

doi: 10.12452/j.fxcxb.26062905

中心切割二维液相色谱-质谱法测定中成药中马兜铃酸-I的含量

胡乐妍^{1,3}, 张艳海^{2*}, 孙思淇¹, 孙学飞², 李笃信^{3*}, 王丽红¹

(1. 佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 纳谱分析技术(苏州)有限公司, 江苏 苏州 215009;
3. 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215031)

摘要: 本研究建立了一种基于反相色谱与混合模式色谱相结合的中心切割二维液相色谱-单四极杆质谱(2D-LC-MS)联用分析方法, 用于7种中成药中马兜铃酸-I (Aristolochic acid I, AA-I)的含量测定。一维分离采用ChromCore AR C₁₈反相色谱柱, 以乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 将目标组分AA-I在线切割并富集至反相/弱阴离子交换(RP/WAX)混合模式捕集柱; 二维分离采用RP/WAX混合模式分析柱, 以乙腈-100 mmol/L乙酸铵缓冲溶液(pH 3.9)为流动相进行梯度洗脱; 质谱检测采用电喷雾正离子选择离子监测(ESI⁺-SIM)模式, 监测离子为 m/z 359和 m/z 298。结果表明, 各中成药样品中AA-I色谱峰与基质干扰物均达到良好分离; AA-I在2~100 ng/mL浓度范围内线性关系良好, 相关系数 $r=0.9997$; 以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别计算检出限(LOD)与定量限(LOQ), 结果分别为0.13 ng/mL和0.44 ng/mL; 平均加标回收率为100.4%。综上, 该方法专属性强、灵敏度高、定量准确可靠, 适用于中成药中AA-I的筛查与定量测定。

关键词: 马兜铃酸-I; 混合模式色谱; 二维液相色谱; 细辛; 单杆质谱; 中成药

中图分类号: O657.7; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-09

Determination of Aristolochic Acid-I in Chinese Patent Medicines by Heart-cutting Two-dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometry

HU Le-yan^{1,3}, ZHANG Yan-hai², SUN Si-qi¹, SUN Xue-fei², LI Du-xin³, WANG Li-hong¹

(1. School of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. Nanochrom Analysis Technology (Suzhou) Co., Ltd., Suzhou 215009, China; 3. School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215031, China)

Abstract: Aristolochic acid I (AA-I) is a naturally occurring toxic compound belonging to the nitrophenanthrene class, which exhibits confirmed nephrotoxicity and presents a strong carcinogenic risk. AA-I is widely distributed in Aristolochia and Asarum species, both of which are members of the Aristolochiaceae family, and is also found in related compound formulations of traditional Chinese medicine. The 2025 edition of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I) has included an HPLC limit test for AA-I in Asarum crude drugs. However, compound TCM preparations possess complex matrices in which coexisting impurities introduce severe interference. Conventional liquid chromatography methods are markedly insufficient in such cases, as they fail to achieve both precise separation and accurate quantification of AA-I. To address these limitations, the present study established a novel analytical approach based on heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with single-quadrupole mass spectrometry, designated as 2D-LC-MS. This technique integrates reversed-phase chromatography with mixed-mode chromatography and was applied to determine AA-I content in a total of seven TCM compound preparations. For the first-dimensional separation, a ChromCore AR C₁₈ column with reversed-phase characteristics was utilized. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid aqueous solution, and

收稿日期: 2026-06-29; 修回日期: 2026-07-28

* 通讯作者: 李笃信, 博士, 研究方向: 药物分析, E-mail: duxin.li@suda.edu.cn;

张艳海, 博士, E-mail: zhangyanhai@nanochrom.com

网络首发日期: XXXX-XX-XX

gradient elution was performed throughout the separation. The target analyte, AA-I, was subjected to online heart-cutting and subsequently enriched onto a reversed-phase/weak anion-exchange (RP/WAX) mixed-mode trap column. In the second dimension, an RP/WAX mixed-mode analytical column was employed with a mobile phase comprising acetonitrile and 100 mmol/L ammonium acetate buffer adjusted to pH 3.9, and gradient elution was also applied. Mass spectrometric detection was conducted in the positive-ion mode using electrospray ionization, with selected-ion monitoring (SIM) adopted for data acquisition at the monitored ions of m/z 359 and m/z 298. The experimental results demonstrated that AA-I peaks achieved satisfactory separation from matrix interferences in all tested samples. The method exhibited excellent linearity over the concentration range of 2–100 ng/mL for AA-I, with a correlation coefficient (r) of 0.9997. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), calculated at signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively, were determined to be 0.13 ng/mL and 0.44 ng/mL. The average spiked recovery rate was 100.4%. In summary, the proposed method demonstrates strong specificity, high sensitivity, and reliable quantitative accuracy. It is therefore well suited for both screening purposes and routine quantitative analysis of AA-I in TCM compound preparations.

