

LC-MS 测定止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药物

刘静, 董宇, 姜鑫, 王震红(辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036)

摘要: 目的 建立 LC-MS 检测止咳平喘类中成药中的 8 种非法添加化学药物(茶碱、磺胺甲噁唑、醋酸泼尼松、地西洋、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林)。方法 采用高效液相色谱-离子阱质谱, ESI 离子源, 在正负离子扫描方式下, 以一级全扫描模式和二级全扫描模式进行检测。采用资生堂 CAPCELL-PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹。通过比较对照品和样品的色谱图和质谱图, 对样品中非法添加的化学成分进行定性鉴别。结果 8 种化合物色谱峰分离良好, 检出限为 0.1~0.4 μg·mL⁻¹。21 批样品中, 3 批检出茶碱。结论 该方法操作简单, 专属性强, 灵敏度高, 适用于止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学类物质的快速分析检测。

关键词: 液质联用法; 止咳平喘; 非法添加; 中成药

中图分类号: R927.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)07-0851-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.014

引用本文: 刘静, 董宇, 姜鑫, 等. LC-MS 测定止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药物[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 851-855.

Determination of 8 Chemical Drugs Illegally Added into Cough and Asthma Traditional Chinese Medicine by LC-MS

LIU Jing, DONG Yu, JIANG Xin, WANG Zhenhong(Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS method for the determination of 8 chemicals(including theophylline, sulfamethoxazole, prednisone acetate, diazepam, chlorpheniramine, diphenhydramine, pentoxifyverine, benproperine) illegally added into cough and asthma traditional Chinese medicine. **METHODS** A high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry and electrospray ionization source were adopted to perform the analysis operated in positive and negative ion modes with full scan MS and full scan MS² modes. Chromatographic separation was performed on a SHISEIDO CAPCELL-PAK C₁₈ column(4.6 mm×150 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution by gradient elution at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The qualitative identification of chemical components illegally added in samples was performed by comparing the chromatograms and mass spectrograms of the reference substances and samples. **RESULTS** A good chromatographic resolution of 8 compounds was obtained under the LC-MS condition. Out of 21 batches of samples, 3 samples contained theophylline with the detection limit of the method of 0.1–0.4 μg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The method is simple, selective and rapid. It is suitable for the rapid analysis and detection of 8 chemical substances illegally added in Chinese patent medicines for relieving cough and asthma.

KEYWORDS: LC-MS; cough and asthma; illegal addition; traditional Chinese medicine

呼吸系统疾病是目前最常见的疾病之一,也是占前十位的死亡原因之一。近年来,随着人们生活环境和生活方式的改变,空气污染、气候变化、不良生活习惯等因素^[1]使得呼吸系统相关疾病的发病率日益攀升。在治疗呼吸道疾病的方法中,中药制剂一直有着其独特的理论和优势^[2-4]。在新型冠状病毒肺炎的临床治疗中,中药也发挥了特有的优势和疗效^[5-7]。正是由于中药较好的治疗效果和广泛的群众基础,使得一些不法商家利用消费者治病心切的心理,在中成药中擅自添加化学药物。这些化学药物,成分不清,剂量不明,并

且具有潜在的不良反应,消费者在不知情的情况下大量服用,会对其身心健康造成巨大的伤害。有文献报道^[8],以公安机关 2011—2015 年侦办的 7 500 余起假药案件为基础,统计得出止咳平喘类药的非法添加比例占到了 14.2%,所以打击此类违法添加的假药,必须作为监管工作的重点,绝不能松懈,尤其是在抗击新型冠状病毒肺炎的严峻形势下,更应该加大对此类药物的非法添加监督检查。

茶碱、磺胺甲噁唑、醋酸泼尼松、地西洋、氯苯那敏、苯海拉明、喷托维林、苯丙哌林等 8

作者简介: 刘静,女,硕士,主管药师

Tel: (024)31266281

E-mail: liujing8326@126.com

种化学药物对呼吸系统疾病有显著疗效^[9-12],是临床常见的止咳平喘类非法添加化学药物,因其价廉易得,是非法添加需要关注的重点。针对此类药物非法添加的检验方法,目前报道的主要有薄层色谱法(TLC)^[13-14]、胶体金免疫层析法^[15]、高效液相色谱法(HPLC)^[16-18]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[19-21]等。由于中成药大多基质复杂,干扰成分多,具有较高灵敏度和专属性的液质联用法更适用于非法添加的检验。本实验建立一种液相色谱-离子阱质谱法,可同时准确、快速地测定8种止咳平喘类化学成分,为中成药中非法添加鉴别提供检验依据,为检验机构提供技术参考,为市场监督管理部门和公安部门打击制售伪劣药品提供技术支持。8种化学药物的结构式见图1。

