

LCMS-8045 测定九味羌活颗粒中的马兜铃酸 I

LCMSMS-530

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 测定九味羌活颗粒中的马兜铃酸 I 的方法。九味羌活颗粒经处理后，用超高效液相色谱分离，三重四极杆质谱仪进行定性定量分析。结果显示在本系统条件下，空白溶剂对马兜铃酸 I 检测无干扰；马兜铃酸 I 在 0.5~100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，标准曲线相关系数 ≥ 0.999 ；对 5 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次，保留时间 RSD $<0.204\%$ ，峰面积的 RSD $<2.49\%$ ，仪器精密度良好；低、中、高加标量的样品的回收率在 102.9%-108.8% 之间，相对标准偏差 $< 1.81\%$ ，方法准确度良好。该方法可为相关从业人员提供参考。

关键词： 三重四极杆液相色谱质谱联用仪 九味羌活颗粒 有机酸

马兜铃酸主要存在于马兜铃科马兜铃属 *Aristolochia* 和细辛属 *Asarum* 植物中，具有抗感染、抗癌、镇痛等药理作用，临床上被用于多系统多种疾病的治疗。同时，马兜铃酸也是一种具有致癌性和肾毒性的硝基菲类有机酸，其中以马兜铃酸 I 的毒性最强。于此，我国自《中国药典》2005 年版也取消了青木香、广防己和关木通的药用标准，加大了该类中药和中成药的监管力度。《中国药典》2010 年版进一步规定，采用 HPLC 法检测细辛中的马兜铃酸 I 含量不得超过 0.001%。另外，2020 年 7 月 10 日国家药典委员会

根据国家药监局关于“含马兜铃酸药品标准修订工作方案”，立项开展了 4 个含马兜铃酸（细辛属）中成药标准的研究工作，并发布了“国家药典委员会 2020 年度国家药品标准提高中药补充课题的公示”。

本文利用使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20ADXR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统对其中河北省药品医疗器械检验研究院负责开展的“九味羌活颗粒中马兜铃酸 I 的限量检查”的项目中的方法耐用性部分完成验证。可为采用 LC-MS/MS 方法检测九味羌活颗粒中的马兜铃酸 I 的检测人员提供很好的参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20ADXR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-20ADXR×2

自动进样器：SIL-30ACMP

柱温箱：CTO-20AC

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.9 μm ; P/N: 227-30048-02, 岛津（上海）实验器材有限公司)

流动相：A 相 - 乙腈，B 相 - 0.1% 甲酸水

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样体积：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 60%，时间程序见表 1。

表 1 洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	泵	B.Conc	40
6.01	泵	B.Conc	60
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI+

碰撞气: 氦气

雾化气: 氮气 3.0 L/min

接口温度: 300°C

干燥气: 空气 10.0 L/min

DL 温度: 200°C

加热气: 氮气 10.0 L/min

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM), MRM 参数见表 2。

表 2 MRM 参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
马兜铃酸 I	313-67-7	359.05	298.10*	-10.0	-13.0	-14.0
			296.00	-13.0	-16.0	-30.0

* 表示定量离子

1.3 样品前处理

取本品, 研细, 取细粉约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 ml, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 分钟, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 经 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

1.4 标准曲线制备

取马兜铃酸 I 对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇溶解并制成每 1 mL 含 25 μg 的溶液, 作为标准储备液。精密量取标准储备液适量, 加 70% 甲醇稀释制成每 1 mL 各含 0.5、1、2、5、8、20、50、100 ng 的溶液作为标准工作液。

1.5 结果判定

以 m/z 359.0 → 298.1 和 m/z 359.0 → 296.1 提取离子流, 供试品色谱中, 应不得同时出现与对照品色谱保留时间一致的色谱峰; 若同时出现, 则供试品中 m/z 359.0 → 298.0 的色谱峰面积值不得大于对照品溶液相应的峰面积值。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品定量定性通道 MRM 色谱图

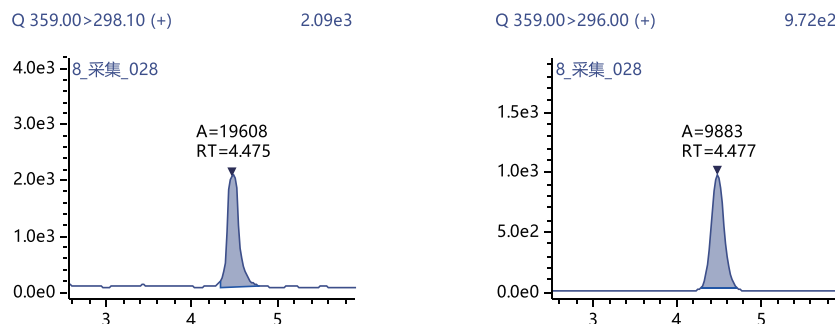


图 1 8 ng/mL 标准样品 MRM 色谱图 (左图为定量离子)

