

基于液相色谱-质谱联用的清肺排毒汤中痕量马兜铃酸I的监测及定量分析

陈奕君^{1,2}, 王伟^{2*}, 肖红斌^{1,2*}

(1. 北京中医药大学, 中药分析与成果转化研究中心, 北京 100029; 2. 北京中医药大学, 北京市方剂与证候研究重点实验室, 北京 100029)

摘要: 清肺排毒汤中细辛用量超《中国药典》规定量一倍, 其限量成分马兜铃酸I是否也超标引发广泛关注。本研究首先利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱联用技术, 证实了清肺排毒汤中确有马兜铃酸I; 基于此, 进一步构建了高灵敏的超高效液相色谱-三重串联四级杆质谱方法, 对清肺排毒汤、细辛水煎液及细辛70% 甲醇提取液中的马兜铃酸I进行了定量对比分析, 发现细辛用量均为6 g时, 其所含马兜铃酸I的量分别约为1.5、3.2和9.0 μg, 均远低于《中国药典》中规定的每日最大限量(30 μg)。因此, 本研究推测通过复方煎煮及优选细辛药材的方法, 可以有效的降低细辛中马兜铃酸I的浸出, 从而避免超限使用。本研究不仅可为中药复方汤剂中痕量马兜铃酸I的检测及定量分析提供方法, 也可为清肺排毒汤中细辛的合理使用提供科学依据。

关键词: 清肺排毒汤; 细辛; 马兜铃酸I; 痕量检测

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1903-05

Monitoring and quantitative analysis of trace aristolochic acid I in a Qing-Fei-Pai-Du decoction using liquid chromatography-mass spectrometry

CHEN Yi-jun^{1,2}, WANG Wei^{2*}, XIAO Hong-bin^{1,2*}

(1. *Research Center of Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;* 2. *Beijing Key Laboratory of Syndrome Prescription Basic Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*)

Abstract: The dosage of asarum in Qing-Fei-Pai-Du decoction (QFPD) is twice the dosage prescribed by the Chinese Pharmacopoeia. Due to the potential toxicity of aristolochic acid I (AAI), a limited component in asarum, the possibility that its dosage also exceeds the dosage prescribed by the Chinese Pharmacopoeia had aroused wide concern. In this study, the UHPLC-Q TOF method was used to determine the presence of AAI in QFPD. A UHPLC-QQQ method was then established to determine the content of AAI in QFPD, a reflux extract of asarum and an ultrasonic extract of 70% methanol of asarum. The results showed that the amount of AAI in the three samples was approximate 1.5, 3.2 and 9.0 μg respectively with equivalent dosages of asarum (6 g). All were obviously lower than the maximum daily limit stipulated in the Chinese Pharmacopoeia (30 μg). Therefore, we concluded that the content of AAI could be effectively reduced by using a Chinese herbal compound decoction and optimization of asarum. This assay is not only convenient, rapid, sensitive and reproducible for the trace detection of AAI in

收稿日期: 2020-02-27; 修回日期: 2020-03-19.

基金项目: 国家重大专项新药创制 (2018ZX09101-002, 2019ZX09201004-001); 国家自然科学基金项目 (81774155, 81803703).

*通讯作者 Tel: 86-10-64286508, E-mail: wangwei26960@126.com;

Tel: 86-10-64286490, E-mail: hbxiao69@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0197

Chinese herbal compound decoction, but also useful for the rational application of asarum in QFPD.

Key words: Qing-Fei-Pai-Du decoction; asarum; aristolochic acid I; trace detection

清肺排毒汤是由麻杏石甘汤、射干麻黄汤、小柴胡汤和五苓散4种中医经典方剂优化组合而成的中药复方,组方合理、性味平和,可用于新冠肺炎患者的临床救治^[1,2]。该方中细辛的用量为6 g,因细辛中含有马兜铃酸类化合物,因此《中国药典》2015年版中规定,细辛每日的用量范围为1~3 g,且每克细辛中马兜铃酸I (aristolochic acid I, AAI) 的含量不得超过0.001%^[3]。