Key words: aristolochic acid-I (AA-I); mixed-mode chromatographic (MMC); two-dimensional liquid chromatography (2D-LC); *Asarum*; single quadrupole mass spectrometer; chinese patent medicines

马兜铃酸类化合物 (Aristolochic Acid Analogues, AAAs) 是一类以硝基菲为母核结构的天然产物, 主要分布于马兜铃科的马兜铃属及细辛属植物中^[1]。早期含马兜铃酸的药用植物被广泛应用于临床, 而后续研究证实, 马兜铃酸类化合物可诱导基因突变, 具有肾毒性与致癌性, 已被世界卫生组织 (WHO) 列为 I 类致癌物^[2]。其中, 马兜铃酸-I (AA-I) 在同类化合物中毒性最强, 且几乎存在于所有的马兜铃科的中药中^[3]。《中国药典》(2025 版) 记载了潜在含有马兜铃酸成分的中药材和中成药达 55 种, 而目前已上市的潜在含有马兜铃酸的中药材及中成药达 300 余种^[4-5]。因此, 建立准确、可靠的 AA-I 含量测定方法, 对保障临床用药安全具有至关重要的意义。

目前, 马兜铃酸类化合物 (AAAs) 的分析检测技术种类繁多, 主要包括荧光传感器法、酶联免疫吸附法、毛细管电泳法、电化学分析法、高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 等^[6-11]。其中, HPLC 因具有良好的稳定性与可靠性, 成为 AA-I 及 AAAs 检测中最常用的分析手段, 但常规 HPLC-紫外检测法 (HPLC-UV) 灵敏度偏低、抗基质干扰能力较弱, 仅适用于基质组分简单的单味药材中 AA-I 测定; 高效液相色谱-荧光检测法 (HPLC-FLD) 虽灵敏度较高, 但需对 AA-I 进行衍生化处理, 操作繁琐, 且中药基质中存在的马兜铃内酰胺类成分会干扰 AA-I 的准确定量^[12]; 超高效液相色谱-串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 检测性能优异, 但仍面临基质效应抑制检测灵敏度的问题^[13-14], 且仪器多依赖进口、运行维护费用高, 限制了其在监管部门和医药企业的推广。鉴于现有方法难以满足中成药复杂基质中痕量 AA-I 的精准检测需求, 开发一种操作简便、分离高效、灵敏度优异且定量准确的普适性分析方法, 实现中药制剂中 AA-I 的专属测定, 已成为当前质量控制领域的迫切需求。

二维液相色谱 (2D-LC) 通过将两种选择性不同的色谱模式相结合, 有效提升系统峰容量与分离选择性, 近年来在中成药等复杂基质分析中得到了广泛应用, 并在细辛药材 AA-I 的定量检测中初步展现了技术优势^[15-16]。目前报道的二维液相方法多采用反相-反相 (RP-RP) 组合^[17], 分离选择性差异有限, 对于基质极端复杂的含细辛中成药, 仍难以实现 AA-I 与干扰组分的基线分离。混合模式色谱 (MMC) 可通过多种保留机制的协同作用提供独特的分离选择性, 相比传统单一模式色谱具有更优的选择性、更高的样品负载容量及更宽的应用范围^[18]。本研究首次将反相/弱阴离子交换 (RP/WAX) 混合模式色谱引入二维液相体系, 利用 AA-I 结构中羧基与弱阴离子交换固定相之间的离子交换作用, 构建与一维反相色谱正交的分离机制, 并通过系统筛选不同离子交换强度的色谱柱获得最优分离选择性, 建立了基于 RP/WAX 混合模式色谱的中心切割二维液相色谱-单杆质谱 (2D-LC-MS) 分析方法。与已有二维液相方法相比, 本方法在分离选择性调控方面更具灵活性, 如通过调节流动相 pH 和盐浓度可独立优化离子交换保留行为, 从而在不改变疏水选择性的前提下实现对分离的调控, 显著提升 AA-

I与中成药复杂基质干扰组分的分离度,有效降低基质效应,在单级质谱检测条件下即可实现痕量AA-I的准确定量。本文将该方法应用于九味羌活丸、辛芩颗粒、镇脑宁胶囊等7种含细辛或马兜铃科药材的中成药中AA-I的含量测定,旨在为中成药中AA-I的常规筛查与质量控制提供可靠的技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

仪器:Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统(美国安捷伦科技公司),包括:四元泵(G7104A);四元泵(G7111B);自动进样器(G7129B),柱温箱(G7116B);阀切换单元(G1170A,含一个2位置6通切换阀),单杆质谱检测器(MSD iQ, G6160A);软件采用:Agilent OpenLab CDS软件,版本2.6。ChromCore AR C18(250×4.6 mm, 5 μm, PN: A401-050012-04625S), Prototype MMC-1/-2/-3(3种具有不同离子交换能力,且疏水保留相当的MMC色谱柱,150×2.1 mm, 5 μm),捕集柱Prototype MMC-3(10×4.6 mm, 5 μm), ChromCore SAA(150×2.1 mm, 5 μm, PN: S014-050018-02115S)(纳谱分析(苏州)有限公司)。KQ-250E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、MC-15Pro离心机(浙江省群安科学仪器有限公司)、BSA124S万分之一分析天平(德国Sartorius公司)。

试剂:乙腈、甲醇(色谱级,上海星可公司),去离子水(18.2 MΩ/cm, Millipore纯水机),磷酸(分析纯,浓度85%,国药集团),乙酸铵(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),乙酸(色谱纯,国药集团)。AA-I对照品(批号:2354340,纯度:98.2%,上海安谱瑞世标准技术服务有限公司)。

材料:九味羌活丸(JWQH pill,批号:230101)、辛芩颗粒(XQ granule,批号:231118)、镇脑宁胶囊(ZNN capsule,批号:230208)、追风透骨丸(ZFTG pill,批号:R10034)、杜仲壮骨胶囊(DZZG capsule,批号:230512)、止咳化痰颗粒(ZKHT granule,批号:240103)、龙胆泻肝丸(LDXG pill,批号:20230506)均购于药店。

1.2 标准溶液的配制

称取AA-I标准品5 mg,置于5 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成浓度为1 mg/mL的标准储备溶液,于4℃下密封保存。量取适量标准储备液,用甲醇逐级稀释制成浓度为1.0 μg/mL的中间液,再精密移取适量中间液,用70%甲醇溶液逐级稀释,制成浓度分别为200、100、40、20、10、4和2 ng/mL的标准溶液。

