

# UPLC-MS/MS 测定安神类中成药和保健食品中 8 种非法添加抗抑郁类化学成分

励炯<sup>1</sup>, 贾彦博<sup>1\*</sup>, 邱红钰<sup>1</sup>, 刘铁兵<sup>2</sup> (1.杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310022; 2.浙江科技学院, 杭州 310023)

**摘要:** 目的 建立了安神类中成药和保健食品中的 8 种非法添加抗抑郁类化学成分的超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。方法 以甲醇为提取溶剂, Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱分离, 三重四级杆质谱仪检测, MRM 模式定性、定量检测安神类中成药和保健食品中的 8 种抗抑郁类化学成分(文拉法辛、西酞普兰、帕罗西汀、阿米替林、氟西汀、三甲丙咪嗪、舍曲林和氯丙咪嗪)。结果 8 种抗抑郁类化学成分质谱检测的线性范围宽, 相关性好,  $r \geq 0.995$ ; 方法精密度 RSD 为 1.5%~4.6%; 方法回收率为 88.2%~103.2%; 定量限为 0.02~0.03 μg·L<sup>-1</sup>; 日内精密度的 RSD( $n=5$ )为 1.1%~3.8%, 日间精密度的 RSD( $n=9$ )为 1.4%~3.7%。结论 本方法专属性强, 操作简单, 快捷, 可作为安神类中成药和保健食品中 8 种抗抑郁类化学成分定量、定性的有效检测方法。

**关键词:** 中成药; 保健食品; 质谱; 超高效液相色谱; 抗抑郁

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)08-0956-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.08.012

引用本文: 励炯, 贾彦博, 邱红钰. UPLC-MS/MS 测定安神类中成药和保健食品中 8 种非法添加抗抑郁类化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(8): 956-960.

## Determination of Eight Antidepressants Illegally Added In Tranquilizing Traditional Chinese Medicine and Health Food by UPLC-MS/MS

LI Jiong<sup>1</sup>, JIA Yanbo<sup>1\*</sup>, QIU Hongyu<sup>1</sup>, LIU Tiebing<sup>2</sup> (1.Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China; 2.Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a ultra performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry(UPLC-MS/MS) method to determine 8 antidepressants in tranquilizing traditional Chinese medicine and health food. **METHODS** The analysis was performed by a UPLC-MS/MS system with Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column. Multiple-reaction monitoring (MRM) was performed to identify and quantify 8 antidepressants(venlafaxine, citalopram, paroxetine, amitriptyline, trimepramine, fluoxetine, sertraline and clomipramine), which were extracted from samples with methanol. **RESULTS** Linear calibration curves were obtained with  $r \geq 0.995$ . The precision of the method was showed by RSDs ( $n=6$ ) ranging from 1.5% to 4.6%. The recoveries were determined at three concentration levels and ranged from 88.2% to 103.2%. The ranges of LOQs were from 0.02 to 0.03 μg·L<sup>-1</sup> and the RSDs( $n=9$ ) of intra-day precision and inter-day precision were from 1.1% to 3.8% and from 1.4% to 3.7%, respectively. **CONCLUSION** The method is specific, simple and rapid to detect 8 antidepressants in tranquilizing traditional Chinese medicine and health food. **KEYWORDS:** traditional Chinese medicine; health food; MS; UPLC; antidepressive

抑郁症是一种常见的精神疾病, 其特征主要表现为自责、悲伤以及绝望等情绪异常, 且经常伴有焦虑、睡眠质量不高及身体不适等典型症状, 从而严重影响患者的工作能力和生活质量<sup>[1-5]</sup>。一些不法分子一般采用在具有缓解上述症状的中成药或者保健食品中添加抗抑郁类化学药物, 提高其产品的吸引力, 而患者在服用这些所谓的天然无不良反应的中成药和保健食品来辅助缓解症状的同时, 不知不觉服用了其添加的化学成分, 会

危害身体健康, 甚至危及生命<sup>[6]</sup>。目前检验抗抑郁类化学成分的方法主要有气相色谱法(GC)<sup>[7]</sup>、液相色谱法(HPLC)<sup>[8]</sup>、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)<sup>[9-11]</sup>、液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[12-16]</sup>。GC和HPLC样品前处理复杂, 且容易出现假阳性, 而GC-MS灵敏度较低, 因此本实验采用超高效液相色谱-串联四级杆质谱法(UPLC-MS/MS)测定安神类中成药和保健食品中 8 种非法添加抗抑郁类化学成分。

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(SP201709)

