

DPiMS-8060 快速筛查和定量检测细辛和天仙藤中的马兜铃酸和马兜铃内酰胺

DPiMS-001

摘要：本文基于岛津 DPiMS-8060 建立了中草药中马兜铃酸类物质的快速筛查和定量分析方法。该方法能够在 20s 内完成 4 种马兜铃酸和 1 种马兜铃内酰胺的定性定量分析，校准曲线相关系数大于 0.999，检出限 0.04-0.66 $\mu\text{g/g}$ ，定量限在 0.13-1.99 $\mu\text{g/g}$ 。精密度和加标回收率都能够满足快速筛查的要求。探针电喷雾离子源 (PESI) 可以直接串接在岛津 8045 以上型号的仪器上，可推广性好。同时该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合中药材中马兜铃酸类物质的快速筛查和定量分析。

关键词：马兜铃酸 马兜铃内酰胺 DPiMS-8060 细辛 天仙藤 快速筛查

马兜铃酸类物质主要包含两个类型，一类是马兜铃酸 (Aristolochic acid)，一类是马兜铃内酰胺 (Aristolactam)。马兜铃内酰胺是马兜铃酸的主要代谢产物之一。纽约州立大学石溪分校药理学教授格罗曼证实马兜铃酸是巴尔干地方性肾病和中草药肾病的病因。2017 年 10 月，世界卫生组织国际癌症研究机构将马兜铃酸、含马兜铃酸的植物列在一类致癌物清单中。很多中草药中都含有马兜铃酸类化合物，中国药典 (2015 版) 中仅收录含马兜铃酸类物质相对较低的三种草药：天仙藤、马兜铃和细辛。天仙藤为马兜铃亚科天仙藤属攀援藤本植物，具有行气活血、利水消肿等功效。细辛为细辛亚科、细辛属多年生草本，具有祛风、散寒等功效。除了中草药外，鱼腥草中也被发现含有马兜铃内酰胺，但是它们的毒性还需要进一步确认。

2019 年 3 月，《中国科学 生命科学杂志》发表了含马兜铃酸中药及其检测研究进展的综述论文，总结了马兜铃酸类化合物的检测方法。目前，TLC 法、液相色谱法和液相色谱质谱联用法是最主要的检测方法。国家标准 (GB/T 35949) 和烟草行业标准 (YC/T 406) 分别规定了化妆品和烟用添加剂中马兜

铃酸 A 的测定方法和检出限。然而，国家标准仅包含马兜铃酸 A 的分析方法和检出限。LCMS 方法需要采用稀释、固相萃取、色谱柱分离等手段实现马兜铃酸的准确定量，前处理和分析时间长，消耗大量的有机溶剂。DPiMS-8060 采用探针电喷雾离子源 (Probe electrospray ionization, PESI) 串接 LCMS-8060 质谱仪，灵敏度和选择性高、分析速度快、不需要流动相、不需要雾化气和干燥气，在快速检测和筛查领域具有极大的优势。目前，该方法已经在毒品、生物毒素、农残的快速筛查和检测以及代谢组学等领域有应用案例。

本文基于岛津 DPiMS-8060 快速检测质谱仪，建立了天仙藤和细辛中 4 种马兜铃酸和 1 种马兜铃内酰胺的定性和定量分析方法。由于存在基质效应，直接采用外标法不能实现化合物的准确测定，因此同时采用稀释实际样品和添加内标物质 (萘普生) 的方法，降低细辛和天仙藤中基质干扰。本方法前处理方法简便，检测灵敏度高，分析时间短，准确度高，适合中草药及其制剂中马兜铃酸类化合物的快速筛查和定量分析。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津公司的快速原位离子化检测仪器 DPiMS-8060。具体配置为：探针电喷雾离子源 (PESI)，LCMS-8060 三重四级杆质谱仪，LabSolutions Ver.5.96 工作站。金属探针在使用之前采用放电 - 充电循环程序进行老化。