马兜铃酸类化合物是马兜铃科马兜铃属植物特有的一类硝基菲类化合物^[4]。自20世纪90年代以来,由于临床上不断出现含马兜铃酸类成分的药品引起肝肾损伤的病例,自2000年5月起,FDA禁止了包括马兜铃、关木通、广防己、天仙藤等相关草药和中成药的进口和销售^[5,6]。马兜铃酸类化合物中,AAI为其主要毒性成分^[7],须对其含量进行严格的监测。目前在国内,多数临床医师常根据患者的实际情况对细辛酌量使用,但由于“细辛不过钱”及“细辛有毒”等说法的存在,部分学者和民众对于清肺排毒汤中细辛的超量使用存在担忧^[8],因此十分有必要对清肺排毒汤中的细辛所含AAI进行准确高效的定性定量分析。

中药复方药材组成多样,成分繁杂;且复方的提取过程多为水煎煮,被检测成分通常含量较低,并被隐匿于复杂的基质中^[9],由此为其成分检测带来了巨大挑战。清肺排毒汤是由21味药材组成的复方^[10],其中AAI含量低微,若想对其进行准确高效的定性定量分析,必须建立适宜的色谱-质谱联用方法。初期实验探索结果证实,通过单独使用超高效液相色谱方法,无法实现清肺排毒汤中AAI的检测,更无法进行准确的定量分析。基于此,本研究首先构建了UHPLC-Q TOF-MS/MS联用方法,对清肺排毒汤中的AAI进行了高效的定性识别,确认了清肺排毒汤中AAI的存在;在此基础上,进一步搭建了UHPLC-QQQ-MS/MS联用方法,并以利血平为内标,在多反应监测模式(MRM)下对清肺排毒汤及细辛药材不同提取液中AAI的含量进行了准确定量分析(AAI及内标化合物利血平的化学结构式见图1),并对不同样品中AAI的含量差异进行了对比分析,从而在一定程度上为清肺排毒汤的合理使用提供了数据支撑。

材料与方法

仪器与试剂 Agilent 1290超高效液相色谱仪、Agilent 6550离子漏斗四级杆飞行时间串联质谱仪和

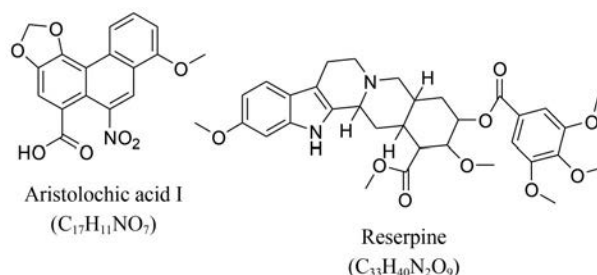


Figure 1 The chemical structures of aristolochic acid I (AAI) and reserpine

Agilent 6470三重串联四级杆质谱仪(美国Agilent公司), Milli-Q超纯水制备仪(美国Millipore公司), 乙腈、乙酸及乙酸铵(色谱级,美国Fisher公司), 其他试剂均为分析纯(北京华威锐科化工有限公司)。清肺排毒汤复方由东直门医院提供,复方药材来源如下:麻黄、桂枝、生姜、陈皮及藿香由盛世龙药业有限公司提供;炙甘草、生石膏、泽泻、猪苓、茯苓、柴胡、黄芩、款冬花、山药、炒枳实及炒白术由西单医药有限责任公司提供;杏仁、射干及细辛由(华邈)中国中药有限公司提供;姜半夏由同仁堂药材有限公司提供;紫菀由仟草中药饮片有限公司提供;AAI及内标化合物-利血平对照品由成都瑞芬思生物科技有限公司提供(纯度≥98%)。

清肺排毒汤供试品溶液的制备(A) 取清肺排毒汤复方药材,置于砂锅中,向其中加入适量水至没过药材表面0.5 cm左右,浸泡15 min后开始煎制;待锅中水煮沸后开始计时,30 min后停止,水煎液过滤至烧杯中备用。随后取药渣再次用水浸泡15 min后(水量酌减),开始二次煎制。二煎水沸后再次计时,20 min后停止,水煎液过滤,并与一煎过滤液合并。煎煮过程中,药液未沸时,用武火,沸后转为文火,每隔3 min左右搅拌一次。因复方中有先煎和后煎药材,因此在上述操作过程中,需将先煎药材单独煎煮10 min,随后加入其余药材,继续煎煮10 min,最后加入后煎药材,保持10 min后停止。二煎过程不存在先煎及后煎问题。两次煎煮共得药液约350 mL,相当于患者每日早晚两次服用剂量。精确量取上述煎煮液30 mL,并转移至50 mL离心管中,12 000 r·min⁻¹离心10 min;取上清液,氮气吹干,随后用70%甲醇1 mL复溶,过0.22 μm微孔滤膜,至进样小瓶中,即得。

