眉山	20190301	2018-12	1.780 5	1.883 0	0.360 3	0.195 0	0.044 8
S3	四川峨眉山	20190501	2018-07	0.938 6	1.377 6	0.430 2	0.137 8	0.026 0
S4	四川峨眉山	20190601	2018-11	2.255 3	2.118 3	0.130 8	0.108 8	0.026 5
S5	四川峨眉山	20190801	2019-06	1.935 2	1.582 8	0.191 7	0.144 9	0.029 4
S6	四川峨眉山	20191001	2018-11	1.558 5	1.394 4	0.273 5	0.234 0	0.033 5
S7	四川峨眉山	20190910	2018-12	2.622 4	2.392 3	0.221 5	0.181 4	0.034 9
S8	四川峨眉山	201908	2018-12	2.317 6	2.158 7	0.193 5	0.142 7	0.029 2
S9	四川峨眉山	20190926	2019-07	1.797 6	1.727 4	0.142 4	0.109 4	0.032 6
S10	四川峨眉山	20191101	2019-10	2.390 1	2.127 7	0.283 0	0.253 9	0.033 9
S11	四川峨眉山	20191103	2019-05	1.286 5	2.018 5	0.453 5	0.186 6	0.046 9
S12	四川峨眉山	201911066	2019-10	2.360 4	2.041 8	0.230 4	0.152 3	0.034 0
S13	四川峨眉山	20191108	2019-03	2.405 4	2.045 8	0.056 3	0.223 6	0.030 4
S14	云南思茅	201804	2017-09	2.068 8	2.147 0	0.203 8	0.124 4	0.044 0
S15	云南思茅	201805	2018-03	3.201 5	3.436 3	0.320 2	0.305 5	0.052 2
S16	云南保山	201811	2018-08	3.567 5	3.679 9	0.527 7	0.206 1	0.052 0
S17	云南保山	201806	2018-01	2.109 4	1.885 3	0.191 2	0.165 4	0.027 2
S18	云南保山	201807	2018-05	2.163 6	2.154 5	0.194 6	0.126 1	0.021 0
S19	云南文山	201809	2018-02	1.877 7	1.713 8	0.198 8	0.113 5	0.037 2
S20	云南文山	201901	2018-11	1.721 2	2.182 4	0.300 1	0.147 3	0.051 9
S21	云南文山	201903	2018-11	2.800 0	3.688 1	0.519 1	0.192 6	0.081 7

2 方法与结果

2.1 检测条件 色谱条件为 ACQUITY UPLC-BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min, 10%B; 1~9 min, 10%~30%B; 9~11 min, 30%~50%B; 11~15 min, 50%~90%B), 流速 0.45 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 1 μL, 检测波长 250 nm。质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 正离子模式全扫描; 离子源工

作参数为毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 30 V, 锥孔反吹气流量(N₂) 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气流量 1 000 L·h⁻¹, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 450 °C, 每 0.2 s 采集 1 次谱图, 扫描范围 *m/z* 50~1 000, 采用 UNIFI™ 1.9.4.053 质谱分析软件进行数据采集和分析。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取朱砂莲块根粉末(过五号筛) 5.0 g, 精密称定, 加入 75% 乙醇 50 mL, 浸泡

30 min, 回流提取2次, 每次2 h, 趁热抽滤; 合并滤液, 减压浓缩, 加甲醇定容至100 mL, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称定对照品AA I, AA II, AAC, AAD和AL I适量, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成质量浓度分别为0.312, 0.264, 0.088, 0.080, 0.024 g·L⁻¹的混合对照品溶液, 4 °C保存, 备用。

2.3 UPLC-QTOF-MS/MS成分指认

2.3.1 化学成分的鉴定 采用UPLC-QTOF-MS/MS对朱砂莲中马兜铃酸类成分进行定性分析, 基峰色谱图(BPI)见图1。查阅相关文献、中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)及Waters商用中药数据库(Traditional Medicine Library, The University of Mississippi Botanical Library和The University of Ottawa Phytochemical Library), 共建立

了115种马兜铃酸类成分的质谱数据库, 数据库包括化合物分子式、中英文名称、化学文摘服务社(CAS)登录号、质谱高分辨质量数与裂解信息等; 经与对照品对比, 并结合文献与MassFragment™ 1.9.4.053软件对马兜铃酸类成分裂解规律进行解析, 最终确认了17种马兜铃酸类化合物, 包括8个马兜铃酸, 7个马兜铃内酰胺和2个4,5-二羰基阿朴菲类生物碱。化合物质谱解析信息见表2^[12,25-30], 结构式见图2。

