

液质联用检测中成药中添加的双氯酚酸钠和布洛芬

刘晓哲¹, 闻京伟²

(1. 河南省南阳市药品检验所, 南阳 473059; 2. 河南省药品检验所, 郑州 45003)

摘要 目的: 建立液质联用同时测定中成药中添加双氯酚酸钠及布洛芬的定性及定量的方法。方法: 采用 C₁₈ 柱分离 (100 mm × 4.6 mm 3 μm), 以乙腈 - 0.02 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (0.1% 乙酸) (40:60) 为流动相, 检测波长: 220 nm、280 nm 双波长测定, 流速: 0.5 mL · min⁻¹。离子源为 ESI 源, 负离子模式进行定性检测, HPLC 测定含量。结果: 6 批受试制剂中有 1 批检测到添加了双氯酚酸钠及布洛芬。结论: 该方法选择性强、灵敏度好, 可作为分析消肿止痛类中成药中违禁添加双氯酚酸钠及布洛芬的有效检测方法。

关键词: 液相色谱 - 质谱联用; 添加; 中成药; 双氯酚酸钠; 布洛芬

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)04 - 0779 - 04

LC - MS/MS simultaneous qualitative and quantitative determination of diclofenac sodium and ibuprofen added to Chinese traditional patent medicine

LIU Xiao - zhe, WEN Jing - wei²

(1. Nanyang Institute for Drug Control, Nanyang 473059, China; 2. Henan Institute for Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

Abstract Objective: To establish a LC - MS/MS method for simultaneous determination of diclofenac sodium and ibuprofen was illegal added to the Chinese traditional patent medicine. **Methods:** A C₁₈ column was used, with the mobile phase of acetonitrile - 0.02 mol · mL⁻¹ ammonium acetate (0.1% acetic acid) (40:60). The detective wavelength: 280 nm 220 nm dual wavelength. The flow rate: 0.5 mL · min⁻¹. It is based on high - performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass (LC - ESI - MS/MS) spectrometric detection in negative ionization mode. HPLC determination of content. **Results:** Diclofenac sodium and ibuprofen was found in one formulation of six. **Conclusion:** The method is selection and sensitive and can be used to expel pathogenic wind and remove dampness reduce swelling medicines in Chinese traditional patent medicine.

Key words: LC - MS/MS; added; Chinese traditional patent medicine; diclofenac sodium; ibuprofen

现代医学对风湿关节痛的发病机理尚不明了, 亦无根治良方。不法分子利用人们相信中药的心理, 在此类药品中大量添加化学药物, 以达到迅速止痛的效果。由于添加的化学药物成分及剂量都不甚明了, 给患者的生命安全造成了极大的威胁, 必须有更专业的检测方法及其检测手段对其进行监控。本文利用 LC - MS/MS 联用的方法对中成药中添加的化学药物成分进行检查, 方法准确, 灵敏度高, 分离度好。可用于中成药中添加双氯酚酸钠和布洛芬的定性及定量检测。

1 仪器与试剂

Agilent1200 - 6310 离子阱液 - 质联用仪, 配有

1200 系统(四元泵、自动进样器、柱温箱、可变波长紫外检测器)、电喷雾源(ESI), Agilent 色谱化学工作站。

对照品布洛芬(批号: 100415 - 200301)、双氯酚酸钠(批号: 100334 - 200302), 提供样品来自河南省南阳市食品药品监督管理局稽查大队市场抽样。

乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 检测条件

2.1 色谱条件 流动相: 乙腈 - 0.02 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液 (0.1% 醋酸) (40:60) 为流动相, 采用等度

洗脱,分析柱: UltimateXB-C₁₈(100 mm×4.6 mm 3 μm);柱温: 30 ℃;流速为 0.5 mL·min⁻¹;检测波长: 0~7 min 280 nm,7~10 min 220 nm。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源;负离子模式(ESI⁻)检测;检测离子选择: 双氯酚酸[M-H]⁻m/z: 294;布洛芬,[M+H]⁻m/z: 205。雾化气流速 1.5 L·min⁻¹;干燥气流量: 8.0 L·min⁻¹;干燥气温度: 350 ℃,雾化气压力约 276 kPa,毛细管电压 3.5 kV。

3 方法和结果

3.1 HPLC 系统适应性试验 分别取“3.2.1”“3.2.2”项下溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定,双氯酚酸钠与布洛芬分离良好,并与中药成分杂质峰有良好的分离度。基线噪音小,双氯酚酸钠与布洛芬的保留时间分别为 5.51 min、8.39 min,二者分离度为 6.53,理论板数分别为 2637、3723。见图 1。

