

沉香化滞丸中松香酸的 HPLC 和 UPLC-Q-TOF 检测方法研究

刘东升^{1,2}, 朱琳^{1,2}, 苏蕊^{1,2}, 徐继军^{1,2}, 姚世霞^{1,2}, 朱旭江^{1,2} (1.甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070; 2.甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 兰州 730070)

摘要: 目的 建立沉香化滞丸中松香酸的 HPLC 和 UPLC-Q-TOF 检测方法。方法 采用 HPLC 测定沉香化滞丸中非法存在的松香酸, 并对阳性结果采用 UPLC-Q-TOF 进行验证。结果 松香酸浓度在 1.40~21.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积积分值呈良好的线性关系, 仪器精密度 RSD 为 0.2%, 加样回收率为 99.5%, RSD 为 1.7%。通过保留时间、最大吸收波长、母离子 (m/z 303.23) 及其子离子 (m/z 285.22, 257.22, 149.13, 123.11) 4 个方面的信息, 确认 13 批沉香化滞丸中 10 批样品非法掺入了松香酸。结论 该方法操作简便、准确, 快速, 灵敏度高, 适合对沉香化滞丸中非法添加松香酸的检测。对沉香化滞丸质量控制方面, 建议增加对松香酸非法添加的检验项目。

关键词: 沉香化滞丸; 松香酸; HPLC; UPLC-Q-TOF

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)14-1726-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.011

引用本文: 刘东升, 朱琳, 苏蕊, 等. 沉香化滞丸中松香酸的 HPLC 和 UPLC-Q-TOF 检测方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1726-1729.

Research on HPLC and UPLC-Q-TOF for the Determination of Abietic Acid in Chenxiang Huazhi Pills

LIU Dongsheng^{1,2}, ZHU Lin^{1,2}, SU Rui^{1,2}, XU Jijun^{1,2}, YAO Shixia^{1,2}, ZHU Xujiang^{1,2} (1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Inspection and Testing Technical Engineering Laboratory for Chinese Herbal and Tibetan Medicine, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish HPLC and UPLC-Q-TOF identification determination methods for abietic acid, an illegal additive in Chenxiang Huazhi pills. **METHODS** HPLC was used to determine the illicit presence of abietic acid in Chenxianghuazhi Pills. The positive results were verified by UPLC-Q-TOF. **RESULTS** The concentration of abietic acid in the range of 1.40–21.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed a good linear relationship with the peak area integral value. The precision RSD was 0.2%, the sample recovery rate was 99.5%, and the RSD was 1.7%. The obtained retention time of HPLC, the maximum absorption wavelength, mother ion (m/z 303.23), fragment ions (m/z 285.22, 257.22, 149.13, 123.11), the identification of abietic acid was performed in 13 batches Chenxiang Huazhi pills. It showed that 10 samples were added the substance containing abietic acid. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, rapid, and sensitive, which is helpful for the detection of abietic acid in Chenxiang Huazhi pills. For the quality control of Chenxiang Huazhi Pills, it is recommended to add the inspection item for illegal addition of abietic acid.

KEYWORDS: Chenxiang Huazhi pills; abietic acid; HPLC; UPLC-Q-TOF

沉香化滞丸由沉香、牵牛子(炒)、枳实(炒)、五灵脂(制)等 15 味中药组成, 为常用中成药, 具有理气化滞的作用, 用于治疗饮食停滞、胸腹胀满等症。沉香化滞丸现行标准为《卫生部药品标准中药成方制剂第九册》, 其标准简单, 很难全面控制其内在质量。且处方中沉香为名贵中药材, 资源有限, 难以满足现实需求, 导致中药材及饮片市场屡见造假、以次充好等现象。甚至向沉香中添加松香等工业原料以增香造假, 其中松香中的主要成分之一松香酸属于萜类化合物, 对人体有害^[1-7]。针对上述情况, 采用 HPLC 和 UPLC-Q-

TOF 对沉香化滞丸中可能存在的松香酸非法添加进行了研究, 发现部分生产企业生产的沉香化滞丸样品中检出松香酸, 依据原国家食品药品监督管理总局药品补充检验方法研制指南、原国家食品药品监督管理总局药品补充检验方法和检验项目批准件(2008017)及相关文献报道, 并结合样品特点, 建立了沉香化滞丸中非法添加松香酸成分的检验方法。为进一步查清沉香化滞丸的质量状况, 为后续工作提供基础数据和执法依据; 也可为此类含沉香中成药中非法添加松香酸检测方法的建立提供参考依据。