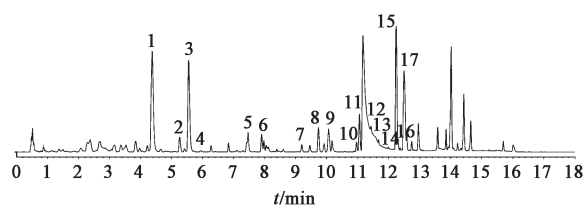


图1 朱砂莲UPLC-QTOF-MS/MS分析的BPI

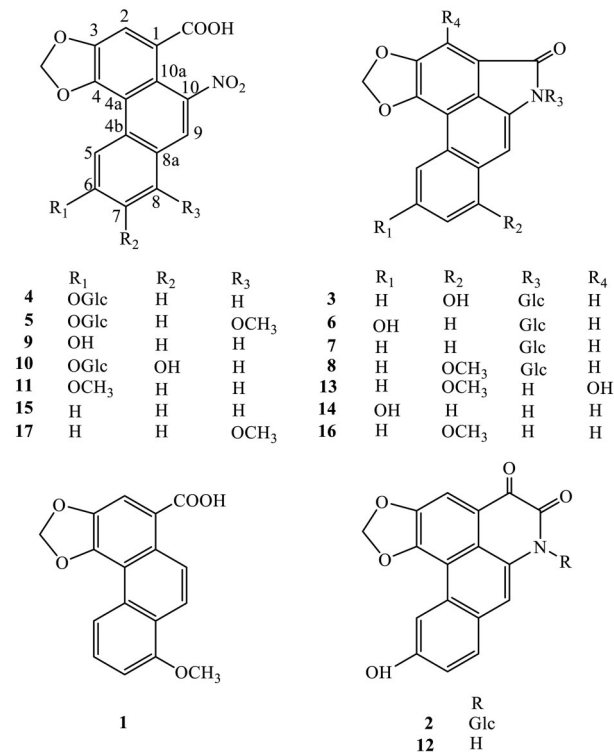
Fig. 1 BPI of *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers by UPLC-QTOF-MS/MS

表2 朱砂莲中马兜铃酸类成分的UPLC-QTOF-MS/MS分析

Table 2 Identification of aristolochic acids in *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers by UPLC-QTOF-MS/MS

化合物	<i>t_R</i> /min	成分	分子式	[M+H] ⁺ <i>m/z</i>			MS/MS裂解碎片	参考文献
				理论值	测量值	δ/ppm		
1	4.37	马兜铃次酸 I ¹⁾	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	297.075 8	297.076 4	-2.0	279.067 3, 253.087 4, 251.110 6, 223.079 3, 221.099 2	[25]
2	5.30	朱砂莲苷	C ₂₃ H ₁₉ NO ₁₀	470.108 2	470.109 1	1.9	308.054 1, 280.059 5, 252.059 8	[26]
3	5.62	马兜铃内酰胺 I a- <i>N</i> -β-D-葡萄糖苷 ¹⁾	C ₂₂ H ₁₉ NO ₉	442.113 3	442.111 9	-3.2	424.102 1, 280.059 5, 250.034 9	[25, 27]
4	5.96	马兜铃酸 III a- <i>O</i> -β-D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₁₉ NO ₁₂	490.098 0	490.095 9	-4.3	472.079 5, 444.110 9, 310.035 6, 284.054 1, 282.051 1	[25]
5	7.34	马兜铃酸 IV a- <i>O</i> -β-D-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₁ NO ₁₃	520.108 6	520.110 8	4.2	502.295 7, 476.160 9, 474.116 9, 340.044 2, 314.090 8, 312.063 4, 297.091 3	[25]
6	7.79	马兜铃内酰胺 III a- <i>N</i> -β-D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₁₉ NO ₉	442.113 3	442.113 7	0.9	424.103 9, 280.061 1, 250.025 8	[25, 27-28]
7	9.24	马兜铃内酰胺 II - <i>N</i> -β-D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₁₉ NO ₈	426.118 3	426.120 1	4.2	408.109 5, 264.065 4, 234.055 9	[25, 27]
8	9.77	马兜铃内酰胺 I - <i>N</i> -β-D-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₁ NO ₉	456.128 9	456.129 1	0.4	438.123 0, 294.079 1, 279.052 3	[25, 27]
9	10.09	AAC ²⁾	C ₁₆ H ₉ NO ₇	328.045 2	328.046 4	3.7	310.037 7, 284.060 1, 282.055 0	[12, 29]
10	10.93	7-羟基马兜铃酸 A ^{1,2)}	C ₁₇ H ₁₁ NO ₈	358.055 7	358.056 7	2.8	340.044 2, 314.066 6, 312.063 4	[30]
11	10.99	AAD ²⁾	C ₁₇ H ₁₁ NO ₈	358.055 7	358.054 6	-2.8	340.044 5, 314.064 6, 312.063 6, 297.063 2, 284.062 5	[12, 29-30]
12	11.35	朱砂莲素	C ₁₇ H ₉ NO ₅	308.055 3	308.056 5	3.9	278.036 9, 250.051 0, 222.062 4	[26]
13	11.55	2-羟基-8-甲氧基-头花千金藤酮 A	C ₁₇ H ₁₁ NO ₅	310.071 0	310.071 4	1.3	295.052 1, 280.065 9, 267.046 9, 252.045 9	[10]
14	11.62	马兜铃内酰胺 III a ¹⁾	C ₁₆ H ₉ NO ₄	280.060 4	280.060 6	0.7	250.052 5, 222.038 7	[27-28]
15	12.25	AA II ²⁾	C ₁₆ H ₉ NO ₆	312.050 3	312.048 5	-5.8	294.038 4, 268.059 2, 266.051 5	[12, 29]
16	12.30	AL I ^{1,2)}	C ₁₇ H ₁₁ NO ₄	294.076 1	294.075 0	-3.7	279.074 2, 264.041 1, 251.054 8, 236.038 9	[29]
17	12.51	AA I ²⁾	C ₁₇ H ₁₁ NO ₇	342.060 8	342.058 7	-6.1	324.049 8, 298.069 8, 296.068 2, 281.066 6, 265.036 2	[12, 29]

