

HPLC-DAD 法测定云香十五味丸中非法添加松香酸

刘益庆, 钱明明, 马秀建

(连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要: **目的** 建立 HPLC-DAD 法测定云香十五味丸中非法添加松香酸的含量。**方法** 云香十五味丸乙醇提取液的分析采用 Shiseido Capcell PakC₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈-四氢呋喃 (35:40:25); 检测波长 241 nm。同时采用 UPLC-Q-TOF-MS 方法对松香酸进一步确认。采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 2.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈 (30:70); 体积流量 0.22 mL/min。**结果** 松香酸在 4.008~100.2 μg/mL ($r=1$) 范围内线性关系良好, 平均回收率为 99.46%, RSD 为 0.99% ($n=9$)。**结论** 该方法简便、准确、重复性好, 适用于云香十五味丸非法添加松香酸的检查。

关键词: 云香十五味丸; 松香酸; 非法添加; HPLC-DAD; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)11-2580-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.046

云香十五味丸收载于卫生部药品标准蒙药分册, 由制草乌、木香、石菖蒲、诃子、梔子、川楝子、决明子、苘麻子、枫香脂、五灵脂、文冠木、瞿麦、黑云香、沉香、麝香十五味药组成, 用于风湿性关节炎、类风湿、“巴木”病、游痛症、疮疡、梅毒^[1]。其中, 沉香、枫香脂收载于 2015 年版《中国药典》^[2], 沉香主要通过性状、鉴别、特征图谱、浸出物、含量测定等指标来控制, 枫香脂主要通过性状、鉴别、干燥失重、总灰分、含量测定等指标来控制。由于这两种药材价格较贵, 市场上经常有在此类药材中非法添加松香的现象^[3]。国家食品药品监督管理局已批复了沉香、枫香脂补充检验方法和检验项目 (批准件编号 2008017、2016005), 通过薄层色谱法和高效液相色谱法来检查松香酸组分^[4-5]。松香中的松香酸属萜类化合物, 主要成分为松香酸酐和游离松香酸, 常用于造纸业或植物抑制剂等, 有小毒, 对人体有害^[6]。本实验采用高效液相色谱法检测云香十五味丸中松香酸的含量^[7-9], 并对检出的阳性样品采用液-质联用方法进行验证^[10-12], 该法可靠、简便, 对云香十五味丸中非法添加问题提供了强有力的技术支撑。

1 仪器与试剂

Agilent1260 型高效液相色谱仪、Agilent 6530B Accurate-Mass Q-TOF 质谱仪 (美国安捷伦公司); BT125D 电子分析天平 (德国赛多利斯公司); XP2U 微量电子天平 (美国梅特勒-托利多公司); KQ-300DE 型超声波清洗器 (昆山超声波仪器有限公司)。

松香酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 111938-201201); 云香十五味丸 (批号 140833、150311、

160602、20150421); 乙腈 (色谱级); 甲酸 (色谱级); 四氢呋喃 (色谱级); 乙醇为分析纯; 水为超纯水; 阴性样品自制。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取松香酸对照品 25.05 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品贮备溶液; 精密量取对照品贮备溶液 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 即得。

2.1.2 供试品溶液制备 取本品 10 粒, 研细, 精密称定 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 加入乙醇 20 mL, 超声处理 20 min, 放置室温, 上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液制备 模拟处方及工艺制备去除枫香脂和沉香的阴性样品, 按“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液, 即得。

2.2 色谱条件 SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈-四氢呋喃 (35:40:25); 检测波长 241 nm; 进样量 10 μL。理论塔板数按松香酸计算应不低于 3 000。

2.3 专属性试验 取松香酸对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL, 在“2.2”项条件下测定, 结果云香十五味丸样品中呈现与松香酸对照品保留时间相同的色谱峰, 且二极管阵列检验器在相应色谱峰的紫外-可见吸收光谱与松香酸对照品相同, 而阴性样品则无相对应的色谱峰, 无其他成分干扰, 见图 1~2。

2.4 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下对照品贮备

收稿日期: 2017-11-17

作者简介: 刘益庆 (1985—), 男, 主管药师, 主要从事药品检验与研究工作。Tel: (0518) 85836783, E-mail: liuyiqing510@163.com