1.3 样品前处理

取供试品(九味羌活丸、辛芩颗粒、镇脑宁胶囊、追风透骨丸、杜仲壮骨胶囊、止咳化痰颗粒、龙胆泻肝丸)适量,研细,称取约1~2 g,细辛药材0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇10 mL,其中细辛药材加入25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)30 min,取出,放置室温,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,取适量提取液以10000 r/min高速离心5 min,取上清液,即得^[11]。

基质效应考察:取龙胆泻肝丸的提取溶液2份,每份800 μL,分别精确加入浓度分别为50和100 ng/mL的AA-I标准品溶液各200 μL,涡旋混匀后,上机分析;另取相同浓度的AA-I标准品溶液各200 μL,分别加70%甲醇各800 μL,涡旋混匀,分别作为溶剂的对照溶液,上机分析,考察质谱的基质效应。按照公式(1)进行计算。

$$\text{基质效应因子(MF)} = \frac{\text{空白样品基质加待测物的响应}}{\text{空白溶剂加待测物的响应}} \quad (1)$$

1.4 二维液相色谱分离条件

第一维(¹D)色谱条件:ChromCore AR C18色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm);流动相:A为0.05%磷酸水溶液,B为乙腈;梯度洗脱程序:0~0.5 min,30%B;0.5~10 min,30%~34%B;10~18 min,34%~35%B;18~20 min,35%~45%B;20~30 min,45%B;30~31 min,45%~53%B;31~35 min,53%B;35~

40 min, 53%~100%B; 40~45 min, 100%B; 45~46 min, 100%~30%B; 46~65 min, 30%B。流速: 1 mL/min; 进样体积: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C;

第二维 (2 D) 色谱条件: Prototype RP/WAX 色谱柱 (150 $\times$ 2.1 mm, 5 μ m); 捕集柱为 Prototype RP/WAX 色谱柱 (10 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: A 为水, B 为乙腈, C 为 100 mmol/L 乙酸铵 (用乙酸调 pH = 3.9); 梯度洗脱程序: 0~36 min, 5%B, 50%C; 36~36.5 min, 5%B, 50%~5%C; 36.5~37 min, 5%B, 5%C; 37~38 min, 5%~80%B, 5%C; 38~50 min, 80%B, 5%C; 50~51 min, 80%B, 5%~20%C; 51~65 min, 80%B, 20%C。流速: 0.6 mL/min。中心切割二维液相色谱系统连接见图 1, 其中 0~34.4 min, 阀位置 1-2; 34.4~35 min, 阀位置 1-6, AA-I 被切割至捕集柱中; 35~65 min, 阀位置 1-2, AA-I 通过第二维分析流动相被转移至第二维色谱柱中, 并开始第二维的分离分析。

质谱采用 ESI 离子源和正离子扫描模式, 毛细管电压 (Capillary voltage) 为 3.5 kV; 干燥气流量 (Gas flow) 11 L/min; 雾化压力 (Nebulizer) 为 3.45×10^5 Pa; 干燥气温度 (Gas temperature) 为 325 $^{\circ}$ C; 选择离子监测 (SIM), m/z 为 359 和 298, 碎裂电压 (Fragmentor) 分别为 65 V 和 135 V; 采集频率为 5 Hz; 其中 53 min~65 min 进质谱检测。

2 结果与讨论

2.1 常规 LC-UV 及 LC-MS 分离

实验首先采用 2025 版药典一部细辛检查项下 AA-I 的液相色谱条件对细辛和九味羌活丸进行了测定。由图 2a 可见, 细辛药材中含有微量的 AA-I, 虽与前面干扰峰分离尚可, 但易受到干扰峰的影响。而含细辛的复方制剂九味羌活丸的基质组成更为复杂, AA-I 与基质干扰峰完全重叠, 无法实现 AA-I 的定量。

本文参考药典委发布的液质联用方法对中药成方制剂龙胆泻肝丸和辛芩颗粒进行了测定^[19], 由图 2b 可见, 采用单杆质谱的 SIM 模式, 选择 m/z 359 进行检测, 结果对比不含 AA-I 的阴性样品龙胆泻肝丸及其加标样品溶液, AA-I 均存在显著的基质干扰; 对于含有 AA-I 的辛芩颗粒样品, AA-I 也受到基质峰干扰, 方法专属性欠佳, 无法实现对 AA-I 的准确定量。因此采用超高效液相色谱-单杆质谱 (UHPLC-MSD) 的方法检测一些中成药中 AA-I 具有一定局限性。

