

UPLC-MS/MS 法测定抗风湿中成药及保健品中非法添加 10 种抗风湿性化学成分

罗廷顺¹, 石桂兰², 胡建勇¹, 刘泽弘³, 孙 钢¹, 杨 静^{1*}

1. 大理州食品药品检验所, 云南 大理 671000

2. 弥渡县中医院, 云南 弥渡 675600

3. 大理州食品检验检测院, 云南 大理 671000

摘要:目的 建立 UPLC-MS/MS 法检测中成药及保健品中非法添加的 10 种抗风湿类化学成分的含量。方法 以 ACQUITY UPLC BEHC₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 为色谱柱, 以含 0.1% 乙酸 0.02 mol/L 醋酸铵溶液-乙腈为流动相梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min; 质谱采用电喷雾离子源 (ESI), 多反应监测 (MRM) 模式进行定性定量分析。结果 10 种化学物质的质谱检测线性范围宽, 线性关系良好, $r \geq 0.996$, 平均方法回收率为 92.5%~101.8%, RSD 为 0.9%~3.1%, 检出限为 0.001 5~0.018 μg, 定量限为 0.004 5~0.55 μg, 27 批样品中有 10 批样品检出了非法添加的化学物质。结论 本方法操作简单, 灵敏度高, 结果准确, 可作为抗风湿类中成药及保健品中非法添加化学物质的测定方法。

关键词: UPLC-MS/MS; 抗风湿; 中成药; 保健品; 非法添加

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)11-1576-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.009

Detection of 10 anti-rheumatic constituents illegally added in Chinese traditional medicine and health products by UPLC-MS/MS

LUO Ting-shun¹, SHI Gui-lan², HU Jian-yong¹, LIU Ze-hong³, SUN Gang¹, YANG Jing¹

1. Dali Institute For Food and Drug Control, Dali 671000, China

2. Chinese Medicine Hospital of Midu County, Midu 675600, China

3. Dali Institute For Food Control, Dali 671000, China

Abstract: Objective To establish a UPLC-MS/MS method for determination of 10 anti-rheumatic constituents illegally added in Chinese traditional medicine and health products preparation. **Methods** The column was ACQUITY UPLC BEHC₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), The mobile phase was acetonitrile -Ammonium acetate solution (containing 0.1% Acetic acid) with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The ion source was electrospray ionization (ESI), Multiple-reaction monitoring (MRM) was performed to identify and quantify 10 anti-rheumatic constituents. **Results** 10 linear calibration curves were obtained with $r \geq 0.996$. The recoveries were determined at three concentration and ranged from 92.5% to 101.8%. The precision of the method was shown by RSD ($n = 5$) ranged from 0.9% to 3.1%. The ranges of limit of detection were from 0.001 5 to 0.018 μg, and quantitation were from 0.004 5 to 0.55 μg. The illegally added chemicals were detected with 10 batches of 27 batches of samples. **Conclusion** The method were simple, sensitivity, accurate, and can be used to detect Anti-rheumatic constituents illegally added in Chinese traditional medicine and health products.

Key words: UPLC-MS/MS; anti-rheumatism; Chinese traditional medicine; health products; illegally addition

近年来, 中成药和保健品非法添加化学药品的现象引起人们越来越多的关注, 特别是抗风湿类中成药和保健品的情况比较严重。风湿性及类风湿性

关节炎为临床常见病、多发病, 属难治性疾病。纯中成药或保健品以其温和持久、副作用小而易被广大消费者接受, 具有广泛的发展前景。然而一些不

收稿日期: 2017-05-03

作者简介: 罗廷顺 (1985—), 男, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事药品检验检测。Tel: 15125175270 E-mail: 309632602@qq.com

*通信作者 杨 静 (1978—), 女, 大学本科, 主管药师, 主要从事药品检验检测。Tel: 13987256476 E-mail: 835871998@qq.com