* 通信作者: 钱明明 (1988—), 男, 硕士, 药师, 主要从事药品检验与研究工作。

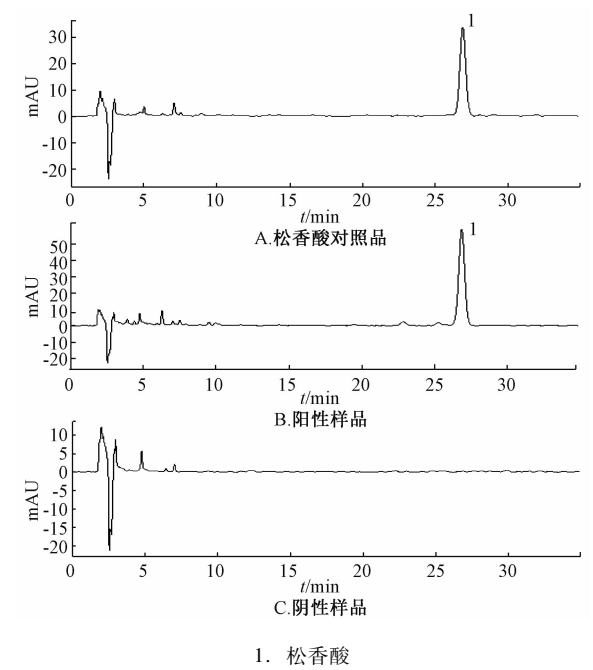


图 1 云香十五味丸色谱图

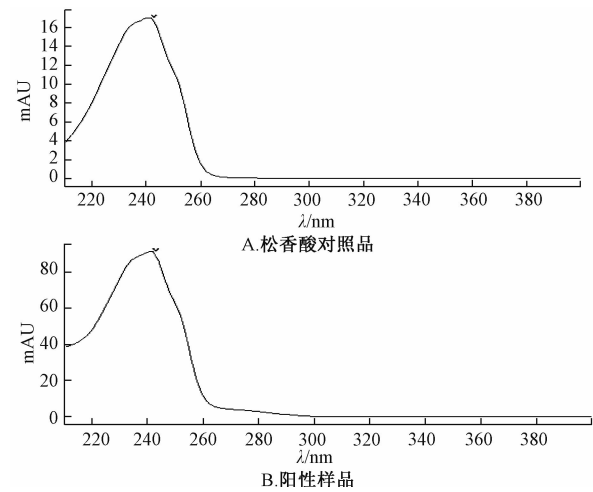


图 2 云香十五味丸 DAD 光谱图

溶液 2 mL，分别置 500、200、100、50、20 mL 量瓶中，加乙醇稀释至刻度，摇匀，在“2.2”项条件下测定，以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X），得到松香酸的回归方程为 $Y = 21.076X + 3.752\ 5$ （ $r = 1$ ），松香酸在 4.008 ~ 100.2 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 取质量浓度为 20.04 $\mu\text{g/mL}$ 的松香酸对照品溶液，在“2.2”项条件下连续测定 6 次，测得峰面积 RSD 为 0.38%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取阳性样品（批号 160602）0.2 g，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、6、8、12 h 进样，测得松香酸峰面积的 RSD 值为 0.62%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取阳性样品（批号 160602）0.2 g，精密称定，平行 6 份，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项条件下测定，记录峰面积，计算松香酸

的平均质量浓度为 3.062 mg/g，RSD 为 0.79%（ $n = 6$ ），表明该方法重复性良好。

2.8 检测限与定量限 取质量浓度为 20.04 $\mu\text{g/mL}$ 的松香酸对照品溶液用乙醇进行多次稀释，信噪比 S/N 为 3 时，检测限为 0.60 $\mu\text{g/mL}$ ；信噪比 S/N 为 10 时，定量限为 1.60 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.9 耐用性试验 选用 Shiseido Capcell Pak C₁₈（250 mm × 4.6 mm，5 μm ）、Aglient Eclipse Plus C₁₈（250 mm × 4.6 mm，5 μm ）、Thermo Hypersil Gold aQ C₁₈（250 mm × 4.6 mm，5 μm ）色谱柱，在“2.2”项条件下，对阳性样品（批号 160602）测定，结果其色谱峰保留时间与松香酸对照品峰相同，理论塔板数和分离度符合要求，且二极管阵列检测器在相应色谱峰的紫外-可见吸收光谱与松香酸对照品相同。

