

UPLC-MS-MS 快速检测中成药及保健食品中 非法添加的 38 种糖皮质激素

钱叶飞, 贾昌平, 鲁辉, 张斌, 周璇, 陈丽波*, 郝刚
(苏州市食品药品检验所, 江苏 苏州 215104)

[摘要] **目的:**建立一种快速、准确检测中成药及保健食品中非法添加 38 种糖皮质激素的方法。**方法:**采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS-MS), Acquity BEH-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 乙酸乙腈溶液(A)-0.1% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 电喷雾电离(ESI), 正离子扫描, 多反应监测(MRM)模式测定 38 种糖皮质激素, 通过比较 MRM 模式下各通道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, 38 种糖皮质激素分离度良好, 方法检测限(LOD)0.3 ~ 1.6 μg·L⁻¹, 定量限(LOQ)1.0 ~ 5.4 μg·L⁻¹, 加样回收率在 80.9% ~ 119.4%。**结论:**该方法简便、准确, 灵敏度高, 可用于中成药及保健品中非法添加糖皮质激素的检测。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱; 抗风湿; 止咳平喘; 中成药; 保健食品; 非法添加; 糖皮质激素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0060-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100060

Rapid Determination of 38 Glucocorticoids Illegally Added into Chinese Patent Medicines and Dietary Supplements by UPLC-MS-MS

QIAN Ye-fei, JIA Chang-ping, LU Hui, ZHANG Bin, ZHOU Xuan, CHEN Li-bo*, HAO Gang
(Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou 215104, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid and accurate method for the determination of 38 glucocorticoids which were illegally added into the Chinese patent medicines and dietary supplements. **Method:** The ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrum (UPLC-MS-MS) method was adopted on a Waters Acquity BEH-C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column with 0.1% acetic acid acetonitrile solution (A) - 0.1% acetic acid water solution (B) as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, and the column temperature was 25 °C. Electrospray ionization (ESI), positive ion scanning and a multiple reaction monitoring (MRM) mode were used to quantitatively determine 38 glucocorticoids. The added chemical components were determined by comparing the molecular ion peaks, secondary fragment ion peaks, and retention time under MRM channels between sample peaks and reference peaks. The exact amount of added medicine was calculated according to the peak area of mass spectrometry with external standard method. **Result:** Under the above chromatography and mass spectrometry conditions, 38 glucocorticoids were well separated. The limits of detection (LOD) and the limits of quantitation (LOQ) of this method were in the range of 0.3-1.6 μg·L⁻¹ and 1.0-5.4 μg·L⁻¹ respectively. The recovery rates were in the range of 80.9% -119.4%. **Conclusion:** This method is simple, accurate, and highly sensitive, which can be used for the determination of illegally added glucocorticoids in Chinese patent medicines and dietary supplements.

[收稿日期] 20150707 (013)

[基金项目] 苏州市科技计划项目(SYS201583)

[第一作者] 钱叶飞, 硕士, 中药师, 从事中药、保健食品质量分析研究, Tel:0512-67079943, E-mail:qian_yefei@126.com

[通讯作者] * 陈丽波, 主任药师, 从事药物分析研究, Tel:0512-67079943, E-mail:1348770440@qq.com

[**Key words**] UPLC-MS-MS; anti rheumatic; relieving cough and asthma; Chinese patent medicines; dietary supplements; illegal additives; glucocorticoids

糖皮质激素有抗炎和免疫抑制作用,可快速消除炎症及炎症反应引起的各种症状,临床主要用于风湿性及类风湿性关节炎、镇咳平喘、皮炎和某些感染类疾病的综合治疗,是治疗风湿性疾病的一线药物。但不正当地使用或长期大剂量使用可导致多种不良反应和并发症,甚至危及生命^[1-4]。近年来不法分子在利益驱使下,利用消费者对中成药及保健食品安全性的信任,常向某些中成药及保健食品中添加糖皮质激素类成分,使通常起效慢的中药和保健食品似乎具备了速效、高效的优点,但产品本身质量安全难以控制保证,严重威胁消费者的生命安全。因此建立一种简便、灵敏、快捷的方法来检测抗风湿类和止咳平喘类中成药及保健食品中是否添加糖皮质激素类药物具有重要的现实意义。

目前,文献报道检测糖皮质激素的方法主要有 HPLC, GC-MS, LC-Q-TOF-MS, LC-QQQ-MS 等^[5-9],但所检测的糖皮质激素种类不够全面,大部分检测方法是根据少数在监管视线以内的添加药物有针对性地建立,而对一些未知的添加物则难以一一进行筛查^[7,10]。UPLC-MS-MS 因同时具备了 UPLC 灵敏度高,串联质谱特异性好、普适性强、高通量等优点,可对多组分混合物进行定性鉴定和分子结

