

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

励 炯, 沈国芳, 朱 建, 裘一婧

杭州市食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310017

摘要: 目的 建立抗风湿中成药中非法添加 8 种抗风湿性化学成分的 UPLC-MS/MS 检测方法。方法 以 BEH-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离, 串联四级杆质谱仪检测, 多反应监测 (MRM) 模式进行定性定量分析, 样品以甲醇为溶剂超声提取, 检测添加在中成药中的氢化可的松、地塞米松、醋酸泼尼松、对乙酰氨基酚、保泰松、萘普生、吡罗昔康与甲氧苄啶 8 种化学成分。结果 8 种抗风湿性化学成分质谱检测的线性范围宽, 相关性好, $r^2 \geq 0.998 9$; 方法精密度的 RSD 为 1.2%~3.5%; 方法回收率为 95.4%~104.9%; 定量限为 0.4~4.9 μg/mL; 日内精密度的 RSD 为 0.6%~2.7% ($n=5$), 日间精密度的 RSD 为 0.9%~2.9% ($n=9$)。结论 方法专属性强, 操作简单快捷, 可作为中成药中非法添加 8 种抗风湿性化学成分的有效检测方法。

关键词: UPLC-MS/MS; 中成药; 抗风湿; 非法添加; 氢化可的松; 地塞米松; 醋酸泼尼松; 对乙酰氨基酚; 保泰松; 萘普生; 吡罗昔康; 甲氧苄啶

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2647-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.014

Detection of eight antirheumatic constituents illegally added in Chinese patent medicine by UPLC-MS/MS

LI Jiong, SHEN Guo-fang, ZHU Jian, QIU Yi-jing

Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310017, China

Abstract: Objective To develop a UPLC-MS/MS method for determination of eight antirheumatic constituents illegally added in Chinese patent medicine preparation. **Methods** The analysis was performed by a UPLC-MS/MS system of Waters Acquity UPLC/Quattro Premier, with BEH-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column. Multiple-reaction monitoring (MRM) was performed to identify and quantify hydrocortisone, dexamethasone, prednisone 21-acetate, 4-acetamidophenol, phenylbutazone, naproxen, piroxicam, and trimethoprim, which were extracted with methanol by ultrasonic method. **Results** Eight linear calibration curves were obtained with $r^2 \geq 0.998 9$. The precision of the method was shown by RSD ($n = 6$) ranged from 1.2% to 3.5%. The recoveries were determined at three concentration and ranged from 95.4% to 104.9%. The ranges of LLOQ were from 0.4 to 4.9 μg/mL and the RSDs ($n = 9$) of intra-day precision and inter-day precision were from 0.6% to 2.7% and from 0.9% to 2.9%. **Conclusion** The method is specific, simple, and fast to detect eight antirheumatic constituents illegally added in Chinese patent medicine preparation.

Key words: UPLC-MS/MS; Chinese patent medicine; antirheumatism; illegally addition; hydrocortisone; dexamethasone; prednisone 21-acetate; 4-acetamidophenol; phenylbutazone; naproxen; piroxicam; trimethoprim

借纯中药之名添加化学药物是近年来一些不法分子牟取利益常采用的手段, 而患者在服用这些所谓的天然无副作用的中成药来治疗风湿性及类风湿性关节炎的同时, 不知不觉服用了添加的化学成分, 长期服用这些违法添加的抗风湿中成药可能会引起严重的后果, 如导致消化道溃疡、肝肾毒性和血液系统问题等^[1-3]。已有很多报道讨论了中成药和保健食品中非法添加化学成分的测定^[2-8]。液相色谱-

串联质谱法既能定性分析能力, 又能准确地定量分析, 是这类非法添加化学药物检测有效方法之一^[4-5]。本实验采用超高效液相色谱-串联四级杆质谱 (UPLC-MS/MS) 法检测抗风湿中成药中非法添加的 8 种抗风湿性化学成分。

1 仪器与材料

美国 Waters 公司超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪, 配 Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、

