

SCIEX LC-MS/MS系统对10种马兜铃酸类化合物的检测方案

Determination of 10 Aristolochic acids Compounds on SCIEX LC-MS/MS

贾金茹, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Jia Jinru, Si Dandan, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Keywords: SCIEX LC-MS/MS; Aristolochic acids

前言

马兜铃酸因其强烈的肾毒性和致癌性, 是近年来中药毒性研究中比较关注的化合物类别, 其广泛存在于马兜铃属和细辛属植物中。马兜铃酸 I 是最常见的一种马兜铃酸类化合物, 也是马兜铃属植物中毒性最强的成分, 它可在几乎所有马兜铃属植物中发现, 并常与马兜铃内酰胺 (aristolactams) 共存。除马兜铃酸 I 之外, 其余多种马兜铃酸也被证明在体内会引起致癌性或遗传毒性^[1-2]。马兜铃内酰胺也是具有菲内酰胺结构母核的一类化合物, 结构与马兜铃酸十分相似。其为马兜铃酸在人体内的主要代谢形式, 所带的硝基是最主要的毒性基团, 可与DNA结合, 损害肾脏细胞。但其不仅是马兜铃酸的代谢产物, 在马兜铃属和细辛属植物中也天然存在的。而在2020版《中国药典》中采用高效液相色谱法对细辛中马兜铃酸 I 进行限量检查。鉴于其中多种马兜铃酸的肾毒性, 检测其中单一成分不足以全面衡量药材毒性, 使其使用也存在一定的安全隐患。

SCIEX基于Triple Quad™液质联用系统建立了10种常见的马兜铃酸以及马兜铃内酰胺类化合物的定量检测方法, 该方法具备高灵敏度、高特异性、高重现性的优点, 为后续该类药物的安全监测提供参考。

该方法特点如下:

1. 灵敏度高, 可满足药典所规定的限度要求。
2. 该方法具有较宽的线性范围以及较高的灵敏度, 方法定量下限 (LLOQ) 最低可达10 pg/ml, 且低浓度点连续进样6针峰面积重复性小于5%。

3. SCIEX质谱独特的Turbo V™离子源具备较强的抗污染能力, 且在长时间的样品采集过程中, 仪器仍能保证数据的稳定性和重现性。

实验方法

样品前处理

精确称量细辛粉末0.5 g置于50 ml的具塞离心管中, 精密加入70%甲醇25 ml, 密塞, 称定重量, 超声提取40 min, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 6000 rpm转速下4℃离心10 min。取上清过0.22 μm 滤膜, 待进样分析。

仪器设备

SCIEX Exion LC™ + SCIEX Triple Quad™ 液质联用系统



液相条件

液相: SCIEX Exion LC™系统

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5, 2.1 × 150 mm, 2.6 μm

流动相: A相: 水 (含0.1%甲酸和5 mM甲酸铵)

B相: 甲醇:乙腈 (7:3, v/v且含1 mM甲酸铵)

流速: 0.25 ml/min

柱温: 40°C

洗针液: 甲醇:乙腈:水:异丙醇 (1:1:1:1)

梯度洗脱程序: 见表1

表1. 梯度洗脱条件

Time (min)	A (%)	B (%)
0	50	50
1	50	50
3	35	65
5	35	65
12	2	98
13	2	98
13.1	50	50
15	50	50

质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 系统

数据采集方法: MRM (多反应监测扫描模式)

离子源: ESI源正模式

离子源参数:

电喷雾电压(IS): 5500 V;

气帘气(CUR): 35 psi;

雾化气(GS1): 55 psi;

辅助加热气(GS2): 55 psi;

离子源温度(TEM): 400 °C;

碰撞气(CAD): 9 psi;

多反应监测离子通道见表2

备注: 表2中标注“*”为定量离子对

实验结果

灵敏度和重现性

各定量下限浓度点标准品溶液的XIC谱图见图2, 大部分化合物的定量下限均可达到pg级别, 最低可达10 pg且在空白溶剂中无

表2. 10种马兜铃酸类化合物MRM通道参数设置

化合物 Compound ID	母离子 Q1(m/z)	子离子 Q3(m/z)	去簇电压 DP(V)	碰撞能 CE(V)
马兜铃酸I	359.1	298.1*	50	20
	359.1	296.1	50	20
马兜铃酸II	329.1	268.1*	50	15
	329.1	294.0	50	15
马兜铃酸III	359.1	296.1*	50	25
	359.1	298.1	50	20
马兜铃酸IIIa	345.1	284.1*	50	15
	345.1	282.1	50	25
马兜铃酸IVa	375.1	314.1*	50	18
	375.1	340.0	50	18
马兜铃酸VIIa	375.1	314.1*	50	15
	375.1	312.1	50	15
马兜铃内酰胺I	294.1	279.1*	100	40
	294.1	251.1	100	50
马兜铃内酰胺AII	266.1	251.1*	60	35
	266.1	195.1	60	45
马兜铃内酰胺FI	266.1	251.1*	50	38
	266.1	195.1	50	38
马兜铃内酰胺BII	280.1	264.1*	50	38
	280.1	236.1	50	40

明显残留和干扰。同时为了考察该方法的重现性, 将LLOQ浓度点样品连续进6针, 计算6针峰面积的RSD%, 结果显示所有化合物的RSD%值均小于5%。由此可以看出, 该方法在具备较高灵敏度的同时也保证了良好的重现性。