构的准确判定,是快速、全面地检测中成药及保健食品中非法添加化学成分的有效工具。本文建立的方法,在短时间内(15 min)即对 38 种糖皮质激素化合物实现分离,并采集化合物母离子和 2 个特征子离子信息,实现目标物质的定性与定量分析。通过对 10 批抗风湿类和 3 批止咳平喘类中成药及保健食品(包括片剂、胶囊、丸剂等不同制剂的中成药及保健食品)的检测,可有效地应用于此类中成药和保健食品中可能添加的 38 种糖皮质激素类化学成分的快速筛查,为打击不法分子的非法行为提供一定的依据。

1 材料

Acquity 型 UPLC 超高效液相色谱仪 [Xevo TQ-S 三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子源 (ESI), MassLynx 4.1 数据处理系统,美国 Waters 公司], Mili-Q 超纯水器 (美国密理博公司), XS 205DU 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), KQ-300DA 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈、甲醇、乙酸均为色谱纯,其余试剂为分析纯,中成药和保健品样品来自本实验室检测样品。糖皮质激素对照品信息见表 1 (后文以对应序号表示该对照品)。

表 1 38 种糖皮质激素对照品信息

Table 1 Information of 38 glucocorticoid

| No. | 名称 | 分子式 | CAS | 来源 | 批号 |
|-----|----------|---|-----------|------------------|---------------|
| 1 | 曲安西龙 | C ₂₁ H ₂₇ FO ₆ | 124-94-7 | 中国食品药品检定研究院 | 100333-201102 |
| 2 | 泼尼松龙 | C ₂₁ H ₂₈ O ₅ | 50-24-8 | 中国食品药品检定研究院 | 100153-201004 |
| 3 | 氢化可的松 | C ₂₁ H ₃₀ O ₅ | 50-23-7 | 中国食品药品检定研究院 | 100152-200206 |
| 4 | 泼尼松 | C ₂₁ H ₂₆ O ₅ | 53-03-2 | Dr. Ehrenstorfer | 10305 |
| 5 | 可的松 | C ₂₁ H ₂₈ O ₅ | 53-06-5 | 中国食品药品检定研究院 | 101128-201001 |
| 6 | 甲基泼尼松龙 | C ₂₂ H ₃₀ O ₅ | 83-43-2 | Dr. Ehrenstorfer | 10829 |
| 7 | 倍他米松 | C ₂₂ H ₂₉ FO ₅ | 378-44-9 | 中国食品药品检定研究院 | 100118-200403 |
| 8 | 氟米松 | C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅ | 2135-17-3 | 中国食品药品检定研究院 | 510006-201301 |
| 9 | 倍氯米松 | C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅ | 4419-39-0 | TRC | B131000 |
| 10 | 曲安奈德 | C ₂₄ H ₃₁ FO ₆ | 76-25-5 | 中国食品药品检定研究院 | 100055-201103 |
| 11 | 氟氢缩松 | C ₂₄ H ₃₃ FO ₆ | 1524-88-5 | USP | J0M002 |
| 12 | 曲安西龙双醋酸酯 | C ₂₅ H ₃₁ FO ₈ | 67-78-7 | USP | I0L189 |
| 13 | 泼尼松龙醋酸酯 | C ₂₃ H ₃₀ O ₆ | 52-21-1 | 中国食品药品检定研究院 | 100124-200303 |
| 14 | 氟米龙 | C ₂₂ H ₂₉ FO ₄ | 426-13-1 | USP | J0F140 |
| 15 | 氢化可的松醋酸酯 | C ₂₃ H ₃₂ O ₆ | 50-03-3 | 中国食品药品检定研究院 | 100013-200106 |

