

LCMS-8045 检测清热散结胶囊中阿多尼弗林碱的含量

LCMSMS-539

摘要： 本文参考国家药品监督管理局国家药品标准 YBZ15862005-2011Z-2018 的相关条件，采用超高效液相色谱仪 LC-40B X3 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用对清热散结胶囊中阿多尼弗林碱含量进行测定。实验结果显示：在本色谱系统下，空白溶液不干扰含量测定，方法专属性较好；校正因子溶液重复进样 6 次，目标峰阿多尼弗林碱和内标野百合碱色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.55% 和 1.13%、2.05%，重复性好、仪器精密度良好；采用内标法定量，方法准确度高，可为清热散结胶囊中阿多尼弗林碱含量测定提供参考。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 阿多尼弗林碱 清热散结胶囊

清热散结胶囊具有消炎解毒，散结止痛的功效。主要用于治疗急性结膜炎、急性咽喉炎、急性扁桃腺炎、急性肠炎、急性菌痢、上呼吸道感染、急性支气管炎、淋巴结炎、疮疖疼痛、中耳炎、皮炎湿疹等。清热散结胶囊的主要有效作用成分是千里光。千里光为菊科植物千里光的全草，具有清热解毒、明目、利湿等作用。而阿多尼弗林碱是中药材千里光中的吡咯里西啶类生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs)，是该属植物的特征性成分之一。阿多尼弗林碱具有强烈的肝毒性，直接靶器官为肝脏，在体内通过代谢活化而致毒，可引起肝细胞出血性坏死等症状，近年来引起了国际社会的广泛关注，国外已有因服用了含欧洲千里光植物的药茶而致死的报道。

由于 PAs 的毒性，许多国家和地区对其限量作出了规定。国家药品监督管理局国家药品标准 YBZ15862005-2011Z-2018 规定清热散结胶囊中阿多尼弗林碱规格 (1) 不得超过 67 μg ，规格 (2) 不得超过 50 μg 。由于千里光属植物中 PAs 含量相对较低，且该类化合物结构上无生色团，紫外响应弱，故采用液相色谱 - 质谱联用法测定清热散结胶囊中的阿多尼弗林碱含量，对清热散结胶囊安全用药进行质量控制，以保障用药安全。本研究参照国家药品标准 YBZ15862005-2011Z-2018，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪定量检测清热散结胶囊中阿多尼弗林碱的分析方法，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。

具体配置为：

系统控制器：SCL-40

柱温箱：CTO-40S

输液泵：LC-40B X3

自动进样器：SIL-40C X3

色谱工作站：LabSolutions Ver.5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack GIST 100 mm x 2.1 mm I.D., 2.0 μm ；

P/N: 227-32001-03；岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B- 乙腈溶液

洗针模式：进样前后洗针，External only（进样针外壁清洗），Rinse Port

流速: 0.4 mL/min
进样体积: 2 μ L
洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 6%, 时间程序见表 1。

柱温: 40°C
洗针液: 甲醇 / 水 = 1/1 (v/v)

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1	柱温箱	Oven Valve 1.	0*
2.5	泵	Pump B Conc.	60
4	泵	Pump B Conc	40
4	柱温箱	Oven Valve 1.	1*
9	泵	Pump B Conc.	40
9.01	泵	Pump B Conc.	6
15	控制器	Stop	

注: * “0” 表示流路切换至质谱, “1” 表示流路切换至废液。

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式
雾化气流速: 3 L/min
加热模块温度: 400 °C
接口温度: 300 °C
DL 温度: 250 °C

电离模式: 正离子模式
加热气流速: 10 L/min
干燥气流速: 10 L/min
扫描模式: 多反应监测 (MRM)
MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	阿多尼弗林碱	366.10	338.20*	-13	-29	-25
			94	-13	-44	-17
2	野百合碱 (内标)	326.15	237.15*	-11	-34	-28
			194	-15	-35	-19