收稿日期: 2014-04-10

作者简介: 励 炯 (1983—), 男, 硕士研究生, 主管技师, 主要从事药品、食品、保健品、化妆品检验。

Tel: (0571)85463893 E-mail: jokelee2@126.com

Quattro Premier 串联四级杆质谱仪、电喷雾离子化源 (ESI)、Masslynx 4.1 数据处理系统。

共测定 22 批次抗风湿性中成药,均为杭州市食品药品监督管理局市场抽取样品。

对照品氢化可的松 (批号 100152-200206)、地塞米松 (批号 100129-201105)、醋酸泼尼松 (批号 100012-200706)、保泰松 (批号 100481-200601)、对乙酰氨基酚 (批号 100018-200408)、萘普生 (批号 100198-0002)、吡罗昔康 (批号 100177-200603) 与甲氧苄啶 (批号 100031-200304),均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 UPLC 色谱条件

色谱柱为 BEH-C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.02 mol/L 乙酸铵水溶液-乙腈,梯度洗脱: 0~4 min, 20% 乙腈; 4~4.5 min, 20%~60% 乙腈; 4.5~5 min, 60%~20% 乙腈; 柱温 40 °C; 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

毛细管电压 3.0 kV; 脱溶剂气 (N₂) 流量 550

L/h; 锥孔反吹气流量 50 L/h; 离子源温度 120 °C; 脱溶剂气温度 300 °C; 采用多反应监测 (multiple-reaction monitoring, MRM) 模式检测; 离子模式: ES⁺。8 种抗风湿性化学成分的其他质谱分析参数见表 1, 8 种抗风湿性化学成分 MRM 总离子流图见图 1。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取 8 种抗风湿化学成分对照品约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇配制成约 1 mg/mL 的对照品储备溶液。分别精密吸取上述对照品储备溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释定容, 作为对照品系列溶液。

2.4 供试品溶液的制备

胶囊剂取 20 粒样品内容物, 片剂和丸剂取 20 粒研细后, 混匀, 精密称取 1 g, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇约 15 mL, 超声 30 min (100 W, 56 kHz), 冷却, 加流动相稀释至刻度。用 0.2 μm 滤膜滤过, 备用。

2.5 线性关系、检测限和定量限

取已制备的对照品系列溶液, 分别进样 2 μL,

表 1 8 种抗风湿性化学成分的质谱分析参数和定性分析结果

Table 1 MS parameters and qualitative analysis for eight antirheumatic constituents

| 组分 | 监测离子对 (<i>m/z</i>) | 锥孔电 压 / V | 碰撞能 量 / eV | 对照品各子离子 丰度 / % | 样品中各成分分子离子丰度 / % | | | |
|--------|-------------------------|--------------|---------------|-------------------|------------------|------|------|------|
| | | | | | 2号样品 | 4号样品 | 6号样品 | 7号样品 |
| 氢化可的松 | 363.3>121* | 40 | 25 | 76.4 | / | / | / | / |
| | 363.3>96.9 | | 20 | 23.5 | / | / | / | / |
| 地塞米松 | 393.5>355.4* | 25 | 15 | 39.3 | / | / | / | / |
| | 393.5>147.1 | | 15 | 27.5 | / | / | / | / |
| | 393.5>237.3 | | 10 | 33.0 | / | / | / | / |
| 醋酸泼尼松 | 401.8>295.4* | 30 | 13 | 62.7 | 62.4 | 62.6 | 62.6 | / |
| | 401.8>147 | | 15 | 37.3 | 38.2 | 37.9 | 38.0 | / |
| 对乙酰氨基酚 | 152.2>110.1* | 30 | 20 | 67.5 | / | / | / | 67.5 |
| | 152.2>92.9 | | 20 | 31.9 | / | / | / | 31.1 |
| 保泰松 | 309.7>160.2* | 30 | 25 | 80.3 | / | / | / | 80.3 |
| | 309.7>105.9 | | 25 | 19.7 | / | / | / | 19.7 |
| 萘普生 | 231.5>170.2* | 30 | 25 | 66.2 | / | / | 65.5 | 65.9 |
| | 231.5>153 | | 20 | 33.8 | / | / | 34.4 | 34.0 |
| 吡罗昔康 | 332.6>95.1* | 30 | 20 | 68.4 | 68.4 | / | 68.7 | 68.1 |
| | 332.6>121 | | 20 | 31.2 | 31.7 | / | 31.5 | 30.9 |
| 甲氧苄啶 | 291.4>122.9* | 25 | 25 | 56.1 | / | / | / | / |
| | 291.4>261.2 | | 20 | 44.7 | / | / | / | / |

