

UPLC-MS/MS法快速筛查抗风湿类中药贴剂中非法添加的17种化学药物成分^Δ

李强^{1*}, 岳磊², 李晓静^{3#} (1.河南省食品药品审评查验中心, 郑州 450018; 2.郑州市食品药品检验所, 郑州 450015; 3.郑州大学第三附属医院, 郑州 450052)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)12-1692-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.12.30

摘要 目的:建立快速筛查抗风湿类中药贴剂中非法添加的9种糖皮质激素和8种非甾体抗炎药物成分的方法。方法:采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)。色谱条件:色谱柱Acquity UPLC[®] BEN C₁₈,流动相为甲醇-水(90:10, V/V),流速为0.4 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为1 μL;质谱条件:离子源为电喷雾离子源,喷雾针电压为5 500 V,离子源喷雾气GS1、GS2分别为50、50 psi,离子源温度为500 ℃,扫描范围为 m/z 50~550,检测方式为正负离子模式,多反应监测(MRM)联合相关信息扫描(IDA)和增强离子扫描(EPI)模式。结果:17种化学药物成分检测限均≤0.400 μg/mL。精密度、重复性、稳定性试验的RSD分别≤4.93%、7.69%、9.57%。实测样品中可检出双氯芬酸钠。结论:该方法专属性强、灵敏度高,适用于抗风湿类中药贴剂中非法添加化学药物成分的定性分析。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法;多反应监测;抗风湿类中药贴剂;非法添加;糖皮质激素;非甾体抗炎药

Rapid Determination of 17 Chemicals Illegally Added into Anti-rheumatic TCM Patches by UPLC-MS/MS

LI Qiang¹, YUE Lei², LI Xiaojing³ (1.Henan Food and Drug Inspection Center, Zhengzhou 450018, China; 2. Zhengzhou Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450015, China; 3.The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid determination method for 9 kinds of glucocorticoid and 8 kinds of non-steroidal anti-inflammatory drugs illegally added into anti-rheumatic TCM patches. METHODS: UPLC-MS/MS method was adopted. The samples were separated on Acquity UPLC[®] BEN C₁₈ column with methanol-water (90:10, V/V) as mobile phase at flow rate 0.4 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 1 μL. The ionization mode was electrospray ion source (ESI): spray needle voltage of 5 500 V, ion source spray GS1, GS2 pressure of 50, 50 psi, ion source temperature of 500 ℃, scanning range of m/z 50-500. The multiple reaction monitoring (MRM) combined with information-dependent acquisition (IDA) and enhanced product ion scanning (EPI) was used to rapid qualitative analysis. RESULTS: The detection limits for 17 kinds of chemical components were not more than 0.400 μg/mL. RSDs for precision, repeatability, stability tests were not more than 4.93%, 7.69%, 9.57%, respectively. Diclofenac sodium was detected in the sample. CONCLUSIONS: The method is selective and sensitive. It is suitable for qualitative analysis of chemicals illegally added into anti-rheumatism TCM patches.

KEYWORDS UPLC-MS/MS; MRM; Anti-rheumatism TCM patches; Illegally added; Glucocorticoid; Non-steroidal anti-inflammatory drugs

随着国家经济及互联网技术的发展,以电商为主的网络销售平台开始出现各种名目繁多的中药,抗风湿类中药贴剂因使用方便、疗效独特、不良反应小而广受患者欢迎;但多数见效慢,需长期使用,不法分子利用患者求治心切,为凸显产品疗效,非法添加功能性化学药品的现象非常普遍^[1],且所添加的化学药种类也逐年增多^[2-4]。抗风湿类中药非法添加物检测现行的国家标准为国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件(编号:2009025),该标准主要针对双

氯芬酸钠、对乙酰氨基酚等非甾体抗炎药进行筛查,对于滥用危害性更大的糖皮质激素类药物仅有氢化可的松、醋酸泼尼松和地塞米松3种,尚不能满足日常检验的需求^[5]。而药品检测前处理仅针对片剂、胶囊剂及大蜜丸进行了简单描述,对贴剂等尚无前处理操作标准。

