

UHPLC-Q-TOF-MS 快速检测中成药中 4 个违法掺入的化学成分

杨敏智¹, 程栋², 申兰慧¹(1.无锡市药品安全检验检测中心, 江苏 无锡 214028; 2.江南大学药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 目的 建立 UHPLC-Q-TOF-MS 快速检测中成药中违法掺入雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠的方法。方法 采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)为流动相, 梯度洗脱; 离子源为 ESI 模式, 正离子检测; 利用保留时间, 一级、二级质谱碎片信息并结合数据库, 对 4 种违法掺入的化学成分进行定性与定量测定。结果 百草糖胶囊中检出雷尼替丁、苯乙双胍; 孟氏咳嗽灵胶囊中检出雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠成分。结论 该方法准确可靠, 可高效、快速检测中成药中违法掺入的雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠。

关键词: UHPLC-Q-TOF-MS; 违法掺入; 雷尼替丁; 苯乙双胍; 吡罗昔康; 双氯芬酸钠

中图分类号: R917 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2019)20-2543-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.011

引用本文: 杨敏智, 程栋, 申兰慧, 等. UHPLC-Q-TOF-MS 快速检测中成药中 4 个违法掺入的化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2543-2547.

Rapidly Detection of Four Chemical Substances Illegally Added in Traditional Chinese Medicine by UHPLC-Q-TOF-MS

YANG Minzhi¹, CHENG Dong², SHEN Lanhui¹(1.Wuxi Institute for Drug Control, Wuxi 214028, China; 2.School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for rapidly detection of ranitidine, phenformin, piroxicam and diclofenac sodium illegally added in Chinese patent medicine by UHPLC-Q-TOF-MS. **METHODS** The Agilent ZORBAX SB C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) column was used, with the mobile phase of methanol-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) by gradient elution. Electrospray ionization(ESI) source was used in a positive ion mode, the qualitative and quantitative analyses of the four illegally added substances were combined with retention time, mass spectra, tandem mass spectra and database. **RESULTS** Ranitidine and phenformin were detected illegally added in Baicaotang capsules. Ranitidine, piroxicam and diclofenac sodium were detected illegally added in Mengshi Kechuanling capsules. **CONCLUSION** This method is accurate, efficient, rapid and can be used to detect the ranitidine, phenformin, piroxicam and diclofenac sodium illegally added in Chinese patent medicine.

KEYWORDS: UHPLC-Q-TOF-MS; illegally added; ranitidine; phenformin; piroxicam; diclofenac sodium

中成药中添加相似或相同治疗功效的化学物质和中药材中添加化工染料是中药掺杂掺假的主要手段。补充检验方法是认定药品有掺杂掺假嫌疑的技术依据^[1]。笔者根据国家药品监督管理局药品检验补充方法检验和检验项目批准件^[2], 并且查阅相关文献^[3-5], 发现止咳平喘类的中药制剂中一般违法掺入马来酸氯苯那敏、土霉素等; 抗风湿类中药制剂中违法掺入吡罗昔康、醋酸泼尼松等; 降糖类中药制剂中违法掺入苯乙双胍、格列本脲等。但在哮喘类和降糖类中药制剂中违法掺入雷尼替丁化学物质, 鲜有文献报道。雷尼替丁属于组胺 H₂ 受体拮抗剂, 药效作用时间比较长, 可降低胃酸与胃蛋白的分泌与活性, 对溃疡疾病的治疗效果较

好, 但会出现过敏性哮喘^[6-8]。同时, 苯乙双胍会对人体造成严重的影响, 被国家列为禁止生产与销售的药品。双氯芬酸钠、吡罗昔康等化学物质长期服用损害人体健康^[7-11]。笔者结合日常检验工作经验, 建立 UHPLC-Q-TOF-MS 法, 能够准确、快速、高效地同时检测中药制剂中是否违法掺入雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠等化学物质。

1 仪器与试剂

Agilent 1290 UHPLC-6530A Q-TOF-MS 仪(超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用仪, 美国 Agilent 公司), 配有系统: 柱温箱、大气压离子源 ESI、Mass Hunter 工作站等; XSE205 电子天平(梅特勒公司); KH-300E 超声仪(昆山禾创超声仪器有

