

# 马兜铃酸及马兜铃内酰胺的含量测定方法建立

## LCMSMS-323

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用检测中药材及中药制剂中马兜铃酸及马兜铃内酰胺的方法。该方法在 8 min 内完成 4 种马兜铃酸及 1 种马兜铃内酰胺的分离检测，校准曲线相关系数大于 0.995，低中高三个浓度连续进样分析 5 针的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.37% 和 0.7~4.3% 之间；仪器检出限在 1~5 ng/L 之间，定量限在 3~15 ng/L 之间。除此之外，应用本方法对市售含马兜铃酸类中药制剂进行检测，效果理想。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合中药材及中药制剂中马兜铃酸及马兜铃内酰胺的高灵敏度快速检测。

**关键词：**超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 马兜铃酸 马兜铃内酰胺

马兜铃酸类化合物主要存在于马兜铃科马兜铃属 (*Aristolochia*L.) 植物和细辛属 (*Asarum* L.) 植物中，最常见的有马兜铃、关木通、广防己、青木香、天仙藤、细辛等。马兜铃酸类化合物可分为马兜铃酸和马兜铃内酰胺两大类。现代研究表明，马兜铃科植物具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、镇痛等药理作用，但长期服用含该类植物的药物可能造成慢性肾衰竭以及肾小管病变。因此，2015 年版中国药典删除了关木通、广防己及青木香的药材标准，仅收载天仙藤、马兜铃及细辛的药材标准。近期，权威医学期刊《*Science Translation Medicine*》发表马兜铃酸与肝癌相关性的文章，文章对亚洲各地肝癌样本进行基因检测发现，大陆 47%、台湾 78%、东南亚 29% 的肝癌样品都明确显示与马兜铃酸诱导的细胞突变有关，这一报道引起了媒体和大众的广泛关注。

目前，马兜铃酸含量测定方法主要有高效液相色谱 (HPLC) 法、毛细管电泳 (CE) 法、薄层色谱 (TLC) 法、液相色谱 - 质谱联用 (LC-MS/MS) 法等。用 HPLC 法分

析马兜铃酸类药材时，因其紫外吸收波长较低，在含量较低且有杂质干扰时仅依靠 HPLC 的保留时间和特征光谱图定性并不准确。毛细管电泳法灵敏度较低且选择性较差，方法要求大量的样品、试剂及伴随着烦琐的样品制备过程。薄层色谱法的精密度、准确度和灵敏度均较差，实验结果受操作者技能的影响很大。LC-MS/MS 定性准确，分析速度快，已广泛应用于中药化学成分分析、中药质量控制、中药代谢研究以及中药药代动力学研究。但现有文献中，使用 LC-MS/MS 进行马兜铃酸检测的方法多仅针对马兜铃酸 A 及马兜铃酸 B，而针对多种马兜铃酸及马兜铃内酰胺同时进行定性定量的研究未见报道。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了马兜铃中药材、细辛中药材及含马兜铃酸中药制剂中马兜铃酸及马兜铃内酰胺的定性定量分析方法，该方法操作简捷、分析速度快、重复性好、灵敏度高，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-8060 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver.5.82 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST (2.1 mmI.D.×50 mmL, 2.0 μm)

流动相：A 相 - (1 mmol/L 甲酸铵, 0.05% 甲酸) 水,  
B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40℃

进样体积：15 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 55%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	55
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.10	Pumps	Pump B Conc.	55
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: +4.0 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

化合物结构: 见图 1

脱溶剂管温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 250°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 2