2.10 加样回收率试验 取阳性样品（批号 160602）0.2 g，精密称定，置 9 个具塞锥形瓶中，分别精密加入松香酸对照品溶液（0.36 mg/mL）1 mL 3 份、2 mL 3 份、3 mL 3 份，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项条件下测定，记录峰面积，计算回收率，结果见表 1。

表 1 松香酸加样回收率试验结果（ $n = 9$ ）

取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
0.201 0	0.616 1	0.361 4	0.971 8	98.42		
0.200 5	0.614 2	0.361 4	0.969 2	98.23		
0.198 9	0.608 5	0.361 4	0.965 7	98.84		
0.200 3	0.613 1	0.722 8	1.336 2	100.04		
0.201 6	0.617 1	0.722 8	1.334 1	99.20	99.46	0.99
0.198 5	0.608 2	0.722 8	1.321 8	98.73		
0.197 8	0.605 2	1.084 2	1.699 2	100.90		
0.201 2	0.615 8	1.084 2	1.701 4	100.13		
0.201 1	0.615 2	1.084 2	1.706 2	100.63		

2.11 样品含有量测定 取云香十五味丸样品 3 批，按照“3.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项条件下测定，记录峰面积，计算含有量，结果见表 2。

表 2 各样品含有量测定结果

批号	松香酸/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均含有量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
140833	3.601 9	3.604
	3.605 2	
150311	2.181 6	2.186
	2.190 8	
160602	3.070 1	3.062
	3.054 3	
20150421	1.126 2	1.155
	1.183 8	

2.12 UPLC-Q-TOF-MS 定性分析

2.12.1 色谱质谱条件 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱（2.1 mm × 50 mm，2.7 μm ）；流动相 0.1% 甲酸-乙腈（30：70）；检测波长 241 nm；进样量 1 μL ；体积流量 0.22 mL/min。ESI⁺扫描；毛细管电压 3.5 kV；毛细管出

口电压 175 V；干燥气温度 300 ℃；干燥气体积流量 8 L/min；雾化器压力 241.325 kPa；碰撞能量 15 eV；扫描范围 m/z 100~1 000。

2.12.2 松香酸质谱特征 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 285.21 [M+H-OH]⁻、257.21 [M-COOH]⁺、149.13 [M-COOH-C₆H₆ (CH₃)₂]⁺、123.11 [M+H-COOH-C₆H₆CH₂CH (CH₃)₂]⁺。

2.12.3 检测结果 分别取阳性样品和对照品溶液，在“2.12.1”项条件下测定，记录一级质谱图和二级质谱图，在非法添加松香的样品色谱图中，与松香酸对照品相应保留时间处色谱峰的质谱图基本一致，见图 3~4。