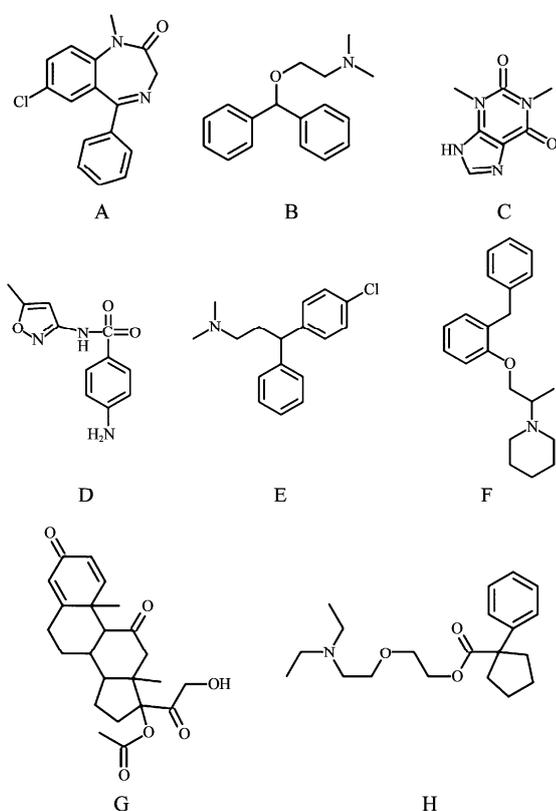


图1 对照品结构式

A-地西洋; B-苯海拉明; C-茶碱; D-磺胺甲噁唑; E-氯苯那敏; F-苯丙哌林; G-醋酸泼尼松; H-喷托维林。

Fig. 1 Structures of reference substances

A-diazepam; B-diphenhydramine; C-theophylline; D-sulfamethoxazole; E-chlorpheniramine; F-benproperine; G-prednisone acetate; H-pentoxifylline.

1 仪器与试剂

Finnigan LTQ XL 离子阱质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI)和 X calibur 质谱工作站均来自美国 Thermo 公司; Acquity Ultra Performance 超高效液

相色谱仪,配有液相泵和自动进样器均来自美国 Waters 公司; XP 205 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

对照品:茶碱(批号:100121-201805;含量:99.9%)、磺胺甲噁唑(批号:100025-201505;含量:99.6%)、醋酸泼尼松(批号:100012-201407;含量:99.5%)、马来酸氯苯那敏(批号:100047-201507;含量:99.7%)、盐酸苯海拉明(批号:100066-200807;含量:99.9%)、枸橼酸喷托维林(批号:100432-201803;含量:99.8%)、磷酸苯丙哌林(批号:100237-201804;含量:99.8%)、地西洋(批号:171225-200302;含量:98%)均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司);醋酸铵(分析纯, 国药集团);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。21 批样品:市场抽样和公安送检样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

资生堂 CAPCELL-PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(B);梯度洗脱程序:0~8 min, 25%(A), 8~10 min, 25%→65%(A), 10~20 min, 65%(A), 20~22 min, 65%→90%(A), 22~35 min, 90%(A), 35~37 min, 25%(A);流速:0.5 mL·min⁻¹;柱温:20 °C;进样量:10 μL。

2.2 质谱条件

离子源:ESI;检测方式:正负离子检测方式;离子源喷射电压:5.0 kV;毛细管温度:275 °C;毛细管电压:15 V;鞘气流速:1.05 L·min⁻¹;辅助气流速:0.15 L·min⁻¹;扫描方式:一级全扫描方式,二级全扫描方式。

2.3 溶液配制

2.3.1 对照品溶液的配制 分别精密称取茶碱、磺胺甲噁唑、醋酸泼尼松、地西洋、马来酸氯苯那敏、盐酸苯海拉明、枸橼酸喷托维林、磷酸苯丙哌林的对照品各 10 mg,加甲醇使溶解后转移至 100 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,作为对照品储备液(浓度约为 100 μg·mL⁻¹);精密量取对照品储备液各 1 mL 置 20 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液(每 1 mL 中含上述 8 种对照品各 5 μg)。

2.3.2 供试品溶液的配制 每份样品取一次最大口服剂量(片剂、颗粒剂、丸剂等取适量,研细;

胶囊剂取内容物), 分别置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声提取 30 min, 放冷, 加甲醇定容, 摇匀, 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液(必要时可将续滤液进行适当的稀释)。

