

与梯度脱洗不相容,平衡时间长。本实验采用蒸发光散射检测器,灵敏度高,与梯度洗脱相容性良好,平衡时间短,能充分发挥 Prevail™ Carbohydrate ES 色谱柱特点,基线非常稳定。

3.2 样品处理方法

为了分离纯化目标分析物,本实验采用了固相萃取法(SPE)对丹参提取物进行纯化,有效去除了酚酸等杂质峰的干扰,纯化效果良好。SPE 是一种集萃取、浓缩、解吸于一体的实验技术,以其高效、高选择性、高度自动化的特点广泛用于分析化学的样品分离和纯化,尤其是在中药分析领域,发展前景良好^[4]。

REFERENCES

- [1] XIAO P G. Modern Chinese Materia Medica(新编中药志) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 212-230
- [2] BAI Y, LI L, LEI J W, et al. Quality determination of *Salvia miltiorrhiza* in pharmaceutical industry by near-infrared spectroscopy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(3): 222-225.
- [3] WANG H, WANG Q, LUO H M, et al. Quantitative analysis of salvia polysaccharide and determination of its composition by HPCE [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2007, 25(4): 827-829
- [4] LAI Y H, CHEN H A. The prospects of applying solid phase extraction to the analysis of traditional Chinese medicine and discussing the strategy and procedure of developing a new SPE method [J]. Guangdong Pharm J(广东药学), 2002, 12(2): 12-16.

收稿日期: 2011-10-29

超高效液相色谱-串联质谱测定保健食品中马兜铃酸 A

罗金文, 吴鸳鸯, 李樱红, 周明昊(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要:目的 建立测定保健食品中马兜铃酸 A 的超高效液相色谱-串联质谱法。方法 采用 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸(含 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵)(60:40); 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 质谱条件为电喷雾电离源(ESI⁺), 以多重反应监测(MRM)方式进行检测, 用于定量分析的反应离子为 m/z 359→324。结果 马兜铃酸 A 在 2~200 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好, 方法平均回收率为 105.3%, RSD 为 0.8%, 最低检测限为 0.2 μg·kg⁻¹。结论 本法专属性强, 灵敏度和准确度高, 可用于保健食品中马兜铃酸 A 的测定。

关键词: 保健食品; 马兜铃酸 A; 超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0186-04

Determination of Aristolochic Acid A in Health Food by UHPLC-MS/MS

LUO Jinwen, WU Yuanyang, LI Yinghong, ZHOU Minghao(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UHPLC-MS/MS method for the determination of aristolochic acid A in health food. **METHODS** The separation and analysis was performed on a Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid containing 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate(60:40). The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. Electrospray ionization(ESI) source was applied and operated in the positive mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 359→324 was used to quantify aristolochic acid A. **RESULTS** The assay linearity of aristolochic acid A was confirmed over the range 2~200 ng·mL⁻¹. The average recovery of aristolochic acid A was 105.3% and RSD was 0.8%. The detection limit was 0.2 μg·kg⁻¹. **CONCLUSION** The method is proved to be specific, sensitive and accurate. Therefore, it can be used to detect aristolochic acid A in health food.

KEY WORDS: health food; aristolochic acid A; UHPLC-MS/MS

马兜铃酸(aristolochic acid)是碳环芳香族酸性化合物,基本骨架构成为蒽菲型结构,主要存在于马兜铃科植物中。早期发现该类物质具有抗肿

瘤活性、抗感染及增强吞噬细胞活性等作用。随着研究的深入,马兜铃酸类物质已被证实具有肾毒、致癌和致基因突变作用。1993—1999年,欧

作者简介: 罗金文,男,硕士,副主任药师 Tel: (0571)86458914 E-mail: luojw31@163.com

洲发现多例因服用含马兜铃酸的中药而导致的肾衰竭病例。随后,英、美等国先后禁止使用含马兜铃酸的中药原料及制品,2003—2004年,国家食品药品监督管理局先后取消了关木通、广防己、青木香的药用标准,并对含马兜铃的中药制剂严格按处方药管理。

国内很多保健食品采用中药材和植物为原料,由于我国马兜铃科植物有40多种,稍有不慎就会将马兜铃酸引入保健食品中,最近有国内患者举报服用减肥类保健食品后发生肾衰竭,怀疑其中含有马兜铃酸。马兜铃酸是一类物质,目前市面上有正规标准品提供的主要是马兜铃酸A,相关的文献报道多以马兜铃酸A作为马兜铃酸的标志性成分进行研究,中国药典2010年版一部中也以马兜铃酸A为参比对照品来鉴别马兜铃药材。截止目前,关于马兜铃酸A测定方法的报道都是针对中药材和中成药中马兜铃酸A含量的测定,尚未见检测保健食品中马兜铃酸A的报道。故有必要建立保健食品中马兜铃酸A的检测方法,以有效控制保健食品的质量。