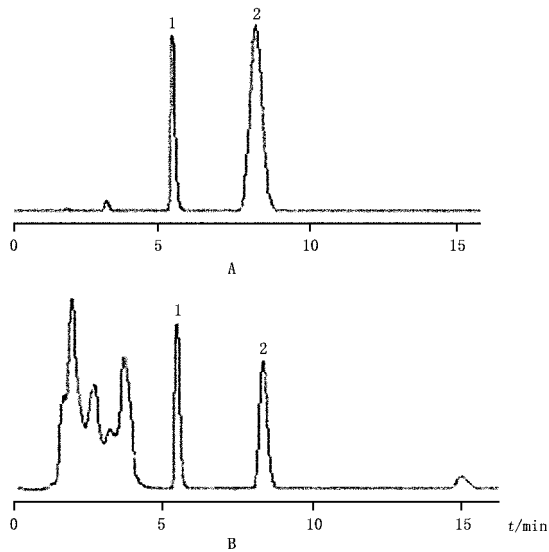


图 1 对照品(A)和样品(B)色谱图

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

1. 双氯酚酸钠(diclofenac sodium) 2. 布洛芬(ibuprofen)

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 分别精密称取双氯酚酸钠、布洛芬对照品各 12.57 mg、95.23 mg,分置 250 mL 量瓶中,加上上述流动相溶解并稀释至刻度,作为对照品储备液。

3.2.2 样品溶液 取样品,精密称定,研细,精密称取 1 次服用量,置 50 mL 量瓶中,加入上述流动相 45 mL,超声提取 10 min,放冷至室温,再加入流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取滤液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

3.3 线性关系 分别精密量取双氯酚酸钠、布洛芬

对照品储备液(浓度为 50.28 μg·mL⁻¹、380.92 μg·mL⁻¹),置同一量瓶中,加流动相稀释成双氯酚酸钠 1~50 μg·mL⁻¹、含布洛芬 4~200 μg·mL⁻¹ 的系列浓度溶液,摇匀,按“2.1”项下的色谱条件,依次进样 10 μL,测定峰面积。分别以双氯酚酸钠对照品、布洛芬对照品的进样浓度(C, μg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行回归,得双氯酚酸钠、布洛芬的回归方程分别为:

$$Y = 2.531 \times 10^4 C + 2.354 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 1.435 \times 10^4 C + 645 \quad r = 0.9999$$

结果表明,双氯酚酸钠和布洛芬进样浓度在 1~50 μg·mL⁻¹、4~200 μg·mL⁻¹ 范围内线性均良好。

3.4 精密度与重复性试验

3.4.1 精密度 取双氯酚酸钠浓度约为 10 μg·mL⁻¹ 的对照品混合溶液,按“2.1”项下的色谱条件,连续进样 6 次,结果双氯酚酸钠、布洛芬的峰面积值 RSD 分别为 0.32%、0.66%。

3.4.2 重复性试验 取样品,按照“3.2.2”项下的方法,平行制备 6 份样品溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定,结果平均含双氯酚酸钠 10.16 mg·粒⁻¹、布洛芬 95.53 mg·粒⁻¹,RSD 分别为 0.35%、0.32%。

3.5 耐用性试验 取样品,按照“3.2.2”项下的方法制备样品溶液,按“2.1”项下的色谱条件,用 3 根不同品牌的以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱进行试验,结果表明,该方法耐用性良好。结果见表 1。

3.6 最低检出限与定量限 取对照品溶液,以不同比例稀释后测定,结果双氯酚酸钠和布洛芬的最低检测限分别为 0.2 ng 和 0.5 ng(S/N=3),定量限分别为 0.7 ng 和 1.7 ng(S/N=10)。

3.7 溶液稳定性试验 取样品溶液,于室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 后,按“2.1”项下的色谱条件,分别测定。结果双氯酚酸钠、布洛芬峰面积值 RSD 分别为 0.85%、0.49%,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

3.8 加样回收率试验 样品加样溶液的制备:取已知含量的样品(含双氯酚酸钠 10.16 mg·粒⁻¹、布洛芬 95.53 mg·粒⁻¹) 9 份,分别加入高、中、低 3 个浓度的双氯酚酸钠、布洛芬对照品混合溶液,各平行 3 份,按“2.9”项下方法测定含量,计算加样回收率,结果本方法的平均回收率为双氯酚酸钠 99.1%,RSD 为 0.67%;布洛芬 99.2%,RSD 为 0.33%,表明方法准确性良好。