2.3.3 阴性样品溶液的配制 取经测定不含 8 种非法添加化合物的样品, 按“2.3.2”项下方法操作, 配制成阴性样品溶液。

2.4 色谱、质谱分析

分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL , 注入液质联用仪, 采用正负离子检测模式对 8 种非法添加化合物进行 LC、MS 和 MS^2 分析, 对照品溶液提取离子色谱图见图 2, 各化合物保留时间、准分子离子和特征碎片离子见表 1。

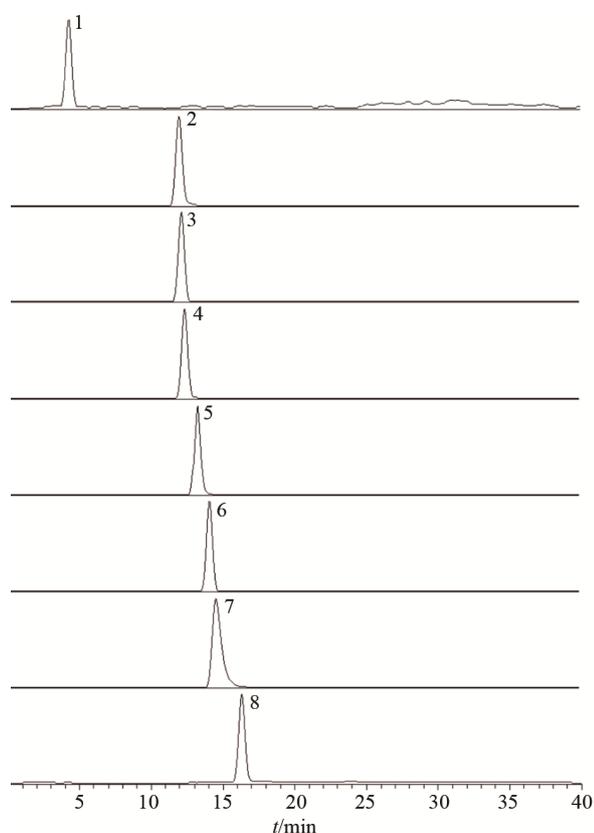


图 2 对照品溶液提取离子色谱图
1-茶碱; 2-氯苯那敏; 3-磺胺甲噁唑; 4-苯海拉明; 5-喷托维林;
6-醋酸泼尼松; 7-苯丙哌林; 8-地西洋。

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of reference solutions
1-theophylline; 2-chlorpheniramine; 3-sulfamethoxazole; 4-diphenhydramine; 5-pentoxifyverine; 6-prednisone acetate; 7-benproperine; 8-diazepam.

2.5 阴性干扰试验

在“2.1”和“2.2”项色谱、质谱条件下, 对不同剂型的阴性中成药(包括片剂、颗粒剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、丸剂、口服液等)的样品溶液进

行分析, 不同的阴性样品溶液均未检出 8 种化合物, 结果均为阴性, 无假阳性情况出现, 说明该方法适用于不同基质的制剂样品。

2.6 检出限考察

在阴性样品中添加一定浓度的对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法进行处理, 以信噪比为 3:1 时对应的对照品浓度计算检出限, 8 种非法添加化合物的检出限见表 1。

表 1 8 种化合物的质谱分析参数

Tab. 1 Mass spectrometry parameters for 8 chemicals

编号	对照品	保留时间/min	准分子离子/ m/z	质谱碎片/ m/z	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	茶碱	4.2	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 179	164	0.4
2	磺胺甲噁唑	6.5	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 254	156, 188	0.1
3	氯苯那敏	13.0	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 275	230	0.1
4	苯海拉明	13.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 256	167	0.1
5	醋酸泼尼松	14.0	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 401	383	0.2
6	喷托维林	15.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 334	100, 145, 217	0.1
7	地西洋	16.3	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 285	257	0.2
8	苯丙哌林	24.0	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 310	126	0.3

2.7 供试品溶液定性分析

采用“2.3.2”项下方法对 21 批样品进行处理, 在“2.1”和“2.2”项色谱、质谱条件下对样品溶液进行分析, 其中 3 批样品检测出色谱峰保留时间与茶碱对照品一致的化合物, 且该色谱峰的一级质谱及二级质谱碎片离子均与对照品一致, 表明这 3 批样品含有茶碱成分。阳性样品典型色谱图及质谱图见图 3, 结果表明, 共有 3 批样品含有非法添加化学成分, 检出率为 14.3%。