注: ¹⁾首次在朱砂莲中报道; ²⁾与对照品比对后确认。



Glc. 葡萄糖基(图3同)

图2 朱砂莲中马兜铃酸类成分的结构式

Fig. 2 Structures of aristolochic acids in *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers

2.3.2 马兜铃酸类成分的鉴定 从朱砂莲提取物中共鉴定出8个马兜铃酸,分别为马兜铃次酸 I (1), 马兜铃酸 III a-O-β-D-葡萄糖苷(4), 马兜铃酸 IV a-O-β-D-葡萄糖苷(5), AAC(9), 7-羟基马兜铃酸 A(10), AAD(11), AA II (15)和 AA I (17)。在正离子模式下,化合物 1 的 $t_R=4.37$ min, MS 出现了 m/z 297.076 4 [M+H]⁺ 的准分子离子峰,其 MS/MS 中可见碎片离子 m/z 279.067 3, 253.087 4, 提示分别为准分子离子峰失去 1 个分子 H₂O 和 CO₂ 而得;同时,推测二级碎片离子 m/z 251.110 6, 221.099 2, 223.079 3 分别为 [M+H-H₂O-CO]⁺, [M+H-H₂O-CO-CH₂O]⁺, [M+H-CO₂-CH₂O]⁺ 所产生;结合文献数据,推断该化合物为马兜铃次酸 I^[27]。化合物 5 的 $t_R=7.34$ min, MS 可观察到准分子离子峰 m/z 520.110 8 [M+H]⁺, 其 MS/MS 质谱中给出 m/z 474.116 9 为失去 1 个分子硝基所产生的碎片离子,而 m/z 340.044 2 为丢失 1 个分子 H₂O, 紧接着脱去葡萄糖基片段所产生的苷元离子 [M+H-H₂O-Glc]⁺;同时,失去 1 个分子硝基和糖基片段产生苷元离子 m/z 312.063 4 [M+H-NO₂-Glc]⁺。结合质谱裂解规律和相关文献,推断化合物 5 为马兜铃酸 IV a-O-β-D-葡萄糖苷^[25]。化合物 10 的 $t_R=10.93$ min,

MS 中准分子离子峰为 m/z 358.056 7 [M+H]⁺, 其分别失去 1 个分子水、羧基和硝基基团得 MS/MS 碎片离子 m/z 340.044 2, 314.066 6, 312.063 4。以化合物 5 为例,推测其裂解途径,见图 3。

2.3.3 马兜铃内酰胺类成分的鉴定 从朱砂莲提取物中共鉴定出 7 种马兜铃内酰胺,依次鉴定为化合物 3, 6, 7, 8, 13, 14, 16。化合物 3 ($t_R=5.62$ min) 准分子离子峰为 m/z 442.111 9, 其 MS/MS 上可看到碎片离子 m/z 424.102 1, 280.059 5, 推测分别为脱掉 1 分子水 ([M+H-H₂O]⁺) 和葡萄糖基 ([M+H-Glc]⁺) 所产生的碎片离子,这表明该化合物中含 1 个葡萄糖基;失去糖基后再脱掉 1 个分子 CH₂O 形成特征碎片离子 m/z 250.034 9 [M+H-Glc-CH₂O]⁺;经查阅文献^[25, 27],推断化合物 3 为马兜铃内酰胺 I a-N-β-D-葡萄糖苷。化合物 13 的准分子离子峰为 m/z 310.071 4, 其 MS/MS 特征碎片离子 m/z 295.052 1, 280.065 9 分别对应 [M+H-CH₃]⁺ 和 [M+H-CH₂O]⁺, 表明该化合物为马兜铃内酰胺类成分;根据质谱裂解规律并结合文献^[10],推测化合物 13 为 2-羟基-8-甲氧基-头花千金藤酮 A, 其可能的裂解途径见图 4。化合物 16 准分子离子峰为 m/z 294.075 0 [M+H]⁺, 其 MS/MS 特征碎片离子有 279.074 2 [M+H-CH₃]⁺, 264.041 1 [M+H-CH₂O]⁺, 251.054 8 [M+H-CH₃-CO]⁺, 236.038 9 [M+H-CH₂O-CO]⁺, 参考文献^[29]并与对照品对比后可确定其为 AL I。

