

UPLC-Q-TOF 检测止咳平喘类中成药中 非法添加的 8 种化学药品

陈晓虎, 秦剑*, 苏晶, 任学毅, 曾令高, 况刚

(重庆市食品药品检验所, 重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121)

[摘要] 目的:建立止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药品的检测方法。方法:采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF), MS 模式进行检测。采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相甲醇-0.1% 甲酸的 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹; 离子源 ESI 源, 正离子检测, 扫描范围 *m/z* 100~600。对茶碱、磺胺甲噁唑、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林、醋酸泼尼松、地西洋进行定量检测。结果:8 种化学药品的线性范围分别为 1.251~62.55, 1.043~52.15, 1.057~52.85, 1.002~50.10, 1.147~57.35, 1.069~53.45, 0.991~49.55, 1.111~55.55 mg·L⁻¹, 8 种化学药品平均回收率在 97.8%~103.2%。结论:该方法快速、简便、准确, 可用于止咳平喘类中成药中非法添加 8 种化学药品的快速检测。

[关键词] 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱; 止咳平喘类; 中成药; 非法添加

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0064-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040064

Determination of 8 Kinds of Chemical Medicines Illegally Added in Traditional Chinese Medicines for Relieving Cough and Asthma by UPLC-Q-TOF CHEN Xiao-hu, QIN Jian, SU Jing, REN Xue-yi, ZENG Ling-gao, KUANG Gang (Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC-Q-TOF method for the determination of 8 kinds of chemical medicines illegally added in traditional Chinese medicines for relieving cough and asthma. **Method:** UPLC-Q-TOF and MS mode was adopted to perform the quantitative determination with the Waters Acquity BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), methanol-10 mmol·L⁻¹ ammonium formate (containing 0.1% formic acid) for the gradient elution, and the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. The ion source was electrospray ionization (ESI) with the positive ion detection. The scan range was *m/z* 100-600. Theophylline, sulfamethoxazole, chlorphenamine, diphenhydramine, pentoxifyverine, benproperine, prednisone acetate and diazepam added in the traditional Chinese medicines were quantitatively identified. **Result:** The linear ranges of 8 kinds of chemical medicines were 1.251-62.55, 1.043-52.15, 1.057-52.85, 1.002-50.10, 1.147-57.35, 1.069-53.45, 0.991-49.55, 1.111-55.55 mg·L⁻¹. The average recovery rate of 8 kinds of chemical medicines was 97.8%-103.2%. **Conclusion:** This method is rapid, simple and accurate, and could be used to detect 8 kinds of chemical medicines added in traditional Chinese medicines for relieving cough and asthma.

[Key words] UPLC-Q-TOF; relieving cough and asthma; traditional Chinese medicines; illegally added

中成药具有毒副作用小、可以长期服用的特点, 尤其适用于咳嗽、哮喘等慢性疾病的治疗^[1], 而茶碱、醋酸泼尼松等抗炎、抗过敏化学药物具有疗效明

确、见效快的特点, 不法分子利用患者信任中药又急于治病的心理, 在止咳平喘类中成药中非法添加化学药物, 牟取暴利。但长期服用或超剂量服用含有

[收稿日期] 20140114(005)

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2012ggB10001)

[第一作者] 陈晓虎, 硕士, 主管中药师, 从事中药质量研究, Tel:023-65072753, E-mail:chenxiaohu78@126.com

[通讯作者] * 秦剑, 研究员, 从事药物质量评价及中药质量研究, Tel:023-86072717, E-mail:023qin@163.com

化学药物的中成药会对身体造成严重损伤^[2]。茶碱、磺胺甲噁唑、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林、醋酸泼尼松、地西泮等8种化学药物价廉易得,对于气管炎、支气管炎等疾病有明显疗效,是常见的平喘类非法添加化学药物。有报道采用 TLC, HPLC, HPLC-MS/MS 检查止咳平喘类中成药中非法添加化学药物,但专属性不强、灵敏度差、检测周期长^[3-4]。本文建立了同时检测止咳平喘类中成药中非法添加的化学药物的 UPLC-Q-TOF 方法,为中成药中8种化学成分的非法添加鉴别提供试验判断方法。