基金项目: 无锡市科技发展资金项目(WX18IVJN714); 江苏省食品药品监督管理局科研项目(20170215)

作者简介: 杨敏智, 女, 主任药师 Tel: (0510)66112798 E-mail: 1056773571@qq.com

限公司); Millipore 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

对照品盐酸雷尼替丁(批号: 100163-201006; 纯度: 99.8%)、吡罗昔康(批号: 100177-200603; 纯度: 99.8%)、双氯芬酸钠(批号: 100334-200302; 纯度: 100%)和盐酸苯乙双胍(批号: 100922-201001; 纯度: 97%)购自中国食品药品检定研究院。百草糖(北京某医药科技有限公司, 批号: 20160411; 规格: 每粒 0.14 g); 孟氏咳喘灵胶囊(河南某咳喘中医研究所, 批号: 20151218; 规格: 每粒 0.4 g)均来自市场抽验样品, 其中以孟氏咳喘灵胶囊作为方法学试验样品。甲醇为质谱级, 甲酸、醋酸铵均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵(含 0.1% 甲酸)溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 30%→70% A; 5~7 min, 70%→85% A; 7~9 min, 85%→30% A; 9~10 min, 30% A。流速 0.4 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 进样量 3 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化正离子检测方式(ESI⁺), 质荷比范围: *m/z* 50~1 000; 干燥气温度: 350 °C; 气体流速 11 L·min⁻¹; 雾化器压力 50 psi; 碎裂电压 60 V; 锥孔电压 40 V; 八级杆上电压 OCT1 RFVpp 750 V。采用全扫描一级质谱、选择离子二级扫描质谱检测方式。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品储备溶液的制备 分别精密称取盐酸雷尼替丁对照品 10.92 mg、盐酸苯乙双胍对照品 10.29 mg、吡罗昔康对照品 20.19 mg、双氯芬酸钠对照品 50.43 mg 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密量取对照品储备液 5 mL 置 25 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 作为混合对照品溶液, 作为方法学考察溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品 20 粒, 内容物混匀, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇约 50 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 35 kHz)15 min, 放冷至室温, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 取上清液用 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。滤液稀释一定倍数后用 UHPLC-MS、UHPLC-MS/MS 分析。

3 结果

3.1 质谱条件优化

首先经过调谐和校正, 使仪器达到最佳状态。选择扩展动态范围模式(2 GHz)进行采集, 优化锥孔电压、干燥气流速、毛细管电压等质谱参数。使用正离子模式对雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠对照品进行一级、二级质谱分析, 结果见表 1。根据化合物碎裂离子推测化合物的质谱裂解规律, 结果见图 1。

表 1 准分子离子及特征碎片离子

Tab. 1 Parent ions and daughter ions

化学成分	保留时间/min	准分子离子 [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	主要碎片离子(<i>m/z</i>)	碰撞能/eV
雷尼替丁	1.16	315.149 3	176.05; 130.06*; 98.08	18
苯乙双胍	1.98	206.140 3	60.06*; 105.07	20
吡罗昔康	4.75	332.070 6	95.06*; 121.04	23
双氯芬酸钠	7.13	296.024 5	215.05*; 250.02	15

注: *-定量离子。

Note: *-quantitative ion.

