

# 液相色谱-质谱联用法测定消肿止痛酊中马兜铃酸A的含量

何颂华<sup>1\*</sup>,唐秀玲<sup>1</sup>,桑彤<sup>1</sup>,赵秀梅<sup>2</sup>,谢潭芳<sup>1</sup>(1.广西食品药品检验所,南宁 530021;2.广西久辉制药有限公司,南宁 530001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)20-1907-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.20.31

**摘要** 目的:建立测定消肿止痛酊中马兜铃酸A含量的方法。方法:采用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法。色谱柱为ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub>柱,流动相为乙腈(含5%水,0.1%甲酸+5 mmol/L甲酸铵)-水(0.1%甲酸+5 mmol/L甲酸铵)梯度洗脱,流速为0.3 ml/min,柱温为40℃,进样量为10 μl;通过电喷雾离子化,采用多反应监测方式进行正离子检测,用于定量分析的检测离子为m/z 359.1→296.1。结果:马兜铃酸A进样量在11.21~299.0 pg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系(r=0.999 5);平均加样回收率为119.20%,RSD=4.0%(n=9)。结论:该方法准确、快速、简便、重复性好、干扰少、特异性好,能满足消肿止痛酊中马兜铃酸A的痕量检测要求。

**关键词** 消肿止痛酊;马兜铃酸A;液相色谱-质谱联用法;含量测定

## Content Determination of Aristolochic Acid A in Xiaozhong Zhitong Tincture by LC-MS/MS

HE Song-hua<sup>1</sup>, TANG Xiu-ling<sup>1</sup>, SANG Tong<sup>1</sup>, ZHAO Xiu-mei<sup>2</sup>, XIE Tan-fang<sup>1</sup>(1.Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China; 2.Guangxi Jiuhui Pharmaceutical Co., Ltd., Nanning 530001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of aristolochic acid A in Xiaozhong zhitong tincture. METHODS: LC-MS/MS was adopted. The dermination was performed on ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile (containing 5% water, 0.1% formic acid, 5 mmol/L ammonium formate)-water (0.1% formic acid and 5 mmol/L ammonium formate, gradient elution) at the flow rate of 0.3 ml/min. The column temperature was set at 40℃ and injection volume was 10 μl; the detection was performed in multiple reaction monitoring mode (MRM) with positive electrospray ionization (ESI), by m/z 359.1→296.1 of aristolochic acid A. RESULTS: The linear range of aristolochic acid A were 11.21-299.0 pg (r=0.999 5) with an average recovery of 119.20% (RSD=4.0%, n=9). CONCLUSIONS: The method is accurate, rapid, simple and reproducible with less interference and good specificity, which can meet the requirements of trace detection of aristolochic acid A.

**KEY WORDS** Xiaozhong zhitong tincture; Aristolochic acid A; LC-MS/MS; Content determination

消肿止痛酊收载于《中国药典》2010年版(一部)<sup>[1]</sup>,是由黄藤、防风、荆芥、细辛、五加皮等21味中药经加工制成的酊剂,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。方中的细辛占处方量的4.23%,细辛中含有极少量的马兜铃酸A<sup>[1]</sup>。早在1993年,比利时就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事件<sup>[2]</sup>。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,马兜铃酸毒性主要表现为“急性肾间质性纤维化”,病情多为不可逆性。2004年8月,为保证民众用药安全,我国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<sup>[3]</sup>。因此,为更好地控制消肿止痛酊的安全性,需要对处方中细辛的毒性成分马兜铃酸A加强质量控制,研究增加该成分含量限度指标对保证消肿止痛酊的质量及用药安全具有重要意义。

目前,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,方法主要有高效液相色谱(HPLC)法<sup>[4-8]</sup>、超高效液相色谱(UPLC)法<sup>[9]</sup>、薄层扫描(TLCS)法<sup>[10]</sup>、液

相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法<sup>[11]</sup>等,其中以HPLC法应用最多。但HPLC法存在灵敏度低、干扰峰多、较难分离且前处理较烦琐的缺点。消肿止痛酊为复方制剂,成分复杂,干扰大,且马兜铃酸含量甚微,故本试验采用溶剂萃取后,以LC-MS/MS法进行测定,结果马兜铃酸A峰与其他杂质峰分离良好,干扰少,缩短了分析时间,同时显著提高了测定灵敏度与专属性,满足了药物中痕量成分检测的要求。

## 1 材料

Agilent 1290快速高分离液相色谱系统、Agilent 6460 Triple Quad LC-MS/MS仪[配电喷雾电离源(ESI),美国安捷伦公司];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];BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司)。

马兜铃酸A对照品(中国食品药品检定研究院提供,批号:110746-200204,供鉴别用,HPLC检测质量分数为99.05%);消肿止痛酊(广西花红药业股份有限公司提供,批号:20101101、20081205、20090201、20090202、20100801、20100802、20100803、20100804、20080303、20080401);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为高纯水。

