

通迪胶囊中马兜铃酸 I 测定方法的研究

梁晟, 杨青, 李瑞莲* (湖南省药品检验研究院, 湖南药用辅料检验检测中心, 湖南省药品质量评价工程技术研究中心, 长沙 410001)

摘要 目的: 建立通迪胶囊中马兜铃酸 I 限量的 UPLC 测定方法。方法: 样品用 70% 甲醇提取, 提取液通过 Phenomenex Strata-X-AW ($60 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}^{-1}$) 小柱除杂后用 UPLC 法进行测定。结果: 马兜铃酸 I 在 $0.149 \sim 4.957 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r^2=0.9994$), 平均回收率为 92.80%, $\text{RSD}=2.21\%$ ($n=6$), 7 批样品中马兜铃酸 I 的含量为 $4.56 \sim 8.94 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 本法灵敏、快速、准确、专属性强, 可用于通迪胶囊中马兜铃酸 I 的限量检查。

关键词: 通迪胶囊; 马兜铃酸 I; 超高效液相色谱; 固相萃取; 柱净化; 限量检查; 梯度洗脱; 液质联用

中图分类号: R917; R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)07-0751-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.07.004

Study on Determination Method of Aristolochic Acid I in Tongdi Capsules

Liang Sheng, Yang Qing, Li Ruilian* (Hunan Institute for Drug Control, Hunan Pharmaceutical Excipients Testing and Inspection Center, Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Changsha 410001, China)

Abstract Objective: To establish a UPLC method for the determination of Aristolochic Acid I in Tongdi Capsules. **Methods:** Samples were extracted with 70% methanol and detected by UPLC after removing impurities from Phenomenex Strata-X-AW ($60 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}^{-1}$) column. **Results:** The linearity range of Aristolochic Acid I was from 0.149 to $4.957 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r^2=0.9994$). The average recovery of Aristolochic Acid I was 92.80% with the $\text{RSD}=2.21\%$ ($n=6$). The concentrations of Aristolochic Acid I in 7 batches of samples were $4.56 \sim 8.94 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The method is sensitive, rapid, accurate and specific enough to be used for the limited determination of Aristolochic Acid I in Tongdi Capsules.

Keywords: Tongdi Capsules; Aristolochic Acid I; UPLC; solid-phase extraction; column purification; limited determination; gradient elution; LC-MS/MS

基金项目: 湖南省自然科学基金-科药联合基金项目(编号 2020JJ9032)

作者简介: 梁晟, 硕士; 研究方向: 主要从事药品质量控制研究及管理; E-mail: 27217153@qq.com

通信作者: 李瑞莲, 主任药师; 研究方向: 从事药品质量控制及标准研究; E-mail: 472762280@qq.com

通迪胶囊由三七、紫金莲、大青木香、七叶莲、鸡矢藤、细辛六味中药组成,具有活血行气、散瘀止痛的功效,临床用于治疗癌痛、术后疼痛、跌打伤痛、肩颈痹痛、头痛、痛经等^[1-3],大青木香和细辛均含有的马兜铃酸类成分,是一系列结构类似的硝基菲类化合物,具有抗感染、增强细胞免疫及终止妊娠等药理作用^[4]。但近年国内外已有大量研究证实,马兜铃酸具有肾毒性和致癌作用^[5-6],其中以马兜铃酸 I 毒性最强,2012年世界卫生组织下属的国际癌症研究机构确定其为一类致癌物,各国都对其使用和销售做出了严格限制^[7-8]。

《中国药典》2015年版一部中已收录了马兜铃酸 I 的限量测定方法^[9]。但该品种现行质量标准中并未对马兜铃酸 I 进行控制,且未见有关通迪胶囊中马兜铃酸 I 测定的文献报道。现参考文献报道的马兜铃酸 I 的测定方法,采用超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)法建立适用于通迪胶囊中马兜铃酸 I 的限量测定方法,为通迪胶囊的合理用药和质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1290超高效液相色谱仪(美国Agilent),Mettler Toledo XSE205DU电子天平(瑞士Mettler,分度值0.01mg),KQ-500DE超声仪(昆山市超声仪器有限公司,功率500 W,频率40 kHz),MILLI-Q纯水器(美国Millipore)。

马兜铃酸 I (中国食品药品检定研究院,批号110746-201611,纯度98.9%),Phenomenex Strata-X-AW固相萃取小柱(60 mg·3 mL⁻¹),甲醇、乙腈、醋酸铵(色谱纯,Merck公司),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