细辛水煎液的制备(B) 精密称取细辛药材1 g,置于250 mL圆底烧瓶中,向其中加入水50 mL,回流

提取1 h, 过滤, 收集滤液, 取续滤液1 mL, 过0.22 μm 微孔滤膜, 至进样小瓶中, 即得。

细辛70%甲醇超声提取液的制备(C) 以2015版《中国药典》中细辛样品的提取方法为依据: 精密称取细辛药材1 g, 置于250 mL具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率500 W, 频率40 kHz) 40 min, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足失重, 摇匀, 过滤, 取续滤液1 mL, 过0.22 μm 微孔滤膜, 至进样小瓶中, 即得。

定性分析条件 ①超高效液相色谱条件: 样品的分离采用ACQUITY UPLC HSS T3柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , Waters), 柱温箱设定为35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长设定为260 nm; 流动相由0.2%乙酸-5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水(A): 0.2%乙酸-乙腈(B)组成, 梯度洗脱(v/v): 0 min, 95% A; 5 min, 85% A; 8 min, 82% A; 10 min, 82% A; 12 min, 80% A; 18 min, 72% A; 23 min, 5% A; 25 min, 5% A, 进样体积为2 μL , 流速为0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。②质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 扫描范围 m/z 为300~400, 正离子模式检测, 毛细管电压为4 kV, 干燥气温度230 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速15 L $\cdot\text{min}^{-1}$, 鞘气温度300 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速12 L $\cdot\text{min}^{-1}$, 雾化气压力50 psi (1 psi \approx 6.9 kPa), 采样频率0.25 s, 碰撞能量10 eV。

定量分析条件 ①超高效液相色谱条件: 样品的分离采用ACQUITY UPLC HSS T3柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , Waters), 柱温箱设定为35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长设定为260 nm; 流动相由0.2%乙酸-5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水(A): 0.2%乙酸-乙腈(B)组成, 梯度洗脱(v/v): 0 min, 95% A; 1 min, 20% A; 3 min, 50% A; 5 min, 95% A; 7 min, 95% A, 进样体积为2 μL , 流速为0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。②质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 毛细管电压3.5 kV, 干燥气温度300 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速10 L $\cdot\text{min}^{-1}$, 鞘气温度250 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速11 L $\cdot\text{min}^{-1}$, 雾化器压力45 psi, 采用MRM模式, 在正离子下进行扫描。

对照品溶液的制备 精密称取AAI对照品1 mg, 用甲醇1 mL溶解, 制备成AAI对照品母液。随后, 以10倍稀释法, 将AAI对照品母液进一步稀释至1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 作为AAI对照品储备液。另精确称取利血平对照品一定量, 制备成100 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的利血平储备液, 备用。接下来, 以2倍稀释法, 将AAI对照品储备液进行稀释, 得到一系列浓度梯度的AAI对照品溶液。取等量AAI各对照品溶液与利血平储备液, 混合均匀, 即得到一系列含有等量内标化合物的AAI对照品溶液。

线性关系考察 分别精密吸取上述各含等量内标化合物的AAI对照品溶液2 μL , 注入超高效液相色谱仪中, 在MRM模式下进行测定, 以对照品质量浓度

(X)为横坐标, 对照品与内标化合物峰面积比值(Y)为纵坐标进行线性回归, 带入Agilent MassHunter Quantitative Analysis软件(美国Agilent公司, 版本B.07.00)中, 绘制标准曲线, 并得到回归方程。

定量限和检测限 取AAI对照品储备液, 以两倍稀释法进行稀释, 在上述色谱条件下进行测定, 并对其峰面积进行积分。当AAI对照品积分面积所对应的信噪比等于3时, 将其规定为AAI的检出限; 当AAI对照品积分面积所对应的信噪比等于10时, 将其规定为AAI的定量限。

