

高效液相色谱/串联质谱法 测定肿节风分散片中异嗪皮啶含量

梁国华^{1*}, 苏树芬²

(1. 广西北海食品药品检验所, 广西北海 536000; 2. 广西北海市妇幼保健院, 广西北海 536000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱/串联质谱法测定肿节风分散片中异嗪皮啶。方法: 采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相甲醇-水 (35:65), 流速 0.2 mL·min⁻¹。三重四级杆质谱检测器, 正离子多反应监测模式 (MRM), 监测离子 (*m/z*) 222.9/189.7, 222.9/161.9。结果: 异嗪皮啶在 0.48 ~ 2.40 mg·L⁻¹ 与峰面积具有良好的线性关系 (*r* = 0.999 2), 平均加样回收率为 99.3%, RSD 0.55% (*n* = 9)。结论: 方法简便易行, 结果准确, 重复性好, 可用于肿节风分散片中异嗪皮啶的含量测定。

[关键词] 肿节风分散片; 异嗪皮啶; 高效液相色谱/串联质谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0148-03

[doi] 10.11653/syfy2013220148

LC-MS-MS Determination of Isofraxidan in Zhongjiefeng Fensanpian

LIANG Guo-hua^{1*}, SU Shu-fen²

(1. Beihai Institute for Food and Drug Control, Beihai 536000, China;
2. Beihai Maternal and Child Health Care Hospital, Beihai 536000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining isofraxidan in Zhongjiefeng Fensanpian by LC-MS-MS. **Method:** Agilent SB-C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) column was used with methanol-H₂O (35:65) as mobile phase. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. MS-MS detection in multiple reactions monitoring (MRM) mode using positive electrospray ionization as the ionization source was applied to determine positive ions at (*m/z*) 222.9/189.7, 222.9/161.9. **Result:** Isofraxidan was linear in the range of 0.48-2.40 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 2). The average recovery was 99.3%, and RSD was 0.55% (*n* = 9). **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and reliable, which can be used for determination of isofraxidan in Zhongjiefeng Fensanpian.

[Key words] Zhongjiefeng Fensanpian; isofraxidan; LC-MS-MS

肿节风分散片具有清热解毒、消肿散结的功效, 主要用于肺炎、阑尾炎、蜂窝组织炎属热毒壅证侯者, 并用于癌症辅助治疗等症。肿节风是方中君药, 主要含有黄酮类、香豆素类、内酯类和挥发油等^[1]。肿节风的有效成分为异嗪皮啶, 肿节风分散片的中异嗪皮啶的含量测定主要采用高效液相色谱法

等^[2]。本文采用高效液相色谱-串联质谱法, 对肿节风分散片中异嗪皮啶的含量进行测定, 以期提高肿节风分散片质量标准可控性, 为进一步完善该制剂的质量标准和不良反应药物质量考察提供实验依据。

1 材料

Agilent 1290 型高液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司), Agilent G6430 型三重串联质谱仪 (安捷伦科技有限公司), AE-240 型电子天平 (上海梅特勒仪器有限公司), SK5200H 型超声波清洗器 (功率 300 W, 频率 250 kHz, 上海科导仪器有限公司)。

异嗪皮啶对照品 (中国药品生物制品检定所,

[收稿日期] 20120305(009)

[基金项目] 广西不良反应药物质量考察项目 (桂科攻 10124001A-66)

[通讯作者] * 梁国华, 副主任药师, 从事药品和食品及保健品检验工作, Tel: 0779-6803559, E-mail: lgh1280@sina.com

批号 110837-200304, 供含量测定用), 肿节风分散片为市售品(浙江维康药业有限公司, 批号 20110204, 20100803, 20110602, 20100302, 20100502, 20110702, 20120102, 20120503, 20121003), 色谱甲醇(默克公司), 纯净水(杭州娃哈哈公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件 色谱条件: Agilent ZOREAX SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相甲醇-水(35:65), 流量 0.20 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为正离子, 监测方式为多反应监测(MRM), 雾化气压力 30 psi, 干燥气温度 300 °C, 干燥气流速 8.0 L·min⁻¹, 喷雾电压 4 000 V, 异嗪皮啶定性离子质荷比(*m/z*) 222.9/161.9, 定量离子质荷比(*m/z*) 222.9/189.7, 定性和定量离子对应的碰撞能量压分别为 25, 20 V, 碎裂电压都为 115 V。