作者简介: 励炯, 男, 硕士生, 副主任技师 Tel: (0571)85460529  
高级工程师 Tel: (0571)85460582 E-mail: 82998580@qq.com

E-mail: jokelee2@126.com \*通信作者: 贾彦博, 女, 博士生,

## 1 材料

### 1.1 仪器

美国 Agilent 公司高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪(美国 Agilent 公司), 配 Agilent 1290 高效液相色谱仪、Agilent 6425 串联四级杆质谱仪; Mili-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

### 1.2 试剂

氟西汀(批号: 100513-201602; 含量: 99.3%)、帕罗西汀(批号: 100357-201303; 含量: 97.4%)、西酞普兰(批号: 100790-200501; 含量: 100%)、阿米替林(批号: 100518-201303; 含量: 99.7%)均购于中国食品药品检定研究院; 舍曲林(批号: Y0000828; 含量: 100%)、文拉法辛(批号: Y0000587; 含量: 100%)、氯丙咪嗪(批号: C2360000; 含量: 100%)、三甲丙咪嗪(批号: T2500000; 含量: 100%)均购于 European Pharmacopoeia Reference Standard; 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯, 均购于德国 Merck 公司。

### 1.3 样品

纽斯葆牌褪黑素片(广州健之嘉健康食品有限公司, 批号: HC341); 静心助眠口服液(深圳太太药业有限公司, 批号: TDH0319); 睡好片(太极集团西南药业股份有限公司, 批号: 16010002); 脑白金胶囊(无锡健特药业有限公司, 批号: 160820); 安神补脑片(长春海外制药集团有限公司, 批号: 20160701); 枣仁安神胶囊(贵州同济堂制药有限公司, 批号: 150305)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: A(0.1%甲酸水溶液): B(甲醇)=65:35。柱温: 40 °C; 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量: 1 μL; 运行时间: 7 min。

### 2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI), 正离子检测方式(ESI+); 多反应检测(MRM 模式); 干燥气温度: 200 °C; 干燥气流速: 14 L·min<sup>-1</sup>; 毛细管电压: 3.5 kV; 毛细管出口电压: 380 V; 校准方法: 质量轴自动调谐校正; MRM 进行分段扫描: 0~1.6 min, 文拉法辛; 1.6~2.3 min, 西酞普兰; 2.3~3.4 min, 帕罗西汀; 3.4~4.3 min, 阿米替林; 4.3~5.1 min, 氟西汀和三甲丙咪嗪; 5.1~5.9 min, 舍曲林; 5.9~7.0 min, 氯丙咪嗪; 其他质谱分析参数见表 1。

表 1 8 种抗抑郁药物质谱分析参数

Tab. 1 MS parameters for 8 antidepressants

药物组分	离子对/ <i>m/z</i>	碰撞能量/eV
文拉法辛	278.3>121.1 <sup>1)</sup>	25
	278.3>215.2	10
西酞普兰	325.3>109.3 <sup>1)</sup>	25
	325.3>262.2	20
帕罗西汀	330.3>70.2 <sup>1)</sup>	30
	330.3>192.1	20
阿米替林	278.1>233.2 <sup>1)</sup>	15
	278.1>91.0	30
氟西汀	310.2>44.3 <sup>1)</sup>	10
	310.2>148.0	5
三甲丙咪嗪	295.1>100.2 <sup>1)</sup>	20
	295.1>208.2	25
舍曲林	306.2>275.1 <sup>1)</sup>	10
	306.2>158.9	25
氯丙咪嗪	315.3>86.3 <sup>1)</sup>	20
	315.3>58.2	30

注: <sup>1)</sup>定量离子对。

Note: <sup>1)</sup>The ion pair for quantitation.

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精密取氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、文拉法辛、阿米替林、氯丙咪嗪、三甲丙咪嗪的对照品各约 10 mg, 分别用甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 作为对照品储备溶液(浓度约为 1 000 mg·L<sup>-1</sup>)。分别精密吸取 4 种对照品储备溶液适当体积于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释定容, 配制成 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 μg·L<sup>-1</sup>的混合对照品系列溶液。

### 2.4 供试品溶液的制备

取本品 5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 25 mL, 超声 30 min(100 W, 56 kHz), 冷却, 加流动相稀释至刻度, 0.2 μm 滤膜过滤。

### 2.5 质谱检测

取一定浓度的混合对照品溶液(8 种抗抑郁类化学成分浓度为 5 μg·L<sup>-1</sup>), 按“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进行分析, 8 种抗抑郁类化学成分的 MRM 总离子图以及定量离子通道见图 1。

