

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定脂必妥片中桔霉素的残留量

罗达龙*,王 华(广西梧州食品药品检验所,广西梧州 543002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1278-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.35

摘要 目的:采用固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定脂必妥片中桔霉素的残留量。方法:采用固相萃取法进行前处理,色谱柱为Zorbax Eclipse Plus C₁₈,流动相为水(加0.1%甲酸)-乙腈(70:30, V/V)(梯度洗脱),流速为0.30 mL/min,柱温为40 ℃,分析时间为7 min,进样量为2 μL;离子化模式为正离子模式,离子源温度为150 ℃,干燥气流速为15 L/min,鞘气温度为350 ℃,鞘气流速为12 L/min,毛细管电压为3 500 V,雾化器压力为40 psi,喷雾电压为0 V,工作模式为多反应监测模式。结果:桔霉素检测质量浓度线性范围为0.1~20 ng/mL($r=0.999 4$);定量限和检测限分别为0.05、0.01 ng/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为98.868%~103.160%(RSD=1.5%, $n=6$)。结论:该方法简便快速、灵敏、结果准确,适用于脂必妥片中桔霉素的残留量测定。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法;固相萃取;桔霉素;残留量;脂必妥片

Determination of Residual Citrinin in Zhibituo Tablets by Solid Phase Extraction-UPLC-MS/MS

LUO Dalong, WANG Hua(Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Guangxi Wuzhou 543002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine residual citrinin in Zhibituo tablet by solid phase extraction-UPLC-MS/MS. METHODS: The sample was processed preliminary by solid extraction. The determination was performed on Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase consisting of water (0.1% formic acid)-acetonitrile (70:30, V/V, gradient elution) at the follow rate of 0.30 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and analysis time was 7 min, the sample size was 2 μL. Ionization mode was positive ion mode. The ion source temperature was 150 ℃, drying gas velocity was 15 L/min, sheath gas temperature was 350 ℃, sheath gas flow rate was 12 L/min, capillary voltage was 3 500 V, atomization device pressure was 40 psi, atomization voltage was 0 V. The acquisition mode was MRM mode. RESULTS: The linear range of citrinin was 0.1-20 ng/mL($r=0.999 4$); the limits of quantitation and detection were 0.05 and 0.01 ng/mL. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%; recoveries were 98.868%-103.160% (RSD=1.5%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid, sensitive, accurate and suitable for the determination of residual citrinin in Zhibituo tablet.

KEYWORDS UPLC-MS/MS; Solid phase extraction; Citrinin; Residual; Zhibituo tablets

脂必妥片具有健脾消食、除湿祛痰、活血化瘀等功效,可用于高脂血症、动脉粥样硬化及由此引起的头晕、头痛、胸痛、肢体麻木等症的治疗^[1]。其主要处方成分是红曲,而红曲是我国传统药材,是用特有的红曲霉菌在大米中培养发酵而成。然而,1995年法国学者Blanc等发现大多数红曲霉菌株能产生对肾脏有很强毒害作用和致癌作用的桔霉素(Citrinin)^[2],从而使红曲及含有红曲的相关制剂的安全性受到质疑。目前已有相关制剂中桔霉素残留量的报道^[3-14],但尚未有测定脂必妥片中桔霉素残留量的报道,因此笔者采用固相萃取-超高效

液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立了测定脂必妥片中桔霉素残留量的方法,以为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1290UPLC型UPLC-QQQ6490型三重四极杆串联质谱仪(美国Agilent公司);XA205DU型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);P180H型超声波清洗器(德国Elma Schmidbauer GmbH公司,功率:300 W,频率:25 kHz);HLB固相萃取柱(上海安谱科学仪器有限公司,填

[13] 赵新静,周慧,冯凯.二盐酸奎宁注射液质量标准的研究[J].中国现代药物应用,2010,4(14):1-2.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年

版.北京:中国医药科技出版社,2015:375.

[15] 李珏,梁鹏云,王立升,等.新型阿那曲唑衍生物的合成[J].合成化学,2013,4(21):450-453.