* 代表定量离子对。

1.3 校正因子溶液配制

取野百合碱对照品适量, 精密称定, 用 0.5% 甲酸溶液制成每 1 mL 含 0.2 μ g 的溶液, 作为内标溶液。

取阿多尼弗林碱对照品适量, 精密称定, 用 0.5% 甲酸溶液制成每 1 mL 含 0.1 μ g 的溶液, 作为对照品溶液。

精密量取对照品溶液 1 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加 0.5% 甲酸溶液至刻度, 摇匀, 待测, 作为校正因子溶液。

1.4 样品前处理

取清热散结胶囊(规格, 0.35 g/粒) 0.25 g, 置于离心管中, 精密加入 0.5% 甲酸溶液 - 甲醇(40:60)的混合溶液【稀释剂】50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 600 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用稀释剂补足减失的重量, 摇匀。过 0.22 μ m 膜, 取续滤液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入内标溶液 2 mL, 加入稀释剂至刻度, 摇匀, 吸取 2 μ L 上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 专属性

本实验针对清热散结胶囊进行分析，主药的浓度约为 mg/mL 级别，杂质阿多尼弗林碱浓度约为 ng/mL 级别。为了准确测定低浓度的，并且避免高浓度的主药和辅料进入质谱，造成污染，需要通过流路切换阀将此类物质切至废液，只让待测杂质进入质谱检测，故主药及辅料与待测杂质的分离度至关重要。本文实现了主药等与待测杂质的良好分离。本方法中通过设置阀切换程序将 4 min 之前洗脱液切入质谱进行分析，其余时间切入废液。

溶剂空白样品与校正因子溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰保留时间处，未见明显干扰，方法专属性好。

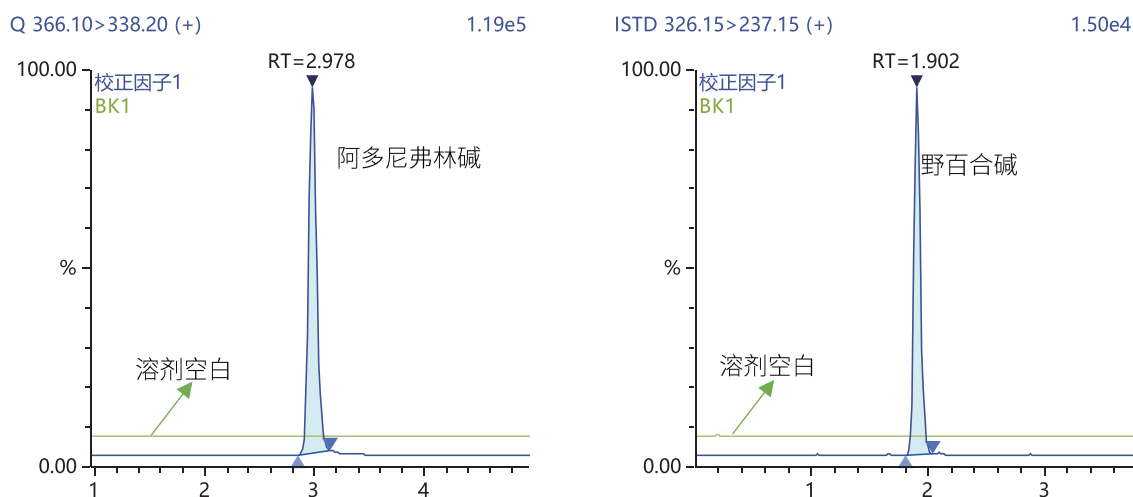


图 1 校正因子溶液与溶剂空白 MRM 重叠色谱图

2.2 精密度实验

校正因子溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如图 2 和表 3 所示。校正因子溶液中阿多尼弗林碱和内标野百合碱的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.55% 和 1.13%、2.05%，仪器精密度良好。

