

中成药中马兜铃酸 A 的 UPLC/MS 研究

周 围^{①a,c} 牛宏亮^b 王 波^a 刘红卫^a 贾松涛^c 解迎双^d

a(甘肃出入境检验检疫局 兰州市嘉峪关东路 387 号 730020)

b(甘肃省轻工业研究院 兰州市 730000)

c(甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州市 730070)

d(西北师范大学地理与环境科学学院 兰州市 730070)

摘 要 建立了中成药中马兜铃酸 A 的超高压液相色谱/质谱检测方法。测定结果表明,马兜铃酸 A 在超高压液相色谱/质谱的选择离子记录(SIR)中有较强的分子离子峰,检出限为 0.1mg/kg,可以满足对中成药中马兜铃酸 A 测定要求。

关键词 超高压液相色谱/质谱联用仪;中成药;马兜铃酸 A

中图分类号:O657.63

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2011)01-0183-05

1 引言

马兜铃酸(Aristolochic Acid)化合物是从植物中发现的一类硝基菲类化合物,也是马兜铃科多种植物的共有成分之一,具有很强的生理作用^[1]。它可提高巨噬细胞吞噬作用及机体免疫力,并可升高血中的白细胞,可用于肿瘤化疗或放疗所致的白细胞减少;也用于支气管炎、前列腺炎等疾病的辅助治疗。但近来由于发现马兜铃酸类对肾脏有毒性作用、抗生育作用等,国外一些国家禁用了该属植物。如美国 FDA 规定,进入美国的中药保健食品中严禁含有马兜铃酸,英国、德国、加拿大等国家也有同样的规定。我国在 2003 年也对含马兜铃酸的中成药的购买作出了严格的规定,限制一些含有马兜铃酸的中药的出售。

马兜铃属植物广泛分布在热带和亚热带地区,全世界有 200 余种,在我国有 40 余种。其中,有些是常用中药,如:马兜铃、青木香、天仙藤、广防己、汉中防己、关木通、寻骨风等^[2]。关于马兜铃酸 A 含量测定方法已见报道的有 HPLC 法^[3-5]、HPLC-MS 法^[2]和 HPLC-MS/MS^[6]等,主要是针对单一中药材中马兜铃酸 A 含量的测定,也有对中成药中马兜铃酸 A 含量的测定^[7]。我们在用 MS/MS 做多反应检测(MRM)时,发现对马兜铃酸 A 的响应值并不高,而在用 MS 的选择离子记录(SIR)对供试样品进行测定,灵敏度高,检出限为 0.1ppm。可以满足对中成药中马兜铃酸 A 进行测定。这主要因为有些天然产物类物质在离子传输时损失严重,因此用 MRM 时反而不如使用 SIR 的灵敏度高。

实验所测的中成药是由兰州佛慈制药厂提供,由于其生产的中成药大多数含有马兜铃、细辛、

① 联系人, 手机: (0) 13669323908; E-mail: nh1322@126.com

作者简介: 周围(1957—), 男, 河北省安国人, 研究员, 博士, 主要从事食品营养及食品安全分析工作。

牛宏亮(1984—), 男, 甘肃省会宁县人, 硕士, 主要从事食品分析与检测研究工作。

收稿日期: 2010-04-25; 接受日期: 2010-05-26

关木通等,并且此类植物中含有大量的马兜铃酸成分,因此,文章的目的是建立一种快速、高效检测马兜铃酸的方法,对此类药材和制剂质量、安全具有重要的意义。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

甲醇、乙腈(德国 Merck 公司,色谱纯);马兜铃酸 A 标准品(上海同田公司,纯度为 99.8%,固体标样)。实验用水为屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

标准储备液制备:准确称取 1mg 马兜铃酸 A 对照品,用 1mL 甲醇充分溶解并定容,得 1mg/mL 的标准储备液。

供试样品:中成药独活寄生丸、龙胆泻肝丸、归脾丸、香砂养胃丸、舒筋活血丸、香莲丸、香砂六君丸(兰州佛慈制药厂提供)、细辛药材(兰州百草中药店提供)。

Waters AcquityTM UPLC 超高压液相色谱仪,配有二元高压梯度泵、自动进样器(美国 Waters 公司);QUATTRO Premier XE 质谱仪(美国 Waters 公司);LD5-2A 型离心机(北京医用离心机厂);Heidolph 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);JP 超声震荡仪(上海翰天公司)。