已见报道的马兜铃酸A测定方法主要有HPLC-UV^[1-5]、HPLC-MS^[6-8]和HPLC-MS/MS^[9-10]等。其中HPLC-UV存在灵敏度低、干扰峰多、较难分离、前处理较繁琐的缺点;HPLC-MS由于单级质谱的局限性,检测灵敏度较低;HPLC-MS/MS的选择性、专属性和灵敏度均优于前2种方法,但由于马兜铃酸A的离子化效果不好,其[M+H]⁺、[M-H]⁻的质谱信号均很弱,导致其检测灵敏度仍不够理想。本实验建立了超高效液相色谱-串联质谱法,通过优化色谱条件和马兜铃酸A的离子化条件,选择其[M+NH₄]⁺为母离子,采用MRM检测,大大提高了检测灵敏度,检出限为0.2 μg·kg⁻¹,可以满足对保健食品中痕量马兜铃酸A的检测。

1 仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent 6490 串联四极杆质谱仪和 Masshunter 色谱工作站(美国 Agilent 公司)。

马兜铃酸A对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110746-200507,含量:98.8%),37批减肥类保健食品为2011年国家保健食品安全风险监测样品,由浙江省食品药品检验研究院从浙江省流通领域抽取;甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵为色谱纯;其他化学试剂均为分析纯;水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈-0.1%甲酸(含10 mmol·L⁻¹甲酸铵)(60:40);流速:0.2 mL·min⁻¹;柱温:35℃;进样量:2 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源;正离子检测;喷雾电压:4 kV;辅助气温度:200℃;辅助气流量:14 L·min⁻¹;喷雾气压力:35 psi;鞘气温度:350℃;鞘气流量:11 L·min⁻¹。定量离子对359→324,碰撞能量:15 eV;定性离子对359→296,碰撞能量:10 eV。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取马兜铃酸A对照品约10 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液,置4℃冰箱保存。精密量取对照品储备液2.0 mL,置100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀作为对照品溶液,备用。

2.4 样品处理

取样品,精密称取一次口服剂量(准确至0.01 g),置50 mL量瓶中,加稀释液[10%甲酸-甲醇(20:80)]适量,超声30 min,放冷至室温,加稀释液稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm的滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.5 线性关系考察

精密量取对照品溶液适量,用稀释液稀释制成浓度分别为2.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0 ng·mL⁻¹的系列溶液。各精密量取2 μL,按“2.1”和“2.2”项下条件进样测定,记录色谱图,以马兜铃酸A的峰面积(Y)对马兜铃酸A的浓度(ng·mL⁻¹)(X)进行线性回归,回归方程为Y=46.97X-30.39(r=0.999 9)。结果表明马兜铃酸A在2~200 ng·mL⁻¹内峰面积与浓度线性关系良好。

2.6 回收率与精密度试验

精密称取空白样品(魔咖瘦身丹健减肥营养晶,批号:20110408,潍坊信丰保健品有限公司生产)约1.0 g,分别置50 mL量瓶中,分别精密加入对照品溶液0.25, 1.0, 2.0 mL,加稀释液适量,超声30 min,放冷至室温,加稀释液稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm的滤膜滤过,取续滤液分别作为低、中、高浓度回收率供试液,每个浓度平行3份。精密量取2 μL,按“2.1”和“2.2”项下条件

进样测定,记录色谱图,以“2.5”项下线性方程计算回收率供试液中马兜铃酸 A 的浓度,并按下式计算回收率:(回收率供试液中马兜铃酸 A 的含量-样品中原有马兜铃酸 A 的含量)/马兜铃酸 A 的加入量 $\times 100\%$ 。结果马兜铃酸 A 低、中、高浓度的平均回收率分别为 106.0%, 105.5%, 104.6%; RSD 分别为 0.6%, 0.7%, 0.2%; 总平均回收率为 105.3%, RSD 为 0.8%。

2.7 仪器精密度试验

取“2.5”项下含马兜铃酸 A 为 $40.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液,连续进样 5 次,结果峰面积的 RSD 为 1.4%,表明仪器精密度良好。