2.3.4 4,5-二羰基阿朴菲类生物碱类成分鉴定 参考文献^[26]并分析质谱数据,确定了 2 个 4,5-二羰基阿朴菲类生物碱,即化合物 2 和 12,见表 2 和图 2。

2.4 马兜铃酸类成分指纹图谱的建立 将 21 批朱砂莲样品按照 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下条件进行测定,建立朱砂莲中马兜铃酸类成分的 UPLC 指纹图谱,以样品 S1 的指纹图谱为对照图谱,从中匹配出 10 个共有峰,峰 1~10 分别为朱砂莲苷(化合物 2), 马兜铃内酰胺 I a-N-β-D-葡萄糖苷(化合物 3), 马兜铃酸 IV a-O-β-D-葡萄糖苷(化合物 5), 马兜铃内酰胺 III a-N-β-D-葡萄糖苷(化合物 6), 马兜铃内酰胺 I -N-β-D-葡萄糖苷(化合物 8), AAC(化合物 9), AAD(化合物 11), AA II (化合物 15), AL I (化合物 16), AA I (化合物 17), 见图 5。

2.4.1 相似度评价 将 21 批朱砂莲样品的 UPLC 色谱图 AIA 数据分别导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2014 版),计算相似度。结果发现除个别样品外,各样品之间的相似度及其与对照指纹图谱之间的相似度均 > 0.9, 见表 3。