法商家为牟取暴利,利用化药成分见效快的特点以及人们对纯中药制剂的信任,在一些抗风湿类中成药和保健品中擅自添加了说明书中未标示的化学成分^[1-2]。消费者在不知情下服用此类产品,易引起重复用药、药物配伍风险等隐患,导致相应毒副作用,甚至死亡,严重地损害消费者的身体健康。通过文献调研并结合本研究发现,在抗风湿类中成药和保健品中常见非法添加的化学成分为对乙酰氨基酚、阿司匹林、甲氧苄啶、安基比林、地塞米松、吡罗昔康、氢化可的松、萘普生、醋酸泼尼松、双氯芬酸钠、吲哚美辛、布洛芬等10种。本研究建立了采用UPLC-MS/MS多反应监测法测定抗风湿类中成药和保健品中10种非法添加化学成分的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ACQUITY UPLC 超高效液相, Waters Micro Mass /Quattro micro API 三重四级杆质谱,离子源为ESI(美国waters公司), Mass lynx v4.1 工作站(美国waters公司);色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); AND GH-252 电子天平,精度为0.01 mg(日本);SB-5200DTS型双频超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯,对乙酰氨基酚(100018-200408)、阿司匹林(100113-200603)、甲氧苄啶(100031-200304)、安基比林(100503-200301)、吡罗昔康(100177-200603)、氢化可的松(152-9103)、萘普生(10198-0002)、双氯芬酸钠(100334-200302)、吲哚美辛(0258-9602)、布洛芬(100179-201105)对照品均购自中国食品药品检定研究院。27批样品均来自大理州宾川县物资交流会食品药品监督管理局收缴缅甸籍非法买卖的中成药和保健品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以乙腈为流动相A,含0.1%乙酸的0.02 mol/L醋酸铵溶液为流动相B,体积流量为0.25 mL/min,检测波长为230 nm,柱温为30℃,进样量为4 μL。按表1进行梯度洗脱。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化源(ESI),毛细管电压3.0 kV;脱溶剂气(N₂)流量500 L/h;锥孔反吹气流量50

L/h;离子源温度100℃;脱溶剂气温度350℃;采用多反应监测(MRM)模式检测;离子模式:ES⁺和ES⁻。10种抗风湿性化学成分的其他质谱分析参数见表2,10种抗风湿性化学成分的MRM总离子流图见图1。

表1 梯度洗脱程序

Table1 The gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	12	88
8.2	60	40
8.5	12	88
10.0	12	88

表2 10种抗风湿性化学成分的质谱分析参数

Table 2 MS parameters for 10 antirheumatic constituents

化学成分	监测离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/Ve
对乙酰氨基酚	152.3>92.7	30	20
	152.3>110.2*		20
阿司匹林	137.5>93.2*	20	15
甲氧苄啶	291.3>123.1*	25	20
	291.3>261.1		25
安基比林	232.5>113.0*	20	15
	232.5>159.2		15
吡罗昔康	332.4>95.2	30	20
	332.4>121.3*		20
	332.4>164.5		15
氢化可的松	363.5>97.0	40	20
	363.5>121.0*		25
萘普生	230.2>185.2*	55	25
双氯芬酸钠	294.3>214.3	35	20
	294.3>250.0*		10
吲哚美辛	356.8>297.4	40	20
	356.8>312.3*		10
布洛芬	206.28>161.3*	20	7

*为定量离子对

*ion pair for quantitation

2.3 对照品储备液的制备

取对乙酰氨基酚、阿司匹林、甲氧苄啶、安基比林、吡罗昔康、氢化可的松、萘普生、双氯芬酸钠、吲哚美辛、布洛芬对照品约10 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度为1 mg/mL的对照品储备液。

2.4 供试品溶液的制备^[3]