(收稿日期:2016-07-21 修回日期:2016-12-11)

(编辑:刘 柳)

*主管药师。研究方向:药品、食品检验。电话:0774-3882209。
E-mail:364634386@qq.com

料量:60 mg,柱容积:3 mL)。

1.2 药品与试剂

脂必妥片(成都地奥九泓制药厂,批号:1501009、1503034、1504015,规格:0.35 g/片);桔霉素对照品(青岛普瑞邦生物工程有限公司,批号:150403,纯度:100%);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

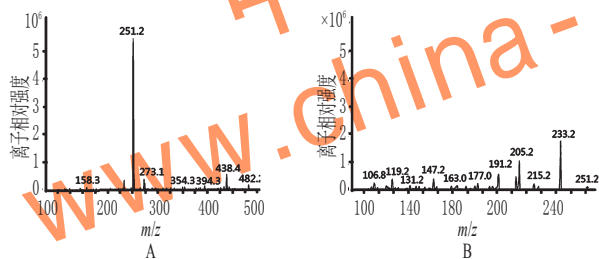
2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相:水(加0.1%甲酸)-乙腈(70:30,V/V),梯度洗脱(0~4.0 min,70%→10% A;4.1~5.5 min,10% A;5.6~7.0 min,70% A);流速:0.30 mL/min;柱温:40℃;分析时间:7 min;进样量:2 μL。

2.1.2 质谱条件 离子化模式:正离子(ESI⁺)模式;离子源温度:150℃;干燥气流速:15 L/min;鞘气温度:350℃;鞘气流速:12 L/min;毛细管电压:3 500 V;雾化器压力:40 psi;喷雾电压:0 V;工作模式:多反应监测模式;母离子:*m/z* 251.2(M+1),二级主要裂解碎片:*m/z* 233.2、205.2。

在上述试验条件下进行测定,理论板数以桔霉素峰计>3 000;峰形良好,分离度>1.5,详见图1、图2。



A.一级质谱;B.二级质谱

A. MS spectrum; B. MS/MS spectrum

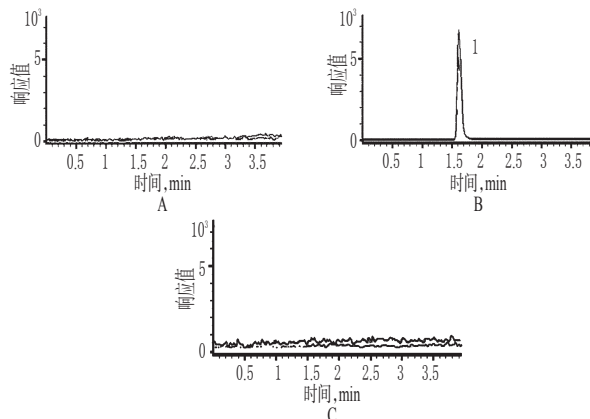
图1 桔霉素扫描质谱图

Fig 1 MS spectra of citrinin

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取桔霉素对照品10.0 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得桔霉素质量浓度为1.0 mg/mL的对照品溶液。测定前样品需净化后再进样。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,研细,精密称取细粉0.5 g,置于10 mL锥形瓶中,加1%甲酸-甲醇溶液3 mL,超声提取30 min,冷却至室温,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液转移至25 mL量瓶中,加水定容,摇匀,即得。测定前样品需净化后再进样。



A.空白溶液;B.对照品溶液;C.供试品溶液;1.桔霉素

A. blank solution; B. control solution; C. test sample solution; 1. citrinin

图2 桔霉素的总离子流图

Fig 2 TIC of citrinin

2.2.3 空白溶液 按样品的处方比例称取空白辅料适量,按“2.2.2”项下方法制备空白溶液。测定前样品需净化后再进样。

2.2.4 样品净化 精密量取上述溶液各5 mL,以1 mL/min通过HLB固相萃取柱(使用前分别以3 mL甲醇和3 mL水活化),用5 mL水淋洗,弃去,再用5 mL甲醇洗脱,收集洗脱液,洗脱液于40℃下用氮气吹至近干,精密加入1 mL甲醇溶解,经0.22 μm有机滤膜滤过,取续滤液进行测定。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,逐级稀释,制备桔霉素质量浓度分别为0.1、2、5、10、20 ng/mL的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液各适量,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。以桔霉素质量浓度(*x*, ng/mL)为横坐标、峰面积(*y*)为纵坐标进行线性回归,得桔霉素回归方程为 $y = 3\,329.186\,799x + 4\,586.551\,631$ ($r = 0.999\,4$)。结果表明,桔霉素检测质量浓度线性范围为0.1~20 ng/mL。

2.4 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,桔霉素的LOQ为0.05 ng/mL,LOD为0.01 ng/mL。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,桔霉素峰面积的RSD=1.6% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,分别于室温下放置0、1、8、12、24 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,桔霉素峰面积的RSD=1.9%(n=5),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:1501009)适量,置于25 mL量瓶中,加入25 ng桔霉素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,桔霉素峰面积的RSD=1.6%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取样品(批号:1501009)适量,共6份,分别置于10 mL量瓶中,分别加入一定质量的桔霉素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test(n=6)

