

UPLC-MS/MS 法快速测定中药及保健食品中非法添加 17 种抗炎镇痛类化学药的研究

黄越燕¹, 屠婕红¹, 徐宏祥², 傅应华^{1*}

1. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001

2. 嘉兴市食品药品检验检测院, 浙江 嘉兴 314050

摘要: 目的 建立一种快速、准确检测中药及保健食品中非法添加 17 种抗炎镇痛类化学药(对乙酰氨基酚、阿司匹林、非那西丁、马来酸氯苯那敏、罗非昔布、吡罗昔康、氯诺昔康、美洛昔康、醋酸泼尼松、舒林酸、萘普生、醋酸地塞米松、保泰松、奥沙普秦、塞米昔布、双氯芬酸钠、吲哚美辛)的方法。方法 采用 UPLC-MS/MS 法, 以 Waters Acquity BEH-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱, 以 0.1%甲酸甲醇溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱: 0~4 min, 40% A; 4~5 min, 40%~50% A; 5~6 min, 50%~60% A; 6~12 min, 60%~80% A; 12~13 min, 80% A; 13~14 min, 80%~40% A; 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 40 ℃。选择 ESI 离子源、多反应监测(MRM)模式测定 17 种临床常用的抗炎镇痛类化学药, 通过比较 MRM 通道中样品峰与对照品峰的分子离子峰、二级碎片离子峰、色谱保留时间等信息确定添加的化学药物, 并根据外标法以质谱峰面积计算添加药物的准确量。结果 在上述色谱及质谱条件下, 对乙酰氨基酚、阿司匹林、非那西丁、马来酸氯苯那敏、罗非昔布、吡罗昔康、氯诺昔康、美洛昔康、醋酸泼尼松、舒林酸、萘普生、醋酸地塞米松、保泰松、奥沙普秦、塞米昔布、双氯芬酸钠、吲哚美辛 17 种化学药物的分离度良好, 方法检测限(LOD)均在 0.3~5.0 ng/g, 定量限(LOQ)均在 0.9~15.0 ng/g, 加样回收率均在 90.5%~113.8%。样品中检出了对乙酰氨基酚、醋酸泼尼松、双氯芬酸钠、吲哚美辛、马来酸氯苯那敏、萘普生。结论 方法简便、准确, 灵敏度高, 可作为抗炎镇痛类中药及保健食品中非法添加化学药的定性定量测定方法。

关键词: UPLC-MS/MS; 化学药物; 中药; 保健食品; 非法添加; 对乙酰氨基酚; 阿司匹林; 非那西丁; 马来酸氯苯那敏; 罗非昔布; 吡罗昔康; 氯诺昔康; 美洛昔康; 醋酸泼尼松; 舒林酸; 萘普生; 醋酸地塞米松; 保泰松; 奥沙普秦; 塞米昔布; 双氯芬酸钠; 吲哚美辛

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)02-0246-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.012

Rapid determination of 17 anti-inflammatory and analgesic chemicals illegally added into Chinese patent medicine and health foods by UPLC-MS/MS

HUANG Yue-yan¹, TU Jie-hong¹, XU Hong-xiang², FU Ying-hua¹

1. Medical College of Jiaxing University, Jiaxing 314001, China

2. Jiaxing Institute for Food and Drug Control, Jiaxing 314050, China

Abstract: Objective To establish a rapid and accurate method for the determination of 17 anti-inflammatory and analgesic chemicals (paracetamol, aspirin, phenacetin, chlorpheniramine maleate, rofecoxib, piroxicam, lornoxicam, meloxicam, prednisone acetate, sulindac, naproxen, dexamethasone acetate, phenylbutazone, oxaprozin, celecoxib, diclofenac sodium, and indomethacin) which were illegally added into the Chinese patent medicines (CPM) and the health foods. **Methods** The UPLC-MS/MS method was adopted. The samples were extracted with methanol by ultrasonic processing and separated on a Waters Acquity BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid methanol (A) and 0.1% formic acid water (B) as the mobile phase by gradient elution (0—4 min, 40% A; 4—5 min, 40%—50% A; 5—6 min, 50%—60% A; 6—12 min, 60%—80% A; 12—13 min, 80% A; 13—14 min, 80%—40% A) at a flow rate of 0.2 mL/min, and the column temperature was 40 ℃. A positive-ion (ESI⁺) source and a MRM mode were used

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划资助项目(2013C37103); “十二五”浙江省高校重点学科(药理学)资助项目

作者简介: 黄越燕(1976—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为药物制剂与质量控制。Tel: (0573)83643848 E-mail: hyylinda@163.com

*通信作者 傅应华, 教授, 研究方向为药物制剂与质量控制。Tel: (0573)83643848 E-mail: yaoji6217@sohu.com

to separately and quantitatively determinate the 17 anti-inflammation and analgesia chemicals. The obtained molecular ions, fragment ions, and retention time for MRM channels were used to identify the 17 chemicals by comparison with those of reference substances. The obtained peak areas were used to determinate the accurate content of chemicals in commonly used drugs in clinic. **Results** A good resolution of the 17 chemicals, including paracetamol, aspirin, phenacetin, chlorpheniramine maleate, rofecoxib, piroxicam, lornoxicam, meloxicam, prednisone acetate, sulindac, naproxen, dexamethasone acetate, phenylbutazone, oxaprozin, celecoxib, diclofenac sodium, and indomethacin was obtained under this UPLC and MS/MS condition. The limits of qualification and quantitation were in the range of 0.3—5.0 and 0.9—15.0 ng/g. The standard addition recoveries were in the range of 90.5%—113.8%. The six components in samples (paracetamol, prednisone acetate, diclofenac sodium, indometacin, chlorpheniramine maleate, and naproxen) were detected. **Conclusion** The method is simple, accurate, and has high sensitivity, which can be used for the qualitative and quantitative determination of illegally added chemicals in CPM and health foods.