续表 1

| No. | 名称 | 分子式 | CAS | 来源 | 批号 |
|-----|-----------|---|------------|------------------|---------------|
| 16 | 地夫可特 | C ₂₅ H ₃₁ NO ₆ | 14484-47-0 | TRC | 13-SSR-80-1 |
| 17 | 氟氢可的松醋酸酯 | C ₂₃ H ₃₁ FO ₆ | 514-36-3 | 中国食品药品检定研究院 | 100009-200704 |
| 18 | 泼尼松醋酸酯 | C ₂₃ H ₂₈ O ₆ | 125-10-0 | 中国食品药品检定研究院 | 100012-200706 |
| 19 | 可的松醋酸酯 | C ₂₃ H ₃₀ O ₆ | 50-04-4 | 中国食品药品检定研究院 | 100123-200303 |
| 20 | 甲基泼尼松龙醋酸酯 | C ₂₄ H ₃₂ O ₆ | 53-36-1 | USP | I0F082 |
| 21 | 倍他米松醋酸酯 | C ₂₄ H ₃₁ FO ₆ | 987-24-6 | 中国食品药品检定研究院 | 510013-201301 |
| 22 | 氢化可的松丁酸酯 | C ₂₅ H ₃₆ O ₆ | 13609-67-1 | USP | J0K395 |
| 23 | 地塞米松醋酸酯 | C ₂₄ H ₃₁ FO ₆ | 1177-87-3 | 中国食品药品检定研究院 | 100122-201206 |
| 24 | 氟米龙醋酸酯 | C ₂₄ H ₃₁ FO ₅ | 3801-06-7 | USP | F1G190 |
| 25 | 氢化可的松戊酸酯 | C ₂₆ H ₃₈ O ₆ | 57524-89-7 | USP | 32100F1 |
| 26 | 曲安奈德醋酸酯 | C ₂₆ H ₃₃ FO ₇ | 3870-07-3 | 中国食品药品检定研究院 | 100125-201105 |
| 27 | 二氟拉松双醋酸酯 | C ₂₆ H ₃₂ F ₂ O ₇ | 33564-31-7 | USP | H0G388 |
| 28 | 倍他米松戊酸酯 | C ₂₇ H ₃₇ FO ₆ | 2152-44-5 | Dr. Ehrenstorfer | 20217 |
| 29 | 泼尼卡酯 | C ₂₇ H ₃₆ O ₈ | 73771-04-7 | USP | F0F172 |
| 30 | 哈西奈德 | C ₂₄ H ₃₂ ClFO ₅ | 3093-35-4 | 中国食品药品检定研究院 | 100146-200403 |
| 31 | 阿氯米松双丙酸酯 | C ₂₈ H ₃₇ ClO ₇ | 66734-13-2 | USP | I0C302 |
| 32 | 安西奈德 | C ₂₈ H ₃₅ FO ₇ | 51022-69-6 | USP | H0D346 |
| 33 | 氯倍他索丙酸酯 | C ₂₅ H ₃₂ ClFO ₆ | 25122-46-7 | 中国食品药品检定研究院 | 100302-201103 |
| 34 | 氟替卡松丙酸酯 | C ₂₅ H ₃₁ F ₃ O ₅ S | 80474-14-2 | Dr. Ehrenstorfer | 01022 |
| 35 | 莫米他松糠酸酯 | C ₂₇ H ₃₀ Cl ₂ O ₆ | 83919-23-7 | USP | I0L395 |
| 36 | 倍他米松双丙酸酯 | C ₂₈ H ₃₇ FO ₇ | 5593-20-4 | 中国食品药品检定研究院 | 100596-200601 |
| 37 | 倍氯米松双丙酸酯 | C ₂₈ H ₃₇ ClO ₇ | 5534-09-8 | 中国食品药品检定研究院 | 100119-200603 |
| 38 | 氯倍他松丁酸酯 | C ₂₅ H ₃₂ ClFO ₅ | 25122-57-0 | EP | C2285000 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Acquity BEH-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 乙酸乙腈溶液(A)-0.1% 乙酸水溶液(B) 梯度洗脱(0 ~ 3 min, 32% A; 3 ~ 12 min, 32% ~ 75% A; 12 ~ 14 min, 75% A; 14 ~ 14.1 min, 75% ~ 32% A; 14.1 ~ 16 min, 32% A), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 1 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描, 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 150 °C; 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流量 1 000 L·h⁻¹, 锥孔反吹气流量 150 L·h⁻¹, 碰撞气为氩气, 流量 0.25 mL·min⁻¹, MRM 模式采集信号, 相关质谱采集参数见表 2。

2.3 对照品溶液制备 精密称取上述 38 种对照品各 10 mg, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇适量溶解, 并稀释至刻度, 制成质量浓度均为 1 g·L⁻¹ 的对照品储备液。再精密量取各溶液适量, 用甲醇定量稀释成质量浓度均为 1 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液制备 取胶囊剂样品的内容物、片剂或丸剂适量, 置于研钵中, 研磨均匀成粉末状。精密称取粉末 1 g, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶液约 40 mL, 超声处理 30 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。精密量取上述供试品储备液适量, 用流动相按比例逐步稀释成与对照品溶液质量浓度相近的溶液, 作为供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 取 2.3 项下对照品溶液按 2.1 和 2.2 项下条件进样测定, 得到对照品 MRM 色谱, 见图 1; 取阴性样品按照 2.4 项下方法处理, 按 2.1 和 2.2 项下条件进样测定, 得到样品溶液的 MRM 色谱图, 阴性样品中色谱图中均无干扰目标物测定的色谱峰, 表明该方法专属性强。