1.2 样品制备

样品破碎后，用甲醇水提取，经过稀释后，直接进行分析。具体步骤如下：

1. 取 100 g 样品，用粉碎机破碎，过 0.35 mm 样品筛；
2. 准确称取 0.20 g 样品于 50 mL 离心管；
3. 准确加入 25 mL 提取液（甲醇 / 水，70/30）混合液，称重；
4. 超声 40min，然后用甲醇 / 水补足超声过程损失的重量；
5. 配置乙醇 / 水（60/40）溶液，含 2mM 甲酸铵，0.1% 甲酸，10ppb 内标；
6. 取 20 μ L 上清液用乙醇 / 水溶液稀释至 1 mL；
7. 取 10 μ L 稀释液进样分析。

1.3 分析条件

离子源条件：

取样时间：50 msec

放电电压：2.3 kV (+) / -3.0 kV (-)

取样位置：46.0 mm

探针清洗：0.05 min (+) / 0.05 min (-)

离子化时间：220 msec

探针频率：2.78 Hz

质谱条件：

离子源：PESI (+)

DL 温度：250°C

加热块温度：30°C

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名	m/z	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
马兜铃酸 A	359.05 > 296.15*	-25.0	-18.0	-22.0
Aristolochic acid A	359.05 > 324.05	-25.0	-21.0	-20.0
马兜铃酸 B	329.05 > 268.15*	-12.0	-12.0	-10.0
Aristolochic acid B	329.05 > 294.10	-13.0	-15.0	-15.0
马兜铃酸 C	345.00 > 284.05*	-24.0	-13.0	-14.0
Aristolochic acid C	345.00 > 282.05	-26.0	-20.0	-32.0
马兜铃酸 D	375.00 > 312.10*	-14.0	-15.0	-24.0
Aristolochic acid D	375.00 > 297.05	-14.0	-34.0	-22.0
马兜铃内酰胺 I	294.05 > 279.10*	-12.0	-27.0	-29.0
Aristololactam I	294.05 > 251.05	-12.0	-35.0	-18.0
萘普生	231.10 > 185.15*	-16.0	-15.0	-24.0
Naproxen	231.10 > 170.15	-16.0	-26.0	-16.0

* 为定量离子

■ 结果与讨论

2.1 标准样品 MRM 色谱图

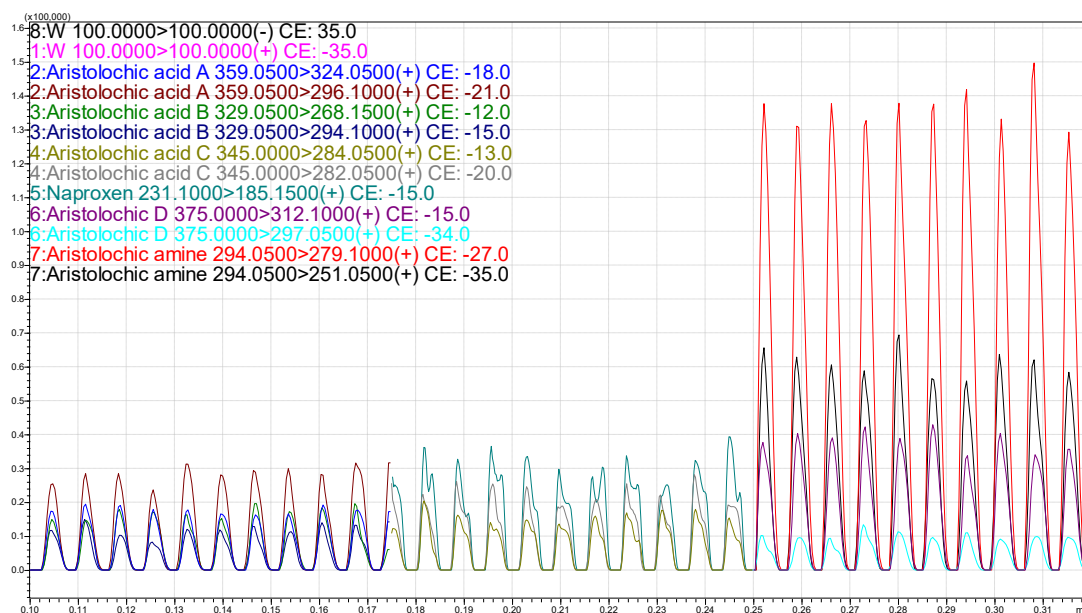


图 1 标准样品的 MRM 色谱图 (10.0 µg/L)