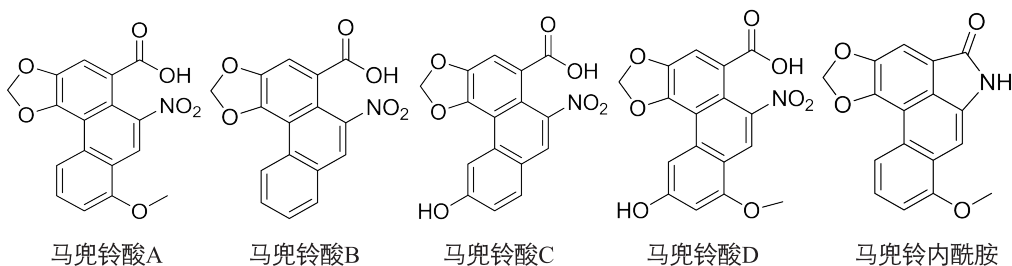


图1 化合物结构式

表2 化合物MRM参数

名称	Mol. Wt.	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
马兜铃酸 A	341.27	313-67-7	359.05	298.00*	-13.0	-13.0	-15.0
				296.00	-13.0	-16.0	-11.0
马兜铃酸 B	311.25	475-80-9	329.05	268.15*	-12.0	-12.0	-10.0
				294.10	-13.0	-15.0	-15.0
马兜铃酸 C	327.25	4849-90-5	345.00	284.05*	-24.0	-13.0	-14.0
				282.05	-26.0	-20.0	-32.0
马兜铃酸 D	357.27	17413-38-6	375.00	312.10*	-14.0	-15.0	-24.0
				297.05	-14.0	-34.0	-22.0
马兜铃内酰胺	293.27	13395-02-3	294.05	279.10*	-12.0	-27.0	-29.0
				251.05	-12.0	-35.0	-18.0

注: \*项为定量离子

### 1.3 样品制备

马兜铃：取马兜铃中药材，万能粉碎机粉碎，过三号筛，精密称取 0.2 g，加 70% 甲醇 20 mL，超声提取 40 min，冷却至室温，用 70% 甲醇定容至 25 mL，精密吸取该溶液 1 mL，用 50% 甲醇稀释并定容至 25 mL，再精密吸取该溶液 1 mL，用 50% 甲醇稀释并定容至 100 mL，过 0.22 μm 滤膜后，上机测定。

细辛：取细辛中药材，万能粉碎机粉碎，过三号筛，精密称取 0.2 g，加 70% 甲醇 20 mL，超声提取 40 min，冷却至室温，用 70% 甲醇定容至 25 mL，精密吸取该溶液 1 mL，用 50% 甲醇稀释并定容至 100 mL，再精密吸取该溶液 1 mL，用 50% 甲醇稀释并定容至 10 mL，过 0.22 μm 滤膜后，上机测定。

含马兜铃酸液体中药制剂：取本品混匀，精密称取 0.2 g，加 70% 甲醇 20 mL，超声提取 40 min，冷却至室温，用 70% 甲醇定容至 25 mL，精密吸取该溶液 1 mL，用 50% 甲醇稀释并定容至 10 mL，再精密吸取该溶液 1 mL，用 50% 甲醇稀释并定容至 100 mL，过 0.22 μm 滤膜后，上机测定。

### 1.4 标准曲线制备

用甲醇配制 1000 μg/L 马兜铃酸 A、马兜铃酸 B、马兜铃酸 C、马兜铃酸 D 及马兜铃内酰胺储备液，用 50% 甲醇水溶液稀释成所需浓度，分别得到 2 ng/L、5 ng/L、10 ng/L、20 ng/L、50 ng/L、200 ng/L、500 ng/L、2000 ng/L、5000 ng/L、20000 ng/L 和 50000 ng/L 的标准溶液，上机测定。

