

HPLC-MS/MS法测定风湿关节炎片中松香酸的含量

杨建龙^{1*}, 曲艳丽¹, 徐彤彤¹, 邢潇¹, 张彦飞², 贡济宇^{2#}(1.长春市食品药品检验中心, 长春 130012; 2.长春中医药大学药学院, 长春 130117)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4299-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.44

摘要 目的:建立测定风湿关节炎片中松香酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法。HPLC色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸(82:18, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为241 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl; MS/MS色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸(80:20, V/V),流速为0.2 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为0.5 μl,离子化模式为ESI+,雾化气压力为25 psi,气体流量为8.0 L/min,毛细管电压为4 000 V,毛细管出口电压为120 V,母离子为303 *m/z*,扫描范围为50~500 *m/z*,干燥气温度为350 ℃。结果:松香酸检测质量浓度线性范围为2.5~100.0 μg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;回收率为96.75%~98.11%,RSD为0.53%(*n*=6)。结论:该方法简便、结果准确、重复性好,适用于风湿关节炎片中松香酸的含量测定。

关键词 风湿关节炎片;高效液相色谱串联质谱法;松香酸

Contents Determination of Rosin Acid in Rheumatoid Arthritis Tablet by HPLC-MS/MS

YANG Jian-long¹, QU Yan-li¹, XU Tong-tong¹, XING Xiao¹, ZHANG Yan-fei², GONG Ji-yu²(1.Changchun Center for Food and Drug Control, Changchun 130012, China; 2.School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of rosin acid in Rheumatoid arthritis tablet. METHOD: HPLC was performed on the column of ZORBAX SB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid (82:18, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 241 nm, column temperature was 30 ℃ and volume injection was 10 μl. MS/MS column was ZORBAX SB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid(80:20, V/V) at flow rate of 0.2 ml/min; column temperature was 30 ℃; volume injection was 0.5 μl. Ionization mode was ESI+, atomization gas pressure was 25 psi, gas flow as 8.0 L/min, capillary voltage was 4 000 V, capillary outlet voltage was 120 V, precursor ion was 303 *m/z*, scan range was 50-500 *m/z* and the gas temperature was 350 ℃. RESULTS: The linear range of rosin acid was 2.5-100.0 μg/ml. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%, recoveries was 96.75%-98.11% (RSD=0.53%, *n*=6). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and suitable for the content determination of rosin acid in Rheumatoid arthritis tablet.

KEYWORDS Rheumatoid arthritis tablet; HPLC-MS/MS; Rosin acid

风湿关节炎片由乳香、没药、羌活、牛膝、红花、续断、当归等17味药材组成,有祛风燥湿、活血止痛等功能,临床多用于风湿麻痹、腰腿疼痛、风湿性关节炎等的治疗^[1]。处方中乳香为名贵药材,部分企业为了达到利益最大化,向处方中添加松香甚至松脂替代乳香。而松香和松脂中的松香酸对人体有害,故笔者参考文献[2]对市售风湿关节炎片进行了抽检,建立了松香酸的高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)检测方法,为打击相关非法掺伪掺假行为提供了可行手段^[3]。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,含二级管阵列检测器和6430串联四级杆质谱检测器(美国Agilent公司);GR202型电子天平(日本

AND公司);POWER I型纯水仪(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

风湿关节炎片(A厂,批号:20130802、20140301;B厂,批号:20140401;C厂,批号:20140502、20140701、20131102);松香酸对照品(上海玉搏生物科技有限公司,批号:00001003-BTG,纯度:98%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件与系统适用性试验

2.1.1 HPLC 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸(82:18, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:241 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.1.2 MS/MS 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(50 mm×2.1 mm,

报,2006,22(2):150。

[3] 黄文涛,张耕,程璐.气相色谱法测定复方薄荷脑洗剂中

*药师,硕士。研究方向:中药分析。E-mail:875704972@qq.com
#通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析新方法、新技术。E-mail:gjy0431@126.com

樟脑与薄荷脑含量[J].医药导报,2011,30(8):1 083。

[4] 谢周涛,胡进.气相色谱法测定复方冰片搽剂中冰片、薄荷脑和樟脑的含量[J].中国医院药学杂志,2008,28(23):2 063。

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-08-10)

(编辑:刘柳)

1.8 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸(80:20, V/V);流速:0.2 ml/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:0.5 μl ;离子化模式:ESI+;雾化气压力:25 psi;气体流量:8.0 L/min;毛细管电压:4 000 V;毛细管出口电压:120 V;母离子:303 m/z ;扫描范围50~500 m/z ;干燥气温度:350 $^{\circ}\text{C}$ 。

