LC-MS/MS 检测清肺止咳丸中马兜铃酸 I

LCMSMS-803

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定清肺止咳丸中的马兜铃酸 I 的方法。马兜铃酸 I 在 0.4 ~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.999 以上，在定量限浓度和高浓度下的化合物保留时间相对标准偏差分别为 0.12% 和 0.23%，峰面积相对标准偏差分别为 4.98% 和 5.80%，仪器精密度良好。加标浓度为 0.4 ng/mL 和 1 ng/mL 的加标回收率在 85%~115% 范围内。该方法灵敏度高，精密度良好，准确度高，分析时间短，可为相关从业人员提供参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪　清肺止咳丸　马兜铃酸 I

技术特点：

- ❖ 本方法检测马兜铃酸 I 的灵敏度高、分析时间短。
- ❖ 本方法前处理过程便捷，准确度良好。

马兜铃酸是一类具有硝基菲结构母核的一类天然产物，主要存在于马兜铃科马兜铃属和细辛属植物中。从马兜铃科植物中提取出来的马兜铃酸大部分都含有马兜铃酸 I, 其具有极强的肾毒性、致突变和致癌作用，随着人们对马兜铃酸 I 危害性的深入了解和广泛关注，使得部分中草药和中成药在国外遭到禁用，阻碍了中药国际化进程的发展。

清肺止咳丸具有清热止咳，利肺化痰等功效，用于扩散热，陈旧热，波动热引起的肺炎，肺脓肿，感冒咳嗽，胸部疼痛等治疗。本品由诃子 (去核)、毛诃子 (去核)、余甘子 (去核)、藏木香、木香、木香马兜铃、天竺黄、紫草茸、藏茜草、紫草、高山辣根菜、翼首草、力嘎都等 13 味中药制成。其中木香马兜铃为马兜铃属药材，在药品生产过程中可能引入不同程度的马兜铃酸 I ，故而严禁超剂量、长时间服用。

多年来，我国高度重视中草药和中成药中马兜铃酸的安全性问题，重点围绕标准修订、安全提醒、建议限制等方面开展了一系列风险控制措施。因此，建立一种分析检测马兜铃酸 I 的方法，对于药品安全监测有很大意义。

为了更好的控制马兜铃科药材及其制剂中马兜铃酸 I 的含量，本文参考以往的文献，通过使用岛津高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪，建立了清肺止咳丸中马兜铃酸 I 的检查方法。该方法具专属性好、灵敏度高、操作简便，可适用于多数中药材及其制剂中马兜铃酸含量的测定。

■ 实验部分

1.1 仪器

输液泵：LC-20AD$_{XR}$
脱气机：DGU-20A$_{5R}$
自动进样器：SIL-30AC
柱温箱：CTO-20AC
系统控制器：CBM-20A
检测器：LCMS-8045
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.114

1.2 分析条件

液相色谱条件

输液泵：Shim-pack Velox C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.8 µm)
流动相：A 相 -1 mmol/L 乙酸铵 0.1 % 甲酸水溶液　B 相 - 乙腈
流速：0.3 mL/min
进样体积：1 µL
柱温：40°C
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1　时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
8.00	Pumps	Pump B Conc.	80
12.00	Pumps	Pump B Conc.	80
12.10	Pumps	Pump B Conc.	20
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI（+）
离子源接口电压：+ 4 kV
雾化气：氮气 3.0 L/min
干燥气：氮气 10 L/min
加热气：空气 10 L/min
碰撞气：氩气
脱溶剂管温度：150°C
加热模块温度：400°C
接口温度：300°C
扫描模式：MRM
驻留时间：100 ms
MRM 参数：见表 2

表 2　MRM 优化参数

中文名	CAS 号	监测离子对	Q1 Pre（V）	CE	Q3 Pre（V）
马兜铃酸I	313-67-7	359.05>298.15*	-13	-12	-21
		359.05>296.05	-13	-15	-21