若供试品为片剂或丸剂取10粒研细,胶囊取10粒内容物,充分混匀,精密称取一次服用量,置

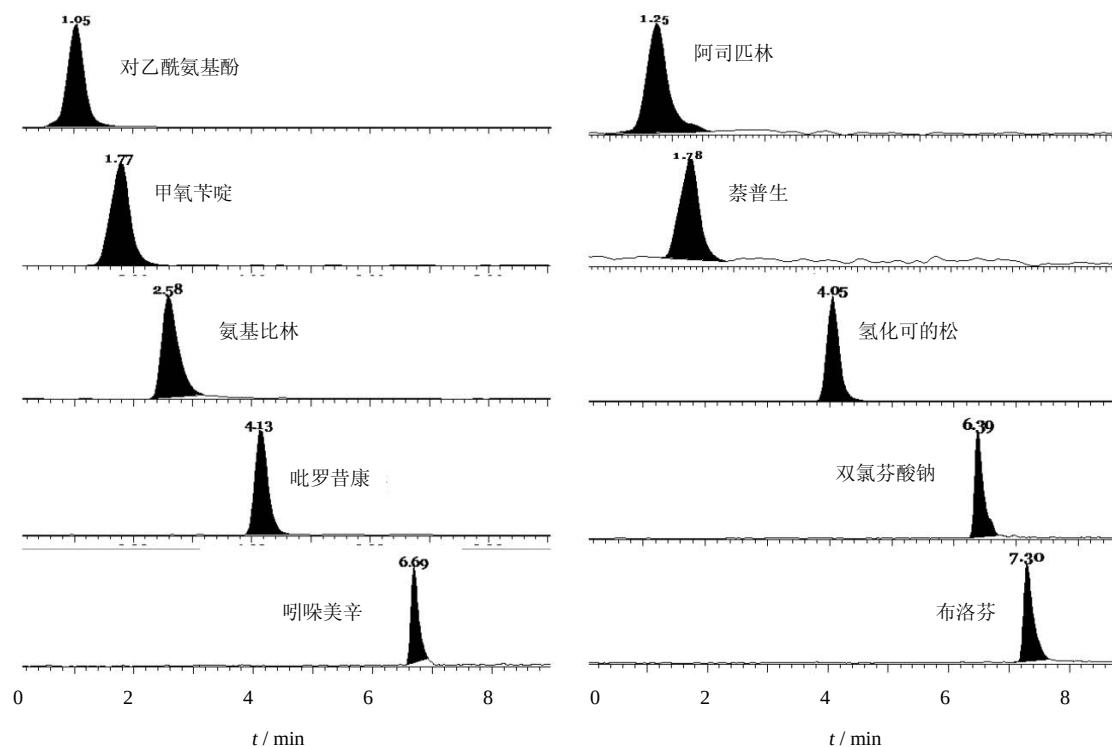


图1 10种抗风湿性化学成分MRM总离子流图

Fig. 1 MRM total ion chromatogram of 10 antirheumatic constituents

25 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声提取 20 min, 放冷至室温, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 膜滤过, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品储备液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.5 mL 置 25 mL 量瓶中, 用加 50% 甲醇定容至刻度, 作为对照品标准系列溶液。分别取 4 μL 进样, 以定量监测离子对的离子流中谱峰峰面积为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标进行线性关系考察, 结果见表 3。

2.5.2 方法检出限和定量限 精密称取 15 号样品风湿骨痛灵 (批号 120814, 未检出 10 种非法添加成分) 约 0.5 g, 加入适当稀释的混合对照品溶液, 按“2.4”项方法制备供试品溶液, 得信噪比为 3 和 10 时分别为 10 种抗风湿非法添加成分的检出限与定量限, 结果见表 3。

2.5.3 重复性试验 取 15 号样品 (批号 120814) 约 0.5 g, 精密称定, 准确加入质量浓度约为 1 mg/mL 的混合对照品溶液 2 mL, 使样品中 10 种对照品最终质量分数为 4 mg/g, 按“2.4”项方法重复制备 6