基金项目: 甘肃省食品药品科研项目(2018GSFDA005, 2018GSFDA037)

作者简介: 刘东升, 男, 硕士 Tel: (0931)7822945 E-mail: 1067664197@qq.com

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(Agilent 公司); Waters UPLC Xevo G2 QTOF 四级杆飞行时间串联质谱仪(Waters 公司); ME 204 分析天平(梅特勒-托利多公司); KQ 500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

松香酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111938-201201; 供含量测定用); 沉香化滞丸(2017 年国家抽样调查, A 厂, 批号见表 1); 甲酸(DIKMA) 和乙腈(Merck) 为色谱纯; 其余均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 液相色谱条件

CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~23 min, 60%→98%A; 23~30 min, 98%→60%A。检测波长为 241 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 2 μL。

2.2 液质条件

液相色谱柱: Waters CORTECS UPLC C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~5 min, 60%→98%A; 5~8 min, 98%A; 8~10 min, 98%→60%A。检测波长为 241 nm; 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 供试品与对照品进样量各 2 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI⁺); 离子源温度 100 °C; 脱溶剂气流速 600 L·h⁻¹; 锥孔气流速 50 L·h⁻¹; 脱溶剂气温度 280 °C; 毛细管电压 2 000 V; 二级锥孔电压 4 V; 碰撞能量 6~20 V; 扫描方式采用全扫描一级质谱、全扫描二级质谱(MS/MS), *m/z* 扫描范围为 100~600 amu。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取松香酸对照品 7.01 mg 于 100 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(临用配制)。

2.3.2 供试品溶液的制备 取本品适量, 研细, 取约 10 g, 加乙醇 25 mL, 浸泡 10 min, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 静置, 取上清液滤过, 作为供试品溶液。

2.3.3 阴性样品溶液的制备 按沉香化滞丸处方比例及制备工艺, 按“2.3.2”项下方法制备缺沉香的阴性样品溶液。

2.4 测定结果判定

按“2.1”项下色谱条件, 分别精密吸取对

照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。供试品溶液色谱图中, 与松香酸对照品色谱峰相应的位置上不得出现相同的色谱峰。

如样品中出现与松香酸对照品保留时间相同的色谱峰, 再采用二极管阵列检测比较相应色谱峰在波长 200~400 nm 的紫外-可见吸收光谱, 吸收光谱应不相同[松香酸对照品色谱峰在(241±2) nm 显示最大吸收], 如吸收光谱相同, 参照“2.2”项下液质联用方法进行验证。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 精密吸取对照品、供试品和阴性样品溶液, 注入液相色谱仪, 测定。发现阴性样品溶液在与对照品色谱峰相同保留时间处无明显干扰, 且基线平稳, 表明该方法专属性良好。结果见图 1。

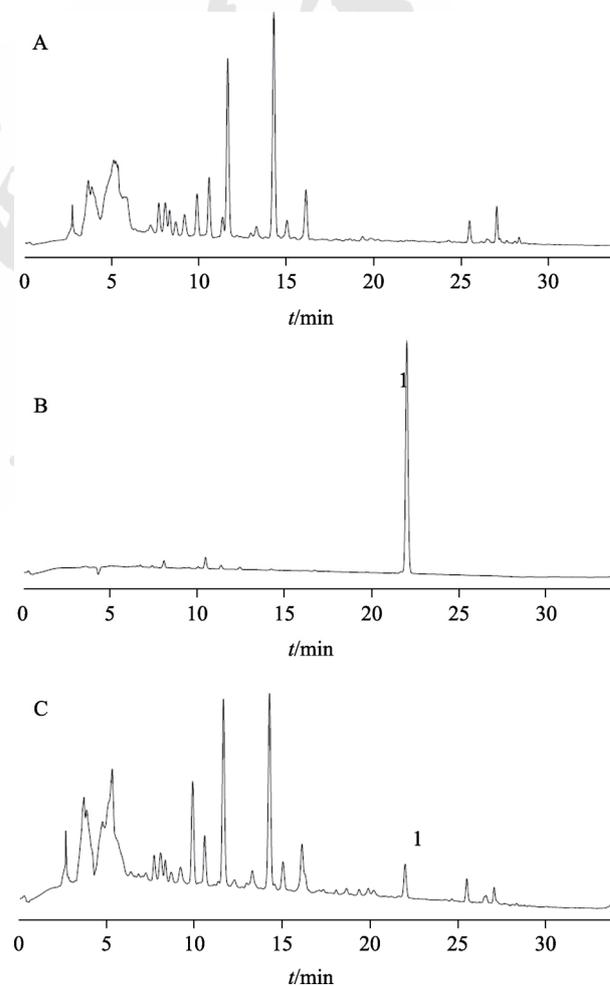


图 1 高效液相色谱图

A-阴性样品溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-松香酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-negative sample solution; B-standard solution; C-sample solution; 1-abietic acid.