### 2.6 线性关系、检测限和定量限的考察

取“2.3”项下对照品系列溶液, 分别进样 1 μL, 以定量监测离子对的离子流中谱峰峰面积(*Y*)为纵坐标, 对照品浓度(*X*, μg·L<sup>-1</sup>)为横坐标进行线性关系考察, 结果见表 2。

取空白样品(检测结果为阴性)5 g, 加入适当稀释的混合对照品溶液, 同供试品溶液制备、测定, 以信噪比为 3 和 10 分别作为 8 种抗抑郁类化学成分的检测限(limits of detection, LOD)与定量限(limits of quantification, LOQ), 结果见表 2。

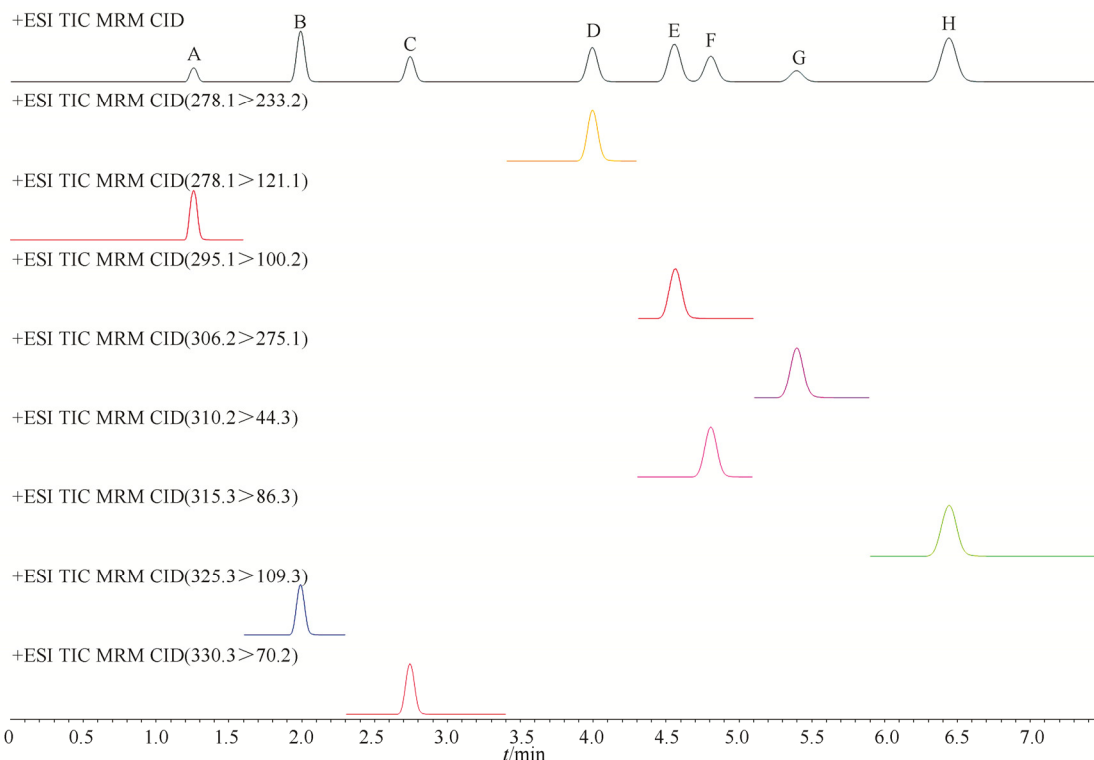


图 1 8 种抗抑郁类化学成分的 TIC 总离子图和 MRM 离子图

A-文拉法辛; B-西酞普兰; C-帕罗西汀; D-阿米替林; E-三甲丙咪嗪; F-氟西汀; G-舍曲林; H-氯丙咪嗪。

Fig. 1 TIC and MRM ion graphs of 8 antidepressants

A-venlafaxine; B-citalopram; C-paroxetine; D-amitriptyline; E-trimepramine; F-fluoxetine; G-sertraline; H-clomipramine.