2.2 线性范围

将含有马兜铃酸和马兜铃内酰胺系列浓度的标准品按照 1.3 中的分析条件进行检测, 利用内标法制作校准曲线, 线性良好。四种马兜铃酸和马兜铃内酰胺的回归方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限见表 3。

表 3 马兜铃酸和马兜铃内酰胺标准曲线回归方程、相关系数、线性范围和定量限

化合物名	回归方程	r^2	线性范围 (µg/L)	检出限 (µg/g)	定量限 (µg/g)
马兜铃酸 A	$Y = 0.843484X + 0.0184829$	0.999	0.05-50	0.09	0.27
马兜铃酸 B	$Y = 0.382409X + 0.0029026$	0.999	1.0-50	0.66	1.99
马兜铃酸 C	$Y = 0.833272X - 0.0366437$	0.999	0.05-50	0.06	0.19
马兜铃酸 D	$Y = 1.33628X - 0.0340039$	0.999	0.05-50	0.14	0.41
马兜铃内酰胺 I	$Y = 4.28566X - 0.0844784$	0.999	0.05-50	0.04	0.13

2.3 精密度

对低、中、高三个浓度的马兜铃酸和马兜铃内酰胺平行测定 6 次, 计算均值和标准偏差, 考察仪器的精密度, 结果表明除了 0.20µg/L 的马兜铃酸 C 和马兜铃酸 D 外, 所有化合物的精密度均低于 11.5%。

表 4 标准样品检测及重复性结果

化合物名	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	6 次平行测量						均值 ($\mu\text{g/L}$)	RSD%
		1	2	3	4	5	6		
马兜铃酸 A	0.20	0.23	0.28	0.22	0.25	0.29	0.26	0.25	11.5%
	10.0	9.92	9.67	8.84	9.24	9.36	9.22	9.37	4.02%
	50.0	49.4	48.9	43.6	48.0	51.3	50.9	48.68	5.68%
马兜铃酸 B	1.0	1.46	1.35	1.19	1.32	1.35	1.38	1.34	6.59%
	10.0	8.23	9.83	7.80	8.61	9.46	9.43	8.89	9.01%
	50.0	50.7	50.5	44.3	50.0	52.6	51.5	49.95	5.81%
马兜铃酸 C	0.20	0.20	0.17	0.21	0.13	0.27	0.15	0.19	26.6%
	10.0	7.37	8.53	6.98	7.22	8.01	7.98	7.68	7.64%
	50.0	47.9	50.5	43.6	49.1	51.8	46.6	48.25	6.07%
马兜铃酸 D	0.20	0.12	0.16	0.24	0.21	0.17	0.14	0.17	26.7%
	10.0	7.58	8.34	7.35	8.28	8.44	8.83	8.14	6.87%
	50.0	49.3	50.5	45.6	50.0	53.0	45.3	48.94	6.10%
马兜铃内酰胺	0.20	0.20	0.21	0.17	0.18	0.21	0.21	0.20	8.39%
	10.0	8.20	8.90	7.70	8.42	9.07	8.92	8.54	6.19%
	50.0	48.4	46.7	45.2	47.8	49.7	46.1	47.32	3.47%

2.4 加标回收率

制备天仙藤和细辛提取液，将提取液稀释后加标，对实际样品用低浓度 $1\mu\text{g/L}$ 和高浓度 $20\mu\text{g/L}$ 标准品进行加标，平行测定 4 次。对于天仙藤和细辛，低浓度加标样品 ($1.0\mu\text{g/L}$) 的回收率在 85.5%-146% 之间，高浓度样品 ($20.0\mu\text{g/L}$) 的加标回收率在 60.1%-151% 之间，回收率良好。