2.8 最低检测限

马兜铃酸 A 的最低检测浓度为 $0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N=3.4$),当取样量为 1.0 g,稀释至 50 mL 时,方法的最低检测限为 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($S/N=3.4$),表明本法具有很高的检测灵敏度。

2.9 样品测定

取样品,按“2.4”项下方法处理后,按“2.1”和“2.2”项下条件进样测定,结果 37 批减肥类保健食品中均未检出马兜铃酸 A。色谱图见图 1。

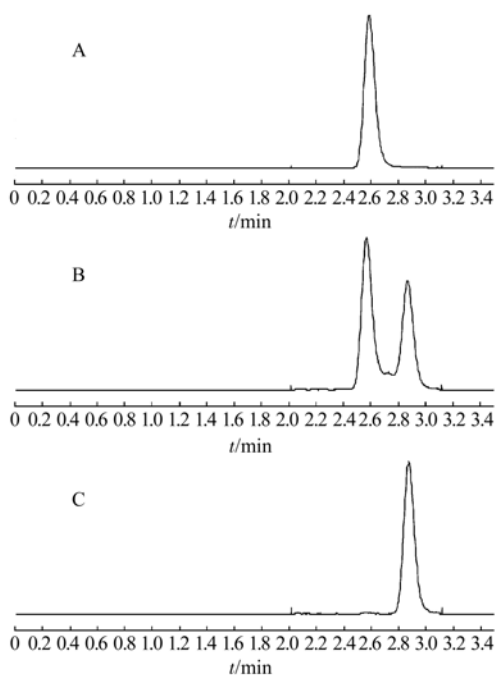


图 1 UHPLC-MS/MS 色谱图
A-马兜铃酸 A 对照品; B-空白样品中加入马兜铃酸 A 对照品(浓度 $40 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-典型样品

Fig 1 UHPLC-MS/MS chromatogram
A-aristolochic acid A reference standard; B-blank sample spiked aristolochic acid A ($40 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-typical sample

3 讨论

3.1 马兜铃酸 A 的质谱行为

试验发现无论采用 ESI 或 APCI 离子源,马兜铃酸 A 的准分子离子 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]$ 的质谱信号均很弱。笔者尝试在流动相中加入 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲酸铵提供 NH_4^+ ,采用 ESI⁺检测,结果发现其 $[M+\text{NH}_4]^+$ 离子 (m/z 359) 质谱信号较强,故选择 359 为母离子,优化离子化条件及碰撞能量,马兜铃酸 A 的二级质谱图见图 2。其中 324、296 两个子离子具有较高的灵敏度,根据马兜铃酸 A 的分子结构及质谱裂解规律分析,324、296 两个子离子分别为马兜铃酸 A 失去 1 分子 H_2O 和失去 1 分子 NO_2 后的产物离子,故选取 324 为定量离子,296 为定性离子进行 MRM 检测,可获得很高的检测灵敏度和专属性。

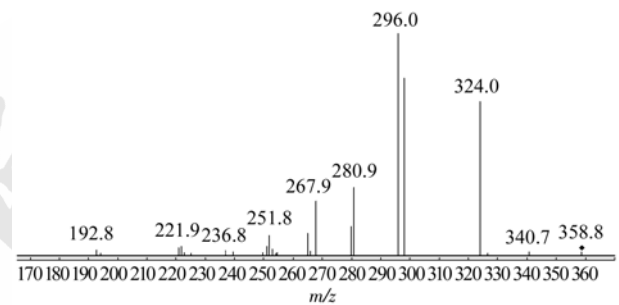


图 2 马兜铃酸 A 对照品二级质谱图
Fig 2 Full scan MS-MS spectra of aristolochic acid A reference standard

3.2 样品中干扰峰的排除

由结果可知,马兜铃酸 A 对照品峰的保留时间约 2.6 min,而样品在保留时间约为 2.9 min 处出现一色谱峰,保留时间与马兜铃酸 A 对照品峰比较接近,但通过 MRM 的 2 个监测离子通道对比后发现,样品中的疑似峰仅在 $359 \rightarrow 296$ 通道有质谱信号,而在 $359 \rightarrow 324$ 通道无质谱信号。根据 MRM 阳性判定原则,只有当样品在选择的 2 个监测离子通道均有质谱信号,且 2 个离子的丰度比与对照品一致时才可判为阳性,故该疑似峰应为干扰峰。由此表明,采用串联质谱 MRM 选择 2 个离子对监测,大大提高了检测的专属性,可有效排除假阳性干扰。

