

LC-MS/MS 法对乌蛇葛根胶囊中非法添加双氯芬酸的检查

赵培敬 张玉洁 李中娥

(南阳市食品药品检验所, 南阳 473061)

摘要 目的: 采用 LC-MS/MS 联用技术, 建立乌蛇葛根胶囊中非法添加双氯芬酸的鉴别方法。方法: 色谱柱为 Shimadzu Shim-pack VP-ODS(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 0.02 mol · L⁻¹ 醋酸铵-0.1% 醋酸水溶液及乙腈(55:45) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 280 nm; Agilent 6310 离子阱质谱仪, 电喷雾离子源(ESI), 雾化气压力 27.6 kPa, 干燥气温度 350 °C, 流速 9 mL · min⁻¹, 扫描范围 *m/z* 150~500。结果: 在高效液相色谱、质谱中, 样品出现与双氯芬酸成分一致的色谱峰、质谱峰。结论: 本方法简单可行, 结果准确可靠, 可用于乌蛇葛根胶囊中添加双氯芬酸成分的定性鉴别。

关键词: 乌蛇葛根胶囊; 双氯芬酸; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1840-04

LC-MS/MS detection of diclofenac in Wushegegen capsules

ZHAO Pei-jing ZHANG Yu-jie LI Zhong-e

(Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang 473061, China)

Abstract Objective: To develop a detection method for diclofenac illegally added in Wushegegen capsules by LC-MS/MS. **Methods:** The detection was performed on a Shimadzu Shim-pack VP-ODS(250 mm × 4.6 mm 5 μm) with a mobile phase of 0.02 mol · L⁻¹ ammonium acetate-0.1% acetic acid solution and acetonitrile(55:45) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 280 nm. The nebulizer pressure was 27.6 kPa and the dry temperature was 350 °C; The scan range was *m/z* 150-500. **Results:** Chromatographic and mass peaks coinciding with that of diclofenac reference substance were found in the sample. **Conclusion:** The method is simple, sensitive and accurate, and can be used to identify diclofenac in Wushegegen capsules.

Key words: Wushegegen capsules; diclofenac; LC-MS/MS

近年来中药制剂的发展比较迅速, 中药制剂具有疗效确切、毒副作用小的特点, 适用于一些慢性疾病的治疗, 很多患者长期服用。极少数人正是利用患者对传统中药的信任, 以及急于获得疗效的心理, 在中药制剂中非法掺入价廉易得的化学药成分, 威胁了患者的健康。液相色谱-质谱联用(LC-MS)法以其快速、高效、高专属性的优势广泛应用于药物非法添加的定性检测中。

市售乌蛇葛根胶囊, 产品介绍中称全部采用中药材加工而成, 适用于腰间盘突出、颈椎病、骨质增生、风湿性关节炎、类风湿等各种疼痛症, 且服用量较小。经过试验, 结果检出双氯芬酸, 遂建立乌蛇葛根胶囊中非法添加双氯芬酸的鉴别方法, 为药品监管提供技术支持。

1 仪器与试剂

Agilent 1200-6310 液相色谱质谱联用仪, 配有 Agilent 1200 液相单元(在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器)、电喷雾离子化源(ESI)。

对照品氨基比林(批号 100503-200301)、双氯芬酸钠(批号 100334-200302) 购自中国药品生物制品检定所, 乌蛇葛根胶囊(市售, 某生物科技开发有限公司)。乙腈(天津市彪仕奇科技发展有限公司) 为色谱纯, 冰醋酸(天津化学试剂有限公司)、醋酸铵(天津市化学试剂三厂) 为分析纯, 水为纯化水。

2 LC-MS 条件

2.1 色谱条件 色谱柱: Shimadzu Shim-pack VP-ODS(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 0.02 mol · L⁻¹ 醋酸铵-0.1% 醋酸水溶液及乙腈(55:45);