抗风湿类中药中非法添加物的检测方法有薄层色谱法^[6-7]、高效液相色谱法^[8-9]、液相色谱-质谱法^[10-11]等,本课题组采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)技术,使用多反应监测(MRM)联合相关信息扫描(IDA)、增强离子扫描(EPI)的方式,建立了同时检测抗风湿类中药贴剂中17种抗炎类化学药物成分(包括9种糖皮质激素和8种非甾体抗炎药)的快速检验方法;其中,新增糖皮质激素类药物成分6种,检测效率得到提高。

1 材料

^Δ 基金项目:郑州地方高校新世纪教育教学改革及人才培养工程立项项目(No.ZZJG-B7027)

* 主管药师,硕士。研究方向:中药质量控制与不良反应。电话:0371-68683820。E-mail:fishsoft008@163.com

通信作者:主管药师,讲师,硕士。研究方向:药物质量分析。E-mail:lixiaojing2050@163.com

1.1 仪器

Acquity UPLC 仪(美国 Waters 公司); 4000QTrap 型 MS 仪(美国 SCIEX 公司); HU10300/40B 型超声波清洗机(上海楚定分析仪器有限公司, 功率: 300 W, 频率: 40 kHz)。

1.2 试剂

实测样品来自郑州市食品药品监督管理局抽检样品(A 公司, 批号: 150523-177, 规格: 100 mm×70 mm); 氢化可的松对照品(批号: 100152-200206, 纯度: 100.0%)、醋酸可的松对照品(批号: 100123-201204, 纯度: 99.2%)、地塞米松对照品(批号: 100129-201506, 纯度: 99.7%)、醋酸泼尼松对照品(批号: 100012-201407, 纯度: 99.7%)、醋酸泼尼松龙对照品(批号: 100124-201104, 纯度: 99.2%)、醋酸氟轻松对照品(批号: 100010-201108, 纯度: 99.6%)、丙酸倍氯米松对照品(批号: 100119-201504, 纯度: 99.0%)、倍他米松对照品(批号: 100118-201204, 纯度: 100.0%)、糠酸莫米松对照品(批号: 100930-201201, 纯度: 99.9%)、氨基比林对照品(批号: 100503-201302, 纯度: 99.9%)、布洛芬对照品(批号: 100179-201406, 纯度: 98.8%)、双氯芬酸钠对照品(批号: 100324-200302, 纯度: 100.0%)、吡罗昔康对照品(批号: 100258-200904, 纯度: 99.9%)、对乙酰氨基酚对照品(批号: 100018-201409, 纯度: 100.0%)、吡罗昔康对照品(批号: 100177-200603, 纯度: 99.8%)、萘普生对照品(批号: 100198-201205, 纯度: 99.9%)、保泰松对照品(批号: 100481-200601, 纯度: 99.9%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙酸铵、乙酸为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC[®] BEN C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 甲醇-水(90:10, V/V); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 1 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 检测方式: 正负离子模式; MRM 联合 IDA 和 EPI 模式; 喷雾针电压(IS): 5 500 V; 离子源温度(TEM): 500 °C; 离子源喷雾气(GS1、GS2): 50、50 psi; 扫描范围: *m/z* 50~550。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取各待测成分对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得单一对照品贮备液。精密量取上述各单一对照品贮备液 1.00 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 制成单一对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品 1 次用量, 撕开不粘层, 展开, 贴在定量滤纸上, 用剪刀裁去多余滤纸, 再将样品裁剪成小片, 置于 50 mL 烧杯中, 加甲醇适量, 超声处理 30

min, 滤过, 续滤液放冷至室温, 精密量取 1.00 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 空白对照溶液 取空白贴剂 1 份, 按“2.2.2”项下方法操作, 制成空白对照溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液各适量, 按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1、图 2。结果显示, 空白贴剂(图略)及前处理中涉及到的相关物质对目标物的测定不产生干扰, 方法专属性强。

2.4 检测限考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液各适量, 倍比稀释, 按“2.1”项下试验条件进样测定, 当信噪比为 3:1 时, 得检测限, 详见表 1。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液各适量, 按“2.1”项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 各待测成分峰面积的 RSD 为 0.88%~4.93% (*n*=6), 表明仪器精密度良好, 详见表 1。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号: 150523-177)适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 时按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果, 各待测成分峰面积的 RSD 为 5.97%~9.57% (*n*=6), 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内基本稳定, 详见表 1。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号: 150523-177)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果, 各待测成分峰面积的 RSD 为 1.81%~7.69% (*n*=6), 表明本方法重复性良好, 详见表 1。