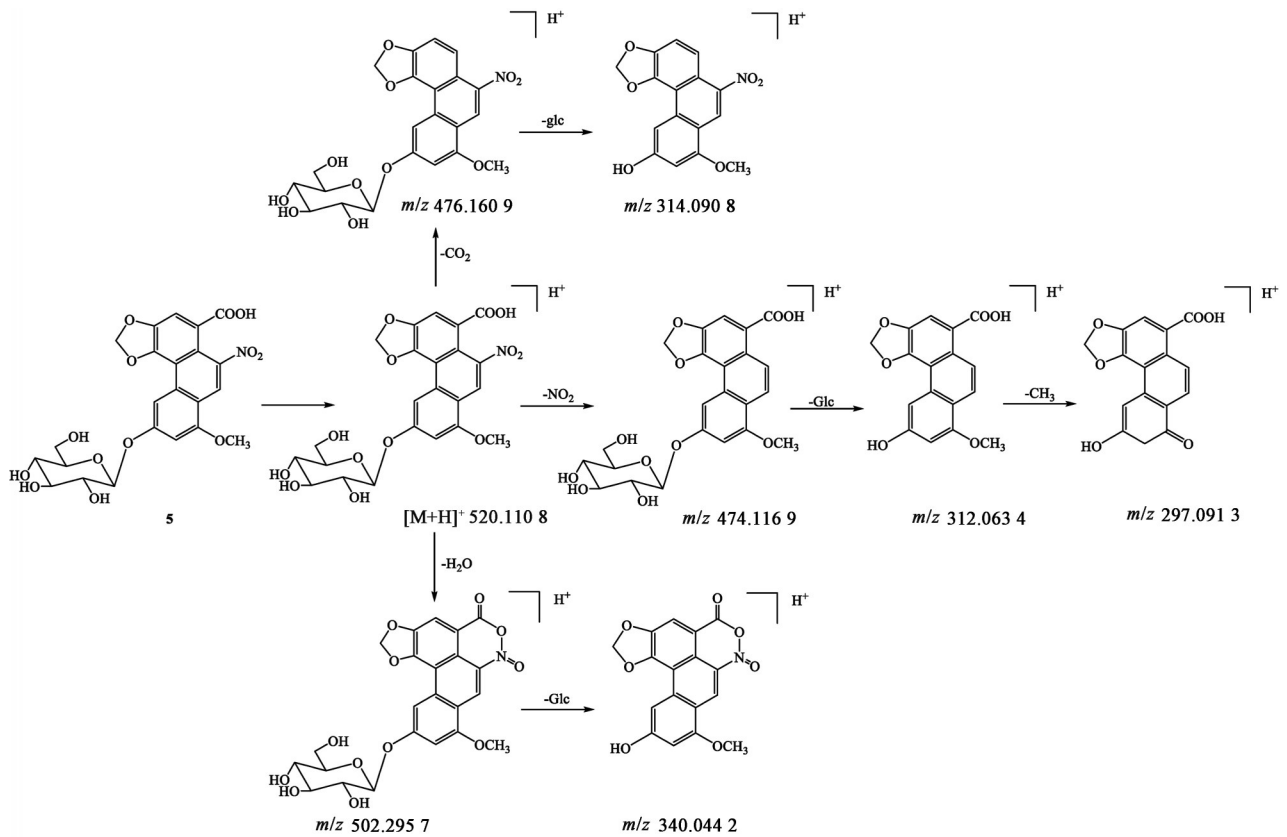


图3 马兜铃酸IV a-O-β-D-葡萄糖苷可能的裂解途径

Fig. 3 Possible fragmentation pathways of aristolochic acid IV a-O-β-D-glucoside

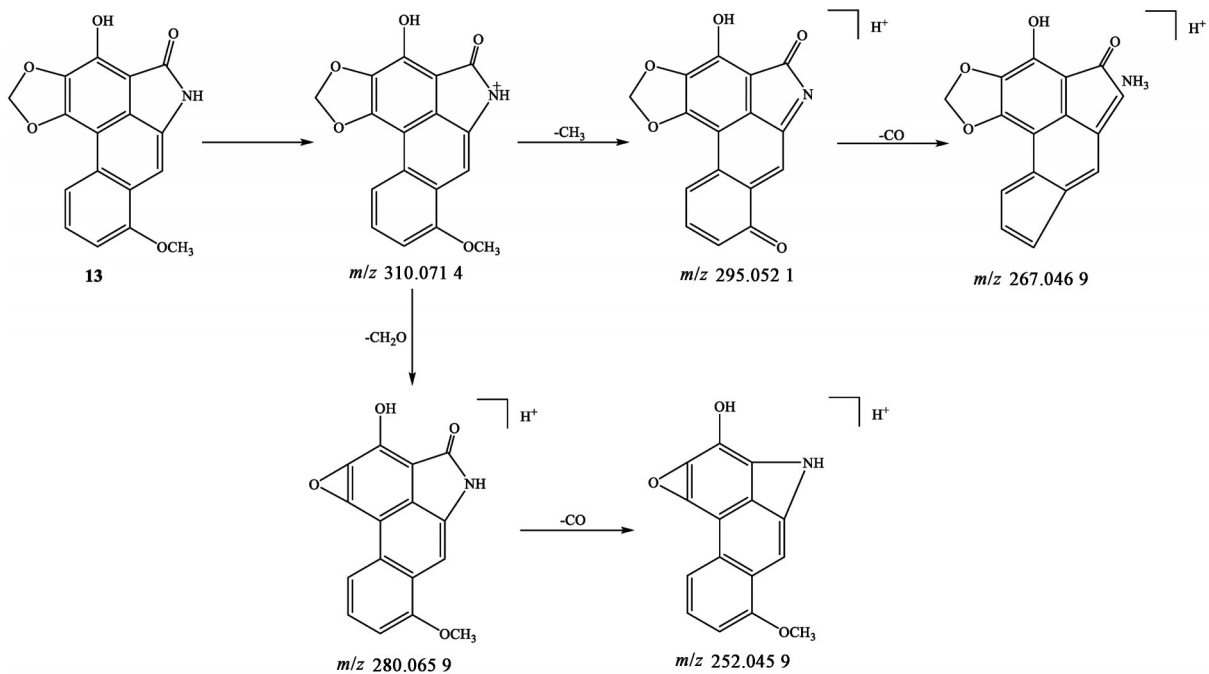


图4 2-羟基-8-甲氧基-头花千金藤酮A可能的裂解途径

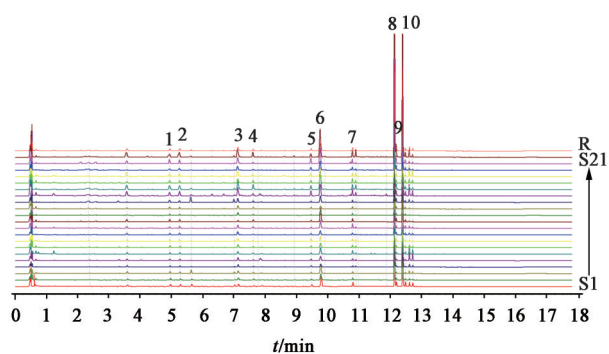
Fig. 4 Possible fragmentation pathways of 2-hydroxy-8-methoxycepharanone A

2.4.2 共有峰结构鉴定 采用UPLC-QTOF-MS/MS技术对21批朱砂莲的UPLC指纹图谱中10个共有峰进行了结构鉴定,结合化合物的质谱信息与相关文献信息,指认了10个共有峰对应的化合物,并

对其中5个色谱峰进行了定量分析(AA I, AA II, AAC, AAD和AL I)。

2.5 指标成分的含量测定

2.5.1 线性关系考察 精密吸取2.2.2项下的混合



R.对照指纹图谱(表3同)

图5 朱砂莲样品的UPLC指纹谱

Fig. 5 UPLC characteristic fingerprints of *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers

对照品溶液1 mL,分别稀释2,4,8,16,32倍,按2.1项下色谱条件测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程,见表4。

2.5.2 精密度试验 取同一批朱砂莲样品(S1),按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样6次,计算AA I,AA II, AAC, AAD和