表 1 耐用性试验结果
Tab 1 Results of durability test

色谱柱 (chromatographic column)	型号 (model)	双氯芬酸钠(diclofenac sodium)		布洛芬(ibuprofen)	
		含量(content) /mg · 粒 ⁻¹	RSD / %	含量(content) /mg · 粒 ⁻¹	RSD / %
UltimateXB - C ₁₈	4.6 mm × 100 mm 3 μm	10.16	0.88	95.53	0.24
Kromasil C ₁₈	4.6 mm × 250 mm 5 μm	10.03		95.29	
Lichrospher C ₁₈	4.6 mm × 250 mm 5 μm	10.06		95.45	
Welchrom C ₁₈	4.6 mm × 250 mm 5 μm	10.19		95.74	
SHIMADZU C ₁₈	4.6 mm × 150 mm 5 μm	9.98		95.16	

3.9 样品测定

3.9.1 HPLC - UV 分别取 6 批消肿止痛中成药, 按照“3.2.2”项下方法制备样品溶液。精密吸取经 0.22 μm 微孔滤膜滤过的对照品混合溶液和样品溶液各 10 μL, 按“2.1”项下的色谱条件在样品 1 色谱图中发现与双氯芬酸钠、布洛芬保留时间一致的色谱峰, 其余样品中未检出与双氯芬酸钠、布洛芬保留时间一致的色谱峰。以外标法计算样品的含量, 双氯芬酸钠 (n = 3) 为 10.16 mg · g⁻¹, RSD 为 0.35%; 布洛芬 (n = 3) 为 95.53 mg · g⁻¹, RSD 为 0.32%。

3.9.2 质谱验证 按“2.2”项下的规定的质谱条件, 采用多反应监测 (MRM) 模式, 将“3.9.1”的含双氯芬酸钠 10 μg · mL⁻¹ 的对照品混合溶液及样品溶液, 取 10 μL 注入质谱仪。5 ~ 8, 双氯芬酸钠, 负离子模式, 选择 m/z 294 同时进行一级质谱及二级质谱分析, 碎片离子基峰为 m/z 250; 8 ~ 10, 布洛芬, 负离子模式, 选择 m/z 205 同时进行一级质谱及二级质谱分析, 碎片离子基峰为 m/z 161。

在与对照品相同的色谱和质谱条件下, 将上述配制的样品溶液进行分析。将样品中检出的成分与对照品的高效液相色谱保留时间、电喷雾离子阱质谱全扫描一级质谱图和选择离子全扫描二级质谱图进行了比对, 发现样品 1 中与液相色谱保留时间相同的成分产生与双氯芬酸钠、布洛芬对照品一致的 MS, MS/MS 谱, 确证了样品 1 中同时被非法添加了双氯芬酸钠、布洛芬; 其余 5 批样品结果为阴性。

4 讨论

4.1 布洛芬 在 220 nm 波长处有较好的吸收, 由于已经是甲醇的末端吸收波段, 故采用乙腈与醋酸铵作为流动相; 而双氯芬酸钠在 280 nm 波长处有最大吸收, 在 220 nm 波长处无最大吸收, 故而利用 Agilent 可变波长紫外检测器的可变波长功能, 在 0 ~ 7