精密性 取含有内标的AAI对照品溶液, 1天内连续进样6次, 连续3天测定, 依据上述检测条件进行分析, 记录AAI及内标的峰面积, 并带入到软件的回归方程中计算其浓度及RSD。

稳定性 取样品A溶液, 分别于0、2、4、8、12和24 h按上述检测条件进行分析, 记录AAI与内标的峰面积, 并带入到软件的回归方程中计算其浓度及RSD。

重复性 取6个批次的清肺排毒汤复方, 制备成供试品溶液, 按上述检测条件进行分析, 记录AAI与内标的峰面积, 并带入到软件的回归方程中计算其浓度及RSD。

回收率 取6个批次已知AAI含量的清肺排毒汤复方, 分别加入等量对照品, 按上述样品制备及检测条件进行分析, 记录AAI与内标的峰面积, 并带入到软件的回归方程中计算其浓度及RSD。

AAI的含量测定 取供试品溶液A、B和C, 测定前分别向3种供试品溶液中各加入等量内标, 混合均匀后, 按上述检测条件进行含量测定, 并将采集所得数据带入到Agilent MassHunter Quantitative Analysis软件中进行计算, 求得3种供试品溶液中AAI的准确含量。在此基础上, 进一步对3个批次的3种供试品溶液中AAI的含量进行测定, 并以每1 g细辛计, 对其中的AAI平均含量进行统计分析。

结果

1 AAI的定性检测

根据AAI的化学结构(图1)推测, 其在上述定性检测条件下, 正离子模式中可能会有 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 离子的存在。通过提取AAI所对应的 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 一级及二级离子图(图2), 并与对照品进行比对发现, 样品A中有AAI的 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 离子存在, 且该离子为其母离子($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7$, 理论分子量 m/z 359.087 9; 实测分子量 m/z 359.088 7; ppm = -2.16); 同时谱图中也有AAI的准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 存在($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_7$, m/z 342.062 2), 但响应很低。进一步对谱图中的主要碎片离子进行推导可

知,当碰撞能量为 10 eV 时,AAI 的主要碎片离子是 $[M+H-CO_2]^+$ ($C_{16}H_{12}NO_5$, m/z 298.074 8), 次要碎片离子是 $[M+H-H_2O]^+$ ($C_{17}H_{10}NO_6$, m/z 324.053 3)。因此可根据定性分析的结果,在随后的 UHPLC-QQQ-MS/MS 定量分析中,以上述两个离子分别作为定量离子和定性离子。

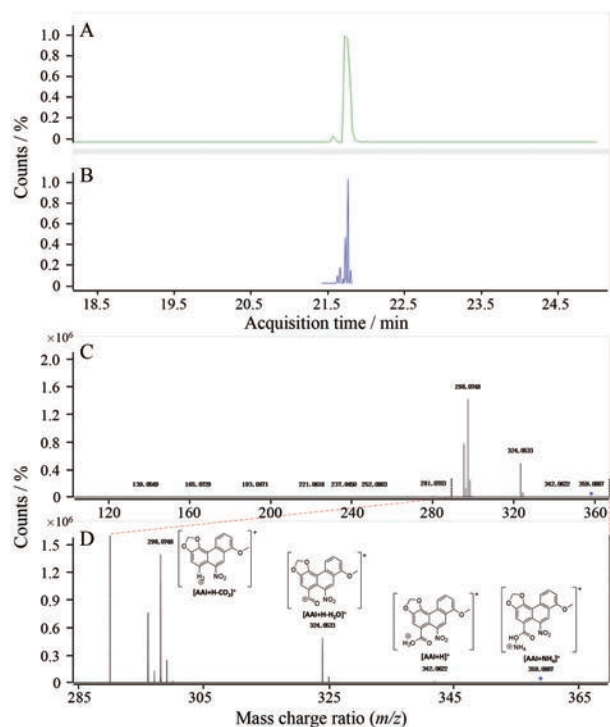


Figure 2 Extracted ion chromatogram (EIC) and fragment ion information (FII) of aristolochic acid I (AAI). A: EIC of AAI (MS); B: EIC of AAI (MS/MS); C: FII of AAI; D: The possible structures of the major fragment ions in figure C