2.8 样品中化学药物成分检测结果

若供试品出现与某对照品所有选择离子对质量数(见表 1)、色谱峰保留时间一致, 且两个选择离子峰高比与对照品一致, 则确认供试品中添加相应的对照品成分。如上述指标不能完全确认检出, 则调用 EPI 模式扫描得到的二级子离子全扫描图谱, 与对照品标准图谱进行比对, 确认是否存在非法添加, 详见图 3。由图 3 可见, 多个成分在保留时间上虽然不能达到完全分离, 但因 MRM 扫描方式下单特征离子对具备专一选择性, 不会造成相互间的干扰; 而 EPI 模式下得到的二级子离子图具备的独特性可以用来进一步的比对、验证, 减少误判的可能性。实测样品总离子流(TIC)图中在保留时间 0.38 min 处出现色谱峰, 响应的 MRM 离子对分别为 294.002/249.900、294.002/213.800, 离子对强度比为 3.22%; 与对照品 TIC 图中双氯芬酸钠色谱峰的保留时间一致, 响应离子对相同且离子对强度比近似。进一步将二者 EPI 图谱进行比对, 结果样品在 294.2(M-1)、

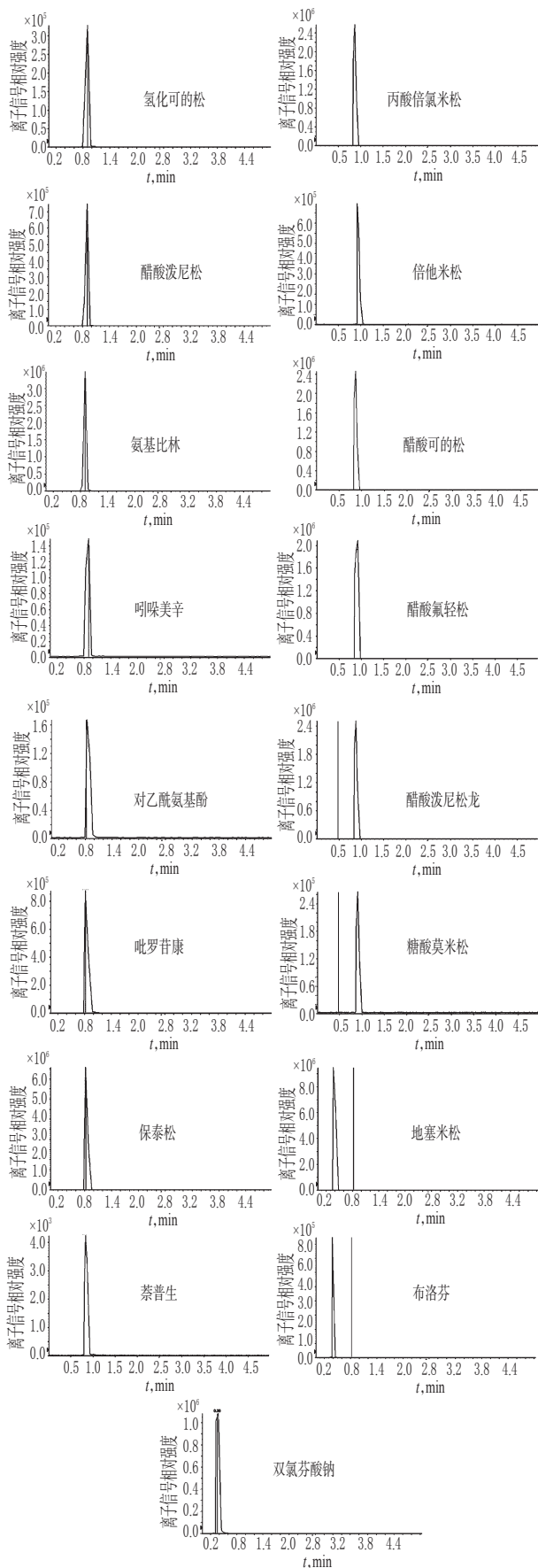


图1 17种对照品的总离子流色谱图

Fig 1 TIC chromatogram of 17 kinds of reference standard

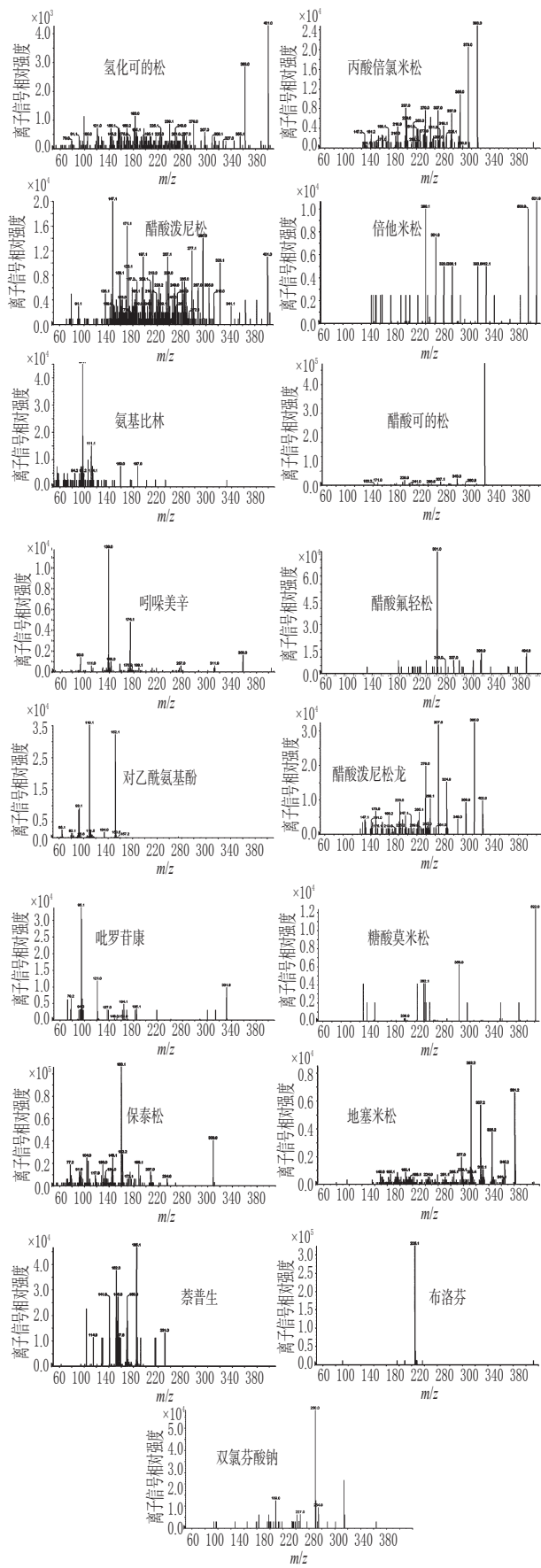


图2 17种对照品的增强离子扫描二级子离子图

Fig 2 EPI second-level daughterion diagram of 17 kinds of reference standard

表1 17种对照品质谱条件优化结果与方法学、检测限结果

Tab 1 Result of MS optimization, methodology and LOD for 17 substance control

化学物名称	DP,V	采样离子对	CE,eV	保留时间,min	检测限, $\mu\text{g/mL}$	精密度的RSD,%	重复性的RSD,%	稳定性的RSD,%
氢化可的松	81	363.238/91.100	93	0.88	0.080	3.38	5.61	6.95
		363.238/121.000	37					
醋酸可的松	101	403.209/163.100	37	0.86	0.020	4.12	5.24	6.42
		403.209/105.100	67					
地塞米松	-45	391.101/361.000	-18	0.37	0.020	2.57	3.81	5.97