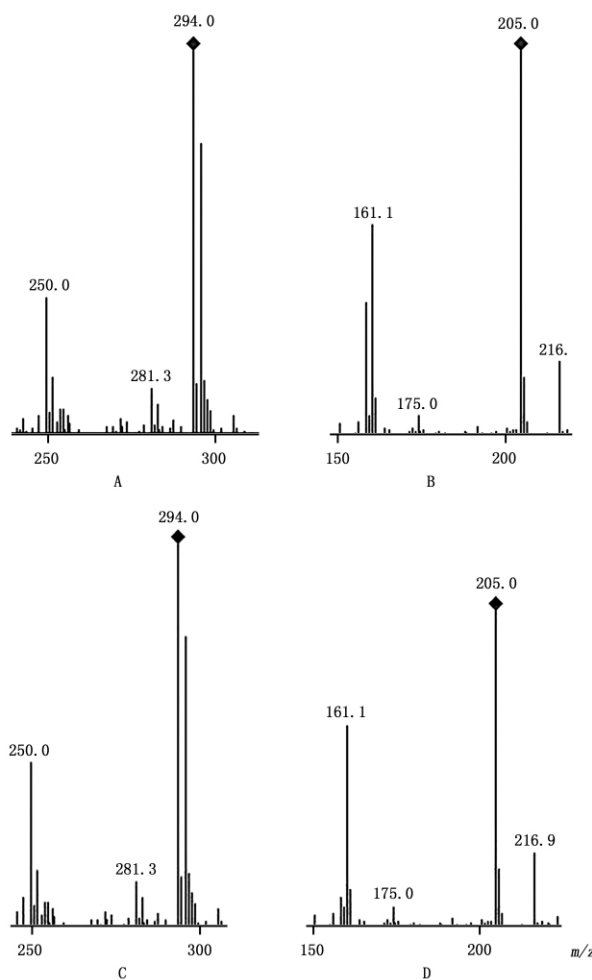


图 2 对照品及阳性供试品溶液一级全扫描质谱图
Fig 2 The full scan MS of positive sample solution
A. 双氯芬酸钠(diclofenac sodium) B. 布洛芬(ibuprofen) C. 阳性供试品 [positive sample(diclofenac sodium)] D. 阳性供试品 [positive sample(ibuprofen)]

min 双氯芬酸钠出峰时采用 280 nm 为检测波长; 在 7 ~ 10 min 布洛芬出峰时, 采用 220 nm 为检测波长, 这样有利于 2 个成分的有效检出。

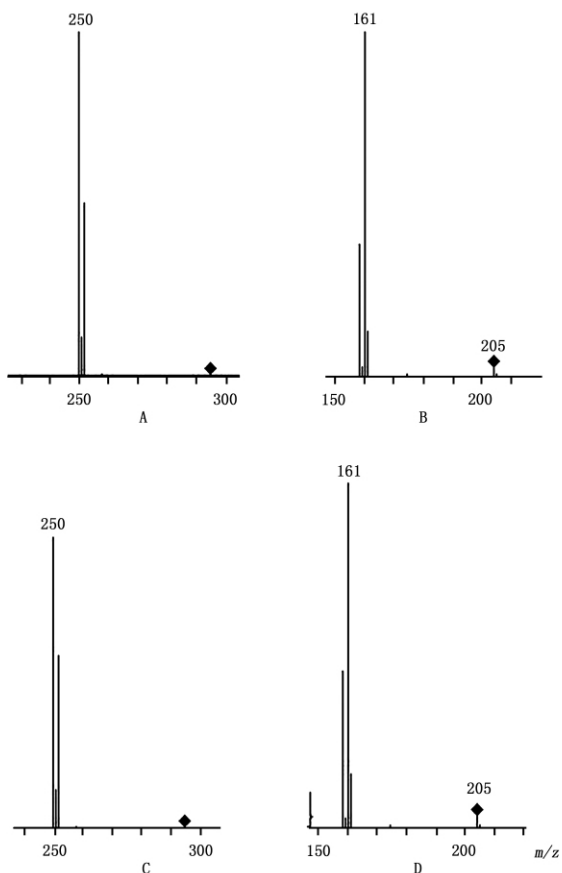


图3 对照品及阳性供试品溶液二级全扫描质谱图

Fig 3 The full scan MS/MS of positive sample solution

A. 双氯芬酸钠(diclofenac sodium) B. 布洛芬(ibuprofen) C. 阳性供试品 [positive sample(diclofenac sodium)] D. 阳性供试品 [positive sample(ibuprofen)]

4.2 本实验的结果表明,LC-ESI-MS/MS 联用选择性高、抗干扰能力强,尤其是在中成药成分复杂的情况下,能有效防止假阳性结果的出现。且分析时间短,样品处理步骤简单,并可以同时添加物进行定性及定量等优点,可以作为 LC-UV/VIS 检出可能含有这 2 种成分分析时用 LC-MS/MS 予以验证的方法。

参考文献

- 1 LI Li(李黎),DUAN Xiao-tao(段小涛). Rapid determination of ibuprofen in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method(液相色谱-串联质谱法快速测定人血浆中布洛芬). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志) 2008 43(21):1657
- 2 LIU Fu-yan(刘福艳),LI Jun(李军),XIE Yuan-chao(谢元超) et al. Recent advances and analytic technique on determination of chemical medicine mixed illegally in Chinese medicine(中成药中非法添加化学药品的现状与分析检测对策). *Chin Pharm Aff*(中国药事) 2008 22(12):1067
- 3 XU Yan(徐艳),FENG Lei(冯蕾). A case of acute renal failure due to diclofenac sodium tablets for oral use(口服双氯芬酸钠片致急性肾功能衰竭 1 例报道). *Chin J Tradit Med Traumatol Orthop*(中国中医骨伤科杂志) 2007 4(04):8
- 4 ZHANG Jie(张洁). A case of allergic shock due to diclofenac sodium (双氯芬酸钠致过敏性休克 1 例). *Her Med*(医药导报) 2007, (06):648

(本文于 2010 年 3 月 27 日收到)