## 2 方法与结果

\* 主管药师。研究方向:中药材及其制剂检测分析。电话:0771-2611653。E-mail: hshua3@sina.com

## 2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相:采用梯度洗脱,A相为水(0.1%甲酸+5 mmol/L 甲酸铵),B相为乙腈(含5%的水,0.1%甲酸+5 mmol/L 甲酸铵),梯度洗脱程序见表1;流速:0.3 ml/min,柱温:40 °C,进样量:10 μl。

表1 液相色谱分离梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program of liquid chromatography

时间, min	A相:水(0.1%甲酸+5 mmol/L 甲酸铵),%	B相:乙腈(含5%的水,0.1%甲酸+5 mmol/L 甲酸铵),%
0	55	45
6	55	45
6.5	5	95
9.5	5	95
10	55	45
14	55	45

2.1.2 质谱条件 电离源:ESI;源电压:4 000V;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;鞘气流温度:390 °C;鞘气流流速:10 L/min;检测方式:正离子检测;扫描方式:多反应监测(MRM),具体参数见表2(\*为定量离子)。

表2 马兜铃酸A的MRM参数

Tab 2 MRM parameters of aristolochic acid A

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*	40	61	5
359.1	268.1	40	61	17

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 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, V/V)制成每1 ml含10 ng的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的消肿止痛酊,精密吸取25 ml,置于蒸发皿中,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,加三氯甲烷振荡提取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,再加三氯甲烷振荡提取4次,每次40 ml,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至5 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密吸取1 ml,置于20 ml量瓶中,加乙腈-水(40:60, V/V)稀释至刻度,摇匀,过0.2 μm滤膜,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按消肿止痛酊处方制备不含细辛的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备溶液,即得。

## 2.3 专属性试验

按“2.1”项下色谱-质谱条件,取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液进样测定,记录色谱-质谱图,见图1。由图1可知,样品中其他成分对马兜铃酸A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,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取3 ml,置于50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取3 ml,置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取25 ml,置于250 ml量瓶中,加乙腈-水(40:60, V/V)稀释至刻度,摇匀,备用。分别精密量取上述溶液3.0、3.0、3.0、3.0、30.0、40.0 ml,各置于100、50、25、10、50、50 ml量瓶中,加乙腈-水(40:60, V/V)稀释至刻

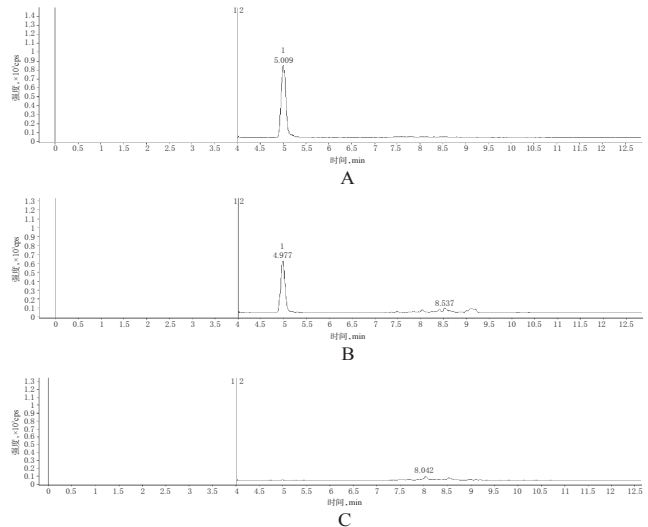


图1 液相色谱-质谱联用图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.马兜铃酸A

Fig 1 LC-MS/MS chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. aristolochic acid A

度,摇匀,制成质量浓度分别为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、30.0 ng/ml的系列对照品溶液,进样测定。以马兜铃酸A进样量(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y=69.2688x-30.6120$ ( $r=0.9995$ )。结果表明,马兜铃酸A进样量在11.21~299.0 pg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

## 2.5 检测限和定量限

按“2.1”项下色谱-质谱条件,分别吸取质量浓度为0.1、0.3 ng/ml的马兜铃酸A对照品溶液10 μl,注入LC-MS/MS仪进样测定。结果,信噪比分别为3:1和10:1。故本方法检测限为0.4 ng/ml,定量限为1.2 ng/ml。

## 2.6 精密度的试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20100801)适量,按“2.1”项下色谱-质谱条件进样,连续测定6次。结果,RSD=3.4%( $n=6$ ),表明本方法精密度良好。

## 2.7 重复性试验

取样品(批号:20100801)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱-质谱条件进样测定。结果,RSD=10.2%( $n=6$ ),表明本方法重复性较好。

## 2.8 稳定性试验

取供试品溶液(批号:20100801)适量,分别在0、2、6、8、10、15 h时,按“2.1”项下色谱-质谱条件进样测定。结果,RSD=5.0%( $n=6$ ),表明在15 h内被测物质量稳定。

## 2.9 加样回收率试验

精密吸取已知含量的样品(批号:20100801,质量浓度:29.99 ng/ml)25 ml,共9份,置于蒸发皿中,每3份分别精密加入马兜铃酸A甲醇溶液(质量浓度:373.7 ng/ml)1、2、3 ml,水浴蒸干,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱-质谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表3。