*为定量离子对, “/” 为未检测出

*ion pair for quantitation, “/” is not detected

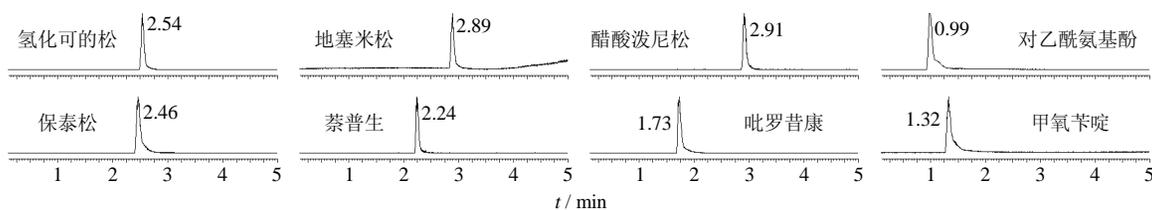


图 1 8 种抗风湿性化学成分 MRM 总离子流图

Fig. 1 MRM total ion chromatogram of eight antirheumatic constituents

以定量监测离子对的离子流中谱峰峰面积 (Y) 为纵坐标, 对照品质量浓度 (X , $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标进行线性关系考察, 结果见表 2。

取 1 号样品 (未检出 8 种非法添加成分) 1 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 8 种抗风湿非法添加成分的检测限与定量限, 结果见表 2。

2.6 重复性试验

取 1 号样品, 加入适当稀释的混合对照品溶液, 使样品中 8 种对照品最终质量分数为 10 mg/g, 按

供试品溶液制备方法重复制备 6 份, 测定这 8 种成分的量, 重复性结果见表 2。

2.7 日内精密度和日间精密度

以 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 8 种抗风湿性化学成分的混合对照品溶液 1 日内 5 次重复进样峰面积的 RSD 作为日内精密度, 以同样浓度的 8 种混合对照品溶液 3 d 重复进样 (每天重复进样 3 次) 峰面积的 RSD 作为日间精密度, 考察方法的稳定性。结果见表 2。

2.8 方法回收率试验

取 1 号样品, 每份称取样品 1 g, 分别加入适量的混合对照品溶液, 使供试品溶液加样浓度分别为

表 2 8 种抗风湿非法添加成分的线性关系、检测限、定量限和重复性

Table 2 Linear regression results, LOD, LOQ, and reproducibility of eight antirheumatic constituents

| 组分 | 线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 线性方程 | R^2 | 检测限 / 定量限 / 重复性 RSD | | | 精密度 RSD / % | |
|--------|--|-----------------------|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | | | | ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | ($n=6$) / % | 日内 ($n=5$) | 日间 ($n=9$) |
| 氢化可的松 | 12.2~122.0 | $Y=1\ 771.7 X-1\ 220$ | 0.999 0 | 0.7 | 2.8 | 2.7 | 2.1 | 1.1 |
| 地塞米松 | 7.2~145.0 | $Y=646.51 X-91.549$ | 0.998 9 | 1.0 | 3.7 | 1.5 | 0.7 | 2.3 |
| 醋酸泼尼松 | 6.0~121.0 | $Y=98.618 X-23.857$ | 0.999 9 | 2.3 | 4.9 | 1.2 | 1.5 | 2.0 |
| 对乙酰氨基酚 | 11.5~115.0 | $Y=3\ 074.3 X-126.71$ | 0.999 7 | 0.5 | 2.1 | 2.1 | 1.0 | 0.9 |
| 保泰松 | 7.4~148.0 | $Y=1\ 272.3 X-174.85$ | 0.999 9 | 0.6 | 1.6 | 2.3 | 2.2 | 1.8 |
| 萘普生 | 6.2~124.0 | $Y=320.41 X-133.53$ | 0.999 5 | 1.7 | 3.7 | 2.9 | 0.6 | 2.9 |
| 吡罗昔康 | 7.0~139.0 | $Y=758 X+571.52$ | 0.999 8 | 0.8 | 3.6 | 1.9 | 1.9 | 1.3 |
| 甲氧苄啶 | 11.7~117.0 | $Y=8\ 232 X+3\ 480.7$ | 0.999 9 | 0.1 | 0.4 | 3.5 | 2.7 | 1.6 |