AL I 峰面积的RSD分别为0.5%,1.0%,1.2%,1.5%,1.8%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一批朱砂莲样品(S1),按2.2.1项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0,2,4,8,12,24 h按2.1项色谱条件测定,计算AA I, AA II, AAC, AAD及AL I峰面积的RSD分别为2.0%,1.8%,2.9%,1.9%,1.2%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批朱砂莲样品(S1),按2.2.1项方法制备供试品溶液,按2.1项色谱条件测定,计算AA I, AA II, AAC, AAD及AL I的平均质量分数分别为1.994 5, 1.497 5, 0.368 1, 0.231 5, 0.062 7 mg·g⁻¹, RSD分别为0.7%,0.9%,0.6%,0.8%,0.9%,说明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收试验 精密称取已知指标成分含量的同一批次朱砂莲样品(S1)6份,每份2.5 g,分别精密加入与样品中含量相当的AA I, AA II, AAC, AAD, AL I对照品溶液,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.1项下条件测定,计算AA I, AA II,

表3 各批朱砂莲样品UPLC指纹图谱的相似度

Table 3 Similarity of UPLC fingerprint of each batch of *Aristolochia cinnabarina* dried root tubers

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	R
S1	1.000																					
S2	0.982	1.000																				
S3	0.935	0.977	1.000																			
S4	0.980	0.989	0.937	1.000																		
S5	0.993	0.988	0.934	0.996	1.000																	
S6	0.994	0.996	0.959	0.991	0.996	1.000																
S7	0.985	0.991	0.941	0.999	0.998	0.995	1.000															
S8	0.984	0.992	0.944	1.000	0.997	0.994	1.000	1.000														
S9	0.982	0.993	0.945	1.000	0.996	0.994	1.000	1.000	1.000													
S10	0.991	0.993	0.947	0.997	0.998	0.998	0.999	0.999	0.998	1.000												
S11	0.930	0.980	0.994	0.949	0.938	0.959	0.951	0.953	0.956	0.953	1.000											
S12	0.990	0.990	0.938	0.998	0.999	0.996	0.999	0.999	0.998	0.999	0.945	1.000										
S13	0.983	0.983	0.922	0.999	0.998	0.990	0.999	0.998	0.998	0.997	0.933	0.998	1.000									
S14	0.977	0.995	0.956	0.998	0.992	0.993	0.998	0.998	0.999	0.996	0.967	0.995	0.994	1.000								
S15	0.989	0.952	0.881	0.964	0.984	0.975	0.970	0.967	0.964	0.974	0.873	0.977	0.974	0.954	1.000							
S16	0.983	0.999	0.971	0.993	0.991	0.997	0.994	0.995	0.995	0.996	0.975	0.993	0.988	0.997	0.957	1.000						
S17	0.987	0.993	0.944	0.999	0.998	0.996	1.000	1.000	0.999	0.999	0.952	0.999	0.998	0.998	0.972	0.995	1.000					
S18	0.981	0.995	0.952	0.999	0.995	0.995	0.999	0.999	1.000	0.998	0.961	0.997	0.996	0.999	0.962	0.997	0.999	1.000				
S19	0.988	0.994	0.949	0.998	0.998	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999	0.956	0.999	0.997	0.998	0.970	0.996	1.000	0.999	1.000			
S20	0.973	0.998	0.978	0.988	0.983	0.991	0.989	0.991	0.991	0.989	0.984	0.986	0.980	0.995	0.940	0.998	0.990	0.994	0.992	1.000		
S21	0.970	0.998	0.987	0.980	0.976	0.989	0.982	0.983	0.985	0.984	0.99	0.98	0.971	0.990	0.932	0.996	0.983	0.988	0.986	0.998	1.000	
R	0.988	0.997	0.959	0.997	0.996	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999	0.965	0.998	0.994	0.998	0.966	0.999	0.999	0.999	0.999	0.995	0.991	1.000

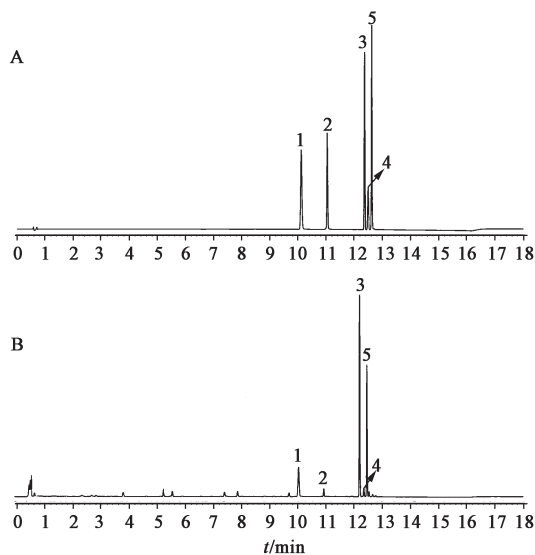
表4 朱砂莲中5种马兜铃酸类成分的线性关系考察
Table 4 Linear ranges of regression equations of aristolochic acids in *Aristolocnia cinnabarina* dried root tubers