色谱柱:CAPCELL PAK C18 MG II (150mm×4.6mm, 5μm)(日本资生堂)。

2.2 实验条件

2.2.1 液相色谱条件

流动相:乙腈/水(含 5mmol/L 的乙酸铵)体积比 35:65,柱温 30℃。

2.2.2 质谱条件

ESI 负离子检测,毛细管电压 3.0kV,锥孔电压 15V,离子源温度 120℃,去溶剂温度 250℃。去溶剂气(N₂)流速:500L/h。离子扫描范围:150—700m/z;选择性离子检测(SIR)。

2.3 样品处理

称取中成药粉末 1g,加 5% 氨水 30mL,浸泡 15min,超声波提取 20min,过滤。吸取滤液 10mL,加入 6mol/L 盐酸 2—3mL 至沉淀不再产生,加乙醚萃取 4 次,每次 5mL,合并醚层,用 25mL 水洗至中性,过滤醚层,滤液蒸发回收乙醚,残留物加甲醇溶解并定容至 2mL 的进样小瓶中,用 0.22μm 有机相滤膜过滤后供分析^[8]。

3 结果与讨论

3.1 提取条件的选择

分别采用了传统的加入甲醇后直接超声提取以及按 2.3 项下方法处理样品,由图 1、图 2 可以看出利用传统的方法处理的样品杂质含量较高,在同一色谱条件下,不同品种的中成药中可能有干扰成分存在。而利用 2.3 项下方法处理的样品杂质含量低,并且可以去除干扰马兜铃酸 A 测定的成分。

3.2 样品中马兜铃酸 A 的成分分析

3.2.1 定性分析

(1) 为了准确地检测中成药中马兜铃酸 A 的存在,本文在利用 HPLC 分析的同时还采用了 MS/MS 的多反应监测(MRM)进行确证。发现对马兜铃酸 A 响应低,这有可能与天然产物类物质性质有关,这一类物质在离子传输时损失较大,所以其灵敏度低,响应不高(见图 3)。因而天然产物