2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品 12.0 mg 于 100 mL 量瓶, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(异嗪皮啶含量为 4.8 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液制备 取肿节风分散片 10 片, 碾碎、混匀, 取粉末约 2 g, 于 50 mL 量瓶, 加入约甲醇 40 mL, 超声处理(功率 300 W, 频率 250 kHz) 40 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 20 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 色谱质谱行为 异嗪皮啶的分子式为 C₁₁H₁₀O₅, 相对分子质量为 222.19。按 2.1 项条件下, 将异嗪皮啶对照品溶液进行正离子扫描, 见图 1。异嗪皮啶的质谱扫描图谱显示, 其 M + H 分子离子峰丰度最强, 质荷比(*m/z*) 为 222.9/189.7, 故选择性监测此离子作为定量依据。异嗪皮啶选择离子色谱图见图 2, 总离子色谱图见图 3。其中, 异嗪皮啶的保留时间约为 0.85 min, 溶液内的其他杂质不干扰样品的分离测定。

2.5 标准曲线制备 精密量取异嗪皮啶对照液 1, 2, 3, 4, 5 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 每个浓度的样品分析 3 次, 以对照品的质量浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 2\ 003.4X - 4.95$ ($r = 0.999\ 2$), 表明异嗪皮啶在 0.48 ~ 2.40 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 按 2.5 标准曲线制备项下制备

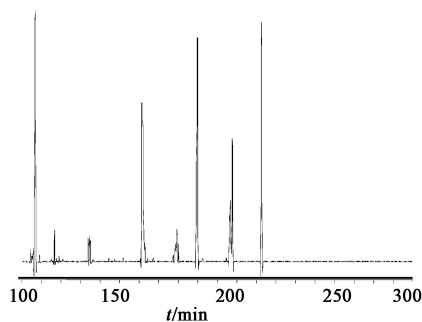
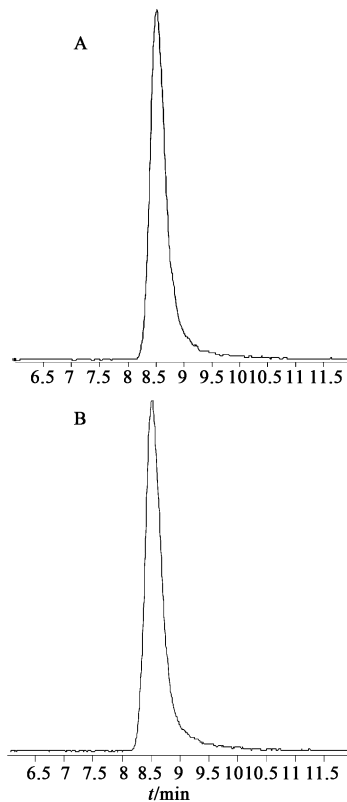


图 1 异嗪皮啶质谱扫描图



A. 对照品; B. 供试品

图 2 异嗪皮啶的定性和定量选择离子色谱

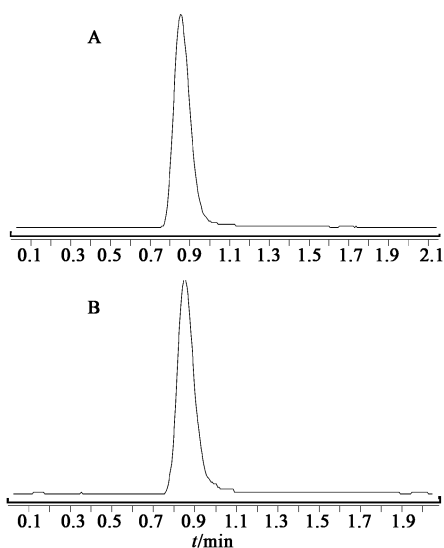
低、中、高 3 个浓度系列分别为 (0.48, 1.44, 2.40 mg·L⁻¹), 各浓度日内重复测定 5 次, 并连续测定 5 d, 每日 1 份。计算其日内、日间的精密度。结果日内 RSD 0.78%, 日间 RSD 0.97%。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 9 份, 分别精密加入异嗪皮啶对照品适量, 分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱及质谱条件下进样, 测定, 计算回收率。结果见表 1。

