

使用 DPiMS™-8060 进行中药中致癌物的快速筛查和定量分析

为了防止造成损害，建立对人体健康可造成重大影响的有害物质的筛查和定量方法是很有必要的。植物所含有害物质通过 LC 和 LC/MS 进行分析时，需要通过色谱柱进行分离和去除杂质。因此，常规分析方法在预处理和分析方面耗费大量的时间，而且会消耗大量的有机溶剂。

探针电喷雾电离法 (PESI) 作为岛津公司提供的超快速筛查平台之一，可以解决上述问题。该方法已被应用于毒品、药品、杀虫剂、生物毒素以及代谢产物的分析。

本次的分析对象马兜铃酸，存在于马兜铃属植物中，包括该植物在内，均被分类为致癌物质。本文为您介绍一种使用 DPiMS-8060 对天仙藤和细辛所含的 4 种马兜铃酸及其代谢产物之一马兜铃内酰胺 I 进行快速筛查和使用内标法（萘普生）定量分析的检测方法。

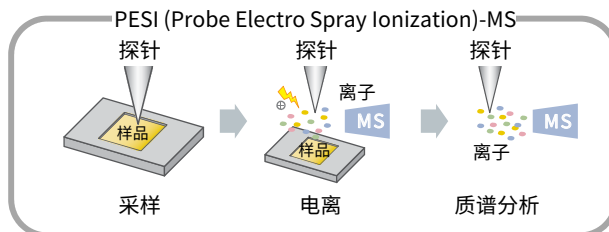
Z.Chen, K.Waki

DPiMS-8060 的特点

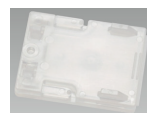
DPiMS-8060 是一种在三重四极杆质谱仪 (LCMS™-8060) 上组合了探针电喷雾电离法 (PESI) 离子源的装置 (图 1)。PESI 离子源可以直接在 LCMS-8045 以上机型的质谱仪上进行安装。PESI 是一种使用探针刺入样品板上的样品，通过对附着在探针表面的样品施加电压形成电离的分析方法，因此不需要使用流动相 (图 2)。另外，预处理简单，不需要使用分离色谱柱，可快速进行分析。



图 1 DPiMS™-8060 的外观



探针



样品板

图 2 使用探针刺入样品板上的样品，通过对附着在探针表面的样品施加电压，使分子电离。

样品制备

为了制备样品而制备了如下两种溶液。

- 甲醇 / 水 (70/30, v/v)
- 乙醇 / 水 (60/40, v/v) : 含 2 mM 甲酸铵、10 ppb 萘普生 (内标)

按照图 3 所示步骤进行样品的制备。按照表 1 和表 2 的条件对目标化合物标准样品溶液 10 μg/L 进行 20 秒左右的超快速分析，结果如图 4 所示。

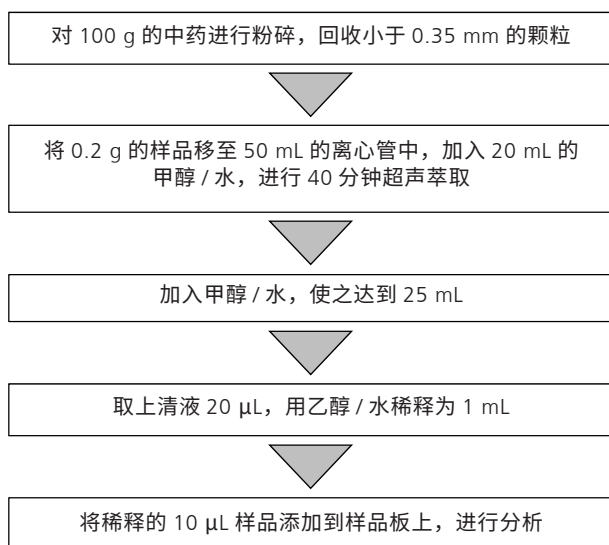


图 3 样品制备工作流程

线性范围

表 3 所示为按照表 1 和表 2 的条件进行分析所得标准曲线的线性结果。标准曲线范围为 0.05 ~ 50 µg/L。各种成分线性相关系数 R² 为 0.999 以上，线性关系良好。