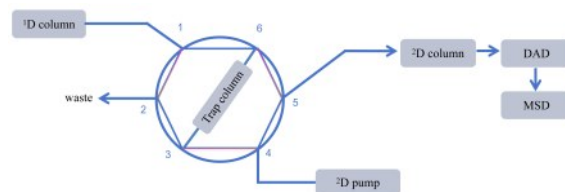


图 1 在线二维液相色谱-质谱联用系统流程图

Fig. 1 The flowchart of online heart-cutting 2D-LC-MSD system

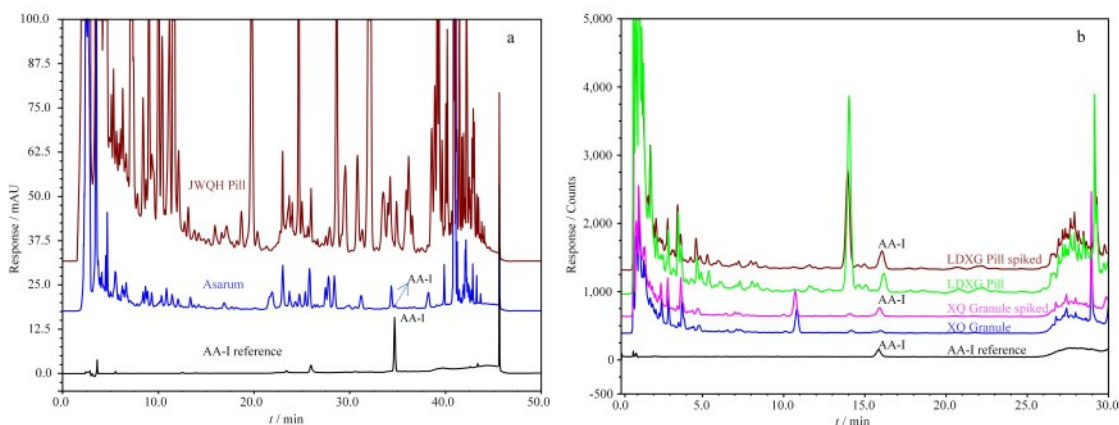


图 2 采用 (a) 常规 LC-UV 方法与 (b) UHPLC-MS 方法的 AA-I 对照溶液与样品的分离谱图

Fig. 2 Chromatograms of AA-I reference solution and sample using (a) conventional LC-UV method and (b) UHPLC-MS method

2.2 基于 RP-MMC 的 2D-LC 方法建立

2.2.1 第二维色谱柱的筛选及保留机制探究 为构建具有良好正交分离选择性的在线二维液相色谱体系, 本文选取了三款疏水保留能力相近、离子交换特性不同的 RP/WAX 色谱柱 (Prototype MMC-1/2/3) 进行测试。实验采用 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液 (pH=5.2) 与乙腈作为流动相, 通过分段梯度洗脱程序探究 AA-I 的色谱保留规律: 首先固定流动相中盐浓度为 10 mmol/L, 有机相在 1~20 min 从 5%B 线

性梯度变化到80%B, 并保持80%B比例5 min, 考察AA-I 随有机相增加的洗脱行为变化; 在25~25.2 min 流动相中盐浓度从10 mmol/L增加至20 mmol/L, 并保持有机相80%B的比例不变, 考察AA-I 随盐浓度增加的保留行为变化。由图3a可知, AA-I 在3个不同的MMC色谱柱以及ChromCore SAA色谱柱上的保留均强于反相ChromCore AR C18, 表明AA-I 在MMC色谱柱上除疏水保留外, 叠加了显著的离子交换作用, 增强了AA-I 的保留, 也使得Prototype MMC色谱柱更适合作为第二维色谱柱, 而不会受到第一维的目标馏分中高比例的有机溶剂所引起的溶剂效应对第二维分离造成的影响; 其次, 对比3个不同离子交换能力的RP/WAX色谱柱(Prototype MMC-1/2/3), 结果AA-I 的保留差异显著, 随色谱柱的离子交换能力的增强(离子交换强弱: Prototype MMC-1 < MMC-3 < MMC-2 < ChromCore SAA), AA-I 的保留也逐渐增强, 其中AA-I 在离子交换能力较强的ChromCore SAA上未能出峰。然而, 考虑到较弱的离子交换保留作用会压缩方法优化的空间; 但离子交换保留过强时, 会导致峰展宽, 且需使用更高浓度盐才能洗脱, 而高浓度的乙酸铵及峰展宽均会降低检测灵敏度, 因此最终选择Prototype MMC-3作为第二维分析柱。

实验在保持相同有机相和缓冲溶液比例下(80/20, v/v, 乙腈/100 mmol/L 乙酸铵)下, 进一步考察了乙酸铵溶液的pH值对AA-I 在Prototype MMC-3色谱柱上保留的影响, 由图3b可知, AA-I 在pH3.9、4.7和5.2下保留略有差异, 其中在pH4.7下保留较强。然而, 在pH3.9、4.7、5.2下目标峰的信噪比分别为1922、420和540, 表明低pH条件显著提升了AA-I 的离子化效率, 响应灵敏度最佳。综合考虑色谱保留与检测灵敏度, 尽管pH4.7保留更强, 但灵敏度增益对痕量分析更为关键, 且保留差异可通过梯度调节予以补偿, 因此实验最终选择pH 3.9作为乙酸铵溶液的最优pH值。

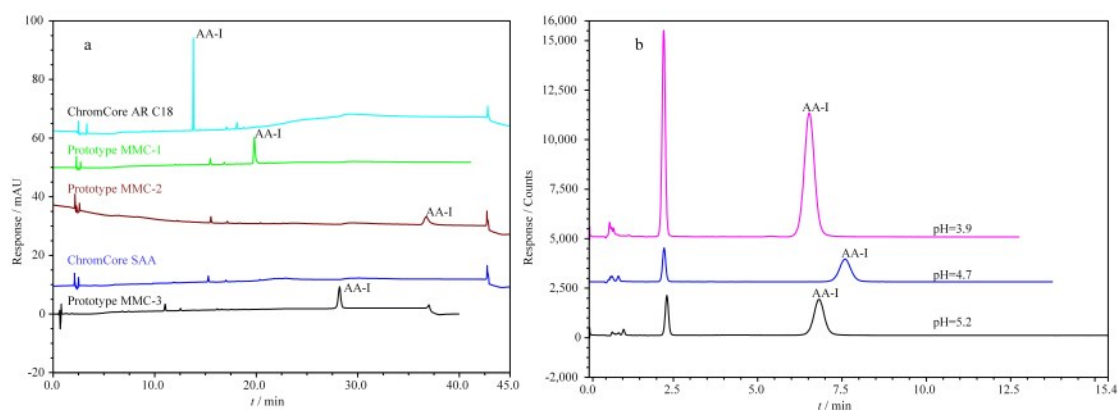


图3 AA-I 在(a)不同离子交换能力的MMC色谱柱以及(b)不同乙酸铵缓冲液pH值下的对比谱图

Fig. 3 Comparison chromatograms of AA-I obtained on (a) RP/WAX columns with different ion-exchange capacities and (b) at different pH values of ammonium acetate buffer