注：* 表示定量离子

样品前处理

取清肺止咳丸适量，研细，取约 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 500 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，离心，滤过，取续滤液，即得。

结果与讨论

3.1 灵敏度与专属性

用 70% 甲醇溶液配制定量限浓度（0.4 ng/mL）的马兜铃酸 I 标准溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定，以 20 倍半峰宽噪音算法计算信噪比，得到 0.4 ng/mL 马兜铃酸 I 的信噪比为 36.47，满足中国药典要求；取市售清肺止咳丸样品，按照 2.0 中样品前处理方法和 1.2 中的分析条件进行测定，得到马兜铃酸 I MRM 色谱图，马兜铃酸 I 有检出，目标化合物保留时间附近无基质干扰峰影响，方法专属性良好。

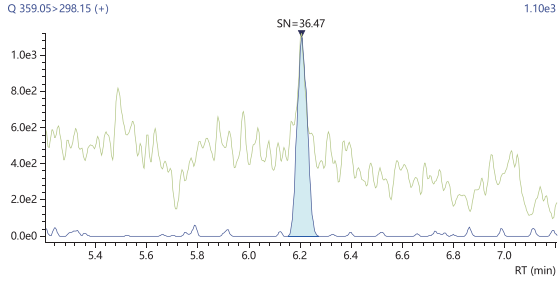


图 1　马兜铃酸 I MRM 色谱图
（0.4 ng/mL）

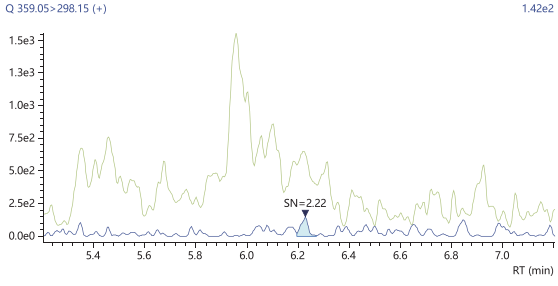


图 2　清肺止咳丸样品中马兜铃酸 I MRM 色谱图
（< 0.4 ng/mL）

3.2 线性范围

用 70% 溶液配制 0.4、1、2、4、10、20 ng/mL 六个浓度的马兜铃酸 I 标准溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定，采用外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，相关系数 r 为 0.9997332 其校准曲线如图 3 所示。

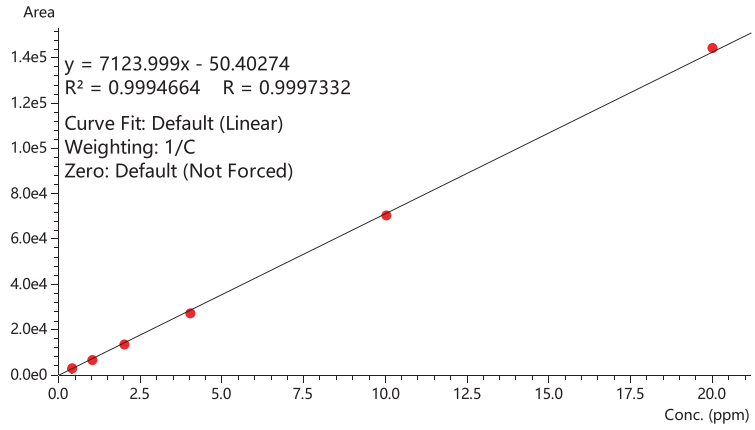


图 3 马兜铃酸 I 校准曲线

3.3 精密度实验

将浓度 0.4 ng/mL 和 1 ng/mL 的马兜铃酸 I 标准工作液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，马兜铃酸 I 保留时间 RSD ≤ 0.23%，峰面积 RSD ≤ 5.80%，仪器精密度良好。