没有对天仙藤中马兜铃酸 D 和细辛中马兜铃酸 D 和马兜铃内酰胺 $1\mu\text{g/L}$ 加标回收率进行分析，这是因为细辛和天仙藤中上述化合物浓度较高。同时，对于天仙藤来说，马兜铃内酰胺的回收率在 60% 左右，这可能是因为萘普生含有羧基基团，而马兜铃内酰胺为酰胺结构，结构差异较大，导致内标不能准确地反映基质效应。

表 5 马兜铃酸类化合物在天仙藤和细辛中的加标回收率

加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	中药名	化合物名	平行 4 次加标回收率			
			1	2	3	4
1	天仙藤	马兜铃酸 A	129%	125%	108%	95.4%
		马兜铃酸 B	109%	134%	85.7%	120%
		马兜铃酸 C	113%	115%	106%	105%
		马兜铃酸 D*	—	—	—	—
		马兜铃内酰胺	112%	101%	85.5%	101%
1	细辛	马兜铃酸 A	134%	140%	119%	120%
		马兜铃酸 B	132%	119%	146%	133%
		马兜铃酸 C	93.6%	101%	93.5%	101%
		马兜铃酸 D*	—	—	—	—
		马兜铃内酰胺 *	—	—	—	—

20	天仙藤	马兜铃酸 A	74.0%	87.4%	71.0%	79.8%
		马兜铃酸 B	86.5%	78.5%	91.9%	74.6%
		马兜铃酸 C	85.0%	88.1%	80.4%	81.6%
		马兜铃酸 D	118%	151%	127%	119%
		马兜铃内酰胺	65.4%	60.1%	65.6%	60.5%
20	细辛	马兜铃酸 A	94.1%	97.7%	106%	110%
		马兜铃酸 B	97.3%	93.5%	96.7%	104%
		马兜铃酸 C	97.8%	101%	94.4%	104%
		马兜铃酸 D	104%	100%	105%	102%
		马兜铃内酰胺	86.0%	72.5%	87.9%	99.0%

注：* 未测定。

2.5 实际样品测试

对天仙藤样品和细辛实际样品中的马兜铃酸类物质的浓度进行测定，四次平行测定的相对标准偏差在 10.3% 以下。可以发现本次测试的实际样品中，天仙藤中马兜铃酸 D 的含量较高，而细辛中马兜铃酸 D 和马兜铃内酰胺的含量较高。

表 6 天仙藤和细辛中马兜铃酸类物质的含量

中药名	化合物名	四次平行测定				均值	RSD%
		1	2	3	4		
天仙藤	马兜铃酸 A	11.3	11.5	11.7	11.8	11.6	2.0%
	马兜铃酸 B	8.07	7.13	8.82	8.66	8.17	9.4%
	马兜铃酸 C	7.33	7.21	8.60	6.83	7.49	10.3%
	马兜铃酸 D	89.6	89.1	96.5	86.3	90.4	4.8%
	马兜铃内酰胺	6.09	5.93	5.66	5.55	5.89	4.2%
细辛	马兜铃酸 A	6.33	6.36	6.48	5.89	6.39	4.0%
	马兜铃酸 B	6.58	5.68	6.79	7.08	6.35	9.5%
	马兜铃酸 C	1.55	1.51	1.63	1.52	1.55	3.4%
	马兜铃酸 D	35.7	36.0	35.6	38.9	36.5	4.3%
	马兜铃内酰胺	80.5	78.7	85.4	83.4	82.0	3.7%

结论

本文基于探针电喷雾离子源 (Probe electrospray ionization, PESI), 与三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用, 建立了天仙藤和细辛中马兜铃酸类化合物的定量和快速筛查分析方法。本方法具有不需要复杂的前处理, 分析速度快 (20s), 不需要流动相, 不需要雾化气和脱溶剂气等特点。同时, 精密度和加标回收率在允许范围内, 分析准确度高, 适合中草药中马兜铃酸类物质的快速筛查与定量分析。