2.2.2 捕集柱的二维接口考察 二维接口的选择是二维液相方法开发的重要因素。其中基于固相辅助调制接口(Stationary Phase Assisted Modulation, SPAM), 即捕集柱接口在解决二维溶剂相容性较差和有效克服溶剂效应的影响上优于定量环^[20]。因此本次实验优先选择了捕集柱的接口。为匹配第二维已确认的Prototype MMC-3色谱柱的分离选择性, 实验选取规格为(10×4.6 mm, 5 μm)的Prototype MMC-3作为捕集柱。为验证捕集柱对AA-I 的捕集效果, 实验在保持第一维分离条件下, 从AA-I 在第一维色谱柱上的峰起点(34.4 min)开始, 将阀切换到位置1-6, AA-I 被转移至捕集柱中, 并保持第一维分析柱与捕集柱串联。由图4a可见, 在34.4 min~46.2 min内未见AA-I 被洗脱, 说明捕集柱具有良好的捕集或保留AA-I 的能力; 按照1.4项下的液相色谱条件和阀切换过程, 将第二维分析柱换成二通进行测试, 考察AA-I 从捕集柱上的洗脱过程, 由图4b可见, AA-I 可被第二维的流动相有效洗脱, 且对称性较好($T_f=1.23$), 从而保证第二维的分离效果。

2.2.3 第二维梯度条件的优化 由于含AA-I 的中药处方制剂的基质化学成分极为复杂, 使用前述确定的Prototype MMC-3的混合模式色谱柱作为第二维色谱柱, 通过调整流动相中有机溶剂和缓冲溶液浓度的洗脱过程, 可有效优化AA-I 与基质干扰峰的分离效果。结合中心切割程序, 在34.4~35 min 区间截取九味羌活丸一维色谱的AA-I 目标馏分并导入第二维色谱系统, 该切割过程见图5。

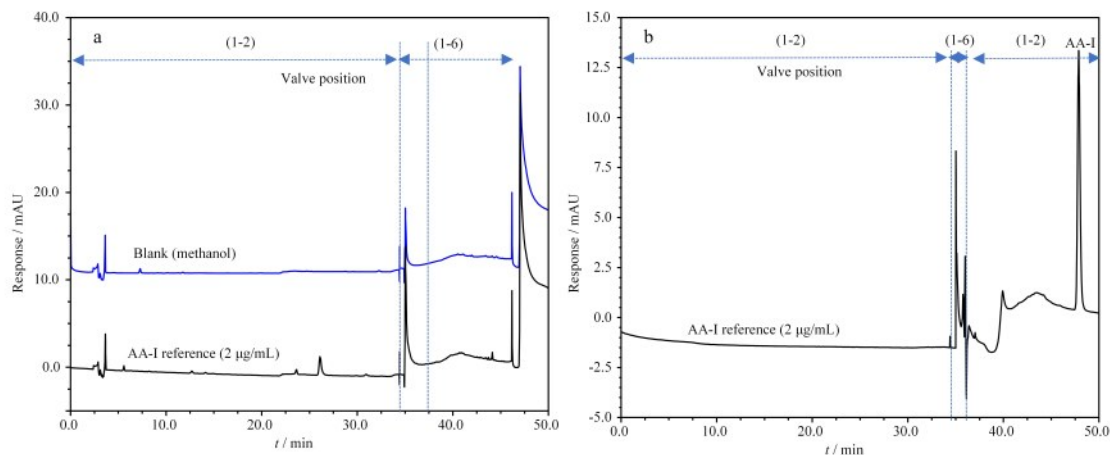


图4 RP/WAX捕集柱的 (a) 捕集和 (b) 洗脱测试谱图

Fig. 4 Investigation chromatograms of (a) trapping and (b) elution using an RP/WAX trap column

在九味羌活丸的色谱条件优化中, 实验保持 1.4 项下的第一维的分离条件不变, 将 AA-I 切换到第二维色谱柱后, 考察了第二维的不同梯度洗脱过程对 AA-I 与基质干扰峰分离的影响。由图 6 可见, 通过调整有机相 (80%B) 和低比例缓冲溶液 (5%C) 的洗脱时间, 样品基质中疏水保留较强的干扰峰与 AA-I 的分离得到有效改善, 继续提高缓冲溶液的比例到 20%C, AA-I 被快速洗脱和检测, 最终确定第二维的洗脱条件 (见 1.4 项下第二维梯度条件)。因此基于 MMC-3 色谱柱, 通过灵活调整流动相中有机溶剂和缓冲溶液浓度可有效控制及优化干扰物与 AA-I 的分离选择性, 从而改善分离。