采用Acquity UPLC HSS T3 C18(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,以0.1%甲酸溶液为流动相A,乙腈为流动相B梯度洗脱(见表1),流速0.3 mL·min⁻¹;进样体积2 μL;柱温40℃,检测波长250 nm。理论板数按马兜铃酸 I 峰计算应不低于20000。

表1 梯度洗脱程序

时间 / 分钟	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
10	54	46
15	54	46
17	0	100
20	0	100

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

取马兜铃酸 I 对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1 mL含0.5 μg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

取装量差异项下的本品内容物,研细,取约3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定重量,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)40分钟,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密吸取续滤液3 mL上样至提前活化、平衡后的Phenomenex Strata-X-AW(60 mg·3 mL⁻¹)小柱上,依次用25 mM醋酸铵溶液(pH 6~7)、甲醇洗涤,弃去,再用含8%甲酸的甲醇溶液洗脱,收集洗脱液至5 mL量瓶中,摇匀,滤过,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备

取处方下除大青木香和细辛外的其余各药材适量,制成缺大青木香和细辛的阴性样品,按“2.2.2”节下供试品溶液制备方法,制成阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析,结果见图1,在色谱图中,供试品待测成分保留时间与对照品溶液相应色谱峰保留时间一致;阴性样品溶液在对照品溶液相对应的位置上无吸收峰,表明处方中其他物质对测定无干扰,马兜铃酸 I 峰与相邻杂质峰的分离度均大于1.5,方法专属性良好。

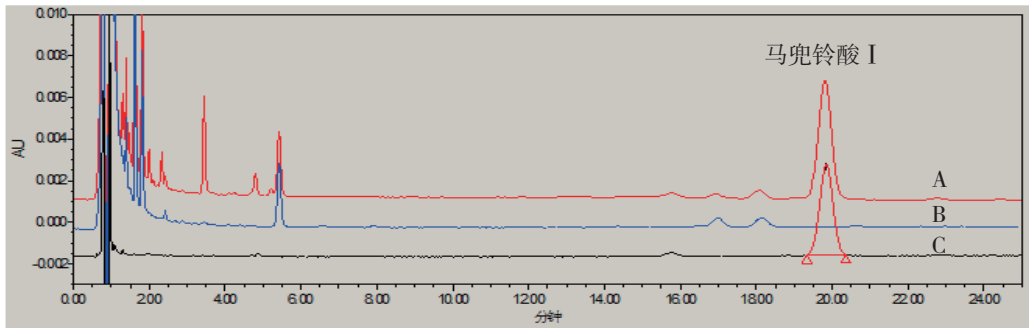


图1 供试品(A)、阴性样品(B)、对照品溶液(C)重叠色谱图

2.4 线性关系与灵敏度考察

精密称取马兜铃酸 I 对照品适量，定量稀释制成马兜铃酸 I 系列对照溶液，按“2.1”项下色谱条件进行分析，记录峰面积值，以马兜铃酸 I 峰面积值为纵坐标，进样量 (ng) 为横坐标，绘制标准曲线。其回归方程 $y = 14721.3541x + 678.9933$ ， $R^2 = 0.9994$ 。结果表明，马兜铃酸 I 在 0.30~9.91 ng 范围内线性关系良好。将低浓度的对照品逐级稀释后进样测定。结果在进样浓度分别为 $0.149 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.050 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，对照品峰信噪比 (S/N) 分别约为 10 和 3，表明马兜铃酸 I 的定量限和检测限分别为 0.30 ng 和 0.10 ng

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液，在拟定条件下连续进样 6 次，每次 $2 \mu\text{L}$ ，记录马兜铃酸 I 峰面积。结果其峰面积的 RSD 为 0.54%，保留时间的 RSD 为 0.11%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批号 (20171009) 样品 6 份，制备供试品溶液，分别进样测定并计算。结果，马兜铃酸 I 的平均含量为 $4.56 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，RSD 为 2.03%，表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号：20171009)，分别于配制后的 0、2、4、9、21、33、42 小时，精密吸取 $2 \mu\text{L}$ ，注入超高效液相色谱仪进行测定，计算马兜铃酸 I 峰面积的 RSD 值为 0.98%，说明溶液在 42 小时内基本稳定。