		391.101/306.900	-38					
醋酸泼尼松	46	401.164/313.200	21	0.85	0.400	3.48	1.81	8.81
		401.164/43.200	97					
醋酸泼尼松龙	56	403.203/385.200	13	0.87	0.020	4.09	4.60	8.34
		403.203/147.100	31					
醋酸氟轻松	76	495.244/475.200	15	0.90	0.010	3.55	4.71	8.53
		495.244/337.100	23					
丙酸倍氯米松	66	393.206/373.200	13	0.87	0.008	1.32	6.24	8.43
		393.206/355.200	17					
倍他米松	66	522.261/504.200	15	0.93	0.040	4.22	6.09	6.09
		522.261/338.200	23					
糠酸莫米松	76	522.185/504.200	15	0.90	0.100	1.85	6.19	9.57
		522.185/356.100	21					
氨基比林	51	232.090/56.100	47	0.90	0.010	2.98	5.17	9.02
		232.090/97.000	45					
布洛芬	-30	204.997/158.600	-10	0.43	0.400	3.67	3.24	7.65
		204.997/160.900	-10					
双氯芬酸钠	-50	294.002/249.900	-16	0.36	0.002	0.88	2.52	7.24
		294.002/213.800	-28					
吡罗昔康	41	358.115/139.000	19	0.80	0.020	3.25	7.69	8.98
		358.115/80.100	21					
对乙酰氨基酚	41	152.060/110.100	23	0.84	0.006	2.72	5.40	9.30
		152.060/93.000	35					
吡罗昔康	46	332.108/95.000	27	0.83	0.020	2.62	4.82	9.36
		332.108/78.000	91					
萘普生	81	231.068/185.100	19	0.84	0.200	3.97	4.92	7.27
		231.068/168.800	19					
保泰松	76	309.163/160.100	29	0.83	0.001	4.93	1.93	6.27
		309.163/77.100	81					