重现性

表 4 所示为重现性的结果、标准品测定值的相对标准偏差 (RSD (%))、n=6)。除了 0.20 µg/L 的马兜铃酸 C 和马兜铃酸 D 外，所有化合物的 RSD 均为 15% 以下。结合 PESI 法的样品测定方法，所得结果重现性在允许范围之内。

表 1 测定条件

取样时间	: 50 msec
取样位置	: - 46.0 mm
离子化时间	: 220 msec
加热块温度	: 30 °C
放电电压	: 2.3 kV (+) / -3.0 kV (-)
探针清洗时间	: 0.05 min (+) / 0.05 min (-)
探针频率	: 2.78 Hz
DL 温度	: 250 °C

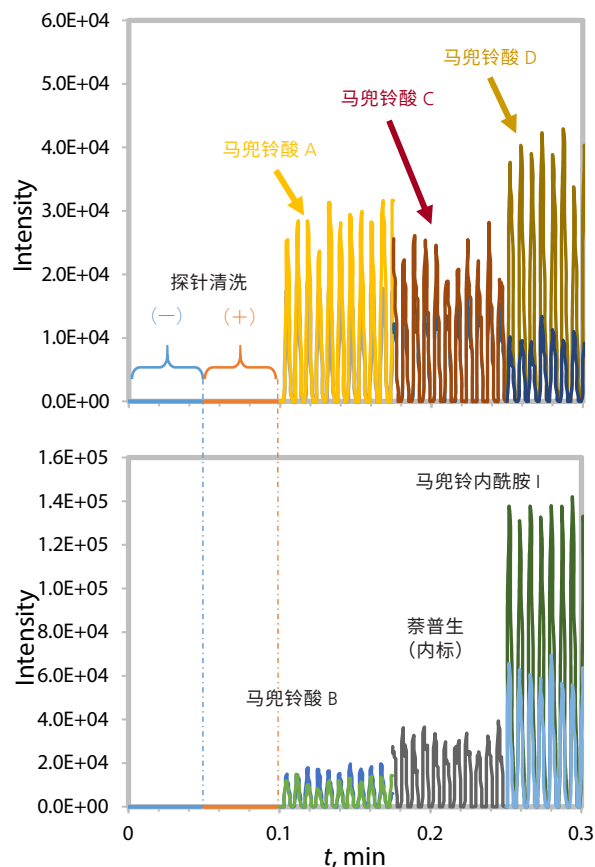


图 4 标准品的 MRM 色谱图

表 2 MRM 分析参数

化合物名称	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
	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
	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
	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
	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
	294.05 > 251.05	-12.0	-35.0	-18.0
萘普生	231.10 > 185.15*	-16.0	-15.0	-24.0
	231.10 > 170.15	-16.0	-26.0	-16.0

* 定量离子

表 3 标准曲线回归方程、线性范围、检测下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)

化合物名称	回归方程	R ²	线性范围 (µg/L)	LOD	LOQ
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

加标回收率

表 5 是天仙藤和细辛提取液中标准品的加标回收率结果 (n=4)。对于天仙藤和细辛, 低浓度加标样品 (1.0 µg/L) 的回收率在 85.5%-146% 之间, 高浓度样品 (20.0 µg/L) 的加标回收率在 60.1%-151% 之间, 回收率良好。

对于天仙藤来说, 马兜铃内酰胺的回收率在 60% 左右, 这可能是由于萘普生含有羧酸基团, 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。

实际样品的测定

使用图 3 的方法, 制备天仙藤和细辛样品。马兜铃酸及其代谢产物的含量测定结果, 如图 5 所示。马兜铃酸 A-D 及马兜铃内酰胺 I 的含量测定结果, 如图 6 所示。从中可知, 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 4 标准样品检测及重现性结果