2.5.2 线性范围、检测限和定量限试验 精密吸取 2.3 项下混合对照品溶液适量, 分别用甲醇稀释制成质量浓度为 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg·L⁻¹ 的

表 2 38 种糖皮质激素的质谱采集参数

Table 2 LC-MS-MS parameters for 38 glucocorticoids

| No. | 母离子/ m/z | 锥孔电压/V | 定量离子/ m/z | 定性离子/ m/z | 碰撞能/V | | 保留时间/min |
|-----|------------|--------|-------------|-------------|-------|----|----------|
| 1 | 395.37 | 28 | 357.33 | 375.28 | 10 | 10 | 0.79 |
| 2 | 361.40 | 24 | 343.39 | 147.23 | 8 | 24 | 1.12 |
| 3 | 363.37 | 32 | 121.22 | 91.18 | 26 | 48 | 1.17 |
| 4 | 359.43 | 28 | 341.42 | 95.20 | 8 | 22 | 1.17 |
| 5 | 361.36 | 50 | 163.23 | 121.22 | 22 | 26 | 1.26 |
| 6 | 375.37 | 26 | 357.29 | 161.21 | 10 | 20 | 1.66 |
| 7 | 393.30 | 28 | 147.16 | 373.14 | 38 | 4 | 1.83 |
| 8 | 411.36 | 30 | 253.26 | 121.21 | 18 | 26 | 2.03 |
| 9 | 409.36 | 28 | 391.35 | 147.22 | 14 | 24 | 2.20 |
| 10 | 435.42 | 28 | 339.274 | 397.32 | 14 | 14 | 2.38 |
| 11 | 437.36 | 54 | 91.17 | 105.21 | 60 | 60 | 2.78 |
| 12 | 479.36 | 20 | 441.32 | 321.32 | 10 | 16 | 2.90 |
| 13 | 403.36 | 24 | 385.35 | 147.22 | 10 | 32 | 2.94 |
| 14 | 377.36 | 24 | 279.33 | 357.34 | 14 | 8 | 3.30 |
| 15 | 405.36 | 34 | 309.33 | 327.34 | 16 | 16 | 3.15 |
| 16 | 442.42 | 70 | 142.21 | 124.20 | 32 | 48 | 3.50 |
| 17 | 423.42 | 54 | 239.30 | 91.18 | 28 | 66 | 3.39 |
| 18 | 401.36 | 34 | 295.33 | 383.35 | 14 | 8 | 3.75 |
| 19 | 403.36 | 42 | 163.28 | 343.29 | 24 | 20 | 4.04 |
| 20 | 417.42 | 24 | 339.343 | 399.35 | 10 | 10 | 4.62 |
| 21 | 435.42 | 30 | 397.326 | 415.39 | 10 | 6 | 4.77 |
| 22 | 433.42 | 44 | 121.22 | 345.33 | 24 | 12 | 5.10 |
| 23 | 435.42 | 24 | 147.22 | 415.39 | 28 | 6 | 5.19 |
| 24 | 419.36 | 26 | 321.39 | 279.33 | 14 | 14 | 5.61 |
| 25 | 447.46 | 46 | 121.21 | 345.33 | 26 | 14 | 6.29 |
| 26 | 477.42 | 34 | 339.34 | 457.39 | 14 | 8 | 6.36 |
| 27 | 495.42 | 30 | 317.30 | 121.21 | 14 | 36 | 6.74 |
| 28 | 477.46 | 34 | 279.32 | 355.38 | 16 | 10 | 7.19 |
| 29 | 489.42 | 34 | 381.38 | 471.41 | 10 | 8 | 7.67 |
| 30 | 455.36 | 58 | 121.21 | 105.21 | 30 | 52 | 7.59 |
| 31 | 521.42 | 32 | 301.30 | 171.27 | 14 | 42 | 7.95 |
| 32 | 503.37 | 28 | 321.40 | 339.28 | 18 | 16 | 7.85 |
| 33 | 467.36 | 32 | 355.28 | 373.35 | 14 | 10 | 8.04 |
| 34 | 501.36 | 32 | 293.32 | 313.34 | 14 | 10 | 8.32 |
| 35 | 521.35 | 28 | 503.33 | 95.14 | 12 | 36 | 8.34 |
| 36 | 505.42 | 34 | 411.35 | 279.33 | 10 | 16 | 8.43 |
| 37 | 521.42 | 20 | 337.32 | 503.40 | 18 | 12 | 8.95 |
| 38 | 479.36 | 40 | 279.33 | 343.30 | 18 | 14 | 9.30 |