低、中、高 3 种约 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$, 平行 3 份, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 检测其量, 计算回收率, 结果见表 3。

2.9 样品定性检测

本方法采用多反应检测扫描 (MRM) 模式检测, 如表 1 所示质谱分析方法, 每个成分都有多个 (地塞米松有 3 个, 其余成分 2 个) 检测通道, 每 1 通道对应 1 个监测离子对。样品检测时, 若某一成分对应的多个通道中均出现与对照品保留时间一致的谱峰, 并且这几个子离子的相对丰度与对照品一致, 则可判定样品中检出该成分。部分样品定性结果见表 1, 表中各成分的丰度数据均符合欧盟 2002/657/

EC 法规^[9]关于定性判断时相对离子丰度的允许偏差范围, 可判断这些子离子的相对丰度一致。按上述法规的分值法 (质谱分析方法鉴定点数) 计算, 上述定性过程已达到 4 分、大于 3 分的要求, 可判断样品 2 中检出醋酸泼尼松、吡罗昔康; 样品 4 检出醋酸泼尼松; 样品 6 中检出醋酸泼尼松、吡罗昔康、萘普生; 样品 7 中检出双氯芬酸钠、对乙酰氨基酚、吡罗昔康、萘普生、保泰松。

2.10 样品定量检测

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 8 种抗风湿性化学成分的量。定量结果见表 4。

表3 回收率试验 ($n=3$)Table 3 Test of recovery rates ($n=3$)

| 组分 | 添加浓度水平/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 平均回收率 / % | RSD / % | 组分 | 添加浓度水平/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 平均回收率 / % | RSD / % |
|--------|---|-----------|---------|------|---|-----------|---------|
| 氢化可的松 | 12.2 | 99.7 | 6.9 | 保泰松 | 7.4 | 103.1 | 2.9 |
| | 24.4 | 103.5 | 3.7 | | 21.8 | 95.9 | 5.9 |
| | 48.8 | 101.2 | 0.9 | | 51.8 | 101.8 | 4.1 |
| 地塞米松 | 7.2 | 98.9 | 4.3 | 萘普生 | 12.4 | 96.9 | 0.9 |
| | 21.8 | 102.7 | 5.5 | | 24.8 | 99.8 | 2.8 |
| | 50.8 | 104.9 | 2.9 | | 55.8 | 95.4 | 1.2 |
| 醋酸泼尼松 | 12.1 | 104.2 | 3.1 | 吡罗昔康 | 13.9 | 102.9 | 3.3 |
| | 24.2 | 101.9 | 3.9 | | 20.8 | 103.8 | 1.7 |
| | 54.4 | 97.9 | 0.8 | | 48.6 | 99.8 | 2.2 |
| 对乙酰氨基酚 | 11.5 | 98.5 | 4.6 | 甲氧苄啶 | 11.7 | 99.4 | 4.3 |
| | 23.0 | 97.1 | 6.2 | | 23.4 | 103.2 | 1.9 |
| | 57.5 | 102.6 | 3.8 | | 58.5 | 99.8 | 2.4 |

