

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.018

风湿二十五味丸中非法添加的松香酸检测

卢洋,刘益庆

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心,江苏 连云港 222006)

摘要:目的 建立检测风湿二十五味丸中非法添加松香酸的方法。方法 采用高效液相色谱法对制剂中的松香酸进行定性,色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(28:72, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 241 nm,柱温为 20 ℃,进样量为 10 μL。采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)法对松香酸进行进一步确认,色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 2.7 μm),流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(28:72, V/V),流速为 0.3 mL/min,检测波长为 241 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 0.5 μL;扫描模式为正离子模式(ESI⁺),毛细管电压为 4.0 kV,毛细管出口电压为 175 V,干燥气温度为 300 ℃,干燥气流速为 8 L/min,雾化器压力为 35 psig,碰撞能量为 15 eV;扫描范围 m/z 100~1 000。结果 松香酸质量浓度在 32.375~518.000 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($n=5$),精密度、重复性试验的 RSD 均小于 1.0%;平均加样回收率为 100.12%,RSD 为 0.33% ($n=9$)。样品的一级质谱、二级质谱均与松香酸对照品一致。结论 该方法简便、准确、重复性好,可用于风湿二十五味丸中非法添加的松香酸检测。

关键词:风湿二十五味丸;松香酸;高效液相色谱法;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)20-0069-04

Determination of Abietic Acid Illegally Added in Fengshi Ershiwuwei Pills

LU Yang, LIU Yiqing

(Lianyungang Inspection Testing Center of Food and Drug, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of the abietic acid illegally added in Fengshi Ershiwuwei Pills.

Methods The qualification of abietic acid in the preparation was determined by the high-performance liquid chromatography(HPLC) method, the chromatographic column was Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile (28:72, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 241 nm, the column temperature was 20 ℃, and the injection volume was 10 μL. The composition of abietic acid was further confirmed by UPLC-Q-TOF-MS, the chromatographic column was Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile (28:72, V/V), the flow rate was 0.3 mL/min, the detection wavelength was 241 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 0.5 μL. The scanning mode was positive-ion ESI mode(ESI⁺), the capillary voltage was 4.0 kV, the capillary outlet voltage was 175 V, the temperature of dry gas was 300 ℃, the dry gas flow rate was 8 L/min, the atomizer pressure was 35 psig, the collision energy was 15 eV, and the scanning range was m/z 100-1 000. **Results** The linear range of abietic acid was 32.375-518.000 μg/mL ($n=5$), and the RSDs of precision and repeatability tests were less than 1.0%. The average recovery of abietic acid was 100.12% with the RSD of 0.33% ($n=9$). The primary and secondary mass spectra of the sample were consistent with those of abietic acid reference. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the determination of abietic acid illegally added in Fengshi Ershiwuwei Pills.

Key words: Fengshi Ershiwuwei Pills; abietic acid; HPLC; UPLC-MS/MS

风湿二十五味丸为独家品种,主要由驴血粉、檀香、紫檀香、苦参、枫香脂、草决明等 25 味药材组方。蒙医认为其主要功效为燥“协日乌素”、散瘀,故常用于治疗游痛症、关节炎、类风湿等疾病^[1]。方中枫香脂为贵重药材,有些商家为了谋求利益最大化,常在该药材中添加廉价易得的松香酸代替,而松香酸属萜类化合物,常用于发酵工业或造纸业等,有毒^[2]。原国家食品药品监督管理总局于 2016 年发布了枫香脂中松香酸检查项补充

检验方法。目前关于松香酸的检测方法主要有薄层色谱法^[3-6]、高效液相色谱(HPLC)法^[7-10]和高效液相色谱质谱联用法^[11-14]。本研究中建立了风湿二十五味丸中松香酸的检测方法,并对检出的阳性样品进行了确认。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪,6530B Accutate -

第一作者:卢洋,女,大学本科,主管药师,研究方向为药物质量分析与评价,(电子信箱)luyang6789@139.com。

Mass Q-TOF 型质谱仪(美国 Agilent 公司);XP2U 型微量电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);BT125D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-300DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

松香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111938-201201,含量为98%);风湿二十五味丸(乌兰浩特中蒙制药有限公司,批号分别为141128,150807,160427,160428,160532,160646,160804,160856,160935,160936,160937,170433,180810);甲酸、乙腈均为色谱纯,乙醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性分析

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1% 甲酸-乙腈(28:72, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:241 nm;柱温:20 °C;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