表 2 8 种抗抑郁类化学成分的线性关系、检测限、定量限和重复性

Tab. 2 Linear regression results, LODs, LOQs and reproducibility of 8 antidepressants

药物组分	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回归方程	$r$	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD( $n=6$ )/%
文拉法辛	1.00~50.0	$Y=711\ 065X+187\ 615$	0.998 1	0.008	0.03	5.2
西酞普兰	1.00~50.0	$Y=1711\ 493X+2\ 190\ 318$	0.996 2	0.005	0.02	2.4
帕罗西汀	1.00~50.0	$Y=121\ 0716X-51\ 981$	0.999 6	0.006	0.02	2.9
阿米替林	1.00~50.0	$Y=1710\ 494X+239\ 387$	0.998 7	0.006	0.02	4.2
氟西汀	1.00~50.0	$Y=2\ 392\ 099X+1\ 079\ 058$	0.996 9	0.008	0.03	1.7
三甲丙咪嗪	1.00~50.0	$Y=3\ 077\ 341X+3\ 437\ 085$	0.995 9	0.006	0.02	1.5
舍曲林	1.00~50.0	$Y=749\ 185X-103\ 519$	0.999 9	0.012	0.03	4.6
氯丙咪嗪	1.00~50.0	$Y=3\ 278\ 544X+1\ 663\ 116$	0.995 5	0.008	0.03	3.3

## 2.7 重复性试验

取空白样品(检测结果为阴性),加入适当稀释的混合对照品溶液,8种抗抑郁类化学成分在样品中的最终浓度为 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,按供试品溶液制备方法平行制备6份,测定这8种抗抑郁类化学成分的含量,结果见表2。

## 2.8 方法回收率

取空白样品(检测结果为阴性)约5g,分别加入适量的混合对照品溶液,供试品溶液中最终加标浓度成低、中、高3个浓度水平(含8种抗抑郁

类化学成分分别约为2, 5,  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),每个浓度水平平行3份,按供试品溶液制备方法制备,检测含量,计算回收率,结果见表3。

## 2.9 日内和日间精密度

取一定浓度的混合对照品溶液(含8种抗抑郁类化学成分分别约为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )1d内5次重复进样峰面积的RSD作为日内精密度,取前述的混合对照品溶液3d重复进样(每天重复进样3次)峰面积的RSD作为日间精密度,考察方法的稳定性。结果见表3。

**表 3** 8 种抗抑郁类化学成分的回收率、日内与日间精密度  
**Tab. 3** Recoveries, intra-day and inter-day precision of 8 antidepressants

药物组分	添加水平/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	平均回收率/%	RSD/ %	日内精密 度 RSD/%	日间精密 度 RSD/%
文拉法辛	2	92.7	4.7	1.6	2.9
	5	90.5	3.2		
	20	97.2	6.7		
西酞普兰	2	95.1	1.9	1.1	1.4
	5	96.0	3.5		
	20	95.4	6.8		
帕罗西汀	2	89.7	4.1	2.3	3.2
	5	92.6	3.9		
	20	97.6	2.0		
阿米替林	2	91.4	6.5	1.9	3.7
	5	98.3	3.8		
	20	101.4	4.4		
氟西汀	2	94.8	7.5	2.2	1.6
	5	98.7	1.7		
	20	104.5	6.8		
三甲丙咪嗪	2	94.2	3.4	3.8	2.4
	5	100.7	5.8		
	20	99.1	2.5		
舍曲林	2	88.2	1.5	3.0	3.5
	5	95.4	5.1		
	20	98.3	2.6		
氯丙咪嗪	2	94.6	2.7	1.7	2.5
	5	92.9	6.1		
	20	103.2	3.0		

## 2.10 样品定性定量检测

本方法采用 MRM 模式检测, 每一成分都有 2 个检测通道, 每一通道对应一个监测离子对。样品检测时, 若某一成分对应的多个通道中均出现与对照品保留时间一致的谱峰, 并且这几个子离子的相对丰度与对照品一致, 则可判定样品中检出该成分。各成分的丰度数据均符合欧盟 2002/657/EC 法规关于定性判断时相对离子丰度得允许偏差范围, 可判断这些子离子的相对丰度一致, 同时根据定量监测离子对的离子流图中谱峰峰面积外标法计算样品中非法添加的 8 种抗抑郁类化学成分的含量。

利用本方法分别对市售的纽斯葆牌褪黑素片、静心助眠口服液、睡好片、脑白金胶囊、安神补脑片、枣仁安神胶囊进行检测, 结果均未检出 8 种抗抑郁类化学成分。

## 3 讨论

### 3.1 质谱条件优化

分别取浓度为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  8 种抗抑郁类化学成分的对照品溶液用于质谱条件优化。本实验采用电喷雾源(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, 结果均在  $\text{ESI}^+$  模式下 8 种化合物响应最好, 故本方法采用正离子模式进行检测。在  $\text{ESI}^+$  模式下进行母离子扫描, 扫描范围为  $m/z$  200~350, 得到  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰, 并适当调节相应的毛细管电压, 使得各母离子一级扫描时相应最高。确定母离子及其毛细管电压, 继续进行子离子扫描, 以得到最佳的二级质谱条件, 经仪器自带的二级质谱参数自动优化程序, 得到 8 种抗抑郁类化学成分的二级质谱优化参数。最终将优化后得到的定量定性离子对、碰撞能量作为 8 种抗抑郁类化学成分的 MRM 扫描参数。

