液相色谱－质谱联用法检测中药制剂中掺入的双氯芬酸、醋酸泼尼松

刘福艳[1], 姜俊[1], 谢元超[1], 丁永华[2]

(1. 山东省药品检验所, 济南 250101; 2. 济南市传染病医院, 济南 250021)

摘要 目的: 建立检测抗风湿类中成药中非法掺入双氯芬酸、醋酸泼尼松的专属性方法。方法: 采用液相色谱－电喷雾质谱联用法。液相色谱: 色谱柱为 Agilent C_{18}柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol·L^{-1}醋酸铵－1%醋酸溶液－甲醇 (32∶3∶65), 流速 0.4 mL·min^{-1}; 柱温 30 ℃。质谱: 电喷雾电离源 (ESI)负离子检测; 质荷比范围 m/z 100～500, 干燥气温度 350 ℃; 干燥气流速 10 L·min^{-1}; 干燥气压力 276 kPa, 源电压为 5 kV。通过相对分子质量、一级、二级质谱碎片信息、液相色谱保留时间和紫外光谱 4方面的信息, 对抗风湿类中成药的提取液中非法掺入的双氯芬酸、醋酸泼尼松进行定性鉴别。结果: 6批抗风湿类中药, 4批检出掺有双氯芬酸, 同时掺有醋酸泼尼松。结论: 该方法选择性强, 灵敏度高, 可作为分析检测抗风湿类中成药中双氯芬酸、醋酸泼尼松的有效方法, 可用于分析鉴定中成药非法添加西药成分的打假工作。

关键词: 液相色谱－离子阱质谱联用; 抗风湿类中药制剂; 双氯芬酸; 醋酸泼尼松

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254－1793(2009)12－2131－03

LC－MS determination of diclofenac and prednisone acetate illegally mixed into traditional Chinese medicine preparations

LIU Fu-yan[1], JIANG Jun[1], XIE Yuan-chao[1], DING Yong-hua[2]

(1. Shandong province Institute for Drug Control, Jinan 250101, China; 2. Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China)

Abstract **Objective**: To develop a specific method for the identification of diclofenac and prednisone acetate illegally added into anti-rheumatism Chinese medicine preparations. **Methods**: The liquid chromatography-ion trap mass spectrometry method was used. LC: Agilent C_{18} column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase consisted of 0.02 mol·L^{-1} ammonium acetate-1% acetic acid-methanol (32∶3∶65). The flow rate was 0.4 mL·min^{-1} and column temperature was 30 ℃. MS: negative electrospray ionization (ESI$^-$) and two scan modes including full scan MS and full scan MS-MS, the scanning range was 100-500 m/z, the drying gas temperature was 350 ℃, the drying gas flow rate was 10 L·min^{-1}, the drying gas pressure was 276 kPa and the ionization voltage was 5 kV. The obtained pseudomolecular ions, fragment ions and retention time were used to identify the two drugs by comparison with those of reference substances. **Results**: Four formulations were detected illegally adulterated by diclofenac and simultaneously detected illegally adulterated by prednisone acetate. **Conclusion**: The method is specific, sensitive and accurate, it can be used to determinate the illegal Chinese traditional medicines illegally adulterated by the anti-rheumatism drugs.

Key words: HPLC-MS; anti-rheumatism traditional Chinese medicine preparations; diclofenac; prednisone acetate

双氯芬酸是临床上常用的用于治疗风湿性关节炎的非甾体解热镇痛药, 如果滥用或使用不当可能引起药敏性皮炎, 严重得甚至导致过敏性休克[1]和急性肾功能衰竭[1~4]。醋酸泼尼松是常见的甾体激素类药物, 能够有效增加抗风湿类药物的疗效, 但是长期大量使用醋酸泼尼松可能引起糖尿病、消化道溃疡和类库欣综合征症状, 对下丘脑－垂体－肾上腺轴抑制作用较强, 并且会引起并发感染等主要不良反应。由于这 2种药品价格较为低廉, 且有一定的治疗作用, 近年来市场上发现抗风湿类中成药中非法掺入这 2种化学药的情况, 若患者在不知情的情况下长期、大量服用这类所谓的抗风湿类中药制剂,

第一作者 Tel: (0531) 81216550, E-mail: lfyflying@sohu.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可能引起严重的不良反应。由于非甾体的消炎镇痛药加强了醋酸泼尼松的致溃疡作用,同时掺有这 2 种化学药的假中药制剂,其危害更为严重。因此,有必要建立灵敏、可靠的分析方法对抗风湿类中成药掺入的化学合成药进行鉴定。由于中药制剂中化学成分复杂,色谱分析时干扰峰多,色谱分离难度很大,而且单独依靠色谱行为难以进行可靠的定性分析[5~7]。本文建立了高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用法,结合相对分子质量、一级、二级质谱碎片信息、液相色谱保留时间和紫外光谱四方面的信息,对中药中是否非法掺入双氯芬酸和醋酸泼尼松进行快速、准确的判断。