Key words: UPLC-MS/MS; chemical drugs; Chinese patent medicines; health foods; illegally added; paracetamol; aspirin; phenacetin; chlorpheniramine maleate; rofecoxib; piroxicam; lornoxicam; meloxicam; prednisone acetate; sulindac; naproxen; dexamethasone acetate; phenylbutazone; oxaprozin; celecoxib; diclofenac sodium; indomethacin

风湿性和类风湿性关节炎是中老年人的常见病和多发病,是一种慢性病,无法根治,其症状为关节肿痛,抗炎镇痛类药物是治疗类风湿性关节炎病的首选药物,其作用机制主要通过抑制环氧化酶使前列腺素生成受抑制而起作用,以达到消炎止痛的效果。目前,抗炎镇痛类药物主要为非甾体类抗炎药(NSAIDs)。本类药物按结构可分为许多类型,如酸类衍生物包括阿司匹林、双氯酚酸钠、吲哚美辛、萘普生、奥沙普秦等,昔康类包括吡罗昔康、美洛昔康、氯诺昔康等,昔布类包括塞来昔布等,吡唑类包括保泰松等^[1]。NSAIDs可引起严重的毒副作用:(1)胃肠道损伤;(2)引起血液系统损害,包括各种血小板减少或缺乏,其中以粒细胞减少或再生障碍性贫血为常见;(3)引起肝肾损害,如大剂量长期使用对乙酰氨基酚可导致严重肝损害,导致的肾损害表现为急性肾衰、肾病综合征等;(4)导致血压升高,对老年人或肾素活性低的高血压病人危险性更大;(5)导致过敏反应,表现为皮疹、荨麻疹、瘙痒及光敏等;(6)神经系统副反应常见头痛、头晕、耳鸣、耳聋等。

目前中药及保健食品中非法添加化学药问题时有发生^[2],一些不法分子为使原本不具有速效、高效的中药或保健食品,通过非法添加抗炎镇痛类化学药物,配合虚假宣传,夸大疗效,让不明真相的消费者上当受骗,以获取高额利润。2009年国家食品药品监督管理局发布了针对抗风湿类中成药中非法添加氢化可的松等13种化学药的药品补充检验方法和检验项目批准件(批准件编号2009025),该方法中,TLC法用于快速筛查,HPLC法用于定性检查,再经液质联用方法进行定性验证,操作繁琐费时。文献对抗风湿类中药及保健食品中非法添加

化学药物的研究报道还不多,已报道的文献方法主要有TLC法^[3]、HPLC法^[4]、HPLC-MS/MS法^[5-11]。本实验选择了临床常用的17种化学抗炎镇痛药作为目标物,采用UPLC-MS/MS方法,以多离子反应监测(MRM)为测定模式,建立了多通道实时定性和定量检测抗风湿类中药及保健食品中非法添加化学药的方法,可在13 min内同时准确检测出胶囊剂、片剂、丸剂3种剂型中非法添加的17种抗炎镇痛类化学药,大大提高了检测效率,为中药和保健食品的日常监督管理工作提供了可靠的检测方法。

1 仪器与材料

Acquity UPLC 型超高效液相色谱仪、Quattro Premiere XE 型三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子化源(ESI)、MassLynx 数据处理系统,美国 Waters 公司;Mili-Q 超纯水器,美国密理博公司;Sartorius BP211D 型电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;KQ-500E 型超声提取仪,上海波龙电子有限公司。对照品对乙酰氨基酚(批号100018-200408,质量分数>99.0%)、阿司匹林(批号100113-201104,质量分数>99.0%)、非那西丁(批号100095-201205,质量分数>99.0%)、马来酸氯苯那敏(批号100047-200606,质量分数为99.7%)、吲哚美辛(批号100258-200904,质量分数为99.7%)、萘普生(批号100198-201205,质量分数为99.9%)、醋酸泼尼松(批号100012-200706,质量分数为99.7%)、醋酸地塞米松(批号100122-200805,质量分数为99.6%)、美洛昔康(批号1006679-201102,质量分数为99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;双氯芬酸钠(批号H2K051,质量分数为99.9%)、奥沙普秦(批号1482207,质量分数为99.8%)、塞来昔布(批号1098504,质量分数为99.9%)、保泰

松(批号 100481-200601, 质量分数为 99.9%)、吡罗昔康(批号 10K351, 质量分数为 99.8%)、舒林酸(批号 10J345, 质量分数为 99.8%)均为美国 USP 对照品; 罗非昔布(批号 1451-003A1, 质量分数 > 99.0%)、氯诺昔康(批号 1204-038A1, 质量分数 > 99.0%)均为加拿大 TLC 对照品, 以上对照品均供定量测定用。

实测样品主要为嘉兴市、县两级食品药品监督管理局市场抽检样品, 部分为公安抽检办案样品。典型样品如甲茸壮骨通痹胶囊、风湿骨友灵胶囊、风寒筋骨康胶囊、复方风湿骨痛宁胶囊、王氏伸筋壮骨胶囊等。甲醇(德国 Merck 公司)、甲酸(美国 Tedia 公司)均为色谱纯, 其余试剂均为国产分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 UPLC 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1%甲酸甲醇溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~4 min, 40% A; 4~5 min, 40%~50% A; 5~6 min, 50%~60% A; 6~12 min, 60%~80% A; 12~13 min, 80% A; 13~14 min, 80%~40% A; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温为 40 °C; 进样量 5 μL。