3 讨论

3.1 质谱条件的优化

本实验采用 ESI 进行离子化, 分别用正离子模式和负离子模式进行全扫描, 结果除茶碱外, 其他 7 种化合物均在 ESI^+ 模式下响应最好, 茶碱的正离子响应不如负离子响应好, 故本方法采用正负离子模式同时进行检测, 得到各自的母离子峰, 继而对各化合物的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 和 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 准分子离子峰进行 CID(碰撞诱导解离)反应, 以获得各自的二级碎片离子, 在此基础上进一步优化碰撞能量和相应的锥孔电压, 得到最佳的二级质谱条件。

3.2 色谱条件的优化

非法添加试验样品量大, 样品杂质相对较多, 对色谱柱的分离效果和耐用性要求较高, 超高效色谱柱虽然分析时间短, 但是耐用性往往不理想。

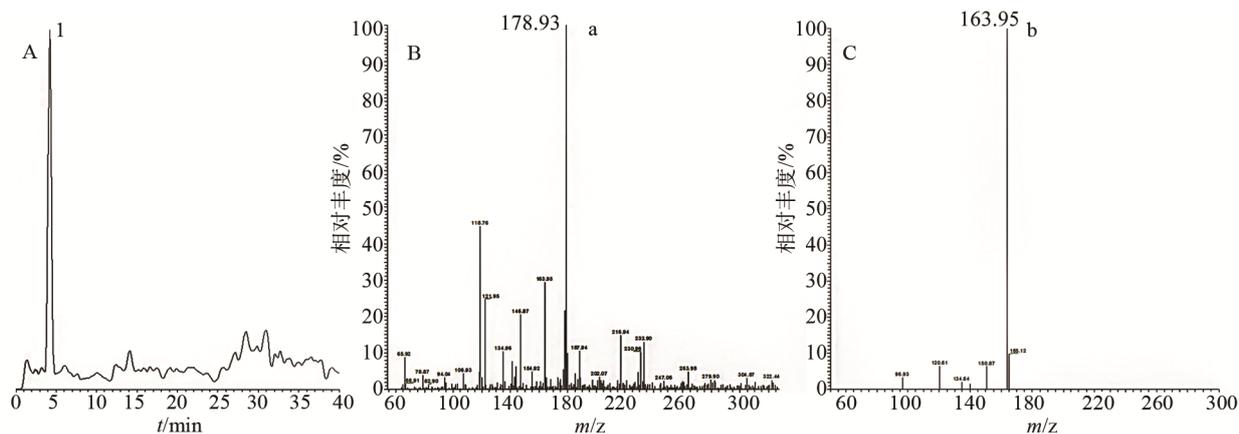


图3 茶碱阳性供试品溶液二级全扫描色谱图(A)、一级全扫描质谱图(B)和二级全扫描质谱图(C)
1-茶碱; a-准分子离子; b-碎片离子。

Fig. 3 Full scan MS² chromatogram(A), full scan MS spectrum(B) and full scan MS² spectrum(C) of samples contained theophylline

1-theophylline; a-quasi-molecular ion; b-fragment ion.

本实验最终采用资生堂 CAPCELL-PAK C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱进行止咳平喘类非法添加的检验,分离度好,且连续分析上百批次样品也能很好地满足实验要求。

液质联用法在选择流动相时,不仅要考虑峰型和分离度,还要兼顾待分析物的离子响应强度。由于该8种化合物极性差异大,为了缩短分析时间,实验采用梯度洗脱进行分析。分别考察了甲醇-水和乙腈-水系统,结果表明,乙腈较强的洗脱能力会明显改善苯丙哌林的峰宽,将水相加入一定比例的乙酸铵,化合物的峰型和离子强度会有一些的改善,但是当乙酸铵的浓度达到一定比例时,这种改善不会再变化,故试验最终确定流动相体系为乙腈-0.02 mol·L⁻¹乙酸铵溶液,适当调整梯度程序,8种化合物在20 min内出峰完全,洗脱时基线平稳,重复性好,方法灵敏度高,可以满足日常监管监测的需求。

4 结论

本研究建立的快速筛查止咳平喘类中成药中非法添加的8种化学药物的检测方法,选择的是离子阱质谱仪,因其扫描模式可以提供n级全扫描的子离子的信息,通过比较样品与对照品一级和二级全扫描色谱图和质谱图的信息来判定二者是否为同一化合物。这种分析方式更全面客观,比串联四级杆质谱仪的专属性更强,假阳性的风险更低,更适用于非法添加定性方面的应用^[22],该方法操作简单高效,结果准确可靠,对国标方法进行了有效的改进,8种化合物达到了同时测定,分析时间更短,效率更高,且已经应用于中