2 MRM 模式下 AAI 及内标化合物的定性定量离子对

由于 Q-TOF 与 QQQ 在检测精密度的存在差异,因此在进行 QQQ 定量分析之前,首先还是需要样品进行全扫描。结果表明,AAI 在 QQQ 中的母离子为 m/z 359.1, 利血平的母离子为 m/z 609.3。进一步对 AAI 和利血平的毛细管电压及碰撞能量分别进行优化发现,在 MRM 模式下 AAI 的定量离子对为 m/z 359.1~298.1, 定性离子对为 m/z 359.1~324.2, 最优毛细管电压为 90 eV, 最优碰撞电压为 12 eV; 利血平的定量离子对为 m/z 609.3~195.0, 定性离子对为 m/z 609.3~174.3, 最优毛细管电压为 195 eV, 最优碰撞电压为 40 eV; 待测化合物及内标化合物的定量离子对提取色谱图见图 3。

3 线性范围及灵敏度

在上述 MRM 检测模式下,AAI 的线性回归方程

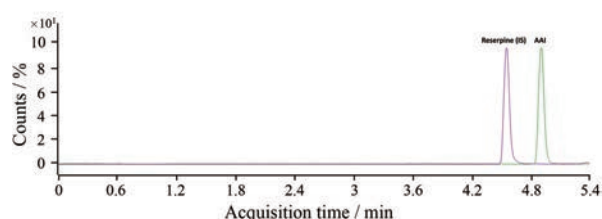


Figure 3 The MRM chromatograms (quantification ion pair) of AAI and IS in sample A

为: $Y = 1.105\ 052 X + 0.108\ 875$; $R^2 = 0.996\ 8$, AAI 在 $1.95 \sim 250\ ng \cdot mL^{-1}$ 的浓度之间呈良好的线性关系。同时,按上述分析条件所述,对 AAI 的检测限和定量限进行分析发现,AAI 的检测限为 $0.25\ ng \cdot mL^{-1}$, 定量限为 $0.98\ ng \cdot mL^{-1}$ 。

4 方法学考察

采用 MRM 模式对 AAI 的日内及日间精密度的分析结果表明,AAI 的日内精密度的 RSD 为 3.79%, 日间精密度的 RSD 为 4.29%, 由此可知仪器的精密度的良好;对 AAI 的稳定性研究结果表明,AAI 在 24 h 内的 RSD 为 2.91%, 表明样品在 24 h 内能够保持稳定;对所制备的 6 个批次的清肺排毒汤中 AAI 的测定结果表明,AAI 的 RSD 为 7.13%, 表明该方法的重复性的良好;清肺排毒汤中 AAI 的加样回收率范围为 97%~114%, RSD 为 6.26%, 表明该方法的回收率的良好的。

5 样品中 AAI 的含量

在上述检测条件下,对 3 个批次的 3 种供试品溶液中 AAI 的含量测定结果表明,以每 1 g 细辛计,样品 A 中 AAI 的平均含量约为 $0.25\ \mu g \cdot g^{-1}$; 样品 B 中 AAI 的平均含量约为 $0.53\ \mu g \cdot g^{-1}$; 样品 C 中 AAI 的平均含量约为 $1.49\ \mu g \cdot g^{-1}$ 。样品 C 中 AAI 的含量远高于样品 A 中其所对应的含量。实际使用过程中,清肺排毒汤中细辛的用量为 6 g, 因此通过计算可知,患者服用清肺排毒汤后每日可能摄入的 AAI 总量不超过 $1.5\ \mu g$ 。同时,所提供的药材中,6 g 细辛水煎液及 6 g 细辛 70% 甲醇超声提取液中 AAI 的总量分别约为 3.2 和 $9.0\ \mu g$ 。