2.2 MS/MS 质谱条件

毛细管电压 3.0 kV; 二级锥孔电压(Extractor) 3 V; 六级杆透镜电压(RF Len) 0 V; 离子源温度 110 °C; 脱溶剂气温度 350 °C; 脱溶剂气体流量 650 L/h; 锥孔反吹气体流量 50 L/h; 碰撞气压力 0.328 Pa; 选择 MRM 模式采集碎片离子信号, 每个化学药选取一组定性离子对和一组定量离子对。各物质的准分子离子峰、主要子离子碎片峰及其质谱数据采集参数见表 1。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取上述 17 种化学药对照品各 10 mg, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 其中美洛昔康、氯诺昔康先用二甲基甲酰胺 1 mL 溶解后再用甲醇定容, 其余均用甲醇溶解并定容, 制成质量浓度均为 1 mg/mL 的对照品储备液。再精密量取适量, 用 50%甲醇水溶液(含 0.1%甲酸)定量稀释成质量浓度均为 200 ng/mL 的混合对照品溶液。其中醋酸泼尼松、醋酸地塞米松为与醋酸成盐的形态, 马来酸氯苯那敏为与马来酸成盐的形态, 定量计算以醋酸盐或马来酸盐计。

2.3.2 供试品溶液的制备 (1) 取胶囊剂、片剂以及丸剂 1 次服用剂量, 分别置于研钵中, 研磨均匀成粉末状, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 40 mL, 超

表 1 17 种抗炎镇痛类化学药的质谱采集参数

Table 1 LC MS/MS parameters for 17 anti-inflammatory and analgesic chemicals

t/min	药品成分	电离模式	母离子 (<i>m/z</i>)	定量离子 (<i>m/z</i>)	定性离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
1.48	对乙酰氨基酚	ESI ⁺	152.0	109.9	92.7	28	14, 22
3.02	阿司匹林	ESI ⁻	178.8	136.7	92.7	16	6, 22
3.65	非那西丁	ESI ⁺	179.8	109.6	137.7	24	22, 16
3.83	马来酸氯苯那敏	ESI ⁺	275.0	166.8	230.0	20	37, 18
4.41	罗非昔布	ESI ⁺	315.0	268.9	191.8	22	20, 26
5.61	吡罗昔康	ESI ⁺	332.1	94.8	120.8	26	22, 22
6.29	氯诺昔康	ESI ⁺	372.1	94.9	120.9	32	16, 30
7.92	美洛昔康	ESI ⁺	352.2	114.9	140.9	30	22, 20
7.92	醋酸泼尼松	ESI ⁺	401.2	383.2	295.2	22	10, 16
8.32	舒林酸	ESI ⁺	357.2	233.0	248.1	40	32, 34
8.75	萘普生	ESI ⁺	231.0	184.9	169.8	25	15, 28
9.14	醋酸地塞米松	ESI ⁺	435.2	397.3	337.2	20	10, 12
10.21	保泰松	ESI ⁺	309.3	119.8	188.0	30	20, 16
10.80	奥沙普秦	ESI ⁺	294.3	276.1	234.0	34	16, 22
10.80	塞米昔布	ESI ⁺	382.2	362.1	300.2	32	28, 30
11.46	双氯芬酸钠	ESI ⁺	296.1	250.0	277.9	22	14, 20
11.46	吲哚美辛	ESI ⁺	358.2	138.9	174.0	28	20, 14

声处理 10 min, 放冷至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀后初滤, 再取续滤液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品储备液 I; (2) 取贴剂样品 1 片, 剪成小条, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入丙酮 50 mL, 称定质量, 超声处理 20 min, 放冷, 再称质量, 用丙酮补足减失的质量, 摇匀, 用滤纸初滤, 作为供试品储备液 II。再精密量取上述供试品储备液 I、II 各适量, 用 50% 甲醇溶液 (内含 0.1% 甲酸) 逐步稀释成使待测物质量浓度与对照品溶液相同质量浓度的溶液 (各约 200 ng/mL), 作为供试品溶液 I、II, 其中供试品溶液 II 测定前需经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.3.3 阴性对照溶液的制备 取胶囊剂 (麝香风湿胶囊、风湿骨痛宁胶囊)、片剂 (关通氨糖软骨素加钙片) 以及丸剂 (活络止痛丸) 3 种剂型阴性样品, 按 “2.3.2” 项下方法分别制成胶囊剂、片剂以及丸剂的空白基质粉末, 分别取 1 次服用剂量, 置于 50 mL 量瓶中, 同法制备 3 种剂型的阴性对照溶液。

2.4 17 种抗炎镇痛类化学药的色谱及质谱特性

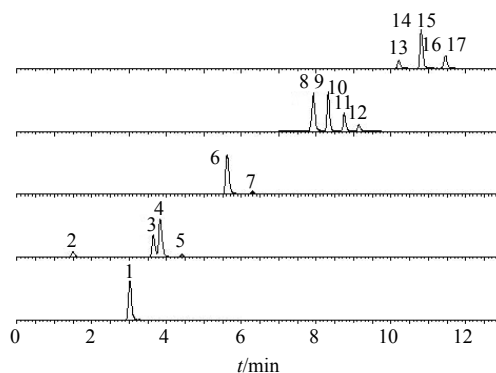
按照 “2.1” 和 “2.2” 项下色谱、质谱条件进样, 分别测定了 17 种抗炎镇痛类化学药的 1 组定性离子对和 1 组定量离子对, 共安排 34 个离子监测通道。为了保证质谱定量分析的准确性, 采用分段扫描技术, 按色谱流出时间将 17 种化学药分为 5 段, 每段内有 1~5 个化学药, 保证每个化学药均有足够的质谱扫描时间, 以满足采集 15 个点以上的要求。各质谱采集时间段的总离子流图见图 1, 各化学药定量离子对的 MRM 色谱图见图 2。