化合物	浓度 (µg/L)	测量次数						均值 (µg/L)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
马兜铃酸 A	0.2	0.23	0.28	0.22	0.25	0.29	0.26	0.25	11.5%
	10	9.92	9.67	8.84	9.24	9.36	9.22	9.37	4.02%
	50	49.4	48.9	43.6	48	51.3	50.9	48.7	5.68%
马兜铃酸 B	1	1.46	1.35	1.19	1.32	1.35	1.38	1.34	6.59%
	10	8.23	9.83	7.8	8.61	9.46	9.43	8.89	9.01%
	50	50.7	50.5	44.3	50	52.6	51.5	50.0	5.81%
马兜铃酸 C	0.2	0.2	0.17	0.21	0.13	0.27	0.15	0.19	26.6%
	10	7.37	8.53	6.98	7.22	8.01	7.98	7.68	7.64%
	50	47.9	50.5	43.6	49.1	51.8	46.6	48.2	6.07%
马兜铃酸 D	0.2	0.12	0.16	0.24	0.21	0.17	0.14	0.17	26.7%
	10	7.58	8.34	7.35	8.28	8.44	8.83	8.14	6.87%
	50	49.3	50.5	45.6	50	53	45.3	48.9	6.10%
马兜铃内酰胺 I	0.2	0.2	0.21	0.17	0.18	0.21	0.21	0.2	8.39%
	10	8.2	8.9	7.7	8.42	9.07	8.92	8.54	6.19%
	50	48.4	46.7	45.2	47.8	49.7	46.1	47.3	3.47%

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 (µg/L)	中药名	化合物	加标回收率 (%)			
			1	2	3	4
1.0	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 I	112	101	85.5	101
1.0	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 I	—	—	—	—
20.0	天仙藤	马兜铃酸 A	74	87.4	71	79.8
		马兜铃酸 B	86.5	78.5	91.9	74.6
		马兜铃酸 C	85	88.1	80.4	81.6
		马兜铃酸 D*	118	151	127	119
		马兜铃内酰胺 I	65.4	60.1	65.6	60.5
20.0	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 I	86.0	72.5	87.9	99.0

* 未测定

总结

通过采用本方法，可以通过简单的预处理和每个样品 20 秒左右的时间，就可以得出中药中的马兜铃酸及其代谢产物马兜铃内酰胺 I 的含量。使用内标的测量方法还可以应用于其他物质。此外，PESI 的电离原理是 ESI，因此，可被 LC/MS 的 ESI 电离的物质，也可能适用于使用 PESI 进行测定。同时，还可以与本公司生产的三重四极杆 LCMS 系列质谱仪（LCMS-8045 以上机型）进行离子源切换。因此，如本应用所示，可以在 LCMS-8060 和 DPiMS 之间进行数据比较，也可以自定义通过本公司生产的 LCMS 创建的分析方法，使用 DPiMS 进行分析。

综上所述，在需要对有害物质进行快速筛选、定量的情况下，DPiMS 分析有望成为一种值得期待的分析方法。

表 6 天仙藤和细辛中的目标化合物含量 (n=4)

中药名	化合物	平均面积比 (μg/g)	RSD (%)
天仙藤	马兜铃酸 A	11.6	2.0%
	马兜铃酸 B	8.17	9.4%
	马兜铃酸 C	7.49	10.3%
	马兜铃酸 D	90.4	4.8%
	马兜铃内酰胺 I	5.89	4.2%
细辛	马兜铃酸 A	6.39	4.0%
	马兜铃酸 B	6.35	9.5%
	马兜铃酸 C	1.55	3.4%
	马兜铃酸 D	36.5	4.3%
	马兜铃内酰胺 I	82.0	3.7%