1 仪器与试剂

Acquity 型 UPLC, Xevo G2 型 Q-TOF 质谱仪, Masslynx 4.1 数据处理工作站(美国 Waters 公司), Milli-Q 型超纯水器(美国 Millipore)。

茶碱(批号 100121-201104)、磺胺甲噁唑(批号 100025-199503)、马来酸氯苯那敏(批号 100047-200606,纯度 99.7%)、苯海拉明(批号 100066-199705)、枸橼酸喷托维林(批号 100432-200401)、磷酸苯丙哌啉(批号 100237-200702,纯度 99.8%)、醋酸泼尼松(批号 110012-0105)、地西泮(批号 171225-9601)对照品均由中国食品药品检定研究院提供,样品均为市售品,甲酸、甲酸铵、甲醇均为色谱纯,超纯水为自制。

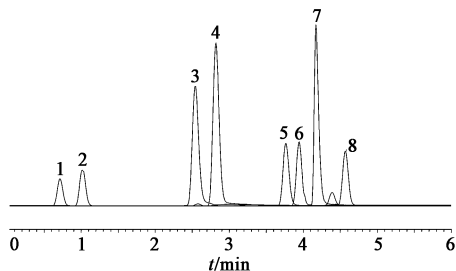
2 方法与结果

2.1 检测条件 色谱条件: Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相甲醇(A)-0.1%甲酸的 10 mmol·L⁻¹甲酸铵溶液(B),进行梯度洗脱(0 ~ 6 min, 30% ~ 80% A; 6 ~ 7 min, 80% A; 7 ~ 8 min, 80% ~ 30% A; 8 ~ 10 min, 30% A),流速 0.4 mL·min⁻¹。

质谱条件: Waters Q-TOF 质谱,离子化模式为 ESI 正离子模式,MS 采集模式,扫描的质量范围 *m/z* 100 ~ 600,毛细管电压 3 kV,锥孔电压 35 V,离子源温度 120 °C,脱溶剂气温度 350 °C,脱溶剂气流速 500 L·h⁻¹。

2.2 质谱定性分析 飞行时间质谱是一种高分辨质谱,能够获得目标化合物分子离子、碎片离子的精确分子量,对化合物结构定性准确,可以有效地避免假阳性干扰。8种非法添加物在 2.1 项色谱条件下可以得到完全分离,按照保留时间和精确分子量,与对照品保留时间和精确分子量进行比对,即可对化合物进行定性鉴别。MS 采集模式可以记录所有进入质谱的总离子流,8种化合物在 2.1 项质谱条件

下一级质谱均能形成 [M + H]⁺ 准分子离子峰,按准分子离子峰的理论质荷比 (*m/z*) 提取离子流,以准分子离子峰面积对浓度做标准曲线,即可进行定量测定。8种化合物的提取离子流见图 1。



1. 茶碱;2. 磺胺甲噁唑;3. 氯苯那敏;4. 苯海拉明;5. 喷托维林;6. 苯丙哌林;7. 醋酸泼尼松;8. 地西泮

图 1 8种化合物提取离子流

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of eight components

2.3 8种化学成分的精确定性 根据建立的标准数据库,将实际样品测试结果的提取离子流图与标准谱库进行比较。阳性样品通过精确相对分子质量(偏差 < 3 × 10⁻⁶)、保留时间(偏差 < 0.2 min)、碎片离子的精确相对分子质量与元素组成等信息综合判断,确定检出化合物。8种化学成分保留时间、一级质谱准分子离子峰以及二级质谱主要碎片离子数据,见表 1。

表 1 精确定性数据库要素

Table 1 Elements of precisely qualitative database

目标物	保留时间 /min	一级质谱准分子离子峰 [M + H] ⁺		二级质谱 主要碎片 离子
		理论值	实测值	
		茶碱	0.71	
磺胺甲噁唑	1.01	254.059 9	254.061 1	156.011 2
氯苯那敏	2.54	275.131 5	275.133 8	230.073 4, 167.073 1
苯海拉明	2.82	256.170 1	256.171 2	165.070 0, 152.062 3
喷托维林	3.78	334.238 2	334.237 8	145.101 2, 100.112 5
醋酸泼尼松	3.94	401.196 4	401.198 8	383.189 3, 341.178 7
苯丙哌林	4.18	310.217 1	310.219 2	165.069 5, 126.128 1
地西泮	4.56	285.079 5	285.079 5	222.115 3, 193.089 0