由图 1 可知由于化合物数量较多, 第 2 时间段内有非那西丁、马来酸氯苯那敏色谱峰之间未完全分离; 第 4 时间段内有美洛昔康、醋酸泼尼松色谱峰之间未分离; 第 5 时间段内有奥沙普秦、塞米昔布色谱峰之间未分离, 双氯酚酸钠、吲哚美辛色谱峰之间未分离; 其余各色谱峰之间均达到基线分离。

由图 2 可知在 MRM 采集模式下, 保留时间相近的上述各化学药均能达到完全分离, 各通道之间无明显干扰。

2.5 方法专属性考察

取 “2.3.3” 项下 3 种阴性对照溶液各 5 μL , 按 “2.1” 和 “2.2” 项下色谱、质谱条件进样测定, 所得到的 3 种剂型阴性对照溶液的 TIC 和 MRM 色谱图, 均未见有干扰 17 种目标化学药成分的色谱峰。结果显示, 3 种剂型中所含的中药成分均不干扰目



1-阿司匹林 2-对乙酰氨基酚 3-非那西丁 4-马来酸氯苯那敏 5-罗非昔布 6-吡罗昔康 7-氯诺昔康 8-美洛昔康 9-醋酸泼尼松 10-舒林酸 11-萘普生 12-醋酸地塞米松 13-保泰松 14-奥沙普秦 15-塞米昔布 16-双氯芬酸钠 17-吲哚美辛
1-paracetamol 2-aspirin 3-phenacetin 4-chlorpheniramine maleate 5-rofecoxib 6-piroxicam 7-lornoxicam 8-meloxicam 9-prednisone acetate 10-sulindac 11-naproxen 12-dexamethasone acetate 13-phenylbutazone 14-oxaprozin 15-celecoxib 16-diclofenac sodium 17-indomethacin

图 1 17 种抗炎镇痛类化学药的总离子流色谱图

Fig. 1 TIC of 17 anti-inflammatory and analgesic chemicals

标物的测定, 方法专属性强。

2.6 线性关系考察与检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 试验

精密量取 “2.3.1” 项下制备的对照品贮备液, 根据各物质离子化效率的不同, 分别用 50% 甲醇水溶液 (含 0.1% 甲酸) 定量稀释成含对乙酰氨基酚、非那西丁、马来酸氯苯那敏、美洛昔康、奥沙普秦、吲哚美辛质量浓度为 5、10、20、40、100、200、400 ng/mL, 吡罗昔康质量浓度为 10、20、40、100、200、400 ng/mL, 罗非昔布、萘普生、舒林酸、双氯芬酸钠、塞米昔布质量浓度为 15、30、60、150、300、600 ng/mL, 氯诺昔康、醋酸泼尼松、醋酸地塞米松、保泰松质量浓度为 30、60、150、300、600 ng/mL, 阿司匹林质量浓度为 50、100、250、500、1 000 ng/mL 的混合对照品溶液。按 “2.1” 和 “2.2” 项下色谱、质谱条件进样测定, 以各化学药的定量监测离子对的色谱峰峰面积为纵坐标 (Y), 对应的进样质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 进行线性回归得线性方程和相关系数见表 2。结果表明, 17 种化学药在各自的质量浓度范围内 (5~400、10~400、15~600、30~600、50~1 000 ng/mL) 与色谱峰峰面积均呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.995 4。

取阴性样品 (麝香风湿胶囊、风湿骨痛宁胶囊), 按 0.5 mg/g 的添加量加入经适当稀释的混合对照品

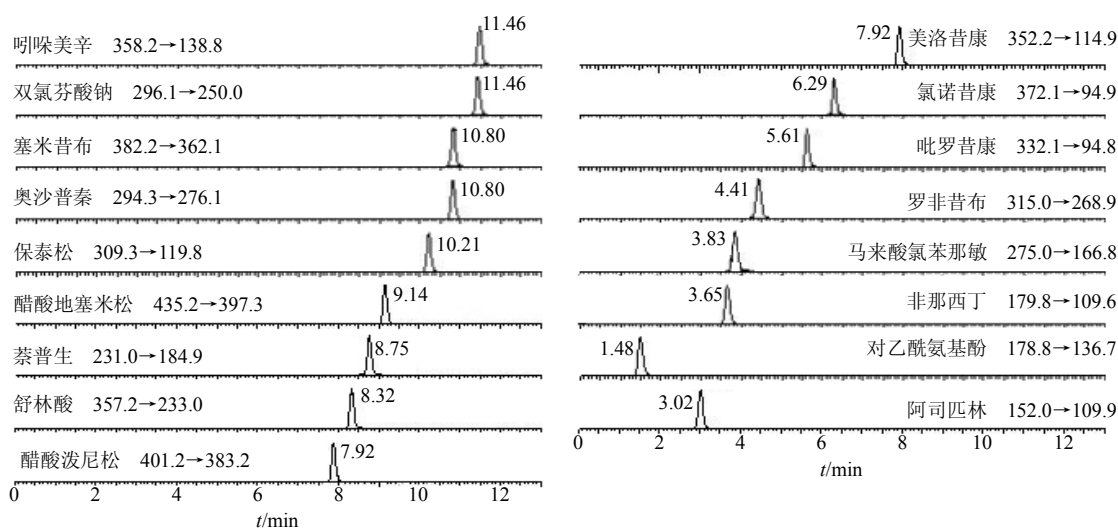


图 2 17 种化学药对照品定量离子对的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of quantitative ion pairs for 17 chemical reference substances

表 2 17 种抗炎镇痛类化学药物的线性方程、相关系数、回收率及检出限、定量限

Table 2 Linear equation, correlation coefficient, recovery rate, LOD, and LOQ for 17 anti-inflammatory and analgesic chemicals