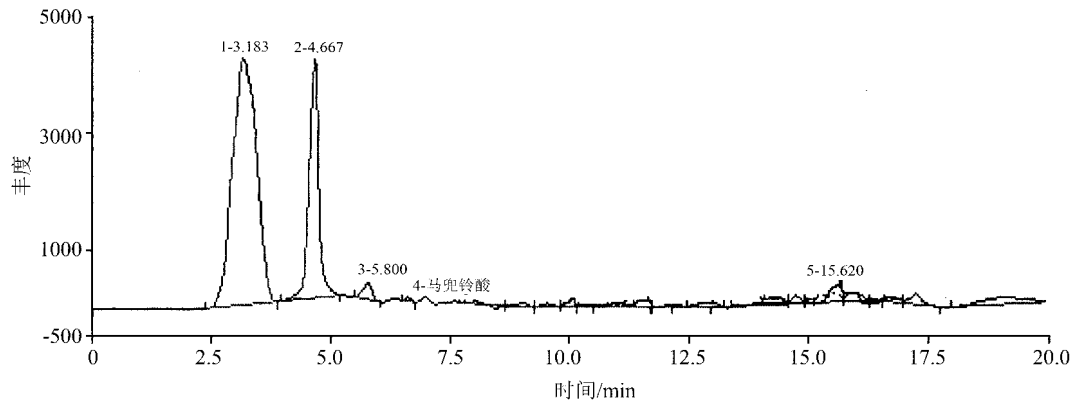


图 1 甲醇直接超声提取图

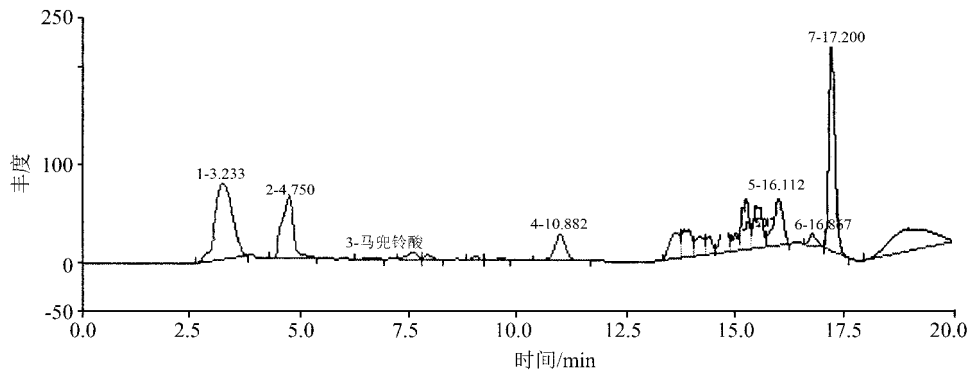


图 2 2.3 方法处理样品图

类物质的 MS/MS 方法,还有待于进一步的实验验证。

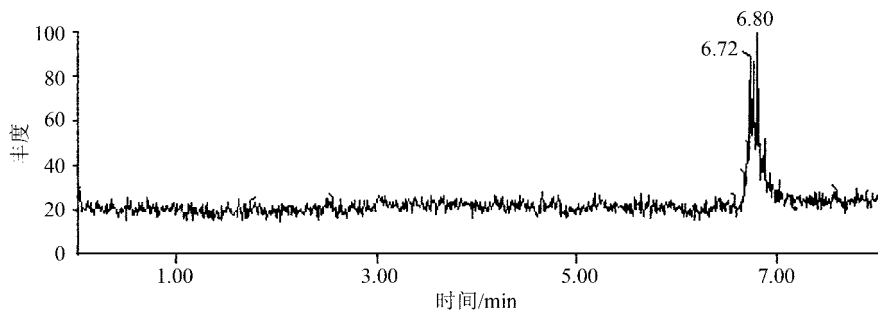


图 3 马兜铃酸 A 标准(10mg/ kg) 质谱图(多反应监测)

(2) 鉴于以上原因,并且样品中只含有微量的马兜铃酸 A,而用 MS/MS 的 MRM 做马兜铃酸 A 时灵敏度较低,因此用 UPLC-MS 的选择离子记录(SIR) 对供试样品进行测定(见图 4),灵敏度高,检出限为 0.1mg/kg。可以对中成药中马兜铃酸 A 进行测定。

3. 2. 2 样品测定

分别取供试样品,按“2.3”项下方法制备供试样品溶液,进样测定,用外标法分别以相应浓度的马兜铃酸 A 对照品计算含量。结果见表 1。样品图见图 5。

表 1 样品测定结果

样品	独活寄生丸	龙胆泻肝丸	归脾丸	香砂养胃丸	舒筋活血丸	香连丸	香砂六君丸	细辛
马兜铃酸 A	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	检出

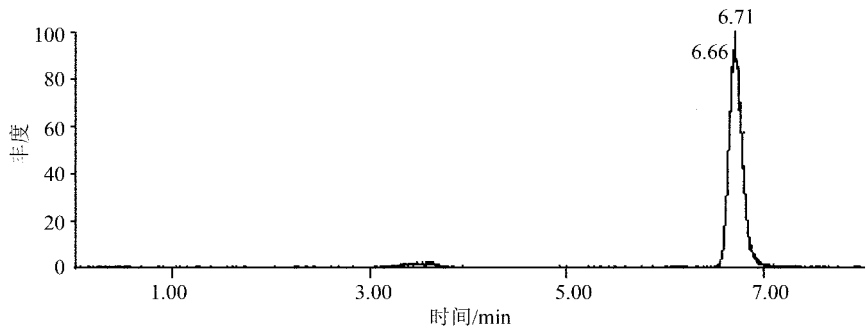


图 4 马兜铃酸 A 标准(10mg/kg)质谱图(选择离子记录)

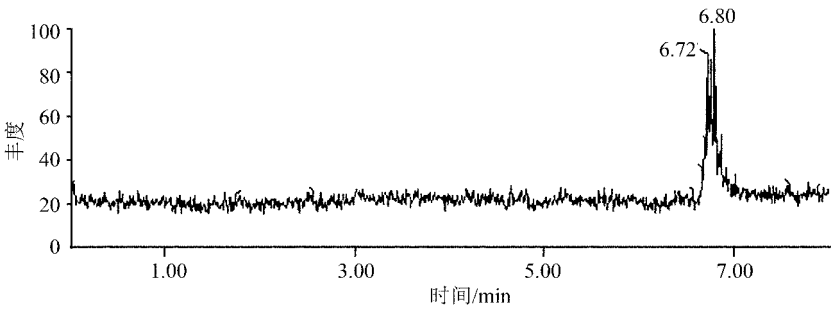


图 5 中药材细辛质谱图

4 结论

(1) 在制备中成药供试样品提取液时,由于药材中含有木兰碱、马兜铃内酰胺、青木香酸等多种杂质,会干扰实验结果,因此,根据马兜铃酸 A 可溶于碱的原理,在碱液中用乙醚萃取除去杂质后,分离效果较好。