2.8 回收率试验

取已知含量 (马兜铃酸 I 含量为 $4.722 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 同一批号样品 (20171009) 粉末 6 份，每份约 1.5 g，分别精密称定，加入马兜铃酸 I 对照品适量，按“2.2.2”项下的方法制备加标供试品溶液，进样测定、计算，结果表明，该方法回收率良好，详见表 2。

表 2 回收率试验结果

n=6

取样量 /g	样品中马兜铃酸 I 含量 / μg	马兜铃酸 I 实测值 / μg	对照品加入量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.4973	7.0702	15.2563	8.8861	92.12	92.80	2.21
1.5858	7.4881	16.0429	8.8861	96.27		
1.5079	7.1203	15.3596	8.8861	92.72		
1.5763	7.4432	15.6245	8.8861	92.06		
1.5881	7.4990	15.5036	8.8861	90.07		
1.5087	7.1240	15.4370	8.8861	93.54		

2.9 样品测定

按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液，以“2.1”项下色谱条件进行测定，计算7批次样品中马兜铃酸 I 的含量，结果见表3。根据药典细辛项

下的限量规定“含马兜铃酸 I 不得过0.001%”及常规用量2 g折算，马兜铃酸 I 的日服用量不得过20 μg ，提示该品种存在一定安全风险。

表3 样品中马兜铃酸 I 的含量测定结果

编号	批号	马兜铃酸 I 含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	马兜铃酸 I 含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$)	马兜铃酸 I 常规 日摄入量 [*] / μg
1	20171008	8.08	3.56	21.38
2	20171009	4.62	2.04	12.25
3	20171024	8.46	3.83	22.98
4	20171026	8.94	4.02	24.14
5	20171027	6.27	2.77	16.61
6	20171028	7.50	3.29	19.75
7	20171007	4.56	2.02	12.09

注：*本品规格为每粒装0.45克，按用法用量一次2粒，一日3次计算常规日摄入量。

2.10 LC-MS/MS法验证

2.10.1 色谱条件

色谱柱：Welch UPLC XB-C18柱（50 mm × 2.1 mm，1.8 μm ）；流动相：含0.1%甲酸的10 mmol · L⁻¹乙酸铵溶液-乙腈，按表4规定进行梯度洗脱；流速：0.3 mL · min⁻¹；柱温：40℃；进样量：5 μL 。

表4 液质联用法梯度洗脱程序

时间 / 分钟	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
7	40	60
8.5	0	100
10	0	100

2.10.2 质谱条件

离子源：采用电喷雾正离子模式（ESI⁺）；喷雾电压：3.2 kV；离子传输管温度：350℃；去溶剂温度：300℃；鞘气流速：30 Arb；辅助气流速：10 Arb；多反应监测模式（MRM）检测，选

择 m/z 358.9 → 297.9（定量离子，CE：10V）和 m/z 358.9 → 324.0（CE：14V）为检测离子对，记录相应色谱图。

2.10.3 质谱方法学评价

经方法学考察，在该质谱条件下，马兜铃酸 I 在0.9991~99.14 ng · mL⁻¹范围内线性关系良好， $y=1855.5x-2432.4$ ， $R^2=0.9999$ ；以信噪比（S/N）约为10时确定马兜铃酸 I 的最低定量限（LOQ）为0.0025 ng，以信噪比（S/N）约为3时确定马兜铃酸 I 的最低检出限（LOD）为0.0049 ng；方法精密度、重复性良好，供试品溶液在配制后24小时内基本稳定；方法评价回收率为105.1%（ $n=6$ ），RSD为4.86%；阴性样品溶液无干扰。该质谱方法适用于通迪胶囊中马兜铃酸 I 含量的验证。

2.10.4 样品测定

精密吸取“2.2”项下的对照品溶液及供试品溶液各5 μL ，注入液质联用仪，记录色谱图，典型图谱见图2。结果表明，经LC-MS/MS法验证，7批次样品在与马兜铃酸 I 对照品保留时间相同的位置，均检出相同的分子离子峰与其碎片离子峰，验证结果与UPLC法一致。LC-MS/MS测定结果与UPLC测定结果基本一致，见表5。

表5 两种方法样品含量测定结果对比

编号	批号	UPLC 含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	LC-MS/MS 含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	20171008	8.08	8.16
2	20171009	4.62	4.74
3	20171024	8.46	8.31
4	20171026	8.94	8.87
5	20171027	6.27	6.44
6	20171028	7.50	7.59
7	20171007	4.56	4.82