化合物	回归方程	线性范围/mg·L ⁻¹
AA I	Y=18 314 487.34X-5 814.308	9.75~312
AA II	Y=19 572 467.62X-6 323.174	8.25~264
AAC	Y=24 197 135.10X-8 291.776	2.75~88
AAD	Y=20 862 267.52X-8 974.522	2.50~80
AL I	Y=37 884 798.86X-3 314.124	0.75~24

注:回归方程的相关系数(r)均为0.999 9。

AAC, AAD, AL I 平均加样回收率分别为 99.23%, 101.84%, 97.06%, 100.37%, 99.15%, RSD 均 < 2.4%, 表明该方法准确可靠。

2.5.6 样品测定 取 21 批朱砂莲样品适量,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下条件测定,计算各指标成分含量。结果发现 21 批样品中 AA I, AA II, AAC, AAD, AL I 的质量分数范围分别为 0.938 6~3.567 5, 1.377 6~3.688 1, 0.056 3~0.527 7, 0.108 8~0.305 5, 0.021 0~0.081 7 mg·g⁻¹, 其中 AA II 和 AA I 在朱砂莲中的含量较高,见表 1 和图 6。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. AAC; 2. AAD; 3. AA II; 4. AL I; 5. AA I
图6 朱砂莲样品的UPLC

Fig. 6 UPLC chromatograms of *Aristolocnia cinnabarina* dried root tubers

3 讨论

朱砂莲为地方常用止痛中药,来源较复杂且同名异物者多,马兜铃科背蛇生(广西朱砂莲),大叶马兜铃,薯蓣科薯蓣(赭魁)和蓼科毛脉蓼(红药子)等均被误认为朱砂莲。有学者查阅了大量的本草文献,对比了各种药材及其形态,考证得出马兜铃

属朱砂莲为正品的结论^[1,31-32]。因朱砂莲正品与混淆品的植物来源及其有效成分存在差异,导致性味和功效亦具有较大不同,因此应进行严格区分,以保证临床用药安全性。

朱砂莲为四川、云南等地的道地药材,在当地有着悠久的药用历史,但对朱砂莲研究目前却仅局限于对其饮片及其制剂中 AA I 等少数几种马兜铃酸类成分的含量分析,缺乏对其他马兜铃酸类成分的研究。自 2010 年版《四川省中药材标准》之后,朱砂莲因含有马兜铃酸类成分而从地方标准中删除,但其饮片及成方制剂保胃胶囊、金朱止泻片、朱砂莲胶囊等仍在市场上销售,存在着一定的临床安全性隐患。本文采用液质联用技术对朱砂莲中马兜铃酸类物质进行了定性与定量分析,鉴定出 17 个马兜铃酸类成分,并对其中 5 个主要成分进行定量分析,同时进行了 UPLC 指纹图谱分析,指出 10 个共有峰;另外,在朱砂莲的定性分析中,云南产 4 批样品(S15, S16, S20, S21)和四川产 2 批样品(S3, S9)中未检测到 7-羟基马兜铃酸 A, 3 批四川产朱砂莲(S1, S6, S8)未检测到 2-羟基-8-甲氧基-头花千金藤酮 A, 可为朱砂莲的安全合理用药提供实验依据。

由表 1 可知,不同批次朱砂莲中马兜铃酸类成分的含量存在一定差异,总体而言,AA I 和 AA II 含量要高于其他马兜铃酸类成分。本文结果表明,四川产朱砂莲中马兜铃酸类成分含量差异较小,而云南产朱砂莲中含量差异较大。AA I 和 AA II 是马兜铃科植物可能产生肝肾毒性的主要化学成分,在朱砂莲中含量很高。此外,朱砂莲中尚含有大量未知的马兜铃酸类成分,这些成分也有可能被人体直接吸收或者代谢成毒性马兜铃内酰胺类成分,故应对朱砂莲的用药安全进行重点关注,建议临床上限定朱砂莲的用量或利用炮制方法对其进行减毒处理,以保证其用药安全性。本文重点对朱砂莲中主要的马兜铃酸类成分进行定性与定量分析,而含量较低的马兜铃酸类化合物仍有待于进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 鄂家林. 朱砂莲的考证[J]. 中药材, 1985, 8(5): 46-48.

[2] 鄂家林. 朱砂莲研究进展[J]. 中药材科技, 1983(5): 36-37.

[3] 尹靖先. 四川朱砂莲的生药学研究[J]. 中草药, 1986, 17(4): 34-37.