系列标准溶液,进样 1 μL ,以各化合物定量监测离子对色谱峰峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐

标(X)绘制标准曲线,得线性方程和相关系数(r)。结果表明 38 种化合物在各自的质量浓度范

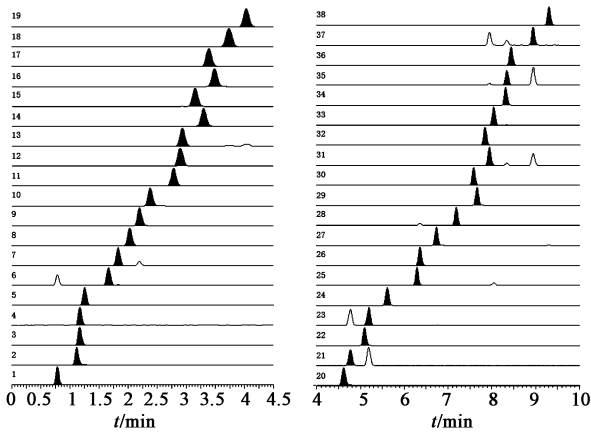


图 1 38 种糖皮质激素定量离子对的 MRM 色谱

Fig. 1 MRM chromatography of quantitative ion pair for 38 glucocorticoid

围内与色谱峰峰面积均呈良好线性关系, r 均 > 0.99 , 见表 3。

取阴性样品加入混合对照品溶液, 经适当稀释后进样, 以信噪比为 3 时计算各化合物的检测限 (LOD) 和信噪比为 10 时的定量限 (LOQ), 见表 3。结果表明方法具有较高的灵敏度, 完全能满足非法添加糖皮质激素的检测要求。

2.5.3 精密度试验 取 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合对照品

溶液, 按 2.1 和 2.2 项下色谱、质谱条件进样 $1 \mu\text{L}$ 测定, 连续测定 6 次, 结果上述 38 种糖皮质激素定量离子对质谱峰面积的 RSD 在 $1.6\% \sim 8.0\%$ ($n = 6$), 表明该方法精密度良好。见表 3。

2.5.4 加样回收率试验 取阴性样品 18 份, 各称取 1 g , 分低、中、高 3 个浓度组 (对照品质量浓度 $0.5, 2.5, 5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 每组 6 份, 按 2.4 项下方法处理, 进样分析, 计算回收率。结果显示, 38 种糖皮质激素的平均回收率均在 $80\% \sim 120\%$, 表明方法的加样回收率较好。见表 3。

2.5.5 重复性试验 取阴性供试品溶液共 6 份, 分别精密加入对照品储备液适量, 使含各种糖皮质激素质量浓度均为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 按 2.4 项下方法进行提取, 2.1 和 2.2 项下色谱、质谱条件进样测定, 结果 38 种糖皮质激素成分含量的 RSD 均 $< 8\%$, 表明该方法具有良好的重复性。见表 3。

2.5.6 稳定性试验 取重复性试验项下 1 份供试品溶液 (各糖皮质激素质量浓度均为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别在配制后避光放置 $0, 2, 4, 6, 8, 12 \text{ h}$, 依法测定。结果上述 38 种糖皮质激素的定量离子对色谱峰面积计算 RSD 均在 $2.2\% \sim 7.4\%$ ($n = 6$), 表明供试品溶液 12 h 内稳定性良好。见表 3。

表 3 38 种糖皮质激素线性方程, 相关系数, LOD, LOQ, 精密度, 回收率, 重复性及稳定性

Table 3 Thirty-eight kinds of glucocorticoid linear equation, r , LOD, LQD, precision, recovery rate, repeatability and stability