流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 280 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI) 雾化气压力 27.6 kPa, 干燥气温度 350 °C, 流速 9 mL · min⁻¹, 扫描范围 *m/z* 150 ~ 500, 毛细管电压 3.5 kV。检测方式分段设置: 4.5 ~ 7.5 min 目标离子 *m/z* 231 正模式一级、二级同时扫描; 10.0 ~ 13.5 min 目标离子 *m/z* 295 负模式一级、二级同时扫描。

3 溶液制备

3.1 对照品溶液 精密称取对照品氨基比林、双氯芬酸钠各 5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相适量使溶解并稀释至刻度, 即得对照品储备液; 精密量取储备液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 即得。

3.2 供试品溶液 取本品 10 粒, 取出内容物, 精密称定, 混合均匀后称取相当于 1 粒量的内容物, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声处理 15 min, 放冷, 加流动相至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置 50 mL

量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

4 对照品和样品的色谱和质谱行为

按上述条件取对照品溶液进样后, 高效液相色谱紫外图谱在保留时间 5.02 min(峰 1) 和 10.57 min(峰 2) 处出现色谱峰(见图 1 - A), 两峰的理论塔板数及分离度均符合中国药典要求; 氨基比林及双氯芬酸的一级、二级质谱分别见图 2 及图 3。

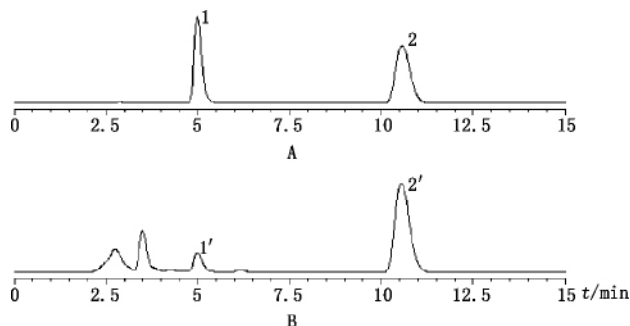


图 1 对照品(A)与样品(B)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

1. 氨基比林(amidopyrin) 2. 双氯芬酸(diclofenac)