### 3.2 色谱条件优化

分别考察了以下 3 组流动相在上述流动相比比例条件下的色谱行为: ①A 为水, B 为甲醇; ②A 为 1% 甲酸水溶液, B 为甲醇; ③A 为 1% 甲酸水溶液, B 为乙腈。实验结果显示: 流动相①和③的目标峰灵敏度明显偏低, 说明在以一定比例水以及乙腈为流动相的条件下 8 种抗抑郁类化学成分的离子化不够完全, 而流动相②目标峰峰型较好, 目标峰灵敏度明显比流动相①和③条件下高, 所以最终将流动相②作为检测 8 种抗抑郁类化学成分的最佳选择。

### 3.3 方法的优缺点

建立的安神类中成药及保健食品中非法添加 8 种抗抑郁类化学成分的检测方法, 采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱的 MRM 模式检测, 可同时进行定性、定量分析, 简便、快速, 灵敏度高, 可满足实际样品检测的需要, 且抗干扰能力强, 可为安神类中成药及保健食品非法添加抗抑郁类药物的质量监督提供可靠的检测方法。

## REFERENCES

- [1] WANG T T, WANG C K, HAN F. Pathological mechanism and drug therapy for post stroke depression [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2017, 34(11): 1628-1634.
- [2] GAO J B, LI Y D, YANG S Z, et al. Impact of Yixinshu capsules on quality of life, anxiety and depression of coronary heart disease patients after PCI [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2017, 26(10): 56-59.
- [3] ZHOU X L, LIN Y, ZHENG G Q. Therapeutic progress of mental diseases (second): depression [J]. *Her Med*(医药导报), 2017, 36(10): 1137-1142.
- [4] HUANG X W, HUANG Q T, PAN J Y. Clinical application of antidepressants in the treatment of insomnia symptoms [J]. *Chin J Contemp Neurol Neurosurg*(中国现代神经疾病杂志), 2013, 13(11): 971-975.
- [5] HOLDEN C. Global survey examines impact of depression [J]. *Science*, 2000, 288(5463): 39-40.

- [6] LI Y X, WANG H H. Efficacy of antidepressants in the treatment of patients with functional dyspepsia: a meta-analysis [J]. Chin J Drug Eval(中国药物研究), 2012, 29(1): 35-40.
- [7] GAO L W, MA X T, YU L X, et al. Determination of amitriptyline in rat blood and urine by gas chromatography [J]. Chin J Forensic Med(中国法医学杂志), 2011, 26(2): 127-129.
- [8] FERNÁNDEZ P, GONZÁLEZ C, PENA M T, et al. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples [J]. Anal Chim Acta, 2013(767): 88-96.
- [9] CARTISER N, BÉVALOT F, LE MEUR C, et al. Gas chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues, with application to animal and human samples [J]. J Chromatogr B, 2011, 879(27): 2909-2918.
- [10] VARDAKOU I, DONA A, PISTOS C, et al. Validated GC/MS method for the simultaneous determination of clozapine and norclozapine in human plasma. Application in psychiatric patients under clozapine treatment [J]. J Chromatogr B, 2010, 878(25): 2327-2332.
- [11] WU H Q, JIN Y C, CAI M Z, et al. Simultaneous determination of 10 mental drugs by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2007, 35(4): 500-504.
- [12] GUO J Q, SHI Y T, WANG H J, et al. Simultaneous determination of 5 antidepressants in blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2014, 42(5): 701-705.
- [13] LIU G R, QIAO S, YU YH Y, et al. Simultaneous determination of nine antidepressants in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2016, 32(23): 2191-2194.
- [14] GOU X L, GAO X, HU G H, et al. Simultaneous determination of nine antidepressants in traditional Chinese medicines and health food by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2014, 32(8): 822-826.
- [15] MING D S, HEATHCOTE J. A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine [J]. J Chromatogr B, 2011, 879(5/6): 421-428.
- [16] CHAMBERS E E, WOODCOCK M J, WHEATON J P, et al. Systematic development of an UPLC-MS/MS method for the determination of tricyclic antidepressants in human urine [J]. J Pharm Biomed, 2014(88): 660-665.

收稿日期: 2018-06-08

(本文责编: 曹粤锋)