| No. | 线性范围 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 线性方程 | r | LOD $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | LOQ $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 精密度 /% | 回收率 /% | 重复性 /% | 稳定性 /% |
|-----|--|--------------------------|---------|---|---|-----------|---------------|-----------|-----------|
| 1 | 5 ~ 200 | $Y = 538.52X + 1186.92$ | 0.997 8 | 0.63 | 2.11 | 5.3 | 107.1 ~ 113.7 | 6.4 | 7.3 |
| 2 | 5 ~ 200 | $Y = 1202.33X + 774.27$ | 0.997 6 | 0.93 | 3.10 | 4.7 | 103.6 ~ 119.3 | 4.2 | 4.0 |
| 3 | 2 ~ 100 | $Y = 1660.03X - 346.06$ | 0.994 9 | 0.49 | 1.64 | 4.8 | 108.1 ~ 115.6 | 5.2 | 4.4 |
| 4 | 5 ~ 200 | $Y = 1132.93X + 3170.85$ | 0.999 5 | 1.16 | 3.87 | 5.9 | 107.7 ~ 119.4 | 5.8 | 8.7 |
| 5 | 2 ~ 200 | $Y = 2745.08X + 1080.84$ | 0.999 0 | 0.47 | 1.58 | 5.0 | 110.5 ~ 116.6 | 6.8 | 6.1 |
| 6 | 5 ~ 200 | $Y = 1240.27X + 912.86$ | 0.997 9 | 1.54 | 5.13 | 1.6 | 107.5 ~ 113.0 | 4.8 | 6.5 |
| 7 | 5 ~ 200 | $Y = 219.17X + 573.43$ | 0.995 5 | 1.62 | 5.41 | 6.5 | 82.6 ~ 85.7 | 6.9 | 5.8 |
| 8 | 5 ~ 200 | $Y = 749.48X + 1232.37$ | 0.996 0 | 1.10 | 3.66 | 4.3 | 94.1 ~ 107.5 | 4.1 | 8.9 |
| 9 | 5 ~ 200 | $Y = 997.67X + 323.42$ | 0.997 9 | 0.80 | 2.66 | 8.0 | 93.0 ~ 95.6 | 3.9 | 7.4 |
| 10 | 5 ~ 200 | $Y = 552.95X - 195.08$ | 0.998 2 | 1.26 | 4.19 | 6.3 | 99.9 ~ 105.3 | 3.2 | 5.7 |
| 11 | 5 ~ 200 | $Y = 438.77X - 37.55$ | 0.998 0 | 0.77 | 2.57 | 6.4 | 84.8 ~ 96.1 | 2.6 | 7.3 |
| 12 | 2 ~ 200 | $Y = 774.26X - 58.10$ | 0.997 4 | 0.42 | 1.39 | 8.0 | 102.2 ~ 113.6 | 4.2 | 4.5 |
| 13 | 5 ~ 200 | $Y = 1148.05X - 704.71$ | 0.996 1 | 0.95 | 3.16 | 3.6 | 93.2 ~ 101.8 | 5.5 | 5.3 |
| 14 | 5 ~ 200 | $Y = 1085.48X + 1669.18$ | 0.999 3 | 0.76 | 2.53 | 2.7 | 95.0 ~ 101.9 | 2.5 | 5.4 |
| 15 | 2 ~ 200 | $Y = 1387.41X + 7.11$ | 0.999 2 | 0.47 | 1.58 | 3.0 | 105.1 ~ 107.6 | 2.8 | 7.2 |
| 16 | 2 ~ 200 | $Y = 4019.16X - 686.50$ | 0.998 1 | 0.37 | 1.23 | 4.7 | 90.5 ~ 98.5 | 3.2 | 5.1 |
| 17 | 2 ~ 200 | $Y = 873.50X + 637.65$ | 0.995 8 | 0.40 | 1.33 | 7.3 | 95.9 ~ 110.6 | 6.3 | 4.2 |