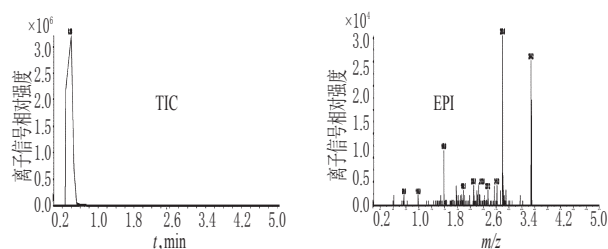


图3 实测样品的总离子流色谱图与增强离子扫描二级子离子图

Fig 3 TIC chromatogram and EPI second-level daughter ion diagram of measured samples

296.2(M+1)均有响应,高度比符合含氯化物质谱规律,其二级子离子图谱中存在250.0、227.0、189.0碎片,碎片强度分布与双氯芬酸钠对照品相似,可确认样品中存在非法添加双氯芬酸钠化学药物成分。

3 讨论

笔者考察了甲醇-水、甲醇-乙酸铵溶液、甲醇-乙酸溶液3个流动相体系。结果表明,甲醇-水(90:10, V/V)能保证全部化合物有效洗脱,保留时间更为稳定,且可有效减少前处理过程及柱平衡时间。

贴剂的不干胶层具有一定的黏合强度,如果不加处理,极易以不规则形态黏在烧杯上,直接进行裁剪又容易黏附在剪刀、操作台或操作员的手套上,均会影响提

取效果。笔者曾使用硅藻土帮助裁剪与提取,但硅藻土存在粉体逸散。后采用将贴剂黏在滤纸上进行裁剪提取,既方便操作又可减少交叉污染。

液质联用法检测非法添加物时常采用MRM模式进行定性或定量分析^[12-13],其扫描方式专属性较强、重复性好、便于定量操作^[14]。但依照现有标准,MRM模式下进行定性的关键参数为所选择离子对强度比,该数值在不同条件下存在较大偏差,同时因中药基质复杂,假阳性现象时有发生,故其定性结果的准确性相对不足。

我国《药品管理法》中明确规定,药品所含成分与国家药品标准规定的成分不符,可直接判定为假药。由此可见,对于中药贴剂,一旦发现其存在药品标准规定之外的非法添加化学药物成分,无论其含量是否与临床治疗量匹配,都可作为违法判定的直接证据,因此在非法添加类检验参数中,对样品定性的准确性要求远远高于对定量精密度的要求。

针对上述问题,可采用常规MS/MS模式取得二级子离子全扫描图来辅助定性。在该模式下,样品分子在进入第一重四级杆(Q1)后进行分子离子检测,在第二重四级杆(碰撞池)中被碰撞气体分子打碎之后进入第三重四级杆(Q3)检测碎片离子,由软件统一记录数据后形成二级子离子全扫描图,以取得足够多的碎片离子特征

RP-HPLC法测定卡博替尼原料药中卡博替尼的含量

徐伟*,詹长娟#,王华,王翼,郭琪(南京理工大学泰州科技学院环境与制药工程学院,江苏泰州225300)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)12-1696-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.12.31