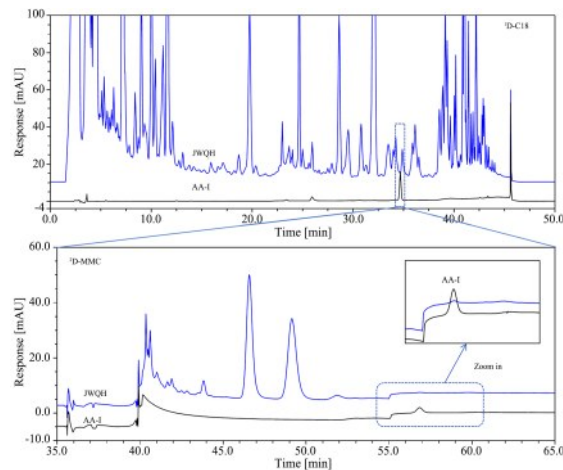


图5 AA-I标准品和九味羌活丸样品的¹D和²D谱图
Fig. 5 One-dimensional (¹D) and two-dimensional (²D) spectra of the AA-I standard substance and JwQH Pill samples

2.3 方法验证

2.3.1 方法专属性考察 实验以九味羌活丸为例考察了方法的专属性。按照九味羌活丸的处方组成, 去除细辛外的其它药材, 制备阴性对照样品, 并按照 1.3 项下的样品前处理方法, 制备阴性对照测试溶液, 同时取细辛药材和九味羌活丸样品, 进样分析。结果由图 7 可见, 阴性样品不干扰 AA-I 的测定, 表明本法专属性良好。因受试样品数量多、处方复杂, 本次仅采用代表性样品完成验证, 未能覆盖所有制剂, 存在研究局限。

2.3.2 基质效应考察 按照前述确定的分析条件, 在 AA-I 的浓度分别为 10 ng/mL 和 20 ng/mL 下, 以龙胆泻肝丸为空白样品基质, 考察质谱的基质效应。结果测得基质效应分别为 97.9% 和 100.64%, 表明本方法的基质效应较小, 完全满足方法测定要求^[19] (参考标准要求为 90~110%)。也说明使用二维液相色谱方法能有效降低基质效应的影响。

2.3.3 线性关系、检出限与定量限 取不同质量浓度的 AA-I 标准溶液, 按“1.4”项下色谱条件进样测定。以 AA-I 的质量浓度为横坐标 (x , ng/mL), 以峰面积为纵坐标 (y) 绘制标准曲线, 进行线性回归分析。结果显示, AA-I 在 2~100 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好, 线性方程为 $y=67.0676x+40.2976$, 相关系数 $r=0.9997$ ($r \geq 0.999$), 表明本法线性相关性良好, 满足定量分析要求。分别以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 计算 AA-I 的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 结果 AA-I 的 LOD 为 0.13 ng/mL, LOQ 为 0.44 ng/mL。

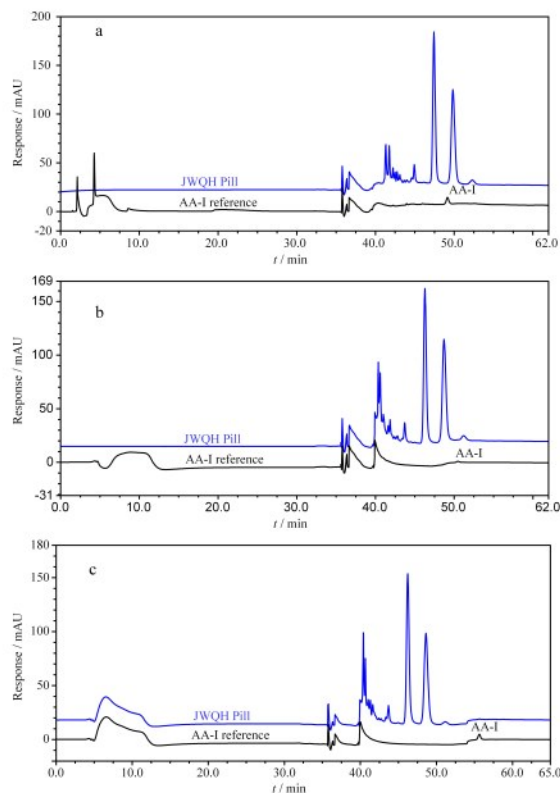


图6 在不同梯度洗脱条件下九味羌活丸的²D分离谱图

Fig. 6 ²D Chromatograms of JWQH pill under different gradient elution conditions
a-c, Chromatograms of ²D under gradient conditions 1, 2, and 3, respectively (see supplementary data for the gradient conditions)

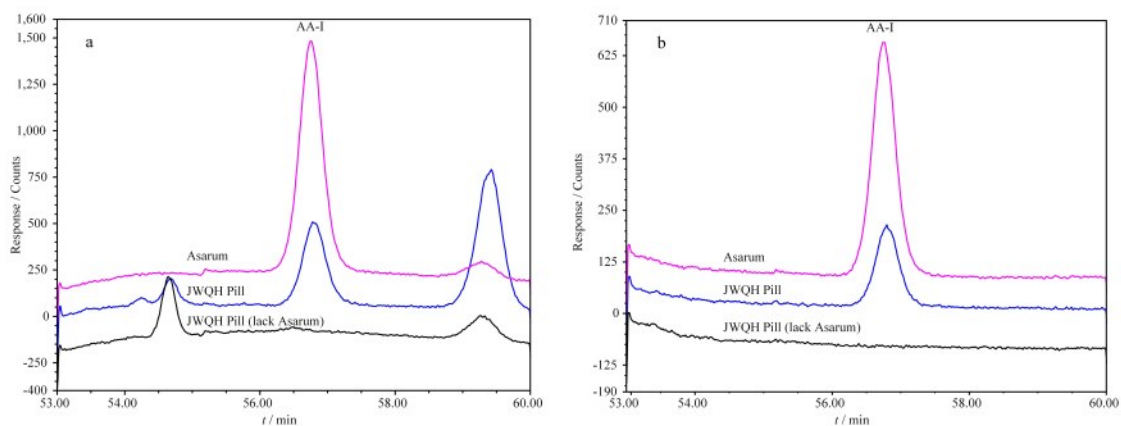


图7 缺少细辛的九味羌活丸阴性对照样品、九味羌活丸以及细辛分别在 (a) m/z 359 和 (b) m/z 298 下的SIM对比色谱图

Fig. 7 Comparative SIM chromatograms of negative control sample of JWQH pill (lack Asarum), JWQH pill, and Asarum, acquired at (a) m/z 359 and (b) m/z 298