2.8 样品含量测定 取 9 批样品分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱及质谱条件下进样测定, 计算含量 ($n = 9$)。结果见表 2。

3 讨论

异嗪皮啶的分子式为 C₁₁H₁₀O₅, 相对分子质量



A. 对照品; B. 样品

图 3 肿节风分散片总离子流图

表 1 肿节风分散片中异嗪皮啶加样回收率试验 (n=9)

样品 取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.552 3	0.541 2	0.72	1.253 5	98.9		
0.524 3	0.532 5	0.72	1.251 2	99.8		
0.512 3	0.512 7	0.72	1.230 5	99.7		
0.510 7	0.502 1	0.48	0.981 2	99.8		
0.523 1	0.511 2	0.48	0.989 7	99.7	99.3	0.55
0.524 3	0.513 4	0.48	0.990 5	99.4		
0.525 4	0.512 5	0.24	0.748 7	98.4		
0.510 5	0.508 9	0.24	0.745 6	98.6		
0.534 2	0.522 4	0.24	0.760 1	99.0		

表 2 样品含量测定 (n=9)

批号	含量	批号	含量	批号	含量
20110204	1.025 4	20100302	1.102 3	20120102	1.025 7
20100803	1.045 2	20100502	1.025 8	20120503	1.235 0
20110602	1.012 5	20110702	1.0897	20121003	1.204 5

mg·g⁻¹

为 222.19。本文采用电喷雾 (ESI) 离子源, 正离子电离模式进行扫描, 按 2.1 项条件下, 将异嗪皮啶对照液在正离子模式下进行全离子扫描优化方法, 先在 MS2 Scan 模式下找出准确的母离子峰 m/z 222.9, 并在 MS2 SiM 模式下确定能使母离子峰信号最强的碎裂电压 115 V, 然后在 Product Ion 模式下对母离子进行轰击打碎, 分别找出 2 个信号较强的碎片离子 m/z 189.7, 161.9, 并确定其对应的最佳

碰撞能量 (CE) 25, 20 V, 建立并优化好方法后, 以母离子和子离子组成监测离子对, 以多反应监测 (MRM) 模式对异嗪皮啶进行定性和定量分析, 选择丰度最强的碎片离子组成的监测离子 (m/z) 222.9/189.7 用于定量分析, 而 (m/z) 222.9/161.9 用于定性分析, 为获得更高的离子强度, 在多反应监测 (MRM) 模式下同时对其他质谱条件进行优化。

比较了多种流动相体系, 甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水梯度洗脱、乙腈-水梯度洗脱。对比各流动相体系的出峰时间、分离度、和峰形对称性, 最终选择了本方法的流动相, 并以不同比例进行试验, 当甲醇-水的比列为 35:65 时, 峰形对称, 峰宽较窄且保留时间较短。采用本法测定肿节风分散片中异嗪皮啶含量具有较高的选择性和专一性, 灵敏度高, 操作简单、重复性好。

参考文献 [3-4] 加甲醇超声处理和用氯仿振荡提取比较, 以峰面积为测定指标, 结果发现加甲醇超声处理提取效果好。

通过对色谱柱 Agilent ZOREAX SB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), Agilent-TC C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent ZOREAX SB (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 的研究比较, 三者峰形均正态, 分离良好, 而前者出峰时间短。择优后选择前者作为系统条件色谱柱。

肿节风分散片采用 HPLC 法测定时, 检测限和定量限较高, 样品中有较大的干扰, 而高效液相色谱/串联质谱法有较高的选择性和专一性, 排除了其他杂质的干扰, 灵敏度高, 短时间内可完成对一个样品的分析, 操作简单、重复性好。

[参考文献]

[1] 覃星柳. 肿节风制剂的研究进展及临床应用[J]. 华夏医学, 2011, 24(6): 738.
 [2] 张广财, 张朔, 李可强. 高效液相色谱波长切换法同时测定肿节风中多指标成分的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23): 2051.
 [3] 高云峰. 反相高效液相色谱法同时测定刺五加脑液中绿原酸和异秦皮啶[J]. 中国药业, 2010, 14(8): 46.
 [4] 金佩芬. 高效液相色谱法测定刺五加注射液中异秦皮啶含量[J]. 中国药业, 2009, 18(3): 9.

[责任编辑 顾雪竹]