成药止咳平喘类化学药物的快速筛查和确证,本法在本部门的实际工作中,多次为公安部门非法添加专项整治行动和日常食品药品监管部门打击制假售假提供了有效的技术支持。

REFERENCES

- [1] WU Y H, LI F J, JIAN X H, et al. Analysis of influencing factors of asthmatic diseases in children[J]. J Mod Med Health(现代医药卫生), 2020, 36(13): 1970-1976.
- [2] YANG L, LIU J Q, BIAN Y, et al. The possibility of using emodin from Chinese herbal medicine as treatment for COVID-19[J]. Pharm Today, 2020, 30(4): 229-234.
- [3] YUAN W Y, WEI P, BAO K K, et al. Effects and mechanism of mahuang-gancao couplet medicines on allergic asthma[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2020, 36(1): 41-45.
- [4] WANG L Y, WANG H F, LI S Y. A review on treating severe community acquired pneumonia with TCM medicine[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2018, 10(26): 143-146.
- [5] XUE B S, YAO K W, XUE Y X. Analysis on traditional Chinese medicine theory of Qingfei Paidu decoction(清肺排毒汤) in fast and effective treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19)[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2020, 61(6): 461-462.
- [6] XU X, ZHANG Y, LI X, et al. Analysis on prevention plan of corona virus disease-19(COVID-19) by traditional Chinese medicine in various regions[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(4): 641-644.
- [7] YANG J. Pondering over the novel coronavirus pneumonia prevented and treated traditional Chinese medicine[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2020, 36(2): 149-151.
- [8] WANG Z G, WANG Y, WANG J L. Study on status quo and characteristics of manufacturing and selling counterfeit drugs in China and supervision strategies[J]. Chin Pharm(中国药房), 2016, 27(28): 3896-3899.

- [9] 王玉娇. 茶碱类药物的研究进展及应用[J]. 中国医药指南, 2016, 14(21): 26-27.
- [10] WU T T. Pharmaceutical care about hypnotic drug therapy of patient with COPD combined with II type respiratory failure: a case report[J]. Shanghai Med Pharm J(上海医药), 2018, 39(10): 33-34.
- [11] 王金兰. 苯海拉明治疗迁延性咳嗽 60 例报告[J]. 湖北医药导报, 1988(1): 16.
- [12] LIU X J, ZHANG Y, LV Z C, et al. Clinical study on treatment of laryngeal cough with Qufeng Lifei method[J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报), 2020, 22(1): 204-207.
- [13] TANG J. Rapid screening of seven chemicals illegally added to the cough and asthma drug by TCL[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2018, 30(1): 83-85.
- [14] 陈旭, 张玉玺, 赵春宝. 止咳平喘胶囊的薄层色谱鉴别研究[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(10): 288-289.
- [15] CHEN F H, ZENG Y M, LIU J, et al. Study of colloidal gold-immunochromatography assay for rapid detection of illegally-added sulfamethoxazole[J]. Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2014, 30(2): 145-150.
- [16] SHEN Y L, SHEN L H, SU J Y. HPLC determination of 9 chemical compositions illegally added in traditional Chinese medicine for relieving cough and asthma[J]. Drug Std Chin(中国药品标准), 2016, 17(1): 37-40.
- [17] 张涛. 平喘镇咳中成药中几种非法添加的化学药品检验分析[J]. 新疆中医药, 2015, 33(5): 61-62.
- [18] WANG M N, PENG Y, WANG X X, et al. Determination of 16 anti-allergic drugs in Chinese traditional patent medicine and health food by UPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 186-190.
- [19] ZHANG K M, XU Y B, LIU X H, et al. Rapid determination of ten chemical drugs for the treatment of cough and asthma added illegally in herbal tea by HPLC-MS/MS coupled with modified QuEChERS[J]. Sci Tech Food Indus(食品工业科技), 2018, 39(24): 294-308.
- [20] XUN X, LI Z, XUN Y, et al. Simultaneous determination of illegally added chemical drugs in cough-relieving Chinese traditional patent medicines by HPLC-MS/MS[J]. Chin Tradit Patent Med(中成药), 2019, 41(10): 2405-2409.
- [21] ZHAO J L, OU B L, ZHOU Y. Simultaneous determination of 11 chemicals added in itching agents traditional Chinese medicines by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1558-1562.
- [22] DONG Y, JIANG X, LIU J, et al. Simultaneous determination of aphrodisiac compounds illegally added into health food by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9(15): 4055-4060.

收稿日期: 2020-02-29

(本文责编: 沈倩)