2.3.4 重复性 取同一批九味羌活丸样品, 按“1.3”项下样品前处理方法平行制备 5 份样品溶液, 在确定的色谱条件下进样测定, 记录 AA-I 的峰面积并计算相对标准偏差 (RSD)。结果显示, AA-I 峰面积的 RSD 为 4.95%, 表明所建立的分析方法重复性良好。

2.3.5 加标回收率 取已知 AA- I 含量的辛芩颗粒样品, 分别加入低、中、高 3 个浓度水平 50.0 ng、100.0 ng、200.0 ng 的 AA- I 标准品, 并按照“1.3”项下的样品前处理方法制备溶液, 计算加标回收率。结果 AA- I 在 3 个加标水平下的加标回收率在 94.7~109.4%, 平均加标回收率为 100.4%, 表明所建方法准确度良好, 结果见表 1。

表 1 AA- I 在辛芩颗粒样品中的加标回收率
Table 1 Recovery rates of AA- I in Xinqin Granule samples

Number	Background/ (ng)	Added/ (ng)	Found/ (ng)	Recovery/%
1	30.9	50.0	85.6	109.4
2	30.9	100.0	128.0	97.1
3	30.9	200.0	220.4	94.7

2.4 实际样品测定

分别取九味羌活丸、镇脑宁胶囊、追风透骨丸、止咳化痰颗粒、杜仲壮骨胶囊、辛芩颗粒、龙胆泻肝丸等样品, 按照 1.3 项下的样品前处理方法, 制备上机溶液, 并按照确定的方法测试样品中 AA- I 的含量。由各样品的分离谱图 (图 8) 所示, AA- I 在两个选择离子监测通道下均与基质组分分离较好, 未观察到明显干扰; 选择 m/z 359 作为定量通道, 测得各样品中 AA- I 的含量结果见表 2; 同时选择主要特征碎片离子 m/z 298 作为定性通道, 可进一步确认 AA- I。从表 2 的测试结果可见, 各中成药因处方组成中对应药材、使用量以及制剂工艺的不同, 测得 AA- I 在不同复方制剂样品中的含量差异较大。相较于 UHPLC-MS/MS, 本方法采用常规二维液相色谱系统, 仪器成本和日常维护要求均大幅降低, 更适合普通实验室的配备条件; 虽然单针分析时间略长, 但其在线净化-分离一体化的设计省去了离线前处理步骤, 在常规批量化监测任务中仍能保持可接受的通量水平。且本研究检出灵敏度较高, 能够对低含量的马兜铃酸类成分进行定量, 可结合中成药的日服用量以及 AA- I 的安全摄入量评估中药的安全性, 为中成药制定合理的限度提供数据参考。

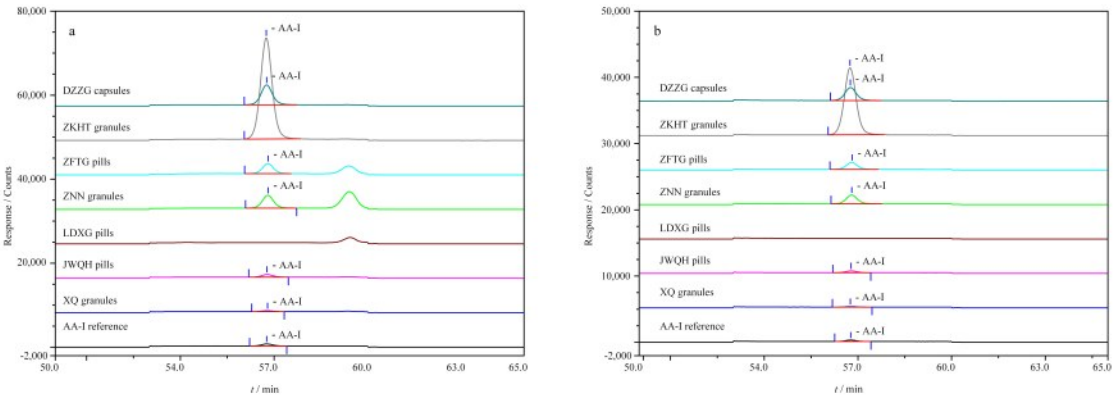


图 8 7 个中成药分别在 (a) m/z 359 和 (b) m/z 298 的 SIM 色谱图
Fig. 8 SIM chromatograms of the seven Chinese patent medicines at (a) m/z 359 and (b) m/z 298

表 2 7 种中成药中 AA- I 的含量测定结果
Table 2 Determination results of AA- I in seven Chinese patent medicines (CPMs)

CPMs	Quantity of medicinal ingredients	Herbal material corresponding to AA- I	Dosage of corresponding CPMs (g)	Content ($\mu\text{g/g}$)
JWQH Pills	9	Asarum	50	0.093
XQ Granules	10	Asarum	200	0.015
ZNN Granules	9	Asarum	37.31	0.585
ZFTG Pills	23	Asarum	100	0.332
DZZG Capsules	23	Aristolochia mollissima/Asarum	16.2	1.524
ZKHT Granules	25	Aristolochia	/	5.153
LDXG Pills	10	Akebia stem	/	0