2.4 溶液的制备

2.4.1 对照品溶液 精密称取 8 种化学对照品各 10 mg, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液 0.5 mL, 置同一 10 mL 棕色量瓶中, 用初始流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液 取一次口服剂量的样品(胶囊剂取 1 粒内容物研细,片剂取 1 片、颗粒剂取 1 袋直接研细,口服液取 10 mL),加甲醇 25 mL,超声处理 10 min,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,滤液作为供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液适量,用初始流动相稀释成 1, 2, 5, 10, 20, 50 mg·L⁻¹ 的系列浓度混合对照品溶液,注入液相色谱仪,进行测定。以化合物提取离子流的峰面积为纵坐标(Y),对照品质量浓度为横坐标(X),进行线性回归,得回归方程。结果见表 2。

表 2 8 种化合物的线性回归方程及检测限

Table 2 Linear regression equations and detection limits of eight components

化合物	回归方程	线性范围 /mg·L ⁻¹	r	检测限 /mg·L ⁻¹
茶碱	$Y = 147.89X + 1266$	1.251 ~ 62.55	0.998 1	0.23
磺胺甲噁唑	$Y = 779.73X + 6409$	1.043 ~ 52.15	0.997 2	0.33
氯苯那敏	$Y = 328.39X + 1540$	1.057 ~ 52.85	0.998 5	0.22
苯海拉明	$Y = 367.7X + 3199$	1.002 ~ 50.10	0.997 8	0.14
喷托维林	$Y = 374.66X + 2704$	1.147 ~ 57.35	0.999 1	0.15
醋酸泼尼松	$Y = 74.88X - 333.5$	1.069 ~ 53.45	0.999 0	0.10
苯丙哌林	$Y = 146.47X + 480.4$	0.991 ~ 49.55	0.999 1	0.19
地西洋	$Y = 193.04X - 295.2$	1.111 ~ 55.55	0.998 9	0.55

2.5.2 检测限 将混合对照品溶液逐级稀释,以 3 倍信噪比确定检测限,结果见表 2。

2.5.3 精密度试验 取混合对照品溶液,在 2.1 项色谱条件下,连续进样 6 次,分别计算茶碱、磺胺甲噁唑、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林、醋酸泼尼松、地西洋提取离子流峰面积,计算精密度,结果 RSD 分别为 3.1%, 3.2%, 2.8%, 2.9%, 2.4%, 1.2%, 2.6%, 1.2%。

2.5.4 稳定性试验 取混合对照品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 注入液相色谱仪,分别计算茶碱、磺胺甲噁唑、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林、醋酸泼尼松、地西洋提取离子流峰面积,计算精密度,结果 RSD 分别为 2.1%, 1.2%, 2.4%, 1.9%, 3.2%, 1.2%, 2.3%, 2.2%。表明 8 种化合物在 24 h 内基本稳定。

2.5.5 重复性试验 精密称取阳性样品(已知仅添加醋酸泼尼松)平行 6 份,按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,测定并计算醋酸泼尼松含量,结果平

均质量分数为 2.241 mg·g⁻¹, RSD 为 1.5%。

2.5.6 回收率试验 精密称取阴性样品 6 份,分别精密加入混合对照品溶液适量,按 2.2 项下方法平行制备成供试品溶液,测定计算各成分的回收率,结果茶碱、磺胺甲噁唑、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林、醋酸泼尼松、地西洋的平均回收率分别为 100.05%, 99.74%, 99.68%, 99.14%, 100.07%, 99.88%, 99.05%, 99.17%, RSD 分别为 3.2%, 2.4%, 2.6%, 1.3%, 2.2%, 2.2%, 3.1%, 2.1%。