## 2.10 样品含量测定

取10批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱-质谱条件进样测定,计算含量,结果见表4。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

序号	取样量, ml	所含量, ng	加入量, ng	测得量, ng	加样回收率, %	平均加样回收率, %	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	119.20	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 样品含量测定结果(n=2)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=2)

样品批号	含马兜铃酸A的量, ng/ml	RSD, %
20101101	18.6	1.9
20081205	10.0	9.5
20090201	7.0	7.5
20090202	8.6	6.3
20100801	30.0	4.5
20100802	34.9	1.2
20100803	30.4	1.7
20100804	23.1	1.3
20080303	8.7	3.1
20080401	8.8	2.8

### 2.11 含量限度的拟定

消肿止痛酊1 000 ml含细辛7.12 g,按《中国药典》2010年版(一部)“细辛”项下规定,马兜铃酸A限度“不得过0.001%”进行折算,得消肿止痛酊中马兜铃酸A的理论限度为71.2 ng/ml,因本品主要为外用制剂,故暂定本品每1 ml含马兜铃酸A(C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>N)不得超过70 ng。

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的选择

笔者曾采用乙腈-0.1%乙酸(45:55, V/V)为流动相,结果回收率较低。故笔者采用提取后添加法评价基质效应<sup>[12]</sup>,即将阴性样品按前处理方法进行提取净化后,在提取液中添加待测物进行测定,与同样浓度的纯溶剂中待测物的峰面积进行比较,计算其相对比值来评价基质效应情况。结果,相对比值为0.79,由此造成回收率偏低。采用“2.1”项下的流动相系统后,相对比值为0.99,基本消除了基质效应。因采集的定量离子对m/z 359.1→296.1中母离子为[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>,以乙腈-0.1%乙酸(45:55, V/V)为流动相时,流动相中的[NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>浓度为痕量,马兜铃酸A分子与[NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>结合受基质的影响较大;而“2.1”项下流动相系统中含有甲酸铵, [NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>较丰富,使得马兜铃酸A分子与[NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>结合受基质的影响较小。

### 3.2 质谱条件的选择

马兜铃酸A分子式为C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>N,精确质量为341.05 Da。采集对照品溶液(2 μg/ml)的全扫描一级质谱图,可见:m/z 342.0[M+H]<sup>+</sup>; m/z 359.1[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>; m/z 364.1[M+Na]<sup>+</sup>; m/z 705.1[2M+Na]<sup>+</sup>; m/z 324.1[M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; m/z 298.1[M+H-CO]<sup>+</sup>。该结果与文献<sup>[13]</sup>报道一致。采集m/z 359.1的二级质谱图,可见:m/z 324.1, m/z 298.1, m/z 296.1, m/z 268.1,见图2。使用Agilent optimizer质谱条件优化软件优化了这4个离子的参数,其中m/z

359.1→298.1响应最大。但10批样品测定图谱中,部分样品m/z 359.1→298.1有杂峰干扰,故MRM参数选定如表2所示。

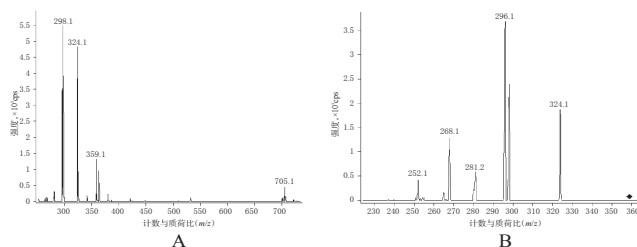


图2 马兜铃酸A扫描质谱图

A.母离子;B.碎片离子

Fig 2 MS/MS spectra of aristolochic acid A

A. parent ion; B. fragment ion

综上所述,本方法具有准确、快速、简便、重复性好、干扰少、特异性好的优点,能满足消肿止痛酊中马兜铃酸A的痕量检测要求,也可用于其他中药及其制剂中马兜铃酸A的限量检测。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 214, 1 030.
- [2] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs[J]. *Lancet*, 1993, 341(8 842): 387.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 关于加强广防己等6种药材及其制剂监督管理的通知[S]. 2004-08-05.
- [4] 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.
- [5] 周跃华, 周娟, 黄莎莎, 等. 部分马兜铃科药材中马兜铃酸A的含量测定研究[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(7): 1 075.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 俞冰, 刘志承, 李曙光. 固本祛风颗粒中马兜铃酸I的限量检查[J]. *中国药房*, 2011, 22(47): 4 485.
- [9] 薛燕, 童湘晖, 王峰, 等. UPLC-UV测定细辛地上和地下部位中的马兜铃酸A[J]. *药学学报*, 2008, 43(2): 221.
- [10] 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*, 2002, 22(3): 171.
- [11] 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): 1 078.
- [12] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 321.
- [13] 韩凤梅, 梁智军, 陈勇. 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.

(收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2013-02-27)