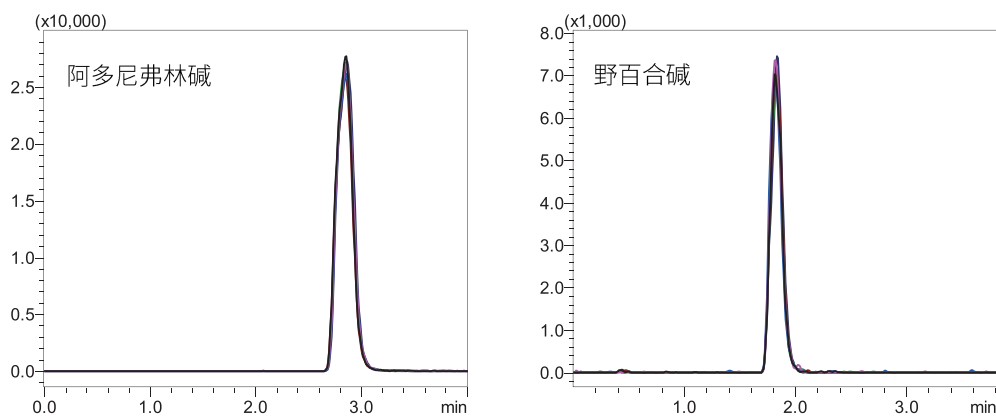


图 2 校正因子溶液精密度色谱图

表 3 精密度结果 (n=6)

名称	阿多尼弗林碱		野百合碱 (内标)	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	2.868	298,253	1.835	52,279
2	2.859	295,375	1.827	53,415
3	2.856	293,504	1.819	52,049
4	2.860	295,199	1.844	51,871
5	2.876	291,741	1.839	53,455
6	2.857	288,673	1.820	54,673
平均	2.863	293,791	1.831	52,957
%RSD	0.28	1.13	0.55	2.05

2.3 样品测定

校正因子溶液与供试品溶液各进样 2 μL 进行测定, 采用内标法计算供试品含量, 如图 3 所示, 定量结果为 34.83 $\mu\text{g}/\text{粒}$, 低于标准规定的限度要求。

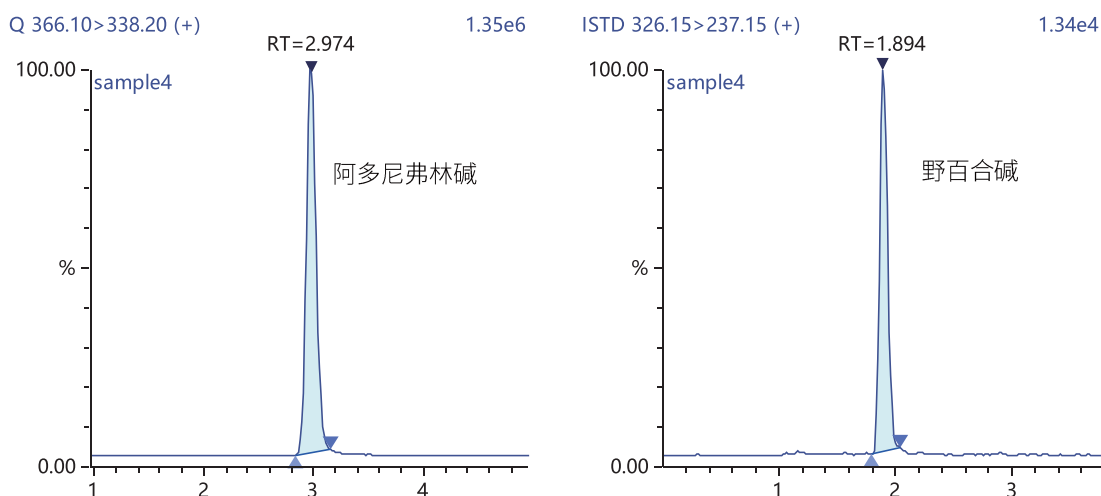


图 3 供试品溶液色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40B X3 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用定量测定清热散结胶囊中阿多尼弗林碱的新方法。本方法重复性好、准确度高、前处理简单, 可实现清热散结胶囊中痕量阿多尼弗林碱的高灵敏度、快速检测。

岛津应用云