2.5.7 专属性 选用各种剂型(胶囊剂、片剂、颗粒剂、口服液)空白样品各 1 批,并另取以上空白样品各 1 份,分别添加混合对照品溶液(各 1 mg·L⁻¹) 1 mL,按拟定的方法处理和测定,比较色谱图,结果空白样品无干扰。

2.6 样品检测 共收集止咳平喘类中成药 30 批,按拟定的方法测定,结果 3 批样品检出醋酸泼尼松,质量分数分别为 2.241, 2.012, 1.517 mg·g⁻¹; 3 批样品检出茶碱,质量分数分别为 0.527, 1.265, 0.693 mg·g⁻¹; 其余 24 批样品未检出非法添加物。

3 讨论

本实验要求的流动相既要达到分离 8 种成分的效果,更重要的是要保证 8 种成分的离子化效率,以满足质谱的检测。故在流动相中添加离子化试剂,分别比较了甲酸、甲酸-甲酸铵和乙酸-乙酸铵系统,结果显示甲酸-甲酸铵系统离子化效率较高,并对甲酸-甲酸铵浓度进行了考察,发现过高的浓度会产生离子抑制效应,降低色谱峰的响应值,最后采用 0.1% 甲酸-10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵系统。

经过试验比较,发现过高的锥孔电压会使对茶碱直接发生二级裂解,难以收集到准分子离子峰,过低的电压会使醋酸泼尼松难以带上电荷,准分子离子峰响应值偏低,故采用 35 eV 的锥孔电压,可以兼顾大分子和小分子,保证 8 种化学成分充分电离。

与常规的液相-串联质谱技术相比, UPLC-Q-TOF 技术能在非常短的时间内(5 min 左右)实现 8 个目标化合物的分离,并且获得高精度的分子离子峰、多级碎片信息等质谱数据,能够实现对目标化合物的精确定性。这对非法添加物的检测具有重要意义。

本文建立了止咳平喘类中成药中非法添加 8 种化学成分的检测方法,该方法简单、高效、快速、准确,可为快速筛查非法添加物,打击制假售假提供强有力的技术保障。

[参考文献]

[1] 王海霞. 止咳平喘药物分析[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(5): 73-74.
[2] 何秋霞. 镇咳药的临床应用评价[J]. 海峡药学, 2012, 24(5): 224-225.
[3] 戴家欢. 糖皮质激素在呼吸系统中应用的临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(10): 125-126.
[4] 赵斌, 谢学超, 王振华. 茶碱类平喘药不良反应文献的回顾性分析[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(5): 638-642.
[5] 徐玉文, 李冰, 郑静. TLC法检查止咳平喘中成药中非法添加四种化学药品的方法[J]. 中国药品标准,

2011, 12(1): 58-60.

[6] 王戈, 赵培敬. 高效液相色谱-质谱联用法检查止咳灵胶囊中非法添加的醋酸泼尼松和茶碱[J]. 中国药业, 2013, 22(4): 40-41.
[7] 姚羽, 田颂九, 张正行. 中成药及中药保健品中非法添加抗组胺药物的检测方法研究[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(8): 720-721.
[8] 王艳红, 李冰, 陈真. 高效液相色谱法同时测定止咳平喘类中成药中违规添加的磺胺嘧啶等7种化学抗菌物质[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(8): 683-687.
[9] 樊磊磊, 刘乃强, 李振国. UPLC-MS定性定量检测中成药中非法添加的盐酸克仑特罗[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 81-83.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国当代医药》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国当代医药》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管, 中国保健协会、当代创新(北京)医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊, 本刊已被美国化学文摘(CA)数据库、万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库全文收录, 系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊, 国内刊号: CN11-5786/R, 国际刊号: ISSN 1674-4721, 邮发代号: 2-515, 定价: 每期20元, 通过本刊发行部订阅全年36期杂志优惠价为540元。

主要栏目: 综述、论著、实验研究、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、新药评价、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、中医中药、护理研究、制剂与技术、医药教育、调查研究、工作探讨等50多个栏目。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订阅单复印件投稿, 同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址: 北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-602 邮编: 100025

投稿热线: 010-59679076 59679077 发行热线: 010-59679533 传真: 010-59679056

投稿邮箱: ddy@vip.163.com 网址: www.dangdaiyiyao.com