药品	线性方程	r	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	回收率/%	LOD/ (ng·g ⁻¹)	LOQ/ (ng·g ⁻¹)	RSD/%	
							进样精密度	重复性
对乙酰氨基酚	$Y=381.0 X+9\ 460.0$	0.994 5	5~400	98.1~108.3	2.0	5.0	3.4	3.3
阿司匹林	$Y=24.4 X-138.1$	0.999 7	50~1 000	96.9~105.8	5.0	15.0	3.4	3.9
非那西丁	$Y=1\ 319.5 X+14\ 041.0$	0.997 6	5~400	99.8~105.3	0.3	1.0	5.2	5.6
马来酸氯苯那敏	$Y=2\ 238.4 X+33\ 111.6$	0.995 4	5~400	100.1~108.6	0.3	1.0	2.9	3.6
罗非昔布	$Y=250.3 X+1\ 837.4$	0.999 3	15~600	98.5~107.5	1.0	3.0	3.0	3.1
氯诺昔康	$Y=60.4 X+538.1$	0.999 4	30~600	95.3~103.5	1.0	3.0	6.7	7.6
吡罗昔康	$Y=1\ 052.3 X-411.3$	0.996 2	10~400	94.0~103.9	0.3	1.0	3.5	4.0
美洛昔康	$Y=718.7 X+6\ 092.0$	0.998 7	5~400	90.5~108.3	0.5	1.5	4.4	2.8
醋酸泼尼松	$Y=97.4 X+1\ 122.0$	0.999 5	30~600	96.2~105.5	1.0	3.0	3.6	3.7
舒林酸	$Y=664.9 X+6\ 280.2$	0.996 6	15~600	93.8~109.6	0.5	1.5	2.3	6.3
萘普生	$Y=257.7 X+4\ 477.8$	0.997 8	15~600	96.1~110.9	1.0	3.0	6.2	3.2
醋酸地塞米松	$Y=73.2 X+1\ 456.4$	0.998 6	30~600	94.8~106.2	1.0	3.0	2.3	3.8
保泰松	$Y=289.6 X+3\ 323.5$	0.999 4	30~600	92.1~112.3	0.3	1.0	2.0	3.7
奥沙普秦	$Y=1\ 226.2 X+18\ 029.4$	0.997 4	5~400	95.2~108.5	0.3	0.9	4.2	4.7
塞米昔布	$Y=221.4 X+5\ 554.0$	0.997 4	15~600	94.7~109.9	1.0	3.0	4.8	5.8
双氯芬酸钠	$Y=224.0 X+2\ 589.4$	0.999 5	15~600	91.6~113.8	1.0	3.0	4.2	2.9
吲哚美辛	$Y=453.3 X+2\ 723.4$	0.997 6	5~400	96.1~107.1	0.3	1.0	1.2	2.1

溶液, 进样, 计算以信噪比为 3 时各化学药的 LOD 和信噪比为 10 时的 LOQ, 结果见表 2, LOD 均在 5.0 ng/g 以下, LOQ 均在 15.0 ng/g 以下, 表明方法具有较高的灵敏度, 完全能满足非法添加化学药的检测要求。

2.7 进样精密度试验

取 200 ng/mL 混合对照品液 5 μ L, 按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件进样测定, 连续测定 6 次, 计算上述 17 种化学药定量离子对质谱峰面积的

RSD 均在 1.2%~6.7%, 见表 2。表明方法的精密度良好。

2.8 重复性试验

取阴性供试品 (麝香风湿胶囊、风湿骨痛宁胶囊, 取内容物研磨均匀, 按 1:1 混合) 共 6 份, 按添加质量浓度均为 1.0 mg/g, 分别精密加入对照品贮备液适量, 按“2.3.2”项下方法进行提取制成各化学药质量浓度均为 200 ng/mL 的溶液, 作为供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件进

样测定, 计算各成分质量分数及 RSD 值。结果对乙酰氨基酚、阿司匹林、非那西丁、马来酸氯苯那敏、罗非昔布、吡罗昔康、氯诺昔康、美洛昔康、醋酸泼尼松、舒林酸、萘普生、醋酸地塞米松、保泰松、奥沙普秦、塞米昔布、双氯芬酸钠、吲哚美辛的平均质量分数分别为 1.05、0.92、0.97、1.06、1.03、1.01、0.96、0.93、0.87、0.95、1.10、1.07、1.13、1.08、0.89、0.91、1.06 mg/g, RSD 值见表 2。表明该方法重复性较好。

2.9 溶液稳定性试验

取重复性试验项下 1 份供试品溶液, 分别在配制后放置 0、2、4、6、8、12 h, 依法测定。根据上述 17 种化学药的定量离子对色谱峰面积计算 RSD 均在 2.5%~6.0%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率与精密度试验

精密称取不含 17 种化学药的阴性胶囊样品(麝香风湿胶囊、风湿骨痛宁胶囊)、片剂(关关通氨糖软骨素加钙片)、丸剂样品(活络止痛丸)的空白基质各 9 份, 每份称取 0.5 g, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加入混合对照品贮备液各适量, 同“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按照各化学药物的质谱响应, 将 17 种化学药分为 3 组, 分别进行 3 个添加水平的回收率试验, 其中对乙酰氨基酚、非那西丁、马来酸氯苯那敏、美洛昔康、奥沙普秦、吲哚美辛、吡罗昔康为 1.0、1.5、2.0 mg/g, 罗非昔布、萘普生、

舒林酸、双氯芬酸钠、塞米昔布为 2.0、3.0、4.0 mg/g, 氯诺昔康、醋酸泼尼松、醋酸地塞米松、保泰松、阿司匹林为 3.0、4.5、6.0 mg/g。结果见表 2。从表 2 可见, 17 种化学药的标准加样回收率, 各质量浓度的回收率均在 90.5%~113.8%, RSD 均在 3.0%~6.8%。达到比较满意的结果。