取松香酸对照品 25.90 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加乙醇溶解并定容,作为对照品贮备溶液;精密量取 3 mL,置 50 mL 容量瓶中,加乙醇定容,即得对照品溶液。取样品 10 丸,研细,取 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入乙醇 10 mL,超声(功率 300 W,频率 40 kHz)处理 20 min,放至室温,上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按风湿二十五味丸处方和工艺制备缺枫香脂的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性试验:取 2.1.2 项下 3 项溶液各 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按松香酸峰计应不低于 3 000,分离度均大于 1.5,基线分离良好。阴性对照品溶液色谱图中,在与松香酸对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,专属性良好。结果见图 1。

线性关系考察:精密量取 2.1.2 项下对照品贮备溶液适量,加乙醇制成每 1 mL 中分别含松香酸 32.375, 64.750, 129.500, 259.000, 518.000 μg 的系列对照品溶液,摇匀,按 2.1.1 项下色谱条件进样,测定峰面积。以松香酸的质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 21.947X + 22.736$ ($r = 0.9999$, $n = 5$)。结果表明,松香酸质量浓度在 32.375 ~ 518.000 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察:将 2.1.2 项下对照品溶液用乙醇倍比稀释,信噪比(S/N)为 3 时,最低检测质量浓度为 0.5 μg/mL,按本方法取样量 0.1 g 计算,则检出质量分数为 50 μg/g,如取样浓度增加,会污染质谱的离子源,故方法的检测限定为 50 μg/g。信噪比(S/N)为 10 时,检测质量浓度为 2 μg/mL,按本方法取样量 0.1 g 计算,则定量限为 200 μg/g。

精密度试验:取 2.1.2 项下对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件下连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.51% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 160427)适量,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,共 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.61% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

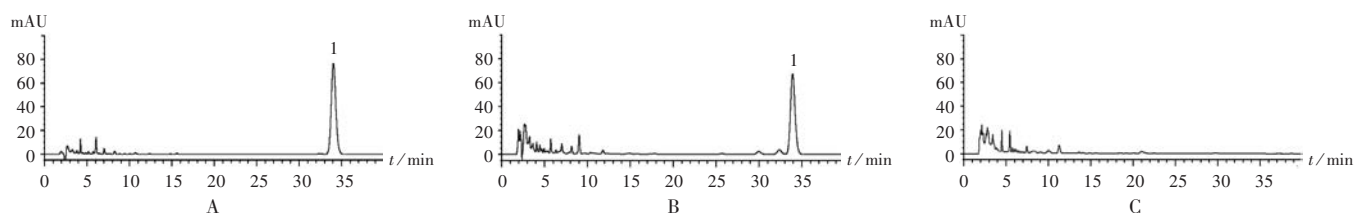
加样回收试验:取样品(批号为 160427)适量,共 9 份,分别精密加入质量浓度为 0.540 0 mg/mL 的松香酸对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0 mL,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算加样回收率。结果见表 1。

2.2 成分确认

2.2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm);流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(28:72, V/V);流速为 0.3 mL/min;检测波长为 241 nm;柱温为 25 °C;进样量为 0.5 μL。

质谱条件:正离子模式(ESI^+)扫描;毛细管电压为



1. 松香酸

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. abietic acid

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

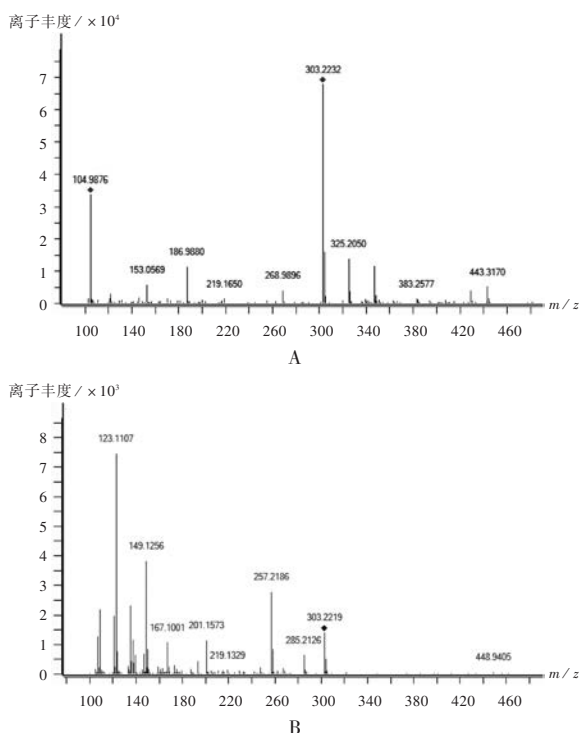
表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab.1 Results of the recovery test($n=9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.103 0	1.101 1	0.540 0	1.643 2	100.39		
0.102 5	1.096 2	0.540 0	1.634 3	99.65		
0.103 6	1.108 2	0.540 0	1.646 1	99.61		
0.105 4	1.126 8	1.080 0	2.211 2	100.41		
0.105 5	1.127 9	1.080 0	2.212 7	100.44	100.12	0.33
0.106 8	1.142 0	1.080 0	2.221 1	99.92		
0.103 4	1.105 2	1.620 0	2.728 2	100.19		
0.108 2	1.157 1	1.620 0	2.783 8	100.41		
0.108 4	1.158 7	1.620 0	2.779 2	100.03		