2.5.2 线性范围考察 分别精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液各 1, 3, 5, 8, 10, 15 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 制成系列对照溶液。精密吸取上述系列对照溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积积分值, 以对照品溶液的浓度为纵坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y)作图, 得到近过原点的一条直线, 回归方程为 $Y=23.451X+8.431(r=0.9999)$ 。结果表明, 松香酸对照品浓度在 1.40~21.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内有良好的线性关系。

2.5.3 检测限与定量限 将“2.5.2”项下溶液图谱进行计算, 以信噪比 3 为检出限和信噪比 10 为定量限, 分别为 0.014 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.4 仪器精密度试验 精密吸取松香酸对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 测定松香酸峰面积的 RSD 为 0.2%, 表明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号: 160303), 在室温下放置 0, 6, 12, 16, 20, 24 h 后分别进样, 测定待测成分峰面积积分值。结果, 松香酸峰面积的 RSD 为 0.2%($n=6$), 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.5.6 重复性试验 精密称取同一批(批号: 160303)的供试品 6 份, 平行测定峰面积积分值, 计算松香酸含量的 RSD 为 0.8%($n=6$), 结果表明本方法重复性良好。

2.5.7 回收率测定 精密量取松香酸对照品溶液 1 mL, 置具塞锥形瓶中, 氮气吹干, 再分别精密称取已知含量的同一批号样品(批号: 160303)约

5.0 g 平行操作 6 份, 按供试品溶液的制备方法同法处理, 按“2.1”项下色谱条件测定含量, 计算加样回收率, 结果松香酸的加样回收率为 99.5%, RSD=1.7%, 表明该方法准确度较好。

2.5.8 耐用性试验 针对由于不同的厂家的高效液相色谱仪和色谱柱在性能上存在的差异, 对液相方法的可行性和适用性进行了考察, 发现采用同一仪器不同生产厂家的色谱柱(安捷伦 CAPCELL PAK C_{18} 和 TechMate III C_{18})和采用同一色谱柱不同生产厂家的液相色谱仪(Agilent 1260 和 Waters e2695)时, 均表现出良好的适用性。

2.6 含量结果测定

按本标准拟定的方法对 13 批样品进行测定, 结果见表 1。

表 1 含量测定结果

Tab. 1 Results of sample determination

批号	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	批号	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
160303	13.02	170402	9.43
160701	8.73	170403	7.32
160702	9.53	151002	10.42
160703	12.55	170701	未检出
160301	9.52	170801	未检出
160302	10.23	170802	未检出
170401	7.23		

2.7 液质验证

按照“2.2”项下液质条件分别对供试品、对照品和阴性样品溶液进行测试, 并且记录一级和二级质谱图, 结果见图 2。发现阴性样品溶液中未

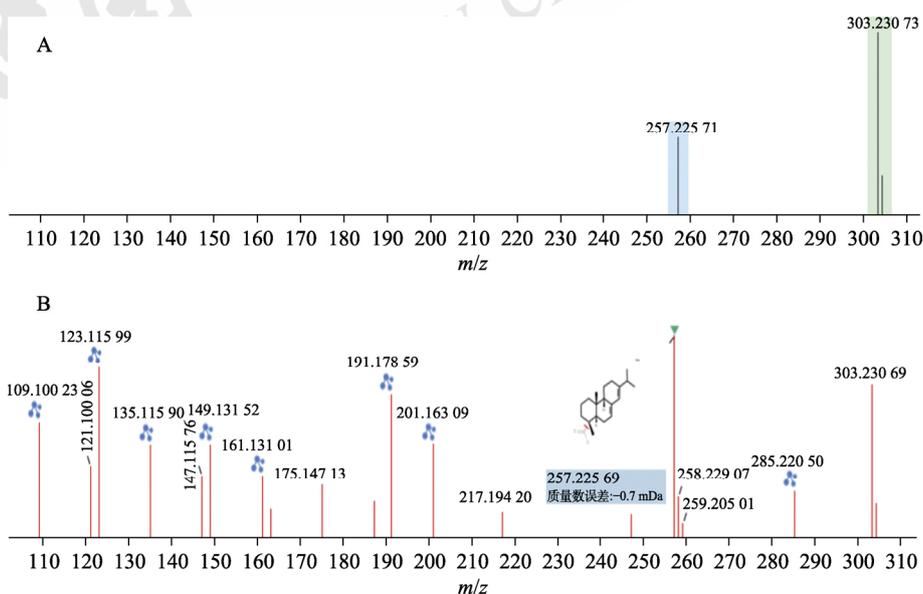


图 2 对照品溶液定性质谱图

A—一级质谱图; B—二级质谱图。

Fig. 2 MS chromatogram of standard solution

A—primary mass spectrogram; B—secondary mass spectrogram.