(2) 中成药中的样品杂质含量较高,可能在同一色谱条件下不同品种的中成药的天然化学物质有可能干扰马兜铃酸 A 的测定。很多针对中药材中马兜铃酸 A 的测定方法应用于中成药中极有可能出现误判,即使是针对某个中成药中马兜铃酸 A 的测定方法也不能广泛的应用,因此本文采用 UPLC-MS 方法进行确证。从而建立一种适合中成药中马兜铃酸 A 的快速、高效的检测方法。

参考文献

[1] 田洪根,王洪明. RP-HPLC 测定万通筋骨片中马兜铃酸 A 的含量[J]. 解放军药学学报, 2007, 23(6): 456.
[2] 路军章,孙艳,魏锋. HPLC-MS 用于中药马兜铃中 6 种马兜铃酸类成分的检测[J]. 解放军药学学报, 2005, 21(3): 204.
[3] 张光文,马祥全,苏镜娉等. 广藿香中的黄酮类化合物[J]. 中草药, 2001, 32(10): 871—874.
[4] 苏镜娉,张光文,李核等. 广藿香精油化学成分分析与抗菌活性研究[J]. 中草药, 2001, 32(3): 204—206.
[5] 关玲,权丽辉,徐丽珍等. 广藿香化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(6): 356—358.
[6] 韩凤梅,梁智军,陈勇. 马兜铃酸电喷雾质谱电离规律及其药材指纹图谱[J]. 湖北大学学报, 2006, 28(1): 65—68.
[7] 于德全,杨峻山. 分析化学手册(第五分册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 839.
[8] 周围,周小平,刘红卫等. 中成药中马兜铃酸 A 的 HPLC/MS 分析方法[J]. 化学研究, 2005, 16(4): 79—81.

Research of *Aristolochic Acid A* in Chinese Traditional Patent Medicine by UPLC/MS

ZHOU Wei^{a,c} NIU Hong-Liang^b WANG Bo^a LIU Hong-Wei^a JIA Song-Tao^c XIE Ying-Shuang^d

^a(Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou 730020, P. R. China)

^b(Gansu Research Institute of Light Industry, Lanzhou 730000, P. R. China)

^c(Department of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, P. R. China)

^d(Geographic and Environmental Science Institute, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, P. R. China)

Abstract The method of UPLC/MS for analysis of *Aristolochic Acid A* in Chinese traditional patent medicine was established. The *Aristolochic Acid A* in selected ion recording (SIR) of UPLC/MS had a strong molecular ion peak, and the detection limit was 0.1 mg/kg. The sensitivity is high enough to determine *Aristolochic Acid A* in Chinese traditional patent medicine.

Key words UPLC/MS; Chinese Traditional Patent Medicine; *Aristolochic Acid A*

欢迎您投稿 “高效、保质、宽容”的中文核心期刊 《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障

发表周期多数(50% - 75%)为 5—9 个月,

少数(20% - 45%)为 1—5 个月,极少数(0 - 7%)为 15—30 天

及时发表科技论文,是尽早实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作中有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”,换言之,作者发表论文总是要为自己“争光”;而不是让自己“蒙羞”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即文字、表格、图片等齐全,并符合本刊《投稿须知》的各项要求;“清”即文字、图片打印清楚,不得有模糊不清的图片(包括上面的文字和数字);若有彩色图片及彩色曲线,请转化为清晰的黑白图片和黑色曲线,并清除图片和曲线上的背景,便于排版和复制;“定”即做到稿件内容(文字、表格、图片等)完整,无需再作增删修改。

来稿请用 Word 排版,用电子邮件发到本部电子信箱(E-mail: gpsys@263.net)。

本刊收到作者来稿后,都会在 3 日(遇公休日顺延)内发出“收稿通知”。因此,作者发送稿件后 7 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的正确的姓名和详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而产生的不良后果由作者自己负责。

本刊发表论文的宗旨是学术交流,提倡“高效、保质、宽容”精神,而不是应付“评职称”、“拿文凭”等。

《光谱实验室》编辑部