日内精密度和日间精密度均采用添加水平为 1.0 mg/g 的空白样品(风湿骨痛宁胶囊), 按“2.3.2”项下方法进行处理后, 按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件进样测定, 日内精密度由重复实验 6 次测定得到, 日间精密度由连续 3 d 重复取样测定得到。结果表明, 日内精密度 RSD 控制在 2.1%~5.8%; 日间精密度 RSD 控制在 2.4%~7.8%。表明方法精密度良好。

2.11 样品测定

本研究共收集抗风湿类中药及保健食品共 55 个样品, 取各样品, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下色谱、质谱条件分别进样测定, 根据定量监测离子对的色谱峰面积, 采用外标法计算样品中添加各化学药的量。结果表明, 在 55 个样品中检出 26 个样品添加了抗炎镇痛类化学药, 阳性率为 47%, 典型的 MRM 色谱图见图 3。样品中检出双氯酚酸钠、吲哚美辛、萘普生、醋酸泼尼松、马来酸氯苯那敏和对乙酰氨基酚。结果见表 3。

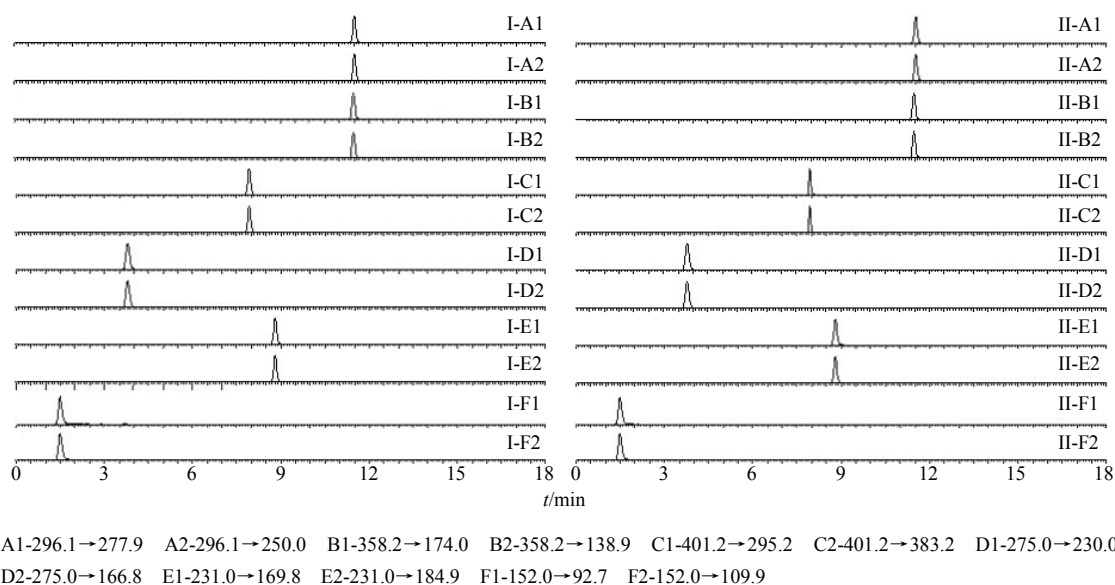


图 3 对照品 (I) 及样品 (II) 溶液中双氯芬酸钠 (A)、吲哚美辛 (B)、醋酸泼尼松 (C)、马来酸氯苯那敏 (D)、萘普生 (E) 和对乙酰氨基酚 (F) 的 MRM 定性、定量离子对色谱图

Fig. 3 MRM chromatogram of qualitative and quantitative ion pairs for diclofenac sodium (A), indomethacin (B), prednisone acetate (C), chlorpheniramine maleate (D), naproxen (E), and paracetamol (F) in reference substances (I) and samples (II)

表 3 样品信息及检出成分 ($n=3$)
Table 3 Sample information and detected components ($n=3$)