表3 10种抗风湿非法添加成分的线性关系、检出限和定量限

Table 3 Linear regression results, LOD and LOQ of 10 antirheumatic constituents

化学成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg	检出限/ μg	定量限/ μg
对乙酰氨基酚	$Y=1.0741 \times 10^6 X + 6964.8$	0.9993	0.0625~0.625	0.0015	0.0045
阿司匹林	$Y=3489.4X + 127.79$	0.9961	0.081~0.81	0.011	0.033
甲氧苄啶	$Y=2.2678 \times 10^6 X + 6237.1$	0.9971	0.0608~0.365	0.0028	0.0084
氨基比林	$Y=2.2722 \times 10^5 X + 4691.6$	0.9997	0.146~0.438	0.0058	0.017
吡罗昔康	$Y=2.0151 \times 10^5 X + 1415.6$	0.9988	0.0587~0.587	0.0027	0.0081
氢化可的松	$Y=1.2060 \times 10^5 X + 529.43$	0.9990	0.0593~0.593	0.0023	0.0070
萘普生	$Y=17973X + 105.57$	0.9972	0.162~0.540	0.0046	0.014
双氯芬酸钠	$Y=1663.3X + 149.20$	0.9963	0.228~1.82	0.018	0.055
吲哚美辛	$Y=724.27X + 26.334$	0.9970	0.258~2.06	0.011	0.034
布洛芬	$Y=1558.8X + 68.096$	0.9964	0.245~1.96	0.016	0.048

份,测定这10种成分的量,其RSD均在1.2%~3.3%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 精密度试验 取上述10种抗风湿性化学成分的混合对照品溶液(40 μg/mL)连续重复进样6次,每次4 μL计算各成分的峰面积,其RSD均在1.8%~2.5%,表明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 取上述“重复性试验”项下其中1份样品,于室温下放置,分别于0、2、4、8、10、12、15 h进样分析,每次4 μL计算各成分的峰面积,其RSD均在1.1%~2.2%,表明所测供试品溶液在15 h内稳定。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取15号样品(批号120814)约0.5 g,共9份,分别准确加入质量浓度约为1 mg/mL的混合对照品溶液1、2、4 mL,使样品中10种对照品最终质量分数分别为2、4、8

mg/g,每个浓度3份。按“2.4”项方法制备供试品溶液,测定10种成分的量,计算各成分回收率。对乙酰氨基酚、阿司匹林、甲氧苄啶、安基比林、吡罗昔康、氢化可的松、萘普生、双氯芬酸钠、吲哚美辛、布洛芬平均加样回收率依次为98.4%、95.2%、99.4%、97.5%、101.8%、96.1%、95.2%、96.5%、100.3%、92.5%;其RSD分别为1.1%、2.1%、2.4%、1.6%、0.9%、3.1%、2.9%、3.1%、1.9%、3.6%,结果表明本方法回收率良好。

2.6 样品定量测定

取需测定的27批样品,每批2份,每份精密称取约0.5 g,按“2.4”项方法制备供试品溶液,按上述色谱条件和质谱条件进样分析,根据定量监测离子对的离子流图中谱峰峰面积外标法计算样品中10种抗风湿性化学成分的量。定量结果见表4。

表4 27批样品定量检测结果

Table 4 Results of quantitative detection of 27 batches of samples

编号	样品名称	标示生产单位	生产批号	检出结果/(mg·g ⁻¹)
1	华佗风湿骨痛王	上海恒安堂药业有限公司	20141002	均未检出
2	风湿灵	香港聚众堂中药厂	110703	氨基比林 6.341
3	风湿灵	香港聚众堂中药厂	130801	双氯芬酸钠 41.49
4	坐骨腰痛丸	香港聚众堂中药厂	130433	吲哚美辛 44.25
5	风湿根治王	美国圣大波德大药房	20140103	双氯芬酸钠 30.13
6	风湿根治王	美国圣大波德大药房	20140418	双氯芬酸钠 45.28
7	追风透骨伤痛膏	香港其门堂国际药业有限公司	20140502	阿司匹林 2.660
8	风湿骨刺丹	香港聚众堂中药厂	130921	吲哚美辛 49.44
9	高效骨痛康	河南健源堂药业有限公司	20140702	均未检出
10	坐骨腰痛丸	杏林药业株式会社监制	20120213	均未检出
11	风湿克星胶囊	美国安特舒大厂出品	20120312	均未检出
12	骨节灵	香港聚众堂中药厂	130412	均未检出
13	风湿止痛药酒	宇翁腾药房出品	201409	均未检出
14	速效坐骨神经痛丸	杏林药业株式会社监制	120108	均未检出
15	风湿骨痛灵	香港聚众堂中药厂	120814	均未检出
16	风湿骨痛灵	香港聚众堂中药厂	110702	氨基比林 0.6766
17	风湿骨痛灵	香港聚众堂中药厂	121113	吲哚美辛 47.17
18	风湿骨刺丸	杏林药业株式会社	130501	均未检出
19	风湿骨刺丸	杏林药业株式会社	101001	均未检出
20	超速效风湿克星	礼士大药房	120418	均未检出
21	痛风灵	鸿伟药业有新公司监制	140628	均未检出
22	抗毒消炎丸	无	11213	均未检出
23	秘制通血丸	香港聚众堂中药厂	111144	吲哚美辛 9.546
24	特效冬虫草金蝎胶囊	北京益康堂医药科技有限公司	20140627	均未检出
25	坐骨神经痛丸	日本塔牌杏林药业株式会社	130108	均未检出
26	灭湿痛胶囊	德国汉堡里哈明药厂	201409	均未检出
27	风湿骨痛宁	北京益康堂医药科技有限公司	20140807	均未检出