讨论与结论

清肺排毒汤中细辛的用量超过了《中国药典》2015 年版中细辛规定的每日用量。鉴于细辛中所存在的 AAI 含量超标可能会引发肝肾毒性,因此引起了一部分专家学者及普通百姓的关注和担忧。本研究的实验结果表明,按照《中国药典》2015 年版细辛供试品溶液的制备方法,制得的 3 批样品中(样品 C),AAI 的平均含量测定结果约为 0.000 15%, 低于《中国药典》中细辛所含 AAI 含量的限定要求(不高于 0.001%), 表明药材

的选取合格。同时,通过实验结果可知,模拟复方水煎,采用水回流提取法制得的细辛供试品溶液中AAI的含量(0.000 053%)明显低于按照《中国药典》所制得的细辛供试品溶液中AAI的含量;导致这一现象的主要原因与AAI的水溶性差有关。而清肺排毒汤中AAI的含量测定结果更低(0.000 025%),仅为依照《中国药典》所制供试品溶液中的17%左右,为细辛水煎液的50%左右。推测其原因除与AAI的水溶性差有关之外,也可能与复方提取所用料液比低,供试品溶液煎煮时间短及其他药材对于AAI浸出抑制等因素有关。

最后,以《中国药典》中细辛药材的每日最大用量3 g,每克细辛中AAI的最大限量0.001%为标准进行计算,患者每日摄入的AAI理论上不得超过30 μg。对于清肺排毒汤而言,患者每日可摄入的AAI最大量仅为1.5 μg,远低于《中国药典》中对于细辛中AAI的限量标准。同时,所提供的6 g细辛水煎液及细辛70%甲醇超声提取液中,AAI的含量分别约为3.2和9.00 μg,也均明显低于《中国药典》的限量标准。因此,本研究认为,通过筛选药材来源,将AAI含量低的药材作为供应品时,可以酌量的增加细辛的用量;另外,在含有细辛的复方水煎液中,AAI的浸出也会在一定程度上受到抑制。因此本研究认为在清肺排毒汤日常的治疗和使用过程中可正常使用,无需过分担忧。综上,本研究不仅为中药复杂处方中AAI的定性定量检测提供了有效方法和数据支撑,同时也为清肺排毒汤中细辛的合理使用提供了科学依据。

作者贡献: 陈奕君主要负责实验具体实施、数据处理及文章撰写;王伟主要负责实验样品提供及实验方案设计;肖红斌主要负责实验方法指导、仪器设备供给及文章修订。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] National Health Commission of the People's Republic of China. Notice on the issue of the diagnosis and treatment programme for the COVID-19 (pilot version 6) [EB/OL]. 2020-02-19 [2020-02-27]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7652m/202002/54e1ad5c2aac45c19eb541799bf637e9.shtml>.
- [2] Office of the National Health Commission of the People's Republic of China, and National Administration of Traditional Chinese Medicine. The recommendation of 'Qing Fei Pai Du Decoction' in the treatment of COVID-19 infection using the combination of traditional Chinese and Western medicine [EB/OL]. 2020-02-07 [2020-02-27]. https://mp.weixin.qq.com/s/_PceHDFnRf8_T5g0JnPF6A.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015, 6: 230-231.
- [4] Liang S, Yang Q, Li RL, et al. Determination of aristolochic acid A in 13 kinds of traditional Chinese patent medicines by UPLC-MS/MS [J]. West China J Pharm Sci (华西药科学杂志), 2020, 35: 078-081.
- [5] Gao Y, Xiao XH, Zhu XX, et al. Study and opinion on toxicity of aristolochic acid [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 4049-4053.
- [6] Liang AH, Gao Y, Zhang BL. Safety problems and countermeasures of traditional Chinese medicine containing aristolochic acid [J]. China Food Drug Adm Mag (中国食品药品监管), 2017, 17-20.
- [7] Ma HY, Wu JJ, Ge GB, et al. Research progress on metabolism and toxicity of aristolochic acid *in vivo* [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2019, 21: 182-189.
- [8] Qin ZN, Wang MX, Shi NN, et al. Rationality of asarum in Qing-feipaidu Decoction based on literature analysis [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20200305.501.
- [9] Liu J, Xiao HB. Research progress on pharmacodynamics substances of Chinese Medicine based on chromatographic techniques [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 73-81.
- [10] Wu H, Wang JQ, Yang YW, et al. Preliminary exploration of the mechanism of Qingfei Paidu decoction against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 374-383.