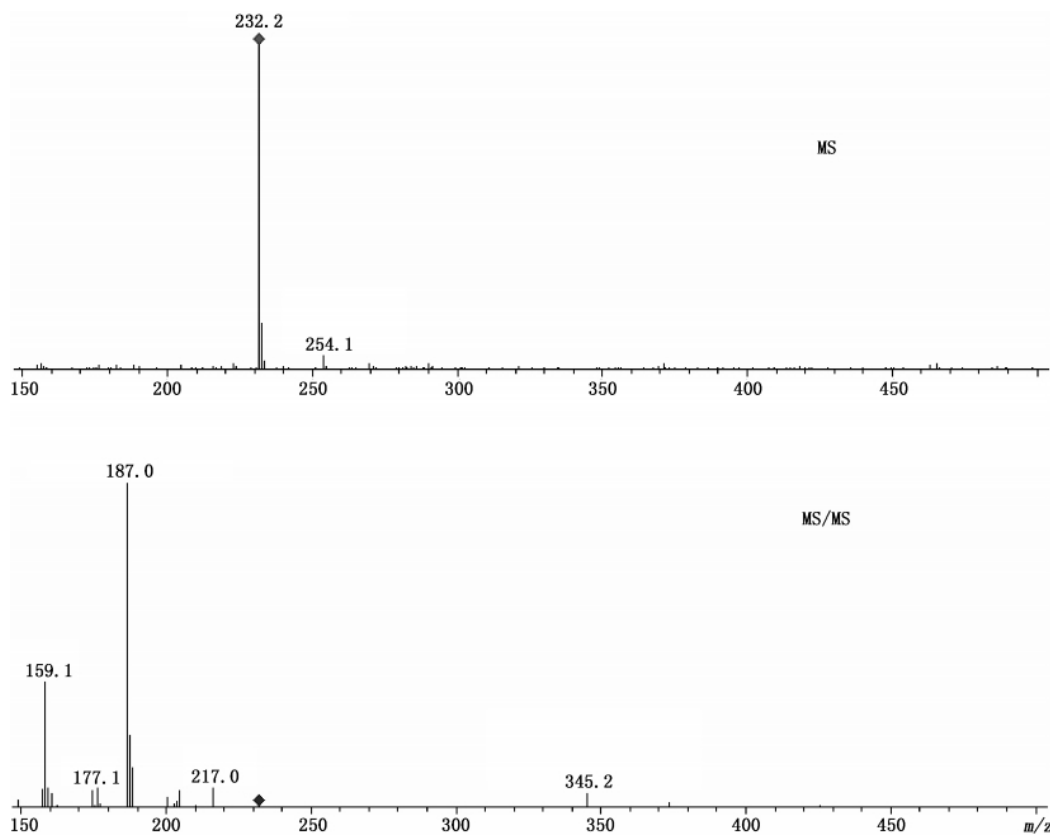


图 2 氨基比林质谱图

Fig 2 Mass chromatograms of amidopyrine

在相同的色谱及质谱条件下对供试品溶液进行分析, 所得的高效液相色谱紫外图谱见图 1 - B, 峰

1'、峰 2' 的质谱图见图 4、图 5。