续表 3

| No. | 线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 线性方程 | r | LOD / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | LOQ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 精密度 /% | 回收率 /% | 重复性 /% | 稳定性 /% |
|-----|---|------------------------------|---------|--|--|-----------|--------------|-----------|-----------|
| 18 | 5 ~ 200 | $Y = 1\ 197.90X + 195.04$ | 0.998 3 | 0.84 | 2.82 | 4.3 | 93.4 ~ 102.6 | 6.2 | 5.7 |
| 19 | 5 ~ 200 | $Y = 2\ 352.14X + 833.59$ | 0.997 3 | 0.55 | 1.85 | 6.3 | 96.6 ~ 104.2 | 6.0 | 3.0 |
| 20 | 2 ~ 200 | $Y = 666.25X - 158.73$ | 0.998 0 | 0.48 | 1.58 | 6.2 | 95.7 ~ 104.0 | 3.4 | 6.1 |
| 21 | 2 ~ 200 | $Y = 621.84X + 666.44$ | 0.996 2 | 0.63 | 2.10 | 6.4 | 85.0 ~ 98.4 | 2.7 | 4.5 |
| 22 | 5 ~ 200 | $Y = 1\ 227.15X + 2\ 546.81$ | 0.996 4 | 0.78 | 2.61 | 5.1 | 84.3 ~ 95.2 | 3.1 | 4.6 |
| 23 | 5 ~ 100 | $Y = 313.96X - 52.44$ | 0.990 5 | 0.65 | 2.17 | 7.1 | 80.9 ~ 95.1 | 8.1 | 8.6 |
| 24 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 605.05X + 1\ 485.15$ | 0.995 1 | 0.57 | 1.89 | 4.8 | 93.9 ~ 103.6 | 2.4 | 4.3 |
| 25 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 341.58X - 11.88$ | 0.995 3 | 0.56 | 1.88 | 6.4 | 90.7 ~ 100.4 | 4.8 | 8.1 |
| 26 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 001.53X + 1\ 239.03$ | 0.990 8 | 0.36 | 1.21 | 3.6 | 91.8 ~ 103.8 | 3.0 | 4.2 |
| 27 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 112.19X + 382.98$ | 0.995 2 | 0.63 | 2.11 | 5.9 | 98.0 ~ 104.4 | 3.4 | 4.2 |
| 28 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 194.32X + 616.51$ | 0.995 6 | 0.40 | 1.33 | 5.1 | 93.9 ~ 103.0 | 3.6 | 3.0 |
| 29 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 884.8X + 2\ 052.51$ | 0.996 9 | 0.30 | 1.01 | 5.2 | 93.4 ~ 102.6 | 2.2 | 3.5 |
| 30 | 5 ~ 100 | $Y = 577.93X - 92.84$ | 0.999 6 | 0.84 | 2.81 | 4.0 | 82.3 ~ 89.9 | 7.5 | 7.2 |
| 31 | 2 ~ 200 | $Y = 678.40X + 798.73$ | 0.994 8 | 0.63 | 2.11 | 6.1 | 96.5 ~ 108.7 | 3.2 | 2.4 |
| 32 | 2 ~ 200 | $Y = 880.30X + 1529.66$ | 0.993 8 | 0.43 | 1.42 | 6.2 | 90.8 ~ 109.8 | 4.3 | 6.5 |
| 33 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 200.83X + 1\ 758.27$ | 0.995 3 | 0.62 | 2.07 | 1.8 | 89.6 ~ 100.4 | 4.8 | 4.6 |
| 34 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 732.43X + 1\ 297.79$ | 0.993 1 | 0.34 | 1.12 | 5.0 | 99.2 ~ 112.7 | 3.2 | 3.5 |
| 35 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 307.51X + 3\ 378.46$ | 0.990 1 | 0.72 | 2.40 | 4.8 | 96.8 ~ 110.7 | 3.9 | 2.2 |
| 36 | 2 ~ 200 | $Y = 2\ 192.89X + 1\ 121.20$ | 0.994 5 | 0.43 | 1.42 | 5.9 | 98.1 ~ 108.8 | 5.9 | 3.4 |
| 37 | 2 ~ 200 | $Y = 620.24X + 681.95$ | 0.991 4 | 0.53 | 1.76 | 6.3 | 90.5 ~ 104.5 | 3.9 | 3.5 |
| 38 | 2 ~ 200 | $Y = 1\ 426.22X + 169.53$ | 0.990 2 | 0.47 | 1.56 | 6.5 | 88.8 ~ 96.9 | 3.1 | 4.6 |

2.6 样品测定 共收集了 10 批抗风湿类和 3 批止咳平喘类中成药及保健食品,按上述拟定方案分别进样测定,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各非法添加物的含量。结果表明,10 批抗风湿类中有 6 批检出醋酸泼尼松,含量为 0.2 ~ 12.3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其中有 1 批还检出了泼尼松,含量为 0.6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,3 批止咳平喘类中有 2 批检出醋酸泼尼松,含量分别为 0.9 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 2.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,具体结果见表 4。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的优化 为了减少操作步骤及获得尽可能高的提取效率,本文优化了超声提取方式。糖皮质激素可溶于多种溶剂,本试验选用溶解性好的甲醇进行超声提取。分别考察了不同时间(10,30,60 min)的超声提取效果。结果表明以甲醇为提取溶剂超声 30 min 对待测成分提取效率较高。

3.2 流动相的优化 考察了水-乙腈,0.1% 乙酸水溶液-乙腈,0.1% 乙酸水溶液-0.1% 乙酸乙腈溶液 3

种流动相体系梯度洗脱,结果显示,0.1% 乙酸水溶液-0.1% 乙酸乙腈溶液分离效果以及质谱响应较好。

3.3 质谱条件的优化 糖皮质激素是具有甾醇母核的一类化合物,有相似的结构及化学性质,且待测的 38 种糖皮质激素中有 5 组化合物为同分异构体(可的松和泼尼松龙(m/z 361),可的松醋酸酯和泼尼松龙醋酸酯(m/z 403),曲安奈德、倍他米松醋酸酯和地塞米松醋酸酯(m/z 435),曲安奈德醋酸酯和倍他米松戊酸酯(m/z 477),莫米他松糠酸酯、阿氯米松双丙酸酯和倍氯米松双丙酸酯(m/z 521)),这给同时分离并测定 38 种糖皮质激素分析带来了一定的难度。由于 38 种待测化合物均在正离子模式下有较强的质谱响应,因此选择在正离子模式检测。通过对碰撞能量、毛细管电压、脱溶剂气气流和温度、碰撞气压力等一系列质谱参数进行优化,确定最佳的质谱条件。最终在 MRM 模式下,使保留时间相近的上述各化合物均能达到完全分离,各通道之间无明显干扰,使从复杂的中药