取样量,g	样品含量,ng	加入量,ng	测得量,ng	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.502 1	0	25.000	25.790	103.160	100.4	1.5
0.510 2	0	25.000	24.891	99.564		
0.500 2	0	25.000	24.717	98.868		
0.511 0	0	25.000	24.992	99.968		
0.520 9	0	25.000	25.032	100.128		
0.517 6	0	25.000	25.198	100.792		

2.9 样品残留量测定

取3批样品(批号:1501009、1503034、1504015)各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,3批样品中均未检出桔霉素。

3 讨论

3.1 固相萃取柱的选择

固相萃取法是利用固体吸附剂将样品中的目标化合物吸附,使目标化合物与干扰物分离,再用洗脱液洗脱达到分离和富集的目的^[15]。固相萃取法与传统的试剂提取方法相比,避免了甲苯等有毒试剂的使用。目前,该方法常用于食品检验前处理时的净化步骤,但在药品检测前处理中尚未记载。由于固相萃取所用填料类型较多,本试验进行了HLB、C₁₈、硅胶、氧化铝等数个填料的固相萃取柱的筛选试验,由于HLB填料固相萃取柱不仅能有效去除桔霉素外的杂质,又同时保证了桔霉素的回收率,故本试验选用HLB固相萃取柱。

3.2 流动相的选择

笔者曾选择了水-乙腈、水(加0.1%甲酸)-乙腈、水

(加0.1%甲酸)-甲醇等作为本试验的流动相。结果发现,水(加0.1%甲酸)-乙腈作为流动相时,能更有效地促进目标物的电离,桔霉素的响应值更大,具有更佳的灵敏度。因此,选择水(加0.1%甲酸)-乙腈为本试验的流动相。

综上所述,本方法简便快速、灵敏、结果准确,适用于脂必妥片中桔霉素的残留量测定。

参考文献

- [1] 李艳,刘素娟,张雷红,等.HPLC法同时测定脂必妥片中3种Monacolin类成分的含量[J].药物分析杂志,2011,31(2):270-273.
- [2] 胡晓清,陈福生,邢淑婕,等.红曲中桔霉素的薄层层析分析[J].食品科学,2003,24(5):126-129.
- [3] 陈蕴,许赣荣,顾玉梅,等.TLC及HPLC测定红曲产品中的桔霉素[J].无锡轻工大学学报,2001,20(2):164-168.
- [4] 黄志兵,李燕萍,王延华,等.橙色红曲菌As3.4384及其诱变体发酵产物中的桔霉素和色素的高效液相色谱研究[J].分析化学,2007,35(4):474-478.
- [5] 江一菲,徐渊金,王钱,等.高效液相色谱法检测几种米醋中的桔霉素含量[J].中国调味品,2012,37(6):85-88.
- [6] 李志强,袁永俊,张晓龙.高效液相色谱法测定桔霉素[J].中国调味品,2011,36(4):72-75.
- [7] 王彩,霞肖杰,孙爱东,等.高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素[J].中国粮油学报,2010,25(7):125-128.
- [8] 陈福生,邢淑婕.红曲产品中桔霉素含量的ELw-asA测定[J].食品科学,2004,25(8):169-172.
- [9] 陈蕴,许赣荣,虞慧玲.红曲桔霉素高效液相色谱测定条件的优化[J].分析与检测,2004,30(1):118-123.
- [10] 许赣荣,李凤琴,陈蕴,等.红曲霉桔霉素的检测方法 & 红曲霉产桔霉素的判别方法[J].微生物学通报,2004,31(3):16-20.
- [11] 文镜,徐东.红曲中桔霉素的HPLC-苯基柱分离分析[J].中国酿造,2010,29(6):148-150.
- [12] 连喜军,鲁晓翔,刘勤生,等.桔霉素的定性及定量测定方法研究进展[J].环境与健康杂志,2007,24(11):935-937.
- [13] 郭雪梅,许杨,刘仁荣.免疫亲和柱-高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素[J].分析与检测,2007,33(10):148-151.
- [14] 潘振球,冯家力,王一红,等.液相色谱串联质谱法检测食品中的桔霉素[J].中国卫生检验杂志,2008,18(11):2192-2193.
- [15] 王海波,杨欣欣,邸学.固相萃取-HPLC法测定大鼠体内咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗的血药浓度及药动学研究[J].中国药房,2015,26(34):4770-4772.

(收稿日期:2016-04-01 修回日期:2016-12-27)

(编辑:刘柳)