样品名称	规格	批准文号	批号或生产日期	标示生产厂家	检出药物量
甲茸壮骨通痹胶囊	0.4 g	无	1100305	河南省台前县风湿哮喘病研究所	醋酸泼尼松 0.7 mg/粒、 双氯酚酸钠 5.1 mg/粒、 马来酸氯苯那敏 0.6 mg/粒、 萘普生 6.8 mg/粒
华佗骨康胶囊	无	新卫特食备字 (2008) 第 115 号		乌鲁木齐市艾伊热提生物技术有限公司	未检出
风湿骨友灵胶囊	320 mg	国药准字 Z41073633	1101028	河南省台前县风湿哮喘病研究所	醋酸泼尼松 1.6 mg/粒、 双氯酚酸钠 11.8 mg/粒、 马来酸氯苯那敏 1.2 mg/粒、 对乙酰氨基酚 0.1 mg/粒
麝香风湿胶囊	每粒装 0.3 g	国药准字 Z20043350	110901	江西省药都仁和制药有限公司	未检出
复方风湿骨痛宁胶囊	400 mg	濮卫药准字 (98) DJ-116	111018	河北省魏县回隆经济开发区 11 号	醋酸泼尼松 2.0 mg/粒、 双氯酚酸钠 15.2 mg/粒
活络止痛丸	每丸重 5.6 g	国药准字 Z22023344	111002	通药制药集团股份有限公司	未检出
风寒筋骨康胶囊	每粒装 0.4 g	鲁卫食字 (2005) 第 56 号	120203	山东省宏康医药科技有限公司	醋酸泼尼松 1.8 mg/粒、 双氯酚酸钠 11.4 mg/粒、 马来酸氯苯那敏 0.9 mg/粒
复方关节炎胶囊	400 mg	无	20120318	河南省台前县商业街	醋酸泼尼松 1.9 mg/粒、 双氯酚酸钠 11.3 mg/粒、 马来酸氯苯那敏 1.3 mg/粒、 萘普生 12.1 mg/粒
王氏伸筋壮骨胶囊	0.5 g	濮卫药制注字 (1999) 第 09318 号	120217	康宏药业有限公司	醋酸泼尼松 0.9 mg/粒、 双氯酚酸钠 12.4 mg/粒、 萘普生 0.1 mg/粒
万通筋骨贴	7 cm×10 cm	吉通卫健证字[2005] 第 001 号	110533	通化万通药业股份有限公司	未检出
风湿关节消痛贴	10 cm×12 cm	豫平食药监械 (准) 字 2010 第 1640008 号	2012-01-06	河南金泰医疗器械有限公司	双氯酚酸钠 11.5 mg/片
回阳牌铁腰板骨康贴	10 g/贴	藏卫健用字 (2008) 第 004 号 003	120301	西安神奇药业有限公司	未检出
络祛膏	7 cm×10 cm	国药准字 Z20000065	120307	河南羚锐制药股份有限公司	未检出
风湿痛贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械 (准) 字 2010 第 1640027 号	20120107	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
筋骨伤痛贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械 (准) 字 2010 第 1640030 号	20120107	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
筋骨镇痛贴 (腰腿专用)	无	无	20120209	银川健春医疗器械厂	双氯酚酸钠 5.4 mg/贴
筋骨镇痛贴 (肩周专用)	无	无	20120209	银川健春医疗器械厂	未检出
颈椎病贴	8 cm×10 cm	无	MY0701A	湖北九叶医疗器械有限公司	双氯酚酸钠 20.7 mg/贴、 马来酸氯苯那敏 5.7 mg/贴
风湿关节炎贴	8 cm×10 cm	无	MY0301A	湖北九叶医疗器械有限公司	马来酸氯苯那敏 3.1 mg/贴
火龙罗汉腰腿痛贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械 (准) 字 2010 第 1640031 号	20120901	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
筋骨镇痛贴 (颈椎专用)	无	无	20120516	银川健春医疗器械厂	未检出
舒筋活血贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械 (准) 字 2010 第 1640029 号	未标示	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
骨质增生贴	7 cm×10 cm	鄂 (黄) 食药监械 (准) 字 2008 第 1640027 号	未标示	黄石济德医疗科技有限公司	未检出

续表 3

样品名称	规格	批准文号	批号或生产日期	标示生产厂家	检出药物量
火龙罗汉跌打扭伤贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械(准)字 2010 第 1640028 号	20130107	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
贴身保镖消炎止痛贴	6.5 cm×10 cm	鄂宜食药监械(准)字 2009 第 1640015 号	未标示	当阳市卫生材料厂	双氯酚酸钠 6.1 mg/贴
月亮神风湿关节贴	7 cm×10 cm	鄂(黄)食药监械(准)字 2008 第 1640029 号	未标示	黄石济德医疗科技有限公司	未检出
贴身保镖活血止痛贴	6.5 cm×10 cm	鄂宜食药监械(准)字 2009 第 1640014 号	未标示	当阳市卫生材料厂	双氯酚酸钠 6.1 mg/贴
贴身保镖骨痛贴	6.5 cm×10 cm	鄂宜食药监械(准)字 2009 第 1640010 号	未标示	当阳市卫生材料厂	双氯酚酸钠 6.7 mg/贴
火龙罗汉腰腿痛贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械(准)字 2010 第 1640031 号	20130107	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
肩颈痛贴	9 cm×11 cm	黑哈食药监械(准)字 2010 第 1640024 号	20130107	哈尔滨康友药业有限公司	未检出
月亮神腰腿痛贴	7 cm×10 cm	鄂(黄)食药监械(准)字 2008 第 1640026 号	未标示	黄石济德医疗科技有限公司	未检出
一品牌节节乐胶囊	350 mg	国食健字 G20050771	2011-08-17	北京天龙智科技有限公司	双氯酚酸钠 3.0 mg/粒、吲哚美辛 5.1 mg/粒
黑骨贴消炎止痛贴	9 cm×12 cm	黑哈食药监械(准)字 2010 第 1640026 号	20120401	湖南爱一百生物科技有限公司	未检出
坐骨腰痛丸	无	无	120604	杏林药业株式会社	对乙酰氨基酚 46.1 mg/粒、吲哚美辛 20.5 mg/粒
绿霸王静电理疗贴	100 mm×120 mm	豫郑食药监械(准)字 2011 第 1260002 号	20130304	河南省永春医药科技有限公司	未检出
关关通氨糖软骨素加钙片	1.0 g	国食健字 G20110012	20121217	广东仙乐制药有限公司	未检出
一品节节乐胶囊	350 mg	国食健字 G20050771	120401	天龙智(香港)集团有限公司	双氯酚酸钠 7.5 mg/粒、吲哚美辛 2.2 mg/粒、萘普生 6.6 mg/粒
静电理疗贴	100 mm×120 mm	豫郑食药监械(准)字 2011 第 1260002 号	20130304	河南永春医药科技有限公司	双氯酚酸钠 81.1 mg/贴
风湿骨痛宁胶囊	0.5 g	Z41091433	20131016	河南刘氏药业有限公司	未检出
痹康杜仲胶囊	0.39 g	卫食准字(2005)第 0339 号	20130701	百康亚丽生物制品有限公司	吲哚美辛 4.7 mg/粒、双氯酚酸钠 12.0 mg/粒、马来酸氯苯那敏 0.1 mg/粒、萘普生 3.4 mg/粒
痹康杜仲胶囊	0.39 g	食准字(2005)第 0339 号	021126	百康亚丽生物制品有限公司	吲哚美辛 5.3 mg/粒、双氯酚酸钠 14.3 mg/粒、醋酸泼尼松 1.3 mg/粒
静电贴(跌打损伤型)	7 cm×9 cm	豫济食药监械(准)字 2011 第 1260008 号	130303	济源市太极医疗用品有限公司	未检出
静电理疗贴(腰痛型)	7 cm×9 cm	豫济食药监械(准)字 2011 第 1260008 号	130303	济源市太极医疗用品有限公司	未检出
静电理疗贴(肩周炎型)	7 cm×9 cm	豫济食药监械(准)字 2011 第 1260008 号	130303	济源市太极医疗用品有限公司	未检出
静电理疗贴(风湿型)	7 cm×9 cm	豫济食药监械(准)字 2011 第 1260008 号	130303	济源市太极医疗用品有限公司	未检出
中药粉末(治疗风湿痛)	无	无	无	无	吲哚美辛 0.05 mg/包、马来酸氯苯那敏 1.9 mg/包、醋酸泼尼松 5.5 mg/包