[4] 张金芝, 高晓红, 张敏, 等. 去马兜铃朱砂莲提取物对

- 小鼠伤害性疼痛的影响[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(23): 118-119.
- [5] 孔繁利, 高晓红, 李凤丽, 等. 朱砂莲提取物镇痛作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(24): 3237-3238.
- [6] 王武康, 卢素琳, 陈屏. 四川野生朱砂莲的镇痛作用[J]. 江南大学学报: 自然科学版, 2002, 1(1): 97-98, 101.
- [7] 马宛珠, 周华安, 肖国华. “家种”与“野生”四川朱砂莲的镇痛及其药理作用的比较[J]. 中草药, 1987, 18(3): 7, 21-23.
- [8] 任华忠, 林海霞, 肖隆祥. 四川朱砂莲生品与炮炙品的镇痛作用比较研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(14): 18-20.
- [9] 刘碧崇, 曲光. 朱砂莲提取物 A₁₀₁₅ 及其单体成分马兜铃酸 A 的镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(2): 13-14.
- [10] LI H, YOUJI S, SHINGO M, et al. Eleven aristolochic acid derivatives from *Aristolochia cinnabarina* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(1): 237-239.
- [11] 李功辉, 陈莎, 邹兰, 等. UPLC-QQQ-MS 测定中药材中马兜铃酸 I 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 61-65.
- [12] 丁慧, 沈君子, 费文静, 等. UPLC-MS/MS 检测马兜铃属药材中 4 种马兜铃酸的含量[J]. 中国民族民间医药杂志, 2018, 27(18): 38-43.
- [13] YE J, QIAN Z Z, XUE M, et al. Aristolochic acid I aggravates renal injury by activating the C3a/C3aR complement system [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 312: 118-124.
- [14] 周莺, 李俊彪, 马中富, 等. 朱砂莲中毒致急性肾功能衰竭一例[J]. 中药材, 2000, 23(10): 662-664.
- [15] 黄仁发, 史伟, 吴金玉, 等. 朱砂莲中毒致急性马兜铃酸肾病[J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9(6): 412-413.
- [16] 刘晓霞, 田茂露, 胡章学, 等. 朱砂莲中毒致急性肾功能衰竭二例[J]. 华西医学, 2012, 27(1): 18-20.
- [17] 王娜. 肾宁方对朱砂莲致小鼠急性肾损伤的影响及机理研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [18] 吴以连. 朱砂莲胶囊致急性肾小管间质性肾炎 1 例[J]. 现代医药卫生, 2004, 20(24): 2699.
- [19] CHEN C J, YANG Y H, LIN M H, et al. Herbal medicine containing aristolochic acid and the risk of primary liver cancer in patients with hepatitis C virus infection [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(11), 1876-1883.
- [20] CUI Y, HAN J Y, REN J, et al. Untargeted LC-MS-based metabolomics revealed that aristolochic acid I induces testicular toxicity by inhibiting amino acids metabolism, glucose metabolism, β -oxidation of fatty acids and the TCA cycle in male mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 373: 26-38.
- [21] LIU Y S, CHAN C K, JIN L, et al. Quantitation of DNA adducts in target and nontarget organs of aristolochic acid I -exposed rats: correlating DNA adduct levels with organotropic activities [J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(3): 397-399.
- [22] XIONG G Y, YAO L, HONG P, et al. Aristolochic acid containing herbs induce gender-related oncological differences in upper tract urothelial carcinoma patients [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 6627-6639.
- [23] ZHANG H M, ZHAO X H, SUN Z H, et al. Recognition of the toxicity of aristolochic acid [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2019, 44(2): 157-162.
- [24] 李琳, 王智民, 高慧敏, 等. 含马兜铃酸类中药材中马兜铃总酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 11-13.
- [25] YU J, MA C M, WANG X, et al. Analysis of aristolochic acids, aristololactams and their analogues using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(8): 626-640.
- [26] 朱大元, 王保德, 黄宝山, 等. 朱砂莲化学成分的研究 I. 朱砂莲素和朱砂莲苷的结构[J]. 化学学报, 1983, 41(1): 74-78.
- [27] MAO W W, GAO W, LIANG Z T, et al. Characterization and quantitation of aristolochic acid analogs in different parts of *Aristolochiae Fructus*, using UHPLC-Q/TOF-MS and UHPLC-QqQ-MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(5): 392-400.
- [28] 朱大元, 蒋福祥, 徐任生, 等. 朱砂莲化学成分研究——II. 朱砂莲内酰胺和朱砂莲内酰胺甙的结构[J]. 中草药, 1981, 12(12): 1-2.
- [29] 孔德强, 高慧媛, 李辛, 等. 基于 UHPLC-Q/TOF-MS 技术快速测定马兜铃科五种植物中 8 种马兜铃酸类物质的含量[J]. 中国药学: 英文版, 2015, 24(6): 364-375.
- [30] 袁金斌. 马兜铃酸类物质的液相色谱联用技术及应用[D]. 长沙: 湖南大学, 2008.
- [31] 邹家林, 陈俊华. 朱砂莲及其混淆品的鉴别[J]. 中药材, 1985, 8(4): 22-25.
- [32] 刘芄, 吴家荣, 李林, 等. 贵州朱砂莲药材的生药鉴定[J]. 贵州医药, 1999, 23(2): 157-159.

[责任编辑 刘德文]