## 结果与讨论

### 2.1 化合物标准溶液的MRM色谱图

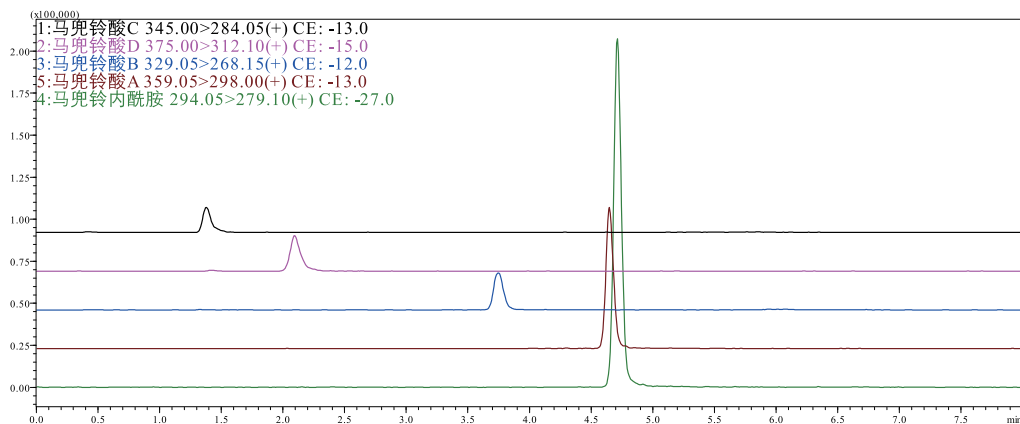


图2 化合物标准溶液的MRM色谱图(500 ng/L)

### 2.2 线性范围

将 1.4 中制备的标准曲线溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

表3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	线性范围 (ng/L)	相关系数 r	准确度 (%)
1	马兜铃酸 A	$Y = (649.181)X + (690.687)$	2~50000	0.9959	87.7~113.9
2	马兜铃酸 B	$Y = (263.457)X + (121.998)$	5~50000	0.9964	90.8~113.4
3	马兜铃酸 C	$Y = (120.182)X + (251.781)$	5~50000	0.9995	93.0~103.1
4	马兜铃酸 D	$Y = (264.015)X + (140.343)$	5~50000	0.9994	92.5~104.0
5	马兜铃内酰胺	$Y = (2066.84)X + (1005.76)$	1~5000	0.9983	93.0~111.3

### 2.3 检出限和定量限

用 50% 甲醇配制低浓度混合对照品溶液，将低浓度混合标准溶液按照 1.2 中的分析条件进行测定，得到 5 种化合物检出限及定量限，检出限及定量结果见表 4，5 种化合物的检出限谱图见图 3。

表4 化合物检出限和定量限

序号	化合物名称	检出限 (ng/L)	定量限 (ng/L)
1	马兜铃酸 A	2	5
2	马兜铃酸 B	5	15
3	马兜铃酸 C	5	15
4	马兜铃酸 D	5	15
5	马兜铃内酰胺	1	3

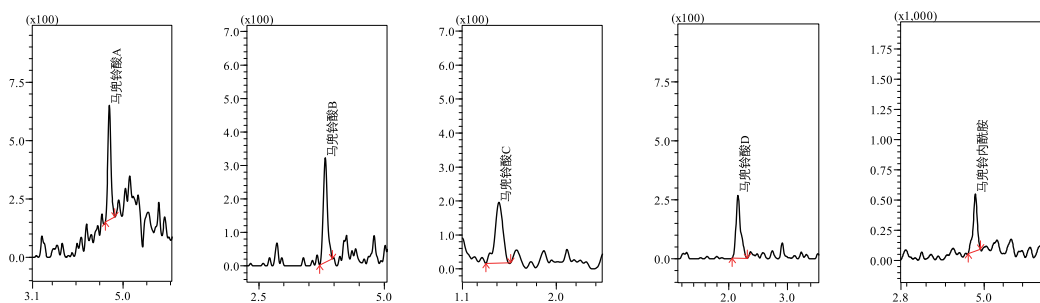


图3 检出限谱图

### 2.4 精密度实验

选择低中高三个浓度的混合标准溶液连续 5 针进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 5 所示。5 种化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.37% 和 0.7~4.3% 之间，仪器精密度良好。

表5 保留时间和峰面积精密度测定结果(RSD)