表 4 样品信息及检出成分 (n=3)

Table 4 Sample information and detected components (n=3)

| No. | 类别 | 样品名称 | 批号 | 检出药物量 |
|-----|------|------------|----------|---|
| 1 | 抗风湿 | 风湿散胶囊 | 20130102 | 醋酸泼尼松 1.3 mg·g ⁻¹ |
| 2 | 抗风湿 | 风湿散胶囊 | 20130507 | 醋酸泼尼松 1.5 mg·g ⁻¹ |
| 3 | 抗风湿 | 西藏复方活筋骨通 | 不详 | 醋酸泼尼松 1.2 mg·g ⁻¹ , 泼尼松 0.6 mg·g ⁻¹ |
| 4 | 抗风湿 | 筋骨痛速康蝮蛇枸杞丸 | 20130618 | 醋酸泼尼松 0.2 mg·g ⁻¹ |
| 5 | 抗风湿 | 蛇粉风湿灵 | 130202 | 醋酸泼尼松 12.3 mg·g ⁻¹ |
| 6 | 抗风湿 | 虫草鹿骨丸 | 20130624 | 醋酸泼尼松 0.2 mg·g ⁻¹ |
| 7 | 抗风湿 | 风湿根治王 | 20130723 | 醋酸泼尼松 11.0 mg·g ⁻¹ |
| 8 | 抗风湿 | 三蛇胶囊 | 20130512 | 未检出 |
| 9 | 抗风湿 | 乌蛇葛根胶囊 | 不详 | 未检出 |
| 10 | 抗风湿 | 骨疼宁胶囊 | 20130205 | 未检出 |
| 11 | 止咳平喘 | 肺宝胶囊 | 20121201 | 未检出 |
| 12 | 止咳平喘 | 复方咳喘灵胶囊 | 20130726 | 醋酸泼尼松 0.9 mg·g ⁻¹ |
| 13 | 止咳平喘 | 润肺咳喘灵胶囊 | 20120902 | 醋酸泼尼松 2.2 mg·g ⁻¹ |

及保健品成分中检测 38 种可能的非法添加化合物的方法成为可能。

本文建立了 UPLC-TQ-MS 同时测定抗风湿和止咳平喘类中成药及保健食品中可能添加的 38 种糖皮质激素含量的检测平台,在较短的时间内(15 min 左右)实现 38 个目标化合物的分离,并且获得分子离子峰、二级碎片信息等质谱数据,并根据待测化合物二级质谱碎片离子的差异找出化合物的特征碎片建立专属的 MRM 通道,对目标化合物快速定性定量。该平台具有操作简便、灵敏度高、快速准确、高通量的特点,可广泛适用于丸剂、片剂和胶囊剂等多种剂型的保健品和中成药样品中非法添加的快速筛查,为药品监管、规范保健品市场及维护消费者的切身利益提供有力的技术支撑。

[参考文献]

[1] 李永清. 糖皮质激素的药理作用及不良反应[J]. 北方药学, 2013, 10(11): 32-33.

[2] 周彬, 刘建, 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, 11(6): 43-44.

[3] 梁锋, 李影, 胡志强. 糖皮质激素不良反应在医疗

纠纷鉴定中引发的思考[J]. 中国卫生法制, 2012, 20(3): 58-60.

[4] 董永成, 杜士明, 陈永顺, 等. 中成药及保健品非法添加化学成分的类型, 危害及对策[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1601-1602.

[5] 潘军. HPLC 法筛查中药软膏制剂中非法添加的 17 种糖皮质激素[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2323-2326.

[6] 吴维群, 沈朝辉, 杨玉林, 等. GC-MS 联用技术检测水性化妆品中性激素的方法研究[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(4): 307-309.

[7] 吴小红, 李焕德, 朱荣华. HPLC-MS/MS 法鉴别中成药及保健品中添加的糖皮质激素类化学药物[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2395-2399.

[8] 张翠英, 李振国, 徐金铃. UPLC-MS 法检测止咳平喘药制剂中非法添加茶碱、醋酸泼尼松、醋酸地塞米松[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1326-1330.

[9] 陈晓虎, 秦剑, 苏晶, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 64-67.

[10] 王静文, 曹进, 王钢力, 等. 保健食品中非法添加药物检测技术研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 1-10.

[责任编辑 顾雪竹]