在上述试验条件下,理论板数以松香酸峰计为4 013,分离度>2.5,各成分基线分离良好。分别以信噪比为10:1、3:1时考察,松香酸定量限为0.057 mg、检出限为0.017 mg。色谱见图1;二级质谱见图2、图3。

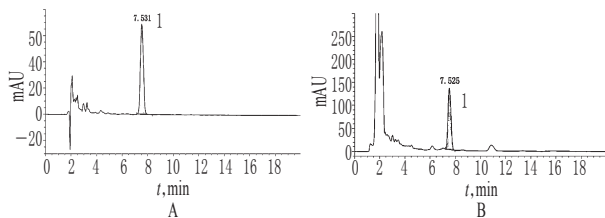


图1 高效液相色谱图

A.对照品; B.供试品; 1.松香酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; 1.rosin acid

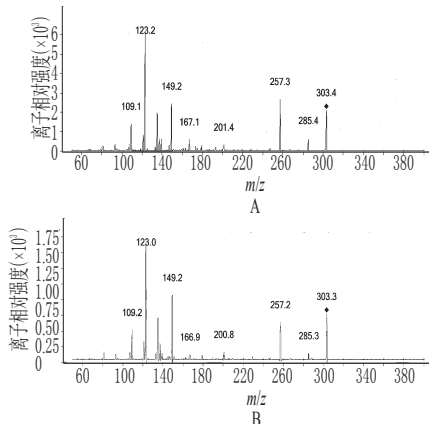


图2 二级质谱图(碰撞能:10 eV)

A.对照品; B.供试品

Fig 2 Secondary mass spectrograms (collision energy: 10 eV)

A. reference substance; B. test sample

由图2可见,松香酸对照品和供试品一级MS的 m/z 同为303.0,二级MS/MS的 m/z 分别为303.4、285.4、257.3、201.4、167.1、149.2、123.2、109.1和303.3、285.3、257.2、200.8、166.9、149.2、123.0、109.2。为了增加确证的说服力,又采用了碰撞能为20 eV的条件进行了质谱测定,结果如图3所示,松香酸对照品和供试品一级MS的 m/z 同为303.0,二级MS/MS的 m/z 分别为257.1、201.1、167.1、135.2、123.2、93.1、67.1和257.3、201.3、167.4、135.2、123.2、93.0、69.0。通过质谱图可见,主要的碎片离子 m/z 为303.4、257.3、149.2、123.2,分析相关离子碎片的归属,303.4: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、257.3: $[\text{M}-\text{COOH}]^+$ 、149.2: $[\text{M}-\text{COOH}-\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_3)_2]^+$ 、123.2: $[\text{M}+\text{H}-\text{COOH}-(\text{CH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_7\text{CH}(\text{CH}_3)_2]^+$ 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取松香酸对照品适量,用乙醇制备成质量浓度为1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,置于0~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光贮藏。

2.2.2 供试品溶液^[4] 取风湿关节炎片样品,除去包衣,研细,精密称取0.2 g,置于具塞锥形瓶中,加乙醇20 ml,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)处理20 min,放至室温,上清液经微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

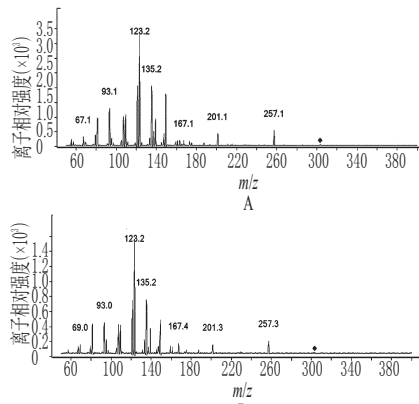


图3 二级质谱图(碰撞能:20 eV)

A.对照品; B.供试品

Fig 3 Secondary mass spectrograms (collision energy: 20 eV)

A.reference substance; B.test sample

2.3 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,加乙醇稀释制成质量浓度为2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各10 μl ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以松香酸质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=53.95x-48.62$ ($r=0.9999$)。结果表明,松香酸检测质量浓度线性范围为2.5~100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.4 精密性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,松香酸峰面积的RSD为0.41% ($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20140502)适量,分别于放置0、2、4、6、12、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,松香酸峰面积的RSD为0.81% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20140502)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,松香酸峰面积的RSD为1.2% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 回收率试验

取样品(批号:20130802)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定^[5-6]

