

LCMS-8050 测定辛芩颗粒制剂中 4 种马兜铃酸

LCMSMS-521

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪 (LCMS-8050) 开发了辛芩颗粒制剂中 4 种马兜铃酸的检测方法。实验结果表明, 在 0.05-100 ng/mL 浓度范围内, 方法线性良好, 线性相关系数在 0.9995-0.9999 之间。曲线各标点准确度在 90.8-111.6% 之间。1 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.04-0.06% 和 1.5-2.8% 之间, 方法精密度良好。0.025 mg/kg、0.5 mg/kg 和 2.5 mg/kg 三个不同浓度加标回收率在 90.7-103.4% 之间, 平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.5-4.3% 之间。该方法简单、方便、准确, 适用于辛芩颗粒制剂中马兜铃酸的检测。

关键词： LCMS-8050 辛芩颗粒制剂 马兜铃酸

马兜铃酸类化合物 (aristolochic acids, AA) 是马兜铃科马兜铃属植物特有的一类硝基菲类化合物, 包括马兜铃酸 A、B、C、D 等, 其中马兜铃酸 A 为主要毒性成分。近几年, 临床不断出现含马兜铃酸类成分的药品引起肾脏损害的病例, 国内外期刊也相继发表了含马兜铃酸药品使用安全性的评论。美国食品药品监督管理局 (FDA) 在 2000 年 5 月禁止了包括关木通、马兜铃、青木香、天仙藤、广防己、木防己等同名异物、异名同物品种的相关草药和中成药的进口和销售。我

国也采取了一系列风险防控措施, 其中包括取消关木通、广防己和青木香的药用标准, 并分别用木通、防己和土木香替代使用等。

细辛属马兜铃科植物, 由于辛芩制剂中含有该药材, 因此很有必要对辛芩制剂中马兜铃酸类化合物含量进行监测, 为国家药品质量标准的提高提供依据。本文采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050, 建立了辛芩颗粒制剂中 4 种马兜铃酸的分析方法, 供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统, 具体配置为:

系统控制器: CBM-20A

脱气机: DGU-20A_{5R}

输液泵: LC-30AD×2

自动进样器: SIL-30ACMP

柱温箱: CTO-30A

色谱工作站: LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack Velox C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm, P/N:227-32009-03, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相: A 相 -(0.1% 甲酸, 1 mmol/L 乙酸铵) 水; B 相 - 甲醇

流速: 0.3 mL/min

柱温: 30 °C

进样器温度: 15 °C

进样量: 2 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 50%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	70
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.10	Pumps	Pump B Conc.	50
11.00	Controller	Stop	

LCMS-8050 质谱条件：

离子源：ESI，正离子模式

加热模块温度：400 °C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：300 °C

干燥气：氮气 10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

加热气：空气 10.0 L/min

MRM 参数：见表 2

DL 管温度：200 °C

表 2 MRM 参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	马兜铃酸 A	313-67-7	359.05	298.00*	-26.0	-13.0	-20.0
				296.00	-26.0	-14.0	-30.0
2	马兜铃酸 B	475-80-9	329.05	268.15*	-16.0	-13.0	-18.0
				294.10	-24.0	-13.0	-29.0
3	马兜铃酸 C	4849-90-5	345.00	282.05*	-26.0	-13.0	-13.0
				284.05	-13.0	-13.0	-19.0
4	马兜铃内酰胺	13395-02-3	294.05	279.10*	-11.0	-27.0	-28.0
				251.05	-21.0	-35.0	-26.0

注：* 表示定量离子

1.3 标准品溶液制备

马兜铃酸混合标准储备液：精密称取 4 种马兜铃酸标准品各 10 mg，用甲醇定容至 100 mL 容量瓶中，制得 100 µg/mL 标准储备液。

马兜铃酸混合标准系列工作溶液：从上述储备液中移取适量，用空白基质配制成 0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 标准系列工作溶液。

1.4 样品前处理

准确称取 1 g 试样至 50 mL 离心管中，加入 70% 甲醇 25 mL，涡旋混匀 2 分钟，超声处理 30 min，取出，放冷，以 10000 转 / 分的速率离心 10 分钟，将上清液过 0.22 µm 滤膜过滤，取滤液上机。