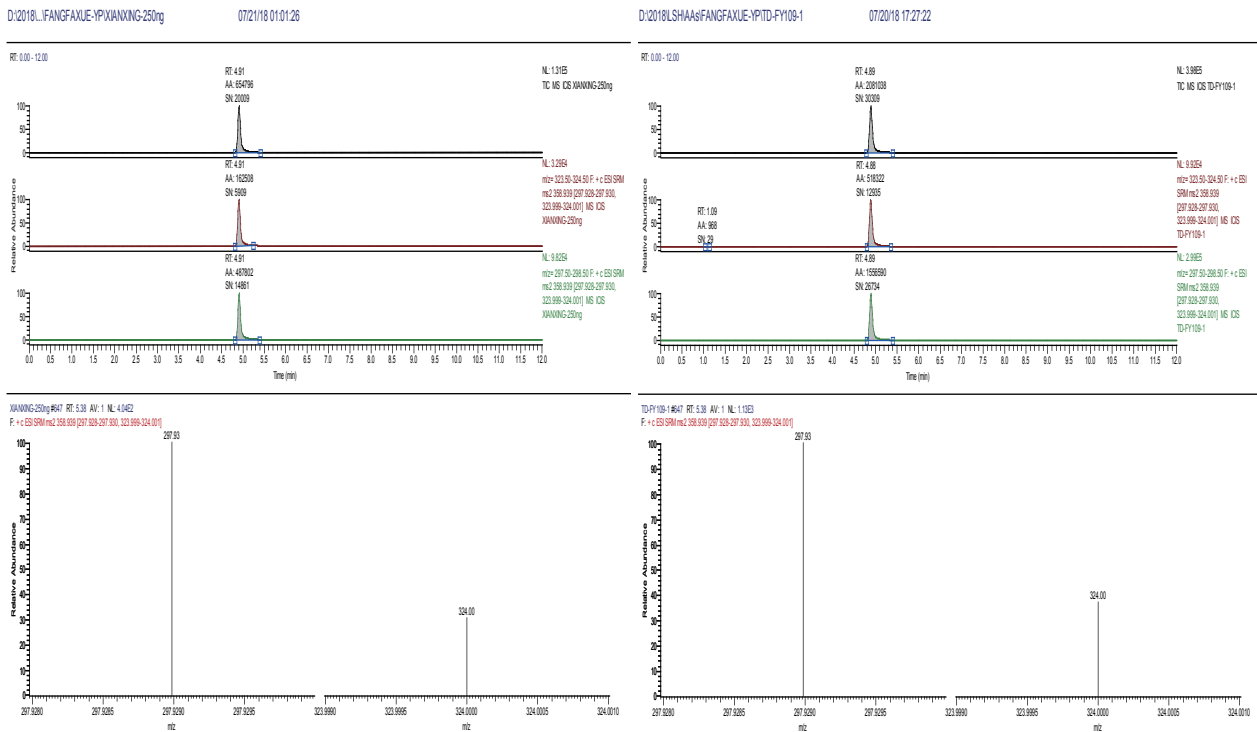


图2 马兜铃酸 对照品及通迪胶囊离子流图和二级质谱棒状图(左为对照,右为样品)

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

流动相的组成对待测组分的峰形、分离度及灵敏度均有影响。笔者分别以0.1%三氟乙酸溶液-乙腈、0.05%磷酸溶液-乙腈、0.5%冰醋酸溶液-乙腈、0.1%甲酸溶液-乙腈为流动相,先后对7种色谱条件进行了考察;同时采用了HPLC和UPLC进行测定。结果表明,采用0.1%甲酸溶液-乙腈梯度洗

脱,UPLC法测定,可大幅缩短分析时间,灵敏度和分离效能更高,故最终选择该条件作为本方法的色谱条件。

3.2 供试品溶液制备方法的优化

3.2.1 提取方式的选择

考察了样品直接用70%甲醇超声提取、用70%甲醇超声提取后通过固相萃取小柱、用碳酸氢钠溶液超声提取后用氯仿萃取并将萃取液再通过固相

萃取小柱, 以及用碳酸氢钠超声提取后将提取液酸化再用氯仿萃取等提取方法。由于本品处方成分复杂, 马兜铃酸 I 含量较低, 采用取样品超声提取液直接进样分析及液液萃取法时, 样品中的其他未知成分对测定干扰严重, 供试品溶液色谱中马兜铃酸 I 峰与其他未知峰共流出; 采用反相保留和阴离子交换功能的混合机制型固相萃取小柱, 将超声提取液通过固相萃取小柱净化后再进样分析, 制得的供试品溶液的色谱图中干扰峰显著减少, 马兜铃酸 I 峰与其他未知峰完全分离, 并且该方法操作简便, 无需使用大量毒性有机溶剂, 故选择固相萃取法制备供试品溶液。