3 讨论

近几年来,在云南各州县举办的大小物资交流会和乡镇农民街上到处都能见到缅甸籍人非法买卖中成药和保健品,初步统计,每年大理州“三月街”民族节药材市场均会有20多家,宾川县物资交流会,祥云县物资交流会和弥渡县物资交流会等均有买卖。这些药物种类繁多,批号混乱,比如有抗炎镇痛类、补肾壮阳类、抗风湿类、减肥类、降糖类等。很多药物批准文号缺失,无说明书、无规格标示或无禁忌症说明等。随着中国经济和社会的发展,人们越来越关注健康和养生问题,中成药和保健品的开发顺应了这个需求,也给人们带来了益处。但随着商业竞争的加剧和人们对保健功效作用的看重,不良生产企业向中成药和保健品中非法添加化学药物的行为愈演愈烈。为了有效打击和查处缅甸籍中成药和保健品扰乱中国市场,保障人们生命和财产的安全,维护市场的正常秩序。

抗风湿类中成药和保健品通常成分非常复杂,而紫外检测器选择性不强,仅凭色谱保留时间来判断,很容易出现假阳性,所以很有必要采用高选择性的质谱检测^[4],本文通过UPLC-MS/MS技术将高效液相色谱的分离能力和质谱的高选择性相结合,对中成药和保健品中非法添加对乙酰氨基酚、阿司匹林、甲氧苄啶、氨基比林、吡罗昔康、氢化可的松、萘普生、双氯芬酸钠、吲哚美辛、布洛芬10种化学药物同时进行检测,本方法专属性强,分离度好,10种化学药物均能达到基线分离,准确高效,

分析速度快,只需10 min即可完成检测,在实际应用中,特别涉及公安部门需要尽快报告结果的检测时,效果很好^[5]。

本次检测的27批样品中有10批样品检出了非法添加物,占总数的37%。其中2号和16号2批样品检出氨基比林,3、5、6号3批样品检出双氯芬酸钠,4、8、17、23号4批样品检出吲哚美辛,7号样品检出阿司匹林;其中7批样品生产厂家均为香港聚众堂中药厂,非法添加物为吲哚美辛、双氯芬酸钠和氨基比林,2批样品生产厂家为美国圣大波德大药厂,非法添加物为双氯芬酸钠,1批样品生产厂家为香港其门堂国际药业有限公司,非法添加物为阿司匹林。

参考文献

- [1] 廖 瑜. HPLC快速筛查抗风湿类中成药及保健品中非法添加的10种化学药[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 868-871.
- [2] 吴晓敏, 史大军, 王明娟, 等. 止痛止痒类中成药中非法添加化学药物的快速鉴定方法[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2095-2100.
- [3] 抗风湿类中成药中非法添加化学药品补充检验方法[S]. 2009.
- [4] 来国防, 程 宾, 鲁 静. LC-MS法测定抗风湿类中药非法添加化学药物成分[J]. 中国药师, 2010, 13(4): 453-455.
- [5] 励 炯, 沈国芳, 朱 建, 等. UPLC-MS/MS法测定抗风湿中成药中非法添加8种抗风湿性化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(18): 2647-2651.