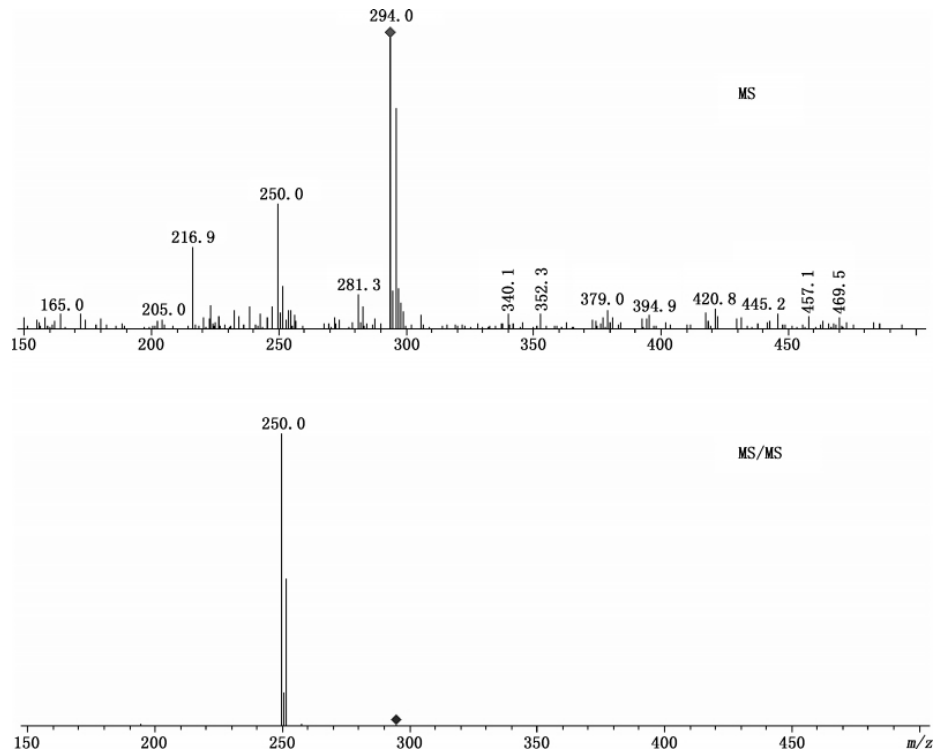


图3 双氯芬酸质谱图

Fig 3 Mass chromatograms of diclofenac

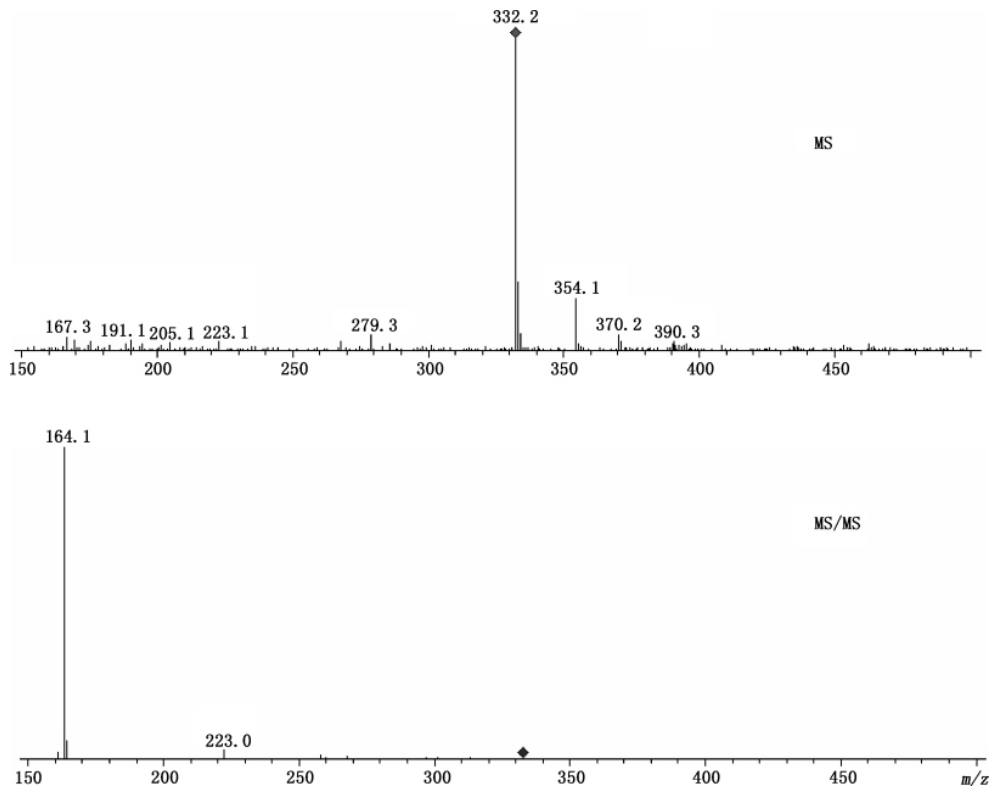


图4 样品峰1'质谱图

Fig 4 Mass chromatograms of sample peak 1'