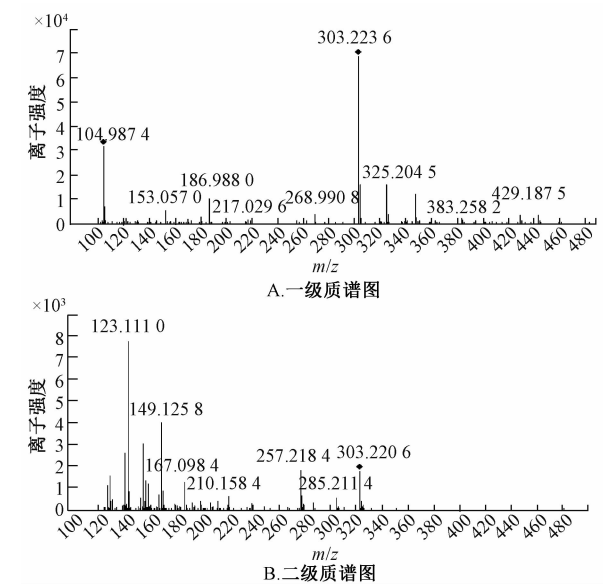


图 3 松香酸对照品质谱图

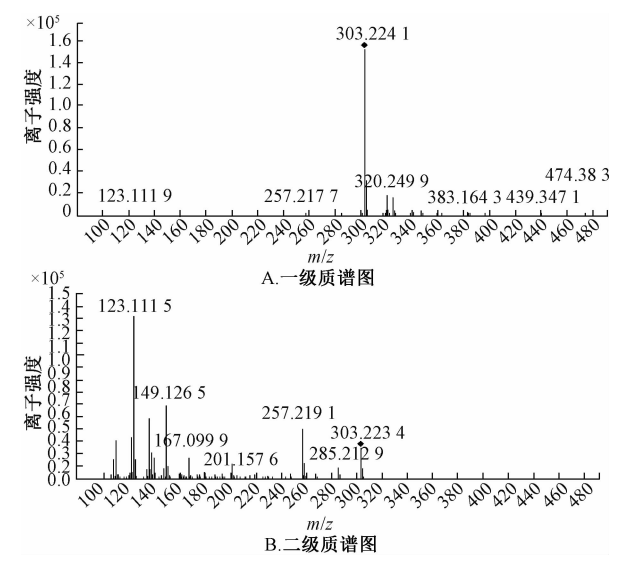


图 4 阳性样品质谱图

3 讨论

云香十五味丸为蒙药，其中枫香脂和沉香都为贵重药

材，而松香价廉易得，常被不法分子作为此类药材造假的材料，松香的主要成分为松香酸 (C₁₉H₂₉COOH)，对人体有危害，曾在中成药银屑敌胶囊中发现非法添加松香酸而导致多人中毒的现象。

国家药品补充检验方法和检验项目批准文件沉香和枫香脂项下均有松香酸检查项，其中 HPLC 方法的流动相分别为乙腈-0.1% 甲酸 (75:25) 和乙腈-四氢呋喃-0.1% 甲酸 (35:25:40)，含有枫香脂的阳性样品中，采用乙腈-四氢呋喃-0.1% 甲酸能将松香酸与前面的杂质峰完全分离出来，调整四氢呋喃的比例，能使保留时间缩短并且不影响分离度和理论塔板数，所以最终流动相确定为乙腈-四氢呋喃-0.1% 甲酸 (35:40:25)。

本实验建立的 HPLC-DAD 方法能够有效地对云香十五味丸中非法添加松香酸进行检查，并采用 UPLC-Q-TOF-MS 方法对检查出的阳性样品进一步确认，有效避免假阳性的出现。通过此法检查市售的四批云香十五味丸，均检出松香酸成分。

参考文献:

[1] 卫生部药品标准蒙药分册，云香十五味丸[S]. 1998: 65.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 185, 206.
[3] 黄宝斌, 许明哲, 杨青云, 等. 中成药和中药材添加化学物质补充检验方法分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (9): 1701-1708.
[4] 孙磊, 刘燕, 逢瑜, 等. 西黄丸和活血止痛散中乳香及非法添加松香的薄层色谱鉴别[J]. 中国药事, 2013, 27(7): 722-724, 744.
[5] 张亚双, 闵春艳. 小活络丸中非法添加松香酸的检查方法研究[J]. 中成药, 2013, 35(4): 867-869.
[6] 潘玄玄, 宋粉云, 李华. 沉香化气丸中非法添加松香酸的检查方法研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 52-55.
[7] 仇雅静. 高效液相色谱法检查筋骨丸胶囊中非法添加的松香酸[J]. 中国药业, 2011, 20(4): 39-40.
[8] 肖聪, 饶伟文, 钟名诚. 没药掺伪品中松香酸的检测方法研究[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1237-1241.
[9] 汪杨丽, 苏晶, 张毅. 舒筋活血丸中非法添加物松香酸的检测方法[J]. 中国现代中药, 2015, 17(3): 244-246.
[10] 王瑞忠, 张玉荣, 何轶, 等. HPLC 法测定冠脉宁片(胶囊)中 11-羧基-β-乙酰乳香酸及松香酸检查[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2326-2330.
[11] 张艳萍, 黄婉锋, 郭智聪, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定含沉香中成药中沉香醇和非法添加物质松香酸的含量[J]. 轻工科技, 2016, 32(11): 29-30.
[12] 张好琳, 曹玲, 谭力, 等. 液质联用技术用于沉香中非法掺入含松香酸类物质的检测[J]. 中成药, 2011, 33 (5): 844-847.