综上所述,本实验建立的超高效液相色谱-串联质谱法专属性强、灵敏度高、操作简便、结果准确,可用于检测保健食品中痕量的马兜铃酸 A。

经检测, 37 批市售减肥类保健食品中均未检出马兜铃酸 A, 表明保健食品中马兜铃酸 A 的残留风险较小。

REFERENCES

- [1] GE X Z, ZHANG Y P, CAI X P, et al. Limit test for aristolochic acid A in Xinqin granules by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2010, 41(8): 604-606.
- [2] LIU Y L, GAO H M, WANG Z M, et al. Trace analysis of aristolochic acid A [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(24): 3314-3317.
- [3] XUE Y, TONG X H, WANG F, et al. Determination of trace amount aristolochic acid A in sliced Asarum [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(5): 842-846.
- [4] HUANG G X, NI C, LI Y S, et al. Assaying of aristolochic acid A in chinese herbal pieces and the traditional Chinese medicine particle [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(14): 75-78.
- [5] YANG C, TIAN D J, LI J. Determination of aristolochic acid

- A in different parts of *Asarum heterotropoides* by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(13): 24-25.
- [6] ZHOU W, NIU H L, WANG B, et al. Research of aristolochic acid A in Chinese traditional patent medicine by UPLC/MS [J]. Chin J Spectrosc Lab(光谱实验室), 2011, 28(1): 183-187.
- [7] ZHOU W, ZHOU X P, LIU H W, et al. HPLC/MS analysis of aristolochic acid A in Chinese traditional patent medicine [J]. Chem Res(化学研究), 2005, 16(4): 80-82.
- [8] LU J Z, SUN Y, WEI F. Qualitative determination of aristolochic acid analogues in the roots of *Aristolochia contorta* by HPLC-UV-MS [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2005, 21(3): 204-205.
- [9] PAN Y K, GAN Q. Determination of aristolochic acid A in prepared traditional Chinese medicines by LC-MS/MS [J]. PTCA(Part B: Chem Anal) (理化检验 化学分册), 2009, 45(6): 1017-1020.
- [10] LI W, HAN J P, GAO J, et al. Determination of aristolochic acid A in Rhizoma Asari and Yangxue Qingnao granules using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2007, 35(12): 1798-1800.

收稿日期: 2012-03-19

HPLC-ELSD 测定益母草颗粒中盐酸水苏碱的含量

徐端琼(福建省泉州市药品检验所, 福建 泉州 362000)

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 测定益母草颗粒中盐酸水苏碱的含量。方法 色谱柱为 Venusil HILIC 丙基酰胺键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 25 °C; 流动相为乙腈-0.2%冰醋酸溶液(80:20); 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL; 漂移管温度为 80 °C, 氮气流速为 1 L·min⁻¹。结果 盐酸水苏碱在 0.646 5~12.93 μg 内呈良好的线性关系, $r=0.999\ 4(n=5)$; 平均加样回收率为 98.48%, RSD=1.15%($n=9$)。结论 该方法简便、快速、准确、重复性和稳定性好, 可作为益母草颗粒的盐酸水苏碱含量测定方法。

关键词: 益母草颗粒; 盐酸水苏碱; 含量测定; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0189-03

Determination of Stachydrine Hydrochloride in Leonuri Granule by HPLC-ELSD

XU Duanqiong(Quanzhou Institute for Drug Control of Fujian province, Quanzhou 362000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-ELSD method for the determination of stachydrine hydrochloride content in Herba leonuri granule. **METHODS** The Venusil HILIC column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The column temperature was 25 °C. The mobile phase was acetonitrile-0.2% glacial acetic acid(80:20). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The injection volume was 10 μL. The drift tube temperature was 80 °C, and the nebulizer gas flow rate was 1 L·min⁻¹. **RESULTS** The linear range of stachydrine hydrochloride was 0.646 5~12.93 μg, $r=0.999\ 4(n=5)$. The average recovery was 98.48%, RSD=1.15%($n=9$). **CONCLUSION** The HPLC-ELSD method is convenient, rapid and accurate with good reproducibility and stability which is suitable for assay of stachydrine hydrochloride content in leonuri granule. **KEY WORDS:** leonuri granule; stachydrine hydrochloride; content determination; HPLC-ELSD

作者简介: 徐端琼, 女, 副主任药师

Tel: (0595)22119787

E-mail: xudianqiong@yahoo.com.cn