1　仪器与试药

Agilent 1200-6320 离子阱液质联用仪,配有 1200系统(四元泵、自动进样器、柱温箱)、二极管阵列检测器(DAD)电喷雾离子化源(ESI)、数据处理系统。

对照品双氯芬酸(批号: 100334-200302)、醋酸泼尼松(批号: 100012-200105)均由中国药品生物制品检定所提供。6批不同厂家的抗风湿类中成药分别由梁山县食品药品监督管理局和莘县食品药品监督局提供。甲醇为色谱纯(天津康科德科技有限公司),乙酸铵、乙酸为分析纯,(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。

2　方法

2.1　色谱条件　色谱柱: Agilent C_{18}柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)流动相: 0.02 mol·L^{-1}醋酸铵-1%冰醋酸溶液-甲醇(32∶3∶65)流速: 0.4 mL·min^{-1}; 柱温: 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 280 nm。

2.2　质谱条件　电喷雾离子化负离子检测方式(ESI^-)质荷比范围: m/z 100~500, 干燥气温度: 350 ℃; 干燥气流速: 10 L·min^{-1}; 干燥气压力: 276 kPa, 源电压: 5 kV; 毛细管温度: 275 ℃, 毛细管电压: 15V。采用全扫描一级质谱、选择离子二级全扫描质谱检测方式。

2.3　溶液的配制

2.3.1　对照品溶液　取双氯芬酸和醋酸泼尼松对照品适量用流动相溶解配制成 50 μg·mL^{-1}的溶液作为对照品溶液,另各取 10 mL定容至 25 mL作为混合对照溶液。

2.3.2　供试品溶液　分别取胶囊内容物或经研细的片剂细粉适量,置样品瓶中,加入流动相 45 mL,超声(功率 600 W, 频率 40 kHz)提取 10 min, 放冷至室温,静置约 10 min, 取上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤,取滤液用于测定分析。

3　实验结果

3.1　色谱、光谱及质谱行为　采用负离子检测方式对双氯芬酸、醋酸泼尼松对照品溶液进行 HPLC、MS 和 MS-MS分析。双氯芬酸和醋酸泼尼松的保留时间分别为 10.5 min和 7.6 min。双氯芬酸的准分子离子峰为 m/z 295, 对 m/z 295进行二级全扫描质谱分析,产生的主要碎片离子有 m/z 250。醋酸泼尼松的准分子离子峰为 m/z 400, 对 m/z 400进行二级全扫描质谱分析,产生的主要碎片离子有 m/z 340。其二级全扫描质谱图与质谱裂解途径如图 1所示。

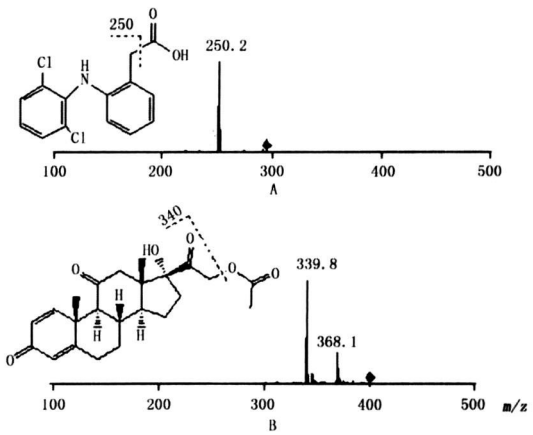

图 1　双氯芬酸(A)和醋酸泼尼松(B)的二级全扫描质谱图与质谱结构式裂解

Fig 1　The full scan MS^2 spectrum and the fragmentation of diclofenac (A) and prednisone acetate (B)

3.2　线性关系考察　取对照品储备溶液用稀释液制备含双氯芬酸和醋酸泼尼松浓度分别为 50, 25, 10, 5, 1 μg·mL^{-1}的系列混合对照溶液,分别取 10 μL注入液相色谱仪,记录色谱图,依据对照品溶液浓度和液相色谱紫外检测峰面积,以对照品溶液的峰面积为纵坐标,以对照品溶液浓度为横坐标,用加权最小二乘法(权重系数 $1/X^2$)进行线性回归,得到双氯芬酸和醋酸泼尼松标准曲线为:

$Y = 2305X + 1.329$　$r = 0.9999$

$Y = 288.6X + 0.6187$　$r = 0.9998$

线性范围分别为 1.0~56 μg·mL^{-1}和 10~283 μg·mL^{-1}。

3.3　进样精密度试验　取 25 μg·mL^{-1}的混合对照溶液,连续进样 6次,考察 2种对照品溶液的峰面积,测得双氯芬酸峰面积的 RSD为 0.5%;醋酸泼尼松的峰面积的 RSD为 0.8%。

3.4　最低检出限与定量限　取对照品溶液,以不同

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

比例稀释后测定,结果双氯芬酸和醋酸泼尼松的最低检测限分别为 0.1 ng和 0.3 ng (S/N = 3),定量限分别为 0.3 ng和 1.0 ng (S/N = 10)。