马兜铃酸 I 是毒性成分, 为确保其从样品中充分提取完全, 将供试品处理第一次滤过后的滤渣再次用70%甲醇超声后滤过, 滤液过Phenomenex Strata-X-AW (60 mg · 3 mL⁻¹) 小柱, 取二次洗脱液注入液相色谱仪, 结果在对照品相应的保留时间处未出现色谱峰, 表明该方法已将样品中的马兜铃酸 I 提取完全。

3.2.2 固相萃取小柱的选择

对不同品牌的反相保留和阴离子交换混合机制型固相萃取小柱进行比较。考察了Phenomenex Strata-X-AW (60 mg · 3 mL⁻¹) 和Waters Oasis MAX 3cc (60 mg) 两种固相萃取小柱, 两种品牌固相萃取柱对样品的净化效果基本一致, 制得的供试品溶液色谱图中马兜铃酸 I 峰均与其他未知峰完全分离, 但从测得含量和回收率的角度考虑, Phenomenex Strata-X-AW (60 mg · 3 mL⁻¹) 小柱获得的结果更好, 故最终选择该小柱净化样品。

3.2.3 提取溶剂的选择

分别采用甲醇、70%甲醇、10%甲酸-甲醇 (20 : 80) 对马兜铃酸 I 进行提取。结果采用纯甲醇的提取率较低; 采用70%甲醇与10%甲酸-甲醇 (20 : 80) 对本品中马兜铃酸 I 的提取效率基本一致, 且高于甲醇。但是, 以10%甲酸-甲醇 (20 : 80) 作为溶剂的超声提取液不宜直接上样, 必须将提取液蒸干后再以非酸性溶剂复溶后上样, 增加了操作步骤。从提取效率和操作简便性的角度

综合考虑, 最终选择70%甲醇作为提取溶剂。

3.3 测定结果分析

从表 3 的试验结果可以看出, 各批次样品中均检出了马兜铃酸 I。马兜铃酸 I 的长期毒性、急性毒性试验结果显示, 其具有肾毒性, 且呈蓄积性, 长期小剂量服用或者短期大剂量服用都有可能造成肾损伤。本文应用Phenomenex Strata-X-AW固相萃取柱净化, 去除中药复杂基质的干扰, 采用超高效液相色谱法 (UPLC) 建立了通迪胶囊中毒性成分马兜铃酸 I 的含量测定方法, LC-MS/MS法验证结果与UPLC法基本一致。本法灵敏度高、重复性好, 可用于通迪胶囊中马兜铃酸 I 的测定。

参考文献:

- [1] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编 (口腔、肿瘤、儿科分册) [S]. 2002: 420.
- [2] 郑东森, 季晖, 胡庆华. 通迪胶囊的长期毒性研究[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26 (9): 40-45.
- [3] 许亚玲, 周兰, 罗曼, 等. 通迪胶囊中细辛脂素含量的高效液相色谱测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22 (10): 2458-2459.
- [4] 张万明, 马淑兰. 马兜铃酸及含有马兜铃酸中药的研究概述[J]. 河北北方学院学报, 2007, 23 (6): 35-38.
- [5] 胡玥, 江振洲, 张陆勇. 中药中马兜铃酸肾毒性研究进展[J]. 中南药学, 2011, 9 (6): 447-450.
- [6] 王潇晗, 张连学, 邵玉钢, 等. 含马兜铃酸中药减毒的研究进展[J]. 中草药, 2013, 44 (22): 3241-3243.
- [7] Priestap H A Minor. Aristolochic Acids from Aristolochia Argentina and Mass Spectral Analysis of Aristolochic Acids[J]. Phytochemistry, 1987, 26: 519-529.
- [8] Vanherweghem J L, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly Progressive Interstitial Renal Fibrosis in Youngwomen: Association with Slimming Regimen including Chinese Herbs[J]. Lancet, 1993, 341 (8842): 387-391.
- [9] 中国药典: 一部[S]. 2015: 230-231.

(收稿日期 2021年1月12日 编辑 邹宇玲)