续表 3

样品名称	规格	批准文号	批号或生产日期	标示生产厂家	检出药物量
中药粉末 (治疗风湿痛)	无	无	无	无	吲哚美辛 0.2 mg/包、马来酸氯苯那敏 1.2 mg/包、醋酸泼尼松 3.7 mg/包
粉末 (治疗风湿痛一)	无	无	无	无	吲哚美辛 22.8 mg/g、醋酸泼尼松 5.4 mg/g
粉末 (治疗风湿痛二)	无	无	无	无	吲哚美辛 21.8 mg/g、醋酸泼尼松 5.4 mg/g
颈肩腰腿贴	外径尺寸 90 mm×120 mm; 内径尺寸 60 mm×80 mm	鲁齐食药监械(准)字 2013 第 1640142 号	2014071702	济南和创医疗器械有限公司	吲哚美辛 12.0 mg/贴、马来酸氯苯那敏 5.4 mg/贴
肩周贴	70 mm×100 mm	鲁齐食药监械(准)字 2013 第 1640130 号	2014071701	济南和创医疗器械有限公司	未检出
白马寺消痛贴	70 mm×100 mm	鲁荷食药监械(准)字 2012 第 1640017 号	2014040601	菏泽市牡丹区德源医疗器械有限公司	未检出
孟氏风湿康胶囊	0.5 g	无	2014.06.01	孟氏风湿哮喘专科	醋酸泼尼松 0.6 mg/粒、吲哚美 5.6 mg/粒、双氯酚酸钠 10.1 mg/粒、马来酸氯苯那敏 0.5 mg/粒
无敌擦剂益痛康喷剂	无	吉卫健用字[2012]第 053 号	20150201	吉林省东颐生物科技有限公司	双氯酚酸钠约 0.2 mg/mL
天地松松针油复合胶囊	450 mg	无	2013/11/21	韩国 CNS 株式会社	未检出

3 结论

本实验建立的 UPLC-MS/MS MRM 方法测定中药及保健食品中违法添加的化学药, 具有操作简便、适用范围广、灵敏度高、准确、快速等特点, 本方法集快速初筛技术、验证技术和准确定量技术为一体, 极大地提高了非标检测工作的效率, 一次进样即可获得 34 个通道采集的色谱、质谱信息, 根据不同质谱采集通道内的色谱保留时间即可判断样品中是否添加了 17 种化学药物。对 17 个化学药物分 5 个时间段进行质谱扫描, 大大提高了定量准确性。不仅适用于胶囊剂、丸剂、片剂样品中添加化学药的准确检测, 也适用于其他剂型中药和保健食品样品的快速筛查。由于抗炎镇痛类药物数量众多, 而且新型药物不断问世, 中药和保健食品成分复杂, 添加的化学物质不易被识别, 需要扩大筛选范围, 不断增加新型药物作为目标物, 提高检测的阳性率, 为药品监管及规范保健食品市场提供技术支撑, 具有非常重大的意义。

参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学 [M]. 第 16 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [2] 朱健, 裘一婧, 沈国芳. 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] 吴晓敏, 史大军, 王明娟. 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.

- [4] 张月辉, 董慧明. HPLC-DAD 超高效液相色谱法同时测定抗风湿类中成药中非法添加 10 种糖皮质激素 [J]. 山东化工, 2015, 44(4): 69-74.
- [5] 丁宝月, 屠婕红, 薛磊冰, 等. UPLC-MS/MS 法快速测定降压类中成药及保健食品中非法添加 34 种化学药的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 688-696.
- [6] 蒋丽萍, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS 法测定抗疲劳类保健食品中非法添加的 9 种壮阳类化学药物 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2238-2245.
- [7] 朱峰, 阮丽萍, 马永建, 等. 超高效液相色谱-串联质谱联用法同时检测降糖类和减肥类保健品中 20 种非法添加的化学降糖药物 [J]. 色谱, 2014, 32(1): 13-20.
- [8] 芦丽, 宫旭, 谭力. 高效液相色谱-离子阱质谱法快速筛查改善睡眠类保健食品中非法添加的 24 种镇静催眠药 [J]. 色谱, 2015, 33(3): 256-266.
- [9] Cho S H, Park H J, Lee J H, et al. Monitoring of 35 illegally added steroid compounds in foods and dietary supplements [J]. Food Addit Contam Part A, 2014, 31(9): 1470-1475.
- [10] Khazan M, Hedayati M, Kobarfard F, et al. Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements [J]. Iran Red Crescent Med J, 2014, 16(3): e15344. doi: 10.5812/ircmj.15344.
- [11] 黎雪清, 鲁艺, 王铁杰, 等. 抗风湿类中成药和保健品中非法添加化学成分的高效液相色谱-质谱/质谱法检测 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(6): 86-90.