3.5 样品的定性检测 在相同的色谱及质谱条件下对 6批抗风湿类中成药的提取液进行 HPLC、MS和 MS-MS分析, 4批检测到双氯芬酸的准分子离子即 m/z 295,对 m/z 295进行二级全扫描质谱分析,产生与双氯芬酸钠对照品完全一致的碎片离子;同时检测到醋酸泼尼松的准分子离子 m/z 400,对 m/z 400进行二级全扫描质谱分析,产生与醋酸泼尼松对照品完全一致的碎片离子,且紫外光谱、保留时间均与相应的对照品一致,色谱图见图 2、3。结合紫外光谱、液相色谱保留时间、准分子离子和二级质谱裂解碎片四方面的信息,可以证实在 6批抗风湿类中成药中, 4批同时被非法掺入双氯芬酸和醋酸泼尼松,其余 2批结果为阴性。

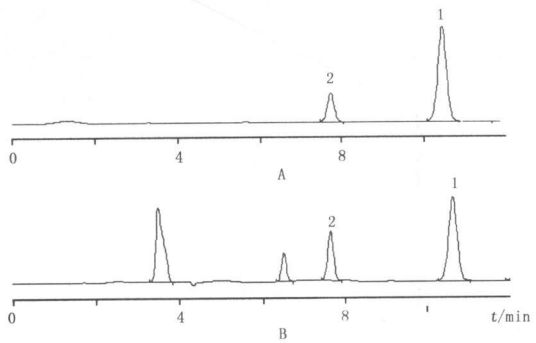

图 2 对照品溶液(A)和阳性供试品溶液(B)高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of control solution (A) and positive sample solution (B)

1. 双氯芬酸(diclofenac) 2. 醋酸泼尼松(prednisone acetate)

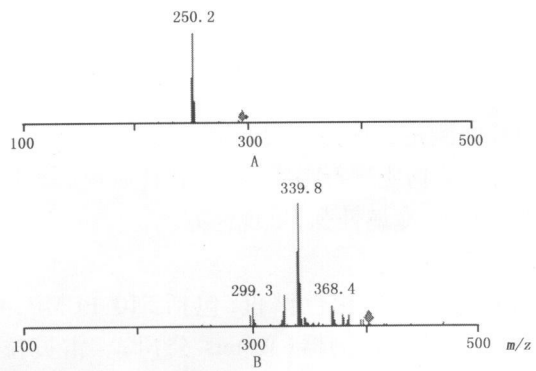

图 3 阳性供试品溶液二级全扫描质谱图

Fig 3 The full scan MS^2 spectrum of positive sample solution

A. 双氯芬酸 (diclofenac) B. 醋酸泼尼松 (prednisone acetate)

4 讨论与结语

尽管本文采用的液相色谱-离子阱质谱联用法可以通过对质荷比的筛选获得复杂基质中单一组分的色谱图,不需要实现其与干扰组分间完全的色谱分离,但考虑到在打假实际工作中,为了更好地提供确凿的证据,在建立方法时优化了流动相比例,使液相色谱条件有较强的专属性,能够满足定性和定量的需要。

本文通过 LC/MS技术将高效液相色谱的高分离能力和质谱分析的高选择性相结合,建立了鉴别抗风湿类中药制剂中非法掺入双氯芬酸和醋酸泼尼松的分析方法,结合相对分子质量、一级、二级质谱碎片信息、液相色谱保留时间和紫外光谱四方面的信息,增强了检测结果的可信度。该方法灵敏度高,选择性强,对打击抗风湿类中药制剂非法添加西药成分的制假行为,保证临床用药安全具有现实意义。

参考文献

1 SHU Ge (苏戈), WANG Pei-song (王培松), WANG Ying (王颖). The adverse effect of diclofenac sodium (双氯芬酸钠的不良反应). *Chin J Misdiagnostics* (中国误诊学杂志), 2008, (16): 4014

2 WANG Wen-shen (王文森), LI Yong-shen (李永申), CHEN jing-ran (陈敬然). A case of system drug sensitivity dermatitis due to diclofenac sodium gel (双氯芬酸钠凝胶引起全身药敏性皮炎 1例). *Chin J Misdiagn* (中国误诊学杂志), 2007, (07): 1527

3 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

4 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, (04): 8

5 LUO Jin-wen (罗金文), ZHANG Ye-ping (张叶萍), ZHU Hai-lin (朱海霖), *et al*. Identification of Anti-obesity drugs adulterated in traditional Chinese medicine preparations by HPLC-MS. (液相色谱-质谱联用法鉴定中药制剂中掺入的减肥药). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25 (7): 791

6 LIU Fu-yan (刘福艳), XIE Yuan-chao (谢元超), LI Yu-qiu (李毓秋), *et al*. LC-ESI-MS determination of naproxen and indometacin illegally mixed into anti rheumatism Traditional Chinese Medicine preparations (液相色谱-离子阱质谱联用法检测抗风湿类中药制剂中非法掺入的萘普生、吲哚美辛). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(8): 1276

7 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

(本文于 2009年 9月 18日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net