摘要 目的:建立测定卡博替尼原料药中卡博替尼含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-SP C₁₈,流动相为乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵缓冲溶液(pH 5.2)(52:48, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为241 nm,柱温为38 ℃,进样量为20 μL。结果:卡博替尼检测质量浓度线性范围为9.88~49.40 μg/mL($r=0.9999$);定量限为11.46 ng,检测限为3.36 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为98.5~101.7%(RSD=1.2%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于卡博替尼原料药中卡博替尼的含量测定。

关键词 卡博替尼;反相高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Cabozantinib in Its Raw Material by RP-HPLC

XU Wei, ZHAN Changjuan, WANG Hua, WANG Yi, GUO Qi (School of Environmental and Pharmaceutical Engineering, Taizhou Institute of Sci. & Tech., Nanjing University of Science & Technology, Jiangsu Taizhou 225300, China)

数据来进行准确判定。但该模式需样品提供足够浓度来保证二级子离子全扫描图的完整性,而样品浓度过高会使得进样针、定量环甚至样品注射器中存在样品残留,进而可能导致后续样品出现假阳性现象。

笔者采用MRM联合IDA和EPI的扫描方式,在IDA-EPI模式下,当MRM获得的信号强度超过阈值后,机器开始启动普通三重四级杆(QQQ)与线性离子阱(Trap)模式的高频切换,在Trap模式下,Q3除具备测定碎片离子的功能外,还可同时对碎片离子进行富集,因此能在更低的样品浓度条件下采集更为完整的二级子离子全扫描图。将样品的二级子离子全扫描图谱与对照品图谱进行比对后可对样品进行定性判断,从而进一步减少复杂基质造成的影响;同时因可使用更低的样品浓度,在样品配制时能增加稀释倍数以避免样品残留,减少样品浓度过大而造成的假阳性现象。

参考文献

- [1] 鲁艺,韩东岐,黎雪清,等.安神类和抗风湿类中药和保健食品中非法添加化学成分的案例分析[J].中国药事,2015,29(8):775-781.
- [2] 倪晓霓.中成药非法添加化学成分的现状及对策[J].药学研究,2014,33(3):172-175.
- [3] 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.
- [4] 刘伟,蔡喜生,谷波,等.保健品中违法添加化学药品分析[J].临床医药文献电子杂志,2015(29):6136-6137.

- [5] 阳怡,自兆平.合理应用糖皮质激素类药物分析[J].中外医学研究,2015,13(15):152-154.
- [6] 苏健.薄层色谱法检测抗风湿类中成药中解热镇痛非甾体抗炎药的非法添加[J].云南中医中药杂志,2014,35(5):74-74.
- [7] 池浩波,张梦虹,李国毅,等.抗风湿类中成药和保健食品中非法添加双氯芬酸钠快速筛查方法研究[J].中成药,2011,33(6):1084-1086.
- [8] 黄萍,凌霄.HPLC-MS/MS法测定抗风湿中药制剂中糖皮质激素类化学药[J].中国药师,2009,12(47):138-140.
- [9] 黎雪清,谭渺,蒋创杰,等.HPLC法快速筛查抗风湿类中成药和保健食品中24种非法添加化学成分[J].中成药,2014,36(9):1891-1894.
- [10] 来国防,程宾.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.
- [11] 宋宁宁,张科明,刘向红,等.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定凉茶中非法添加的12种化学物质[J].色谱,2015,33(10):1026-1031.
- [12] 陈日檬,柯春文,万晓明,等.高效液相色谱-质谱联用法检测抗鼻炎喷剂中非法添加盐酸萘甲唑林[J].中国药业,2015,24(13):33-34.
- [13] 蒋丽萍,涂婕红,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中壮阳类化学药物[J].中草药,2015,46(15):2238-2245.
- [14] 王海东,程聪,高山,等.超高效液相色谱-串联质谱法快速测定人血浆中氯吡格雷及其代谢物浓度[J].中国新药与临床杂志,2015,34(12):955-961.

* 讲师,硕士。研究方向:药物化学。电话:0523-86150675。
E-mail:541175674@qq.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:药物分析。E-mail:
Jenny_yz@sina.com

(收稿日期:2016-05-07 修回日期:2016-08-21)

(编辑:张静)