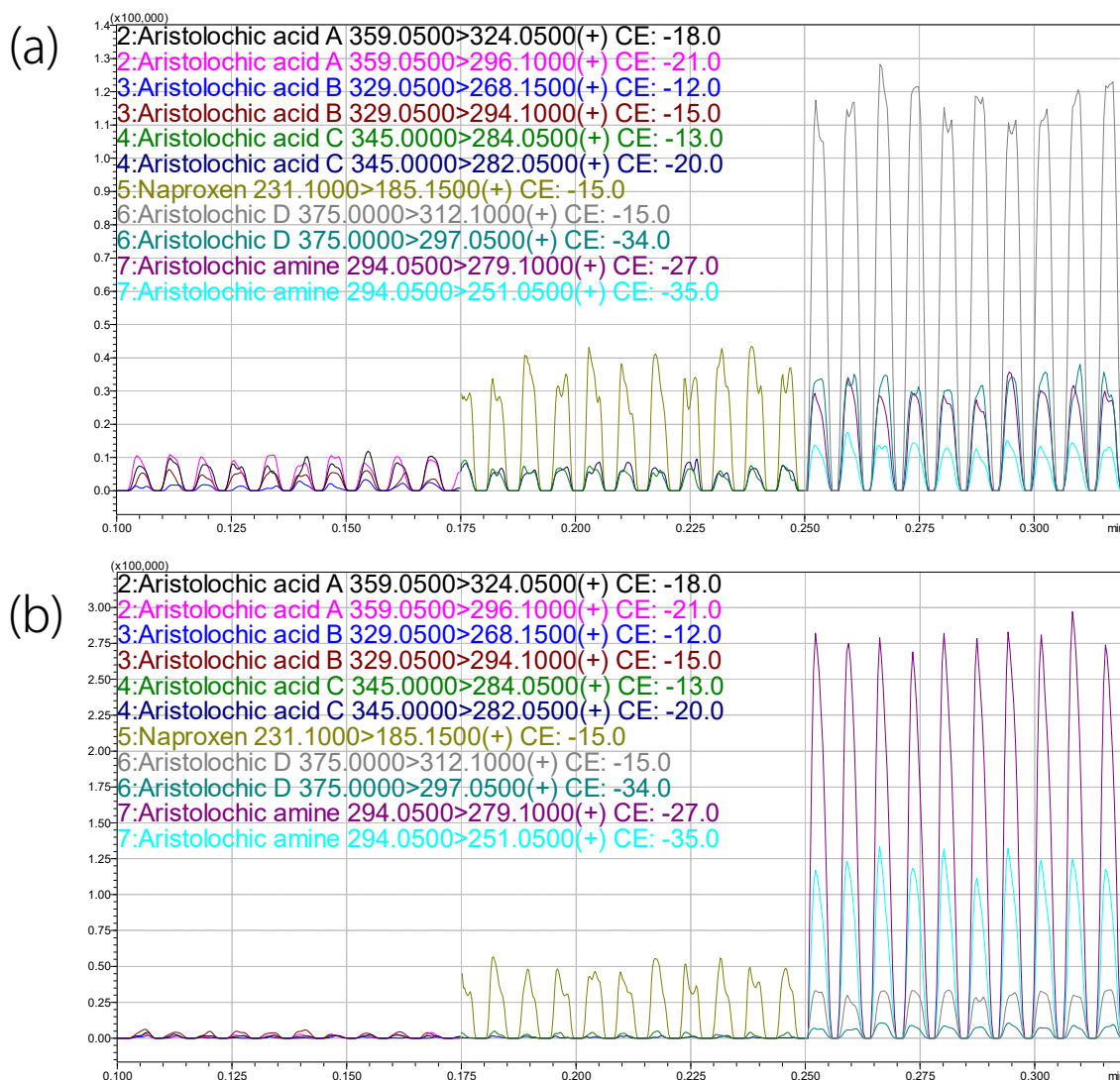


图 5 测定实际样品时的 MRM 数据
(a): A. 细辛、(b): 天仙藤

岛津应用云



本文中记载的产品不作为《药品和医疗器械法》批准或认证的医疗器械。
本文中记载的分析手法不可用于诊断目的。
DPiMS 及 LCMS 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020 年 3 月