出现与松香酸对照一致的离子峰；而在供试品溶液一级 MS 中，出现与松香酸对照品相同的母离子 (m/z 为 303.23)；二级 MS/MS 中，均出现与松香酸对照品相同的子离子 (m/z 为 285.22, 257.22, 149.13, 123.11)，且松香酸对照品溶液相同保留时间的质谱图与掺有松香酸样品的质谱图相应保留时间吻合，这与液相色谱法的结果相一致，利用 UNIFI 软件对其相关碎片离子进行进一步归属：303.23 $[M+H]^+$ ；285.22 $[M+H-H_2O]^+$ ；123.11 $[M+H-COOH-C_6H_5CH_2CH(CH_3)_2]^+$ ；149.13 $[M-COOH-C_6H_5(CH_3)_2]^+$ ；257.22 $[M-COOH]^+$ 。

3 结论与讨论

本研究采用建立的 HPLC 和 UPLC-Q-TOF 方法，对 A 厂的 13 批沉香化滞丸样品进行松香酸检测，发现 10 批检出松香酸，检出率达 76.9%。从上述的检测情况来看，沉香化滞丸中沉香药材的非法添加松香酸的问题比较严重。究其原因，现行沉香化滞丸标准中缺少对松香酸的检查方法，使得一些厂家对投料用沉香药材的质量不够重视。但沉香是沉香化滞丸的重要成分，非法添加松香酸对整个药品质量造成了很大影响。因此，建议增加沉香化滞丸中松香酸非法添加的检验项目，以便控制沉香化滞丸的产品质量。

提取溶剂考察：为了考察不同溶剂对样品中松香酸溶解能力的影响，选用常用的提取试剂甲醇和乙醇，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，注入高效液相色谱仪，结果发现：甲醇提取的供试品溶液中杂质峰较多，严重影响目标峰；而乙

醇提取的色谱峰与目标峰有较好的分离效果，故选用乙醇作为提取溶剂。

流动相系统选择：本次实验分别尝试采用乙腈-0.1%甲酸(75 : 25)、甲醇-0.1%甲酸(75 : 25)、乙腈-四氢呋喃-0.1%甲酸(40 : 25 : 35)和乙腈-0.1%甲酸(“2.1”项下梯度条件)作为流动相体系，结果显示当选择乙腈-0.1%甲酸(“2.1”项下梯度条件)作为流动相时色谱峰的峰形较好，且分离度和理论塔板数都能达到药典要求。

REFERENCES

- [1] PAN X X, SONG F Y, LI H. Identification of illegal additive abietic acid in Chenxiang Huaqi pills [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2017, 33(1): 52-55.
- [2] WU J L, QU F N, ZHANG Q B B, et al. Research on determination of illegal additive abietic acid in Xiaorhuadu series preparations [J]. Chin J Pharmacov(中国药物警戒), 2016, 13(8): 468-471.
- [3] ZHANG Y S, MIN C Y. Study on the detection methods for sabietic acid illegally added in some Chinese herbal medicines [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2013, 28(2): 133-136.
- [4] 余俊, 曹美婧, 薛霞飞, 等. 根痛平胶囊中非法添加松香酸的补充检验方法研究[J]. 安徽医药, 2014, 18(7): 1241-1243.
- [5] ZHONG M C, RAO W W, PENG F Y. Study on determination methods for abietic acid in Xiaohuoluo pills [J]. Chin Pharmacist(中国药师), 2013, 16(12): 1791-1794.
- [6] LIU D S, XU J J, SU R, et al. Improvement of the quality standard for Chenxiang Huazhi pills [J]. Chin J Med Guide(中国医药导刊), 2019, 21(6): 359-364.
- [7] CHEN A Z, SHA Q Y, SHAN X M, et al. Determination of abietic acid in Dieda tablets by HPLC and HPLC-MS/MS [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(9): 1940-1942.

收稿日期: 2019-05-29

(本文责编: 蔡珊珊)