2.2 专属性实验

对空白溶剂进行分析，目标峰保留时间处，无干扰，如图 2 所示。

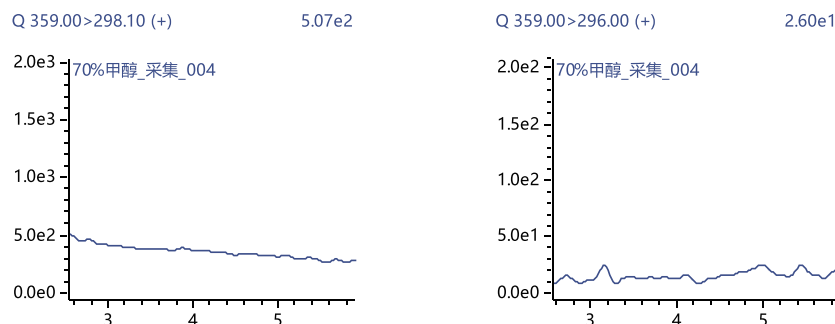


图 2 空白溶剂色谱图（左图为定量离子）

2.3 线性范围

将浓度为 0.5、1、2、5、8、20、50、100 ng/mL 标准工作液，按 1.2 中的分析条件上机分析，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法建立校准曲线，结果如图 3 所示，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

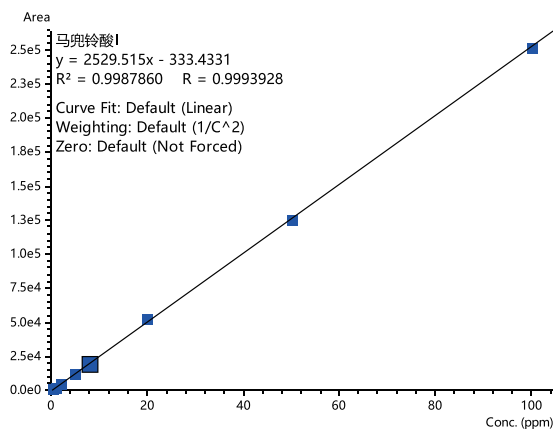


图 3 校准曲线

表 3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度 (%)
马兜铃酸 I	$Y = (2529.51)X + (-333.433)$	0.5~100	0.9994	95.1-104.1

2.4 精密度实验

对浓度为 5 ng/mL 的标准溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，结果如表 4 所示，保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.204% 和 2.49%，仪器精密度良好。

表 4 精密度测试结果

项目	保留时间 (min)	峰面积
1	4.482	12873
2	4.479	12881
3	4.473	13079
4	4.499	12697
5	4.477	12393
6	4.482	12256
RSD(%)	0.204	2.49

2.5 加标回收率实验

取九味羌活颗粒，分别加入 25 ng、200 ng、1250 ng 的标品（每个浓度重复三次），按照 1.3 中方法制备，通过计算测得量与加入量的比值，计算回收率，回收率数据见下表 5，不同浓度下有机酸类化合物的加标回收率范围均在 102.9%-108.8% 之间，相对标准偏差 < 1.81%，方法准确可靠。

表 5 加标回收率考察

序号	加标量 (ng)	实测值 (ng)	回收率 (%)	平均回收率	RSD(%)
1	25.00	27.475	109.9	108.8	1.81
2	25.00	26.625	106.5		
3	25.00	27.500	110.0		
4	200.00	213.425	106.7	105.6	1.45
5	200.00	207.725	103.9		
6	200.00	212.550	106.3		
7	1250.00	1282.625	102.6	102.9	0.23
8	1250.00	1287.375	103.0		
9	1250.00	1287.850	103.0		

2.6 实际样品测定

取供试品溶液按 1.2 中的分析条件上机分析，以 m/z 359.0 → 298.1 和 m/z 359.0 → 296.1 提取离子流，供试品色谱图中，未同时出现与对照品色谱保留时间一致的色谱峰，因此样品中未检出马兜铃酸 I，供试品的 MRM 色谱图如图 4 所示。

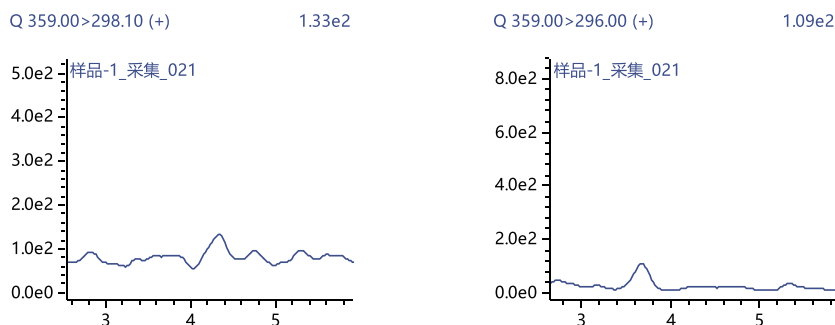


图 4 供试品色谱图（左图为定量离子）

■ 结论

2020 年 7 月 10 日国家药典委员会根据国家药监局关于“含马兜铃酸药品标准修订工作方案”，立项开展了 4 个含马兜铃酸（细辛属）中成药标准的研究工作，并发布了“国家药典委员会 2020 年度国家药品标准提高中药补充课题的公示”。本文利用使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20ADXR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统对其中河北省药品医疗器械检验研究院负责开展的“九味羌活颗粒中马兜铃酸 I 的限量检查”的项目中的方法耐用性部分完成验证。可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