■ 结果与讨论

2.1 标准品溶液色谱图

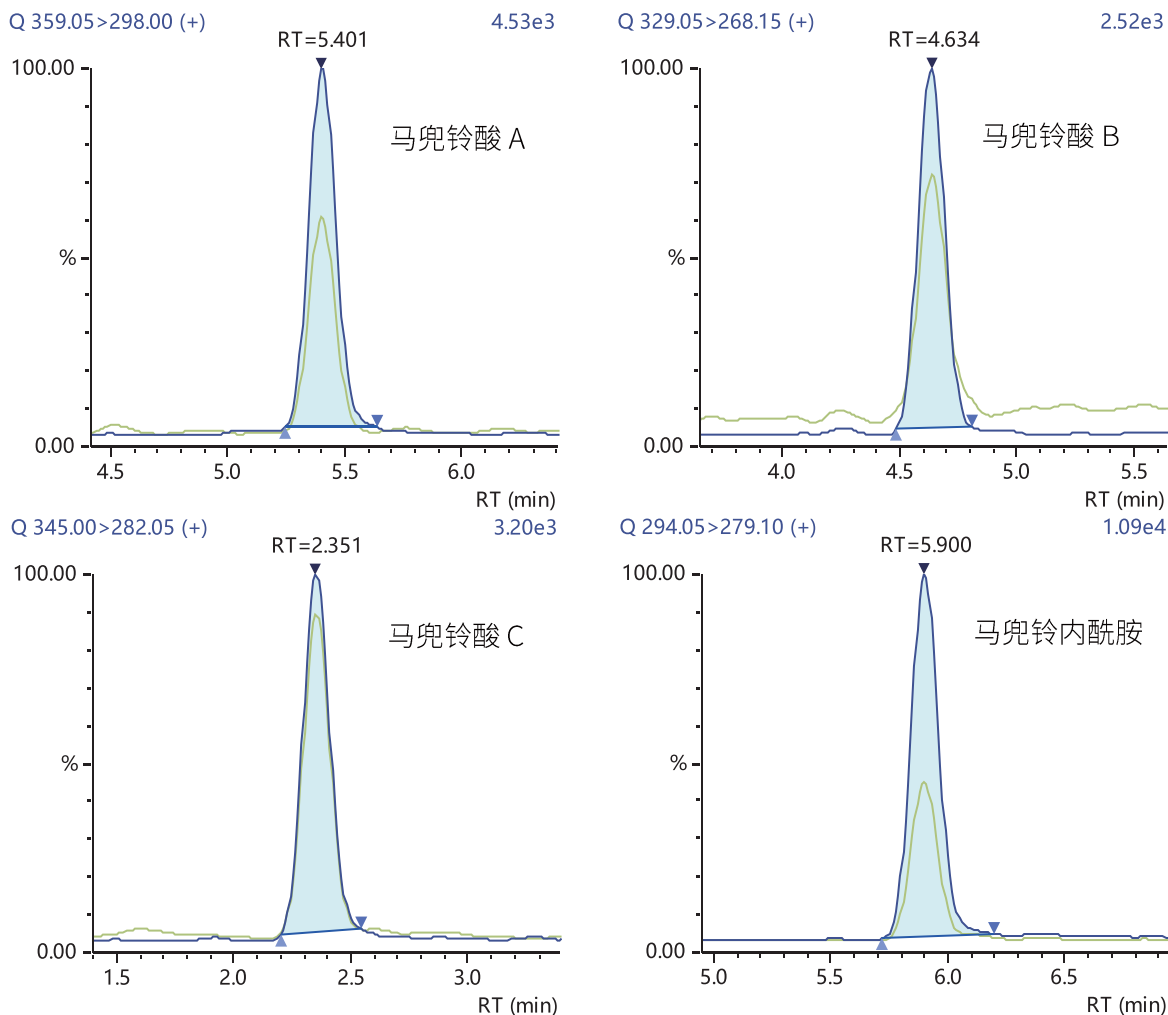
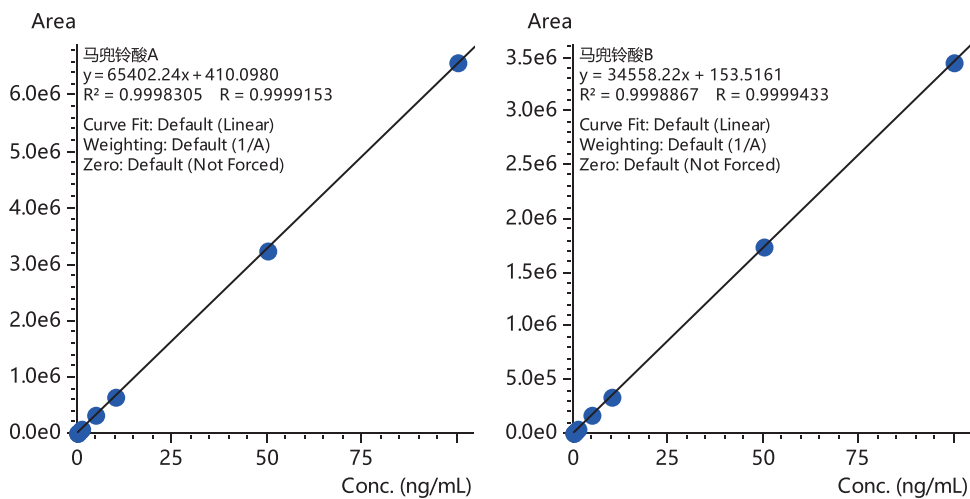