表4 样品中8种抗风湿性化学成分的分析结果

Table 4 Analytical results of eight antirheumatic constituents in samples

| 序号 | 样品名称 | 批号 | 标示生产单位 | 检验结果 |
|----|-----------|----------|----------------------------|---|
| 1 | 风湿定胶囊 | 121102 | 通化振霖药业有限责任公司 | 均为检出 |
| 2 | 风湿骨痛宁胶囊 | 20130606 | 河南省台前县风湿哮喘病研究所 | 醋酸泼尼松 1.42 mg/g、吡罗昔康 4.75 mg/g |
| 3 | 风湿骨康片 | 20130101 | 陕西省雄风制药有限公司 | 均未检出 |
| 4 | 复方关节炎胶囊 | 20120918 | / (未标示) | 醋酸泼尼松 4.25 mg/g |
| 5 | 风湿二十五味丸 | 130301 | 内蒙古奥特奇蒙药股份有限公司 (金山)蒙药厂 | 均未检出 |
| 6 | 甲茸壮骨通痹胶囊 | 20050526 | 河南省台前县人民东路77号-1号 (邮购地址) | 醋酸泼尼松 4.52 mg/g、吡罗昔康 16.5 mg/g、萘普生 52.5 mg/g |
| 7 | 甲竭胶囊 | 130310 | 河南省濮东华佗药业股份有限公司 | 双氯芬酸钠 14.2 mg/g、对乙酰氨基酚 0.210 mg/g、吡罗昔康 2.23 mg/g、萘普 生 16.8 mg/g、保泰松 16.1 mg/g |
| 8 | 骨筋丸胶囊 | 20120012 | 哈尔滨同一堂药业有限公司 | 均未检出 |
| 9 | 骨康胶囊 | 20121009 | 贵州维康药业有限公司 | 均未检出 |
| 10 | 骨刺消痛胶囊 | 120901 | 山西天星制药有限公司 | 均未检出 |
| 11 | 舒筋健腰丸 | EH3111 | 广州陈李济药厂有限公司 | 均未检出 |
| 12 | 黑骨藤追风活络胶囊 | 20121201 | 贵州老来福药业有限公司 | 均未检出 |
| 13 | 复方南星止痛膏 | 120904 | 江苏南星药业有限责任公司 | 均未检出 |
| 14 | 过岗龙片 | L12D012 | 广东罗浮山国药股份有限公司 | 均未检出 |
| 15 | 活络消痛片 | 20120110 | 哈尔滨三乐生物工程有限公司 | 均未检出 |
| 16 | 抗骨质增生丸 | 120301 | 江西药都樟树制药有限公司 | 均未检出 |
| 17 | 万通筋骨片 | 111215M | 通化万通药业股份有限公司 | 均未检出 |
| 18 | 骨龙胶囊 | 111102 | 山东东阿阿胶股份有限公司 | 均未检出 |
| 19 | 腰痛片 | 20111201 | 中山市恒生药业有限公司 | 均未检出 |
| 20 | 虎力散胶囊 | 110535 | 云南云河药业有限公司 | 均未检出 |
| 21 | 骨刺丸 | 110301 | 河北万岁药业有限公司 | 均未检出 |
| 22 | 痛风定胶囊 | 110601 | 成都中汇制药有限公司 | 均未检出 |

3 讨论

3.1 定性与定量检测时注意进样针污染

由于串联四级杆质谱灵敏度高, 在实践中发现定性与定量检测时, 特别是进样浓度高时, 会引起进样针的残留, 进而引起假阳性, 所以在2个样品之间, 特别是对照品与样品进样之间, 最好进一针溶剂空白, 确保进样系统没有残留时, 再进下一个样品。

3.2 方法的优缺点

本实验建立了抗风湿中成药中非法添加8种化学成分的定性定量检测方法, 简捷快速, 灵敏度高, 抗干扰能力强, 可满足实际样品检测的需要。由于采用了UPLC-MS/MS作为分离手段, 分析速度快, 只需5 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。采用串联四极杆的MRM模式检测, 可同时进行定性定量分析, 利用化学成分的2个子离子信息, 已符合定性检测的判定要求。

参考文献

- [1] 周斌, 刘健, 朱静, 等. 糖皮质激素类药物的不良反应和并发症 [J]. 中国药业, 2002, 15(6): 43-44.
- [2] 符江, 荆文光, 章军, 等. 中药中非法添加问题研究现状与分析 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 437-442.
- [3] 潘伟, 顾鑫荣, 刘志璋, 等. LC-MS/MS法测定中成药制剂中23个非甾体抗炎药 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 261-266.
- [4] 来国防, 程宾, 鲁静, 等. LC-MS法测定抗风湿类中药非法添加化学药物成分 [J]. 中国药业, 2010, 13(4): 453-455.
- [5] 沈国芳, 朱健, 裘一婧. UPLC-MS/MS法检测减肥类保健食品中的西布曲明及其去甲基衍生物 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(20): 1609-1611.
- [6] 李丹, 文红梅, 崔福春, 等. LC-MS/MS法快速测定中成药、保健食品中非法添加的36种化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1527-1532.
- [7] 朱健, 裘一婧, 沈国芳. UPLC-MS/MS法快速检测减肥类保健品中13种非法添加化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 509-515.
- [8] 汪建君, 陈惠玲. HPLC-PDA法检测正天丸和正天胶囊中6种非法添加色素 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 51-53.
- [9] Commission. Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the inter pertation of results [J]. *Off J Eur Communit*, 2002, 8(17): 8-36.