3 结 论

本研究采用二维液相色谱法, 建立了七种中成药中马兜铃酸- I (AA- I) 的含量测定方法。针对

中成药基质组分复杂、易对 AA-I 检测产生干扰的技术难题，本研究确立了采用基于反相/离子交换作用的混合分离模式为核心的中心切割二维液相色谱策略，实验筛选了不同离子交换强度的 MMC 色谱柱，确定了优选批次，并优化梯度、pH 值等关键条件，获得了 AA-I 与基质干扰组分的良好分离，实现 AA-I 的精准的定量检测。经方法学验证，所建方法准确度高、重复性好、可靠性强，可为中药制剂中 AA-I 的痕量检测提供科学可行的分析技术支撑。由于中成药品种多、处方复杂，本次未对全部七种中成药逐一完成专属性、加标回收率等方法学考察。下一步将针对每一种中成药补充完善对应的验证试验，全面提升方法的完整性与稳定性。此外，后续可依托本方法获取的实际检测数据，深入开展中成药中 AA-I 限量标准研究，从而满足药品监管法规与中药行业高质量发展需求。

参考文献：

- [1] Wang Z, He B, Liu Y, Huo M, Fu W, Yang C, Wei J, Abliz Z. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, **2020**, 10 (6): 1083-1093.
- [2] Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Galichet L, Coglian V, WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol.* **2009**, 10 (1): 13-14.
- [3] Tian J Z, Liu S Y, Gao Y, Zhang B L, Liang A H. *China Journal of Chinese Materia Medica* (田婧卓, 刘素彦, 高月, 张伯礼, 梁爱华. 中国中药杂志), **2022**, 47 (14): 3693-3700.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 1*. Beijing: China Medical Science Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 中国医药科技出版社), **2025**: 230.
- [5] Shao X, Zhang Y, Zheng Y X, Wang Y Y. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (邵鑫, 张月, 郑雁雪, 王圆圆, 魏金霞, 李遇伯. 中草药), **2022**, 53 (19): 6200-6212.
- [6] Wu S Q, Yin K P, Sun Y, Su Y Q, Yang H, Qi L W, Li P. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, **2021**, 340: 129792.
- [7] Chen X R, Huang T, Huang Z B, Han Q B. *Phytochemical analysis: PCA*, **2021**, 33 (3): 441-451.
- [8] Shen Y J. *Development of Polydopamine-Modified Colloidal Gold Immunochromatographic Test Strips for Rapid Detection of Aristolochic Acid I and Ochratoxin A*. Jiangxi: Nanchang University (沈亚晶. 快速检测马兜铃酸I和赭曲霉毒素A聚多巴胺修饰的胶体金免疫层析试纸条的研制. 江西: 南昌大学), **2025**.
- [9] Luo F H. *Detection of Harmful Elements and Aristolochic Acid A in Traditional Chinese Medicine by Capillary Electrophoresis-Capacitively Coupled Contactless Conductivity*. Gansu: Lanzhou University (罗芳红. 毛细管电泳耦合非接触电导检测用于中药材中有害元素和马兜铃酸A的检测. 甘肃: 兰州大学), **2021**.
- [10] Xu Q Y, Shen S B, Lan C H, Liu T Z, Kong L F, Zhou C L. *China Modern Traditional Medicine* (徐秋阳, 沈书博, 兰卉, 刘天竹, 孔令锋, 周春玲. 中国现代中药), **2026**, 28 (4): 798-805.
- [11] Cheng Q B, Wang H X, Zheng Z, Yuan J, Yang B, Wang W, Zhang Y Z. *Chemical Analysis and Meterage* (程庆兵, 汪海宣, 郑正, 袁杰, 杨彬, 王玮, 张亚中. 化学分析计量), **2024**, 33 (11): 52-57.
- [12] Yan S T, Ma M, Ding F L, Wen X X, Zhou F, Jiang F J, Zhang C H. *Chinese Wild Plant Resources* (颜淑婷, 马铭, 丁芳林, 文星星, 周芳, 姜放军, 张朝辉. 中国野生植物资源), **2025**, 44 (2): 41-47.
- [13] Wu Y. *Journal of Food Safety & Quality* (吴燕. 食品安全质量检测学报), **2026**, 17 (2): 154-164.
- [14] Min X Y, Zhao Y, Zhao X Y, Rao Y M, Fu H Y, Lan W. *Journal of South-central Minzu University (Natural Science Edition)* (闵心怡, 赵奕, 赵翔宇, 饶艳敏, 付海燕, 兰薇. 中南民族大学学报(自然科学版)), **2026**, 45 (03): 342-352.
- [15] R D S, W P C. *Analytical chemistry*, **2017**, 89 (01): 519-531.
- [16] Zhou W J, Liu Y M, Wang J X, Guo Z M, Shen A J, Liu Y F, Liang X M. *Journal of separation science*, **2020**, 43 (01): 87-104.
- [17] Tao X Y, Cao Q L, Zhang Y F, Cai X J, Zhang M, Zhang H Y, Hu P. *Journal of Chromatography A*, **2025**, 1740: 465573.
- [18] Fukushima T, Koishi M, Sakamoto T, Onozato M. *Molecules*, **2024**, 29 (10): 2341.
- [19] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guidelines for the Determination of Aristolochic Acid I in Proprietary Chinese Medicines (Draft for Publicity) (国家药典委员会. 中成药中马兜铃酸I 检查指导原则(草案公示稿). [2026-06-29]. <https://www.chp.org.cn/>.
- [20] Stoll D R, Carr P W. *Multi-Dimensional Liquid Chromatography: Principles, Practice, and Applications*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, **2023**.

(责任编辑：丁 岩)