图 1 4种马兜铃酸标准品溶液 (0.5 ng/mL) MRM 色谱图

2.2 线性范围

将 1.3 中制备的 0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 标准系列工作溶液，取 2 μ L 进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，使用外标法拟合工作曲线。标准曲线见图 2。各浓度点线性回归的准确度、判定系数 R^2 等结果见表 3。



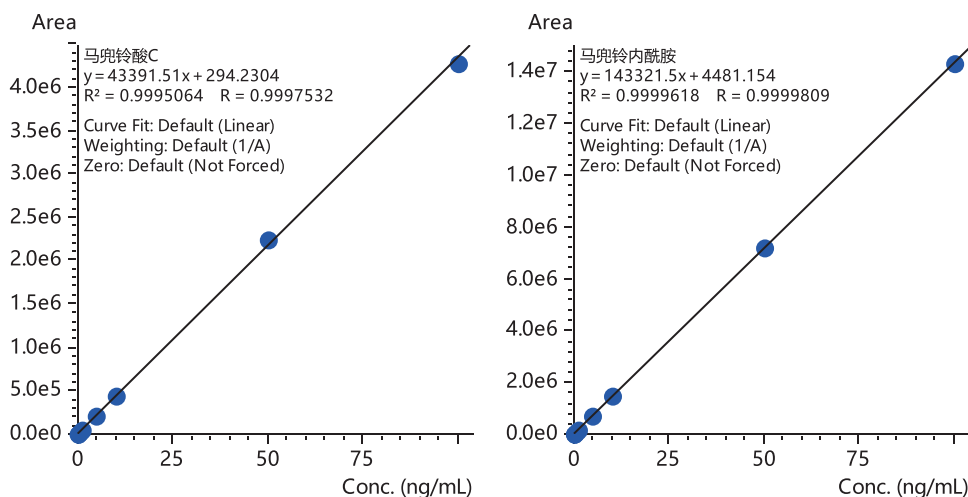


图2 4种马兜铃酸工作曲线

表3 校准曲线信息

化合物	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	判定系数 R ²
马兜铃酸 A	0.05-100	96.3-111.3	0.9998
马兜铃酸 B	0.05-100	93.3-111.6	0.9999
马兜铃酸 C	0.05-100	95.6-108.4	0.9995
马兜铃内酰胺	0.05-100	90.8-111.0	0.9999

2.3 重复性考察

1 ng/mL 浓度对照品溶液，连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 4 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.04-0.06% 和 1.5-2.8% 之间，方法精密度良好。

表4 1 ng/mL 马兜铃酸标准溶液连续 6 针重复性结果

化合物	RSD% (1 ng/L)	
	R.T.	Area
马兜铃酸 A	0.05	1.5
马兜铃酸 B	0.06	2.8
马兜铃酸 C	0.04	2.7
马兜铃内酰胺	0.04	1.9

2.4 加标回收率及重复性考察

按照 1.4 前处理方法，对辛芩颗粒制剂样品进行低、中、高三个浓度水平加标回收率考察。每个浓度平行制备三份样品，进行重复性考察。低、中、高三个加标浓度分别为 0.025 mg/kg、0.5 mg/kg 和 2.5 mg/kg。三水平加标回收率及重复性结果见表 5。

表 5 三浓度水平加标回收率及重复性计算结果 (n=3)

名称	0.025 mg/kg		0.5 mg/kg		2.5 mg/kg	
	回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)
马兜铃酸 A	97.9	1.5	95.1	2.2	94.4	3.5
马兜铃酸 B	93.8	3.4	93.3	3.1	90.7	2.4
马兜铃酸 C	98.0	2.7	94.7	1.9	93.1	3.5
马兜铃内酰胺	97.4	1.8	92.4	2.8	103.4	4.3

■ 结论

本文利用岛津 LCMS-8050 三重四级杆液质联用仪定量测定了辛芩颗粒制剂中 4 种马兜铃酸。实验结果表明，在 0.05-100 ng/mL 浓度范围内，方法线性良好，线性判定系数在 0.9995-0.9999 之间。曲线各标点准确度在 90.8-111.6% 之间。1 ng/mL 标准溶液连续进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.04-0.06% 和 1.5-2.8% 之间，方法精密度良好。0.025 mg/kg、0.5 mg/kg 和 2.5 mg/kg 三个不同浓度加标回收率在 90.7-103.4% 之间，平行三份样品的相对标准偏差 (RSD%) 在 1.5-4.3% 之间。该方法灵敏，准确，稳定性好，回收率高，抗假阳性能力强，适用于辛芩颗粒制剂中 4 种马兜铃酸的检测。

岛津应用云