5 检出限

取对照品溶液, 稀释成不同浓度的溶液后进样测定, 测定检测限 ($S/N = 3$)。结果氨基比林、双氯

芬酸的 HPLC 最低检出限分别为 $1 \mu\text{g}$ 、 $2 \mu\text{g}$; MS 最低检出限均为 20 ng , 可满足试验要求。

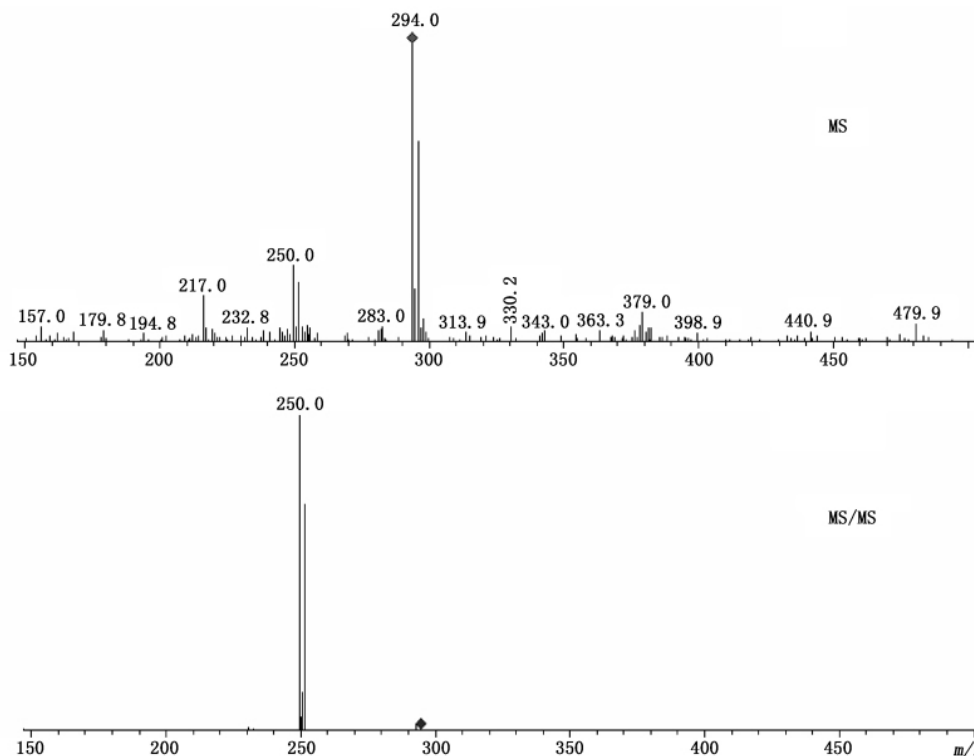


图5 样品峰2⁺质谱图

Fig 5 Mass chromatograms of sample peak 2⁺

6 实验结果分析

样品高效液相色谱紫外图谱在与氨基比林、双氯芬酸对照品保留时间处有色谱峰,但经过与对照品的质图相比较,样品中峰1⁺的一级、二级质谱均与氨基比林不同,故断定没有添加氨基比林;峰2⁺的质谱图与双氯芬酸质谱图完全吻合,二级质谱所得到离子 m/z 250,经过对双氯芬酸分子结构的分析,应该是在羧基处发生断裂后的产物,综合以上信息,可以确定峰2⁺为双氯芬酸。

7 讨论

7.1 对照品溶液为氨基比林和双氯芬酸钠的混合溶液,由于是液质联用,所以可以根据离子质量数非常容易辨别出哪个是氨基比林峰,哪个是双氯芬酸峰。

7.2 中药制剂中通常都含有多种中药材,每种药材中均含有多种组分,采用紫外检测法或荧光检测法对中药提取液进行检测时,由于选择性不强,在干扰组分多的情况下,对待测物的色谱分离提出了更高的要求,因此可能会产生假阳性结果。本文采用LC/MS技术,将高效液相色谱的高分离能力与质谱分析的高选择性相结合,对纯中药制剂中非法掺入的双氯芬酸进行多级质谱分析,对其进行了结构确证,增强了检测结果的可信度。该法灵敏度高,选择性强,对该中药制剂的质量控制具有现实意义。

7.3 本文未建立双氯芬酸的含量测定方法,但也考虑到含量的问题,可以根据样品中双氯芬酸的峰面积,大致估算双氯芬酸的添加量,本文中对照品的浓度最终稀释为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,如果样品的双氯芬酸峰面积大于或等于对照品峰面积,那么单位取样中双氯芬酸的含量将大于或等于 5 mg ,这个含量足以排除污染和残留的可能,可以断定是非法添加了双氯芬酸类化学成分。例如样品中双氯芬酸峰面积约为对照品的1.5倍,可以推算出制剂中双氯芬酸的含量约为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$,这足以作为药品执法提供坚实的依据。

7.4 本产品自市场中抽得,产品说明书中关于处方和制备工艺介绍比较简单,故未进行阴性实验。考虑到双氯芬酸为化学药,是现在科技合成的产物,作者也查阅大量资料,未见报道某种中药材或中药制剂中自身含有双氯芬酸类成分,所以判定本制剂中检测出的双氯芬酸为人为非法添加。

参考文献

- 1 ChP(中国药典).2005. Vol II(二部):60
- 2 LIU Fei(刘斐),CHEN Chang-qing(陈长青),ZHENG Jing(郑静) *et al.* Identification of seven chemical substances added into traditional Chinese medicine with LC-MS/MS(LC-MS/MS方法鉴定中药制剂中掺入的7种西药成分). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2009 29(8):1378

(本文于2011年1月29日修改回)