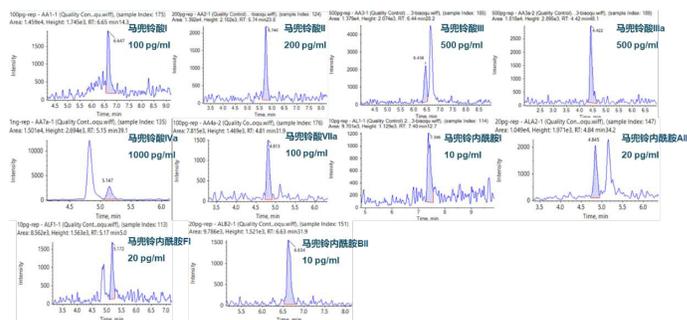


图2. 各LLOQ浓度点标准品溶液的XIC谱图

线性和准确度

所有化合物在线性范围内线性关系良好，线性相关系数均大于0.99，各浓度点准确度均在85%-115%之间，具体见图3。

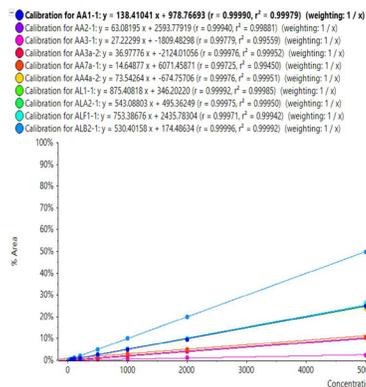


图3. 10种马兜铃酸化合物的标准曲线图，线性范围线性良好，线性相关系数均大于0.99

样品测定结果

取某细辛样品，按照样品的前处理方法进行处理，对处理好的样品溶液进行10种马兜铃酸类化合物含量测定。结果显示，在细辛样品中检出马兜铃酸I (0.019 $\mu\text{g/g}$)、马兜铃酸IVa (1.184 $\mu\text{g/g}$)、马兜铃酸VIIa (0.007 $\mu\text{g/g}$)以及马兜铃酸衍生物马兜铃内酰胺I (0.450 $\mu\text{g/g}$)、马兜铃内酰胺AII (0.002 $\mu\text{g/g}$)。根据2020版《中国药典》规定，马兜铃酸I的检出含量满足药典规定的限度要求。

加标回收率

取某细辛样品，向其中加入低、中、高三个浓度的混合标准品溶液，按照样品的前处理方法进行提取，且平行制备三份，进行加标回收率考察。测试结果如下表格，回收率均在85%~115%，且平行制备的三份样品的重复性RSD%小于5%。

结论

本实验基于SCIEX Triple Quad™系统建立10种常见的马兜铃酸以及马兜铃内酰胺类化合物的定量检测方法。该方法中大部分化合物的定量下限 (LLOQ) 到pg级别，其中最低可达10 pg/ml，低于限度水平，同时空白溶剂中无干扰无残留，说明该方法特异性

表3. 10种马兜铃酸类化合物加标回收率考察结果

化合物名称	浓度	重复次数	RSD%	平均加标回收率
马兜铃酸 I	L	3 of 3	3.1	95.28
	M	3 of 3	2.9	99.64
	H	3 of 3	2.9	103.40
马兜铃酸 II	L	3 of 3	2	98.13
	M	3 of 3	3.0	105.41
	H	3 of 3	4.1	94.19
马兜铃酸 III	L	3 of 3	1.9	103.73
	M	3 of 3	3.8	106.92
	H	3 of 3	2.8	95.77
马兜铃酸 IIIa	L	3 of 3	3.7	106.45
	M	3 of 3	3.3	102.43
	H	3 of 3	1.8	94.87
马兜铃酸 IVa	L	3 of 3	3.3	96.52
	M	3 of 3	1.8	97.68
	H	3 of 3	2.4	91.70
马兜铃酸 VIIa	L	3 of 3	4.2	89.67
	M	3 of 3	4.2	96.52
	H	3 of 3	4.1	102.46
马兜铃内酰胺 I	L	3 of 3	1.4	99.43
	M	3 of 3	1.8	98.89
	H	3 of 3	5.0	90.09
马兜铃内酰胺 AII	L	3 of 3	2.0	91.96
	M	3 of 3	0.7	102.52
	H	3 of 3	0.8	104.80
马兜铃内酰胺 FI	L	3 of 3	2.3	90.90
	M	3 of 3	0.8	87.29
	H	3 of 3	1.4	87.83
马兜铃内酰胺 BII	L	3 of 3	1.4	99.87
	M	3 of 3	4.8	102.89
	H	3 of 3	3.1	104.09

较好、灵敏度较高。所有化合物在线性范围内线性关系良好，线性相关系数均大于0.99；低浓度点（LLOQ）标准品溶液连续进样6针，峰面积重现性结果小于5%。低、中、高三个浓度的加标回收率结果均在85%~115%，说明方法和仪器重现性较好。该方法可为后续该类药物的安全监测提供一定参考。

参考文献

- [1] Michl J, Ingrouille MJ, Simmonds MS, Heinrich M. Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. *Nat Prod Rep.* 2014; 31(5): 676-693.
- [2] Michl J, Kite GC, Wanke S, et al. LC-MS- and (1)H NMR-Based Metabolomic Analysis and in Vitro Toxicological Assessment of 43 Aristolochia Species. *J Nat Prod.* 2016; 79(1): 30-37.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15905-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)