4.0 kV;毛细管出口电压为175 V;干燥气流速为8 L/min;干燥气温度为300 °C;雾化器压力为35 psig;碰撞能量为15 eV;扫描范围 m/z 为100~1 000。

2.2.2 检测结果

取2.1.2项下对照品溶液、供试品溶液,按2.2.1项下试验条件进样测定。结果见图2和图3。供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处有相应离子峰,且一级质谱与二级质谱与对照品溶液基本一致,ESI⁺扫描一级质谱 m/z 303.22[M+H]⁺,以 m/z 303为母离子的二级质谱 m/z 257.22[M-COOH]⁺、149.13[M-COOH-C₆H₆(CH₃)₂]⁺、123.11[M+H-COOH-C₆H₆CH₂CH(CH₃)₂]⁺。阴性对照品溶液图谱中未见相同的质谱峰。



A. 一级质谱 B. 二级质谱

图2 对照品溶液质谱图

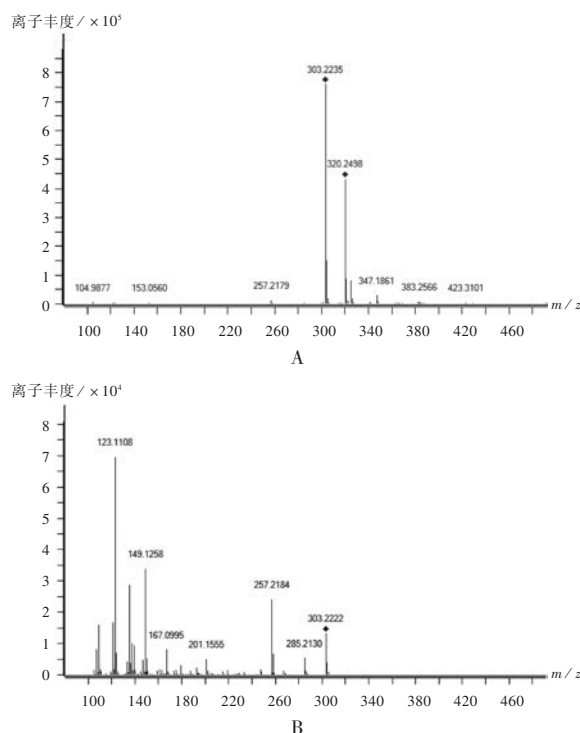
A. MS1 B. MS2

Fig.2 Mass spectrogram of reference solution

3 讨论

枫香脂中松香酸检查项补充检验方法中,HPLC法的流动相为乙腈-四氢呋喃-1%甲酸(35:25:40, V/V/V),本试验中采用0.1%甲酸-乙腈(28:72, V/V),经预试验比较,后者组分简单经济,色谱峰形佳,分离效果好,故选其为流动相。预试验中考察了不同品牌的色谱柱[包括OmniGene LLC Hubble C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent Eclipse Plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), YMC Hydrosphere C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)],流动相比比例[0.1%甲酸-乙腈(25:75, 30:70, 35:65, V/V)],柱温(17, 20, 23 °C),波长(239, 241, 243 nm),流速(0.9, 1.0, 1.1 mL/min)对检测结果的影响,发现其中微小的变动对定性的结果影响不大,但在柱温升高、乙腈比例加大时会降低分离度。

方法学考察结果表明,本研究中所建立HPLC法能对风湿二十五味丸中松香酸成分进行有效检查,并采用UPLC-Q-TOF-MS法对检查出的阳性样品进一步确认,可有效避免假阳性结果的出现。采用该方法对该厂家的13批样品进行检测,发现2018年前几乎全为松香酸阳性样品,说明当枫香脂中松香酸检查项补充检验方法发布后的短时间内,厂家并未意识到用其控制枫香脂药材的质量,但在2018年后,该品种几乎均为松香酸阴性样品,说明厂家已开始重视枫香脂药材的质量安全。



A. 一级质谱 B. 二级质谱

图3 供试品溶液质谱图

A. MS1 B. MS2

Fig.3 Mass spectrogram of test solution