化合物名称	浓度 1			浓度 2			浓度 3		
	(ng/L)	R.T.	Area	(ng/L)	R.T.	Area	(ng/L)	R.T.	Area
马兜铃酸 A	50	0.07	2.7	500	0.03	1.2	5000	0.06	1.0
马兜铃酸 B	50	0.11	4.3	500	0.06	1.3	5000	0.07	0.7
马兜铃酸 C	50	0.22	2.8	500	0.14	2.3	5000	0.08	1.7
马兜铃酸 D	50	0.37	3.8	500	0.09	3.7	5000	0.12	0.9
马兜铃内酰胺	50	0.07	2.1	500	0.04	1.8	5000	0.06	1.4

### 2.5 回收率考察

精密称取马兜铃中药材、细辛中药材及含马兜铃酸液体制剂适量，加入低中高三种浓度对照品溶液（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 6，马兜铃中药材、细辛中药材及含马兜铃酸液体制剂三个浓度回收率分别在 88.0%~123.0%、94.4%~113.6% 及 98.2%~128.8% 之间，相关系数分别在 0.2%~8.6%、0.8%~7.1% 及 1.1%~7.7% 之间。

表6 加标回收率实验结果

化合物名称	加标浓度 ng/L	马兜铃回收率/RSD	细辛回收率/RSD	含马兜铃酸液体制剂/RSD
马兜铃酸 A	100	未测定*	95.3%/6.0%	102.0%/7.7%
	1000	102.6%/0.2%	94.4%/1.1%	105.2%/3.6%
	10000	110.7%/1.2%	112.6%/1.0%	115.7%/2.1%
马兜铃酸 B	100	91.2%/8.6%	102.4%/7.1%	123.6%/3.3%
	1000	97.4%/1.9%	98.5%/4.8%	116.2%/2.2%
	10000	104.7%/1.2%	109.6%/1.3%	121.3%/2.3%
马兜铃酸 C	100	123.0%/4.7%	102.5%/4.1%	120.8%/7.0%
	1000	103.6%/3.7%	103.0%/1.0%	115.5%/2.5%
	10000	104.5%/0.8%	108.6%/1.1%	117.2%/1.1%
马兜铃酸 D	100	未测定*	未测定*	未测定*
	1000	111.7%/4.3%	111.3%/3.6%	128.8%/2.1%
	10000	109.3%/1.3%	113.6%/0.8%	128.8%/1.6%
马兜铃内酰胺	10	未测定*	未测定*	未测定*
	100	88.0%/1.1%	102.5%/5.7%	98.2%/5.8%
	1000	99.2%/1.4%	105.7%/1.4%	101.6%/2.1%

注：\*项由于样本中含量较高，故未进行低浓度回收率测定

## 2.6 实际中药材测定结果

对马兜铃中药材及细辛中药材按文中方法测定，测定结果见表 7。

表7 中药材中马兜铃酸含量和方法检出限( $\mu\text{g/g}$ )

名称	马兜铃酸 A		马兜铃酸 B		马兜铃酸 C		马兜铃酸 D		马兜铃内酰胺	
	含量	检出限	含量	检出限	含量	检出限	含量	检出限	含量	检出限
马兜铃	274.8	0.6	13.2	1.6	182.4	1.6	548.2	1.6	66.7	0.3
细辛	8.3	0.3	N.D.	0.6	N.D.	0.6	102.2	0.6	36.5	0.1

## 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，建立了中药材及中药制剂中马兜铃酸及马兜铃内酰胺的含量测定方法。该方法在 8 min 内完成 4 种马兜铃酸及 1 种马兜铃内酰胺的分离测定，校准曲线相关系数大于 0.995，低中高三个浓度连续 5 针进样分析的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.37% 和 0.7~4.3% 之间；5 种化合物仪器检出限在 1~5 ng/L 之间，定量限在 3~15 ng/L 之间。除此之外，应用本方法对市售含马兜铃酸类中药制剂进行检测，效果理想。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合中药材及中药制剂中马兜铃酸及马兜铃内酰胺的高灵敏度快速检测。