取6批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表2。

3 讨论

针对3家企业的6批样品进行松香酸检测,发现其中1家企业的3批样品含有非法添加成分松香酸,为不合格批次样品。由于松香酸成本较低,较多不法企业为了牟利而将松香甚至松脂直接代替乳香等名贵药材投药^[2],从而导致相当数量中成药中含有松香酸。然而现行《中国药典》中并没有收录松香酸的检测方法,由此使得许多伪劣药品蒙混过关。因此,建议针对乳香等药材或者含有乳香的中成药进行松香酸的测定。

HPLC-MS/MS法准确性高,是非法添加违禁物质现象的

我校药学专业药物化学实验教学改革的探索与实践[△]

陈 灿^{1*}, 蒋庆琳^{2#}, 臧志和²(1.成都医学院第一附属医院, 成都 610050; 2.成都医学院药学院, 成都 610083)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4301-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.45

摘要 目的:为提高药学专业药物化学的实验教学水平提供参考。方法:以我校药学专业药物化学实验教学为试点,从教学内容、教学方式和考核办法等方面进行改革。结果:我校药学专业药物化学实验教学增加了设计性实验教学内容,引入了多媒体教学方式,建立了合理的考核办法。结论:通过对我校药物化学实验教学的改革,培养了学生的独立思考及创新能力,提高了学生的积极性和主动性,取得了良好的教学效果,同时也促进了教师队伍专业素质的提高。

关键词 药物化学;实验教学;教学改革

Exploration and Practice of the Reform of Pharmacology Experiment Teaching for Pharmacy Major in Our School

CHEN Can¹, JIANG Qing-lin², ZANG Zhi-he² (1.The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610050, China; 2.School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the level of pharmaceutical experiment teaching for pharmacy major. METHODS: The experiment teaching of pharmacology for pharmacy major in our school was taken as a pilot, and the teaching contents, teaching methods and appraisal system were explored. RESULTS: The teaching contents of "designing experiment" of pharmacology for pharmacy major in our school were added, multimedia teaching mode was introduced and scientific and comprehensive assessment mode was established. CONCLUSIONS: The reform of experiment teaching has cultivated the independent thinking and creative ability of students, improved enthusiasm and initiative, achieved good teaching quality and promoted the improvement of professional quality of teaching staff.

KEYWORDS Pharmacology; Experiment teaching; Teaching reform

表1 回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
1 130.0	1 093.3	96.75	97.16	0.53
1 130.0	1 094.4	96.85		
1 130.0	1 108.6	98.11		
1 130.0	1 102.9	97.60		
1 130.0	1 103.5	97.65		
1 130.0	1 098.5	97.21		

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

企业	批号	松香酸含量, mg/g
A	20130802	未检出
A	20140301	未检出
B	20140401	未检出
C	20140502	9.9
C	20140701	3.2
C	20131102	2.6

主要检测手段。笔者采用正离子检测方式进行二级MS/MS分

△基金项目:四川省教育厅高等教育人才培养质量和教学改革重点项目(No.2011JX118Z11169)

*药师, 硕士。研究方向:药学教学和科研。电话:028-83016070。E-mail:baicai.333@163.com

#通信作者:副教授, 博士。研究方向:药物化学教学和科研。电话:028-62308658。E-mail:jq12000_1026@163.com

析,因为有不含松香酸的样品,本试验采用了回收率试验。

本研究建立的HPLC-MS/MS法能够对风湿关节炎片中非法添加的松香酸进行检测,通过MS/MS法对可疑样品进行确认,可以避免假阳性结果的出现,保证检测结果的可靠性。此方法可以满足药监部门对风湿关节炎片准确检测的需要,可对该药的质量进行有效控制。

综上所述,该方法简便、结果准确、重复性好,适用于风湿关节炎片中松香酸的含量测定。

参考文献

- [1] 国家卫生部. 卫生部药品标准中药成方制剂:第3册[S]. 2010年版. 北京:人民卫生出版社, 2010:49.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件[S]. 2014.
- [3] 汪杨丽, 苏晶, 张毅. 舒筋活血丸中非法添加物松香酸的检测方法[J]. 中国现代中药, 2015, 17(3): 1 673.
- [4] 陈安珍, 沙启营, 单秀明, 等. 跌打片中松香酸的HPLC和HPLC-MS/MS检测方法研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1 940.
- [5] 黄昆, 王文辉, 李宝才, 等. 超高效液相色谱和质谱联用在药物研究领域的应用[J]. 光谱实验室, 2009, 26(4): 922.
- [6] 张好琳, 曹玲, 谭力, 等. 液质联用技术用于沉香中非法掺入含松香酸类物质的检测[J]. 中成药, 2011, 33(5): 844.

(收稿日期:2015-04-20 修回日期:2015-07-17)

(编辑:张 静)