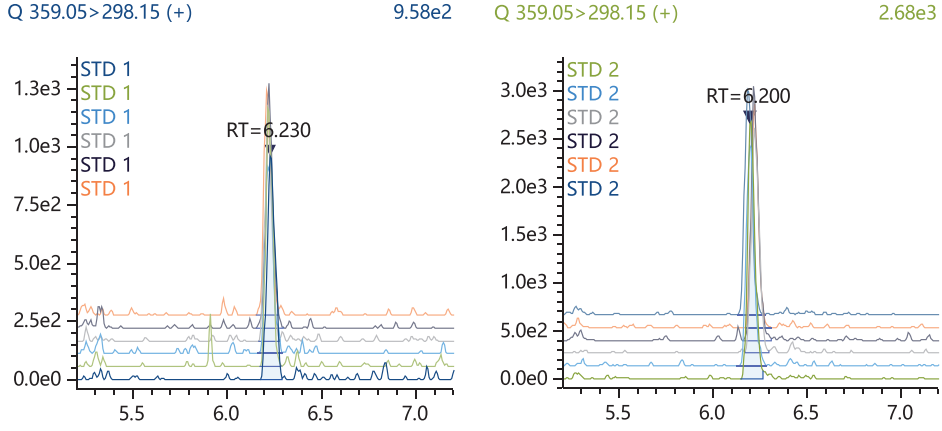


图 4 0.4 ng/mL 和 1 ng/mL 重复性色谱图（n=6）

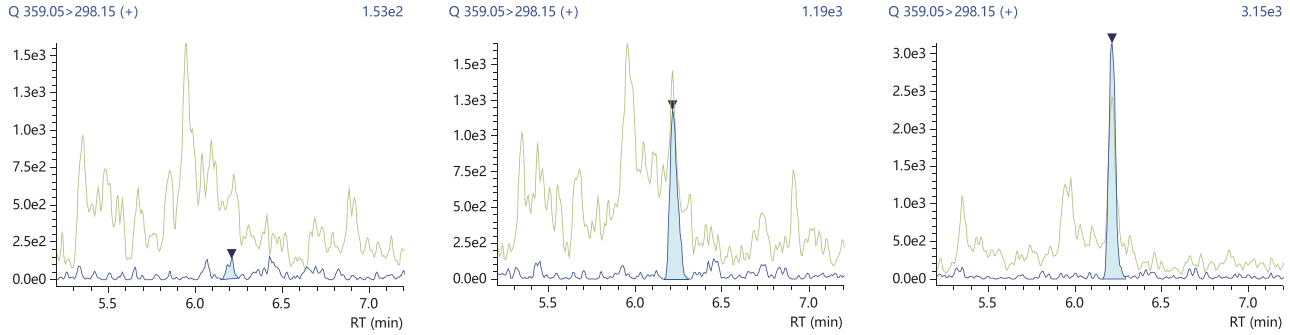
表 3 马兜铃酸 I 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物	RSD%（0.4 ng/mL）		RSD%（1 ng/mL）	
	R.T	Area	R.T	Area
马兜铃酸 I	0.12	4.98	0.23	5.80

3.4 实际样品检测和回收率实验

样本实测：取市售清肺止咳丸样品按本方法测定，马兜铃酸 I 有检测，含量为 1.35 ng/g（0.054 ng/mL）。

准确度考察：在样品中分别添加 10 ng/g（0.4 ng/mL）浓度水平和 25 ng/g（1 ng/mL）浓度水平马兜铃酸 I 进行加标回收实验，回收率分别为 105.4% 和 114.9%。



未加标样本　　样本加标 10 ng/g　　样本加标 25 ng/g

图 5　清肺止咳丸样本实测与加标回收色谱图

结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪，建立了清肺止咳丸中马兜铃酸 I 的检查方法。马兜铃酸 I 在 0.4~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.999 以上。该方法灵敏度高，专属性强，精密度和准确度高，分析时间短，可为相关从业人员提供参考。