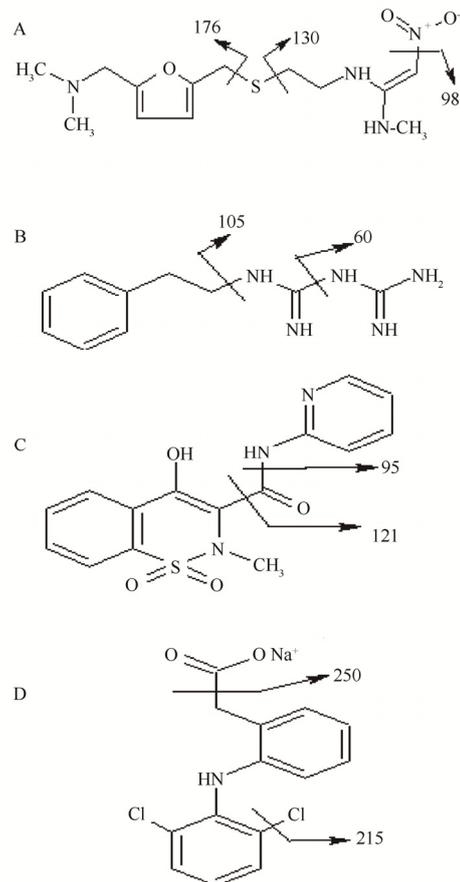


图 1 雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠的质谱预测裂解规律

A-雷尼替丁; B-苯乙双胍; C-吡罗昔康; D-双氯芬酸钠。

Fig. 1 Fragmentation mechanism of ranitidine, phenformin, piroxicam and diclofenac sodium

A-ranitidine; B-phenformin; C-piroxicam; D-diclofenac sodium.

3.2 样品的定性检测

样品稀释后按照“2.1”“2.2”项下条件进行UHPLC、MS、MS/MS分析。结果显示，百草糖中检测出雷尼替丁和苯乙双胍；孟氏咳喘灵胶囊检测出雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠。与对照品相比较，保留时间(图2)和二级质谱(图3)一致，确证百草糖违法掺入雷尼替丁、苯乙双胍；孟氏咳喘灵胶囊违法掺入雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠。

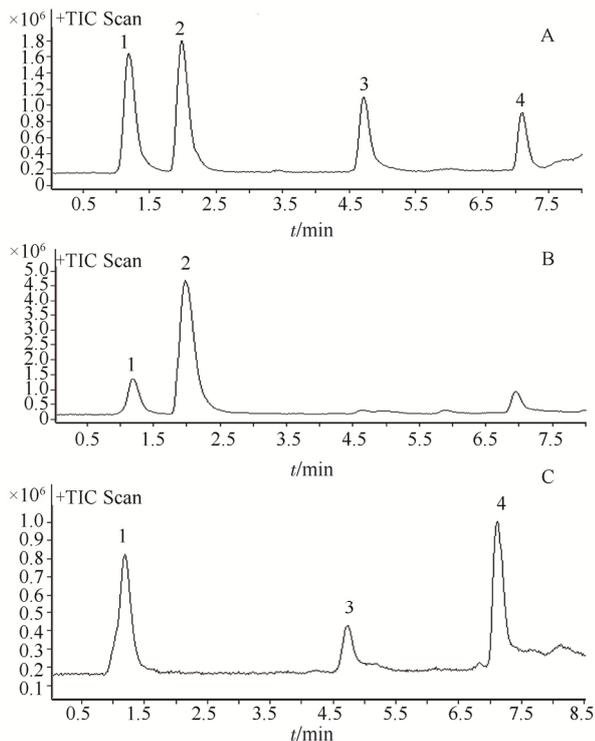


图2 混合对照品和供试品总离子流图
1-雷尼替丁；2-苯乙双胍；3-吡罗昔康；4-双氯芬酸钠；A-混合对照品；B-百草糖；C-孟氏咳喘灵胶囊。
Fig. 2 TIC of mixed reference substance and test sample
1-ranitidine; 2-phenformin; 3-piroxicam; 4-diclofenac sodium; A-mixed references; B-Baicao Tang; C-Mengshi Kechuanling capsules.

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液0.5, 1, 3, 5, 9 mL置于25 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，按“2.1”和“2.2”项下条件进行测定，以峰面积为纵坐标，溶液的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标绘制标准曲线，计算回归方程，见表2。

3.3.2 重复性试验 精密称取“孟氏咳喘灵胶囊”6份，按照“2.3.3”项下方法制备供试液，按照“2.1”和“2.2”项下条件进样，测定其峰面积，以外标法计算雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠的含量，其RSD分别为2.91%，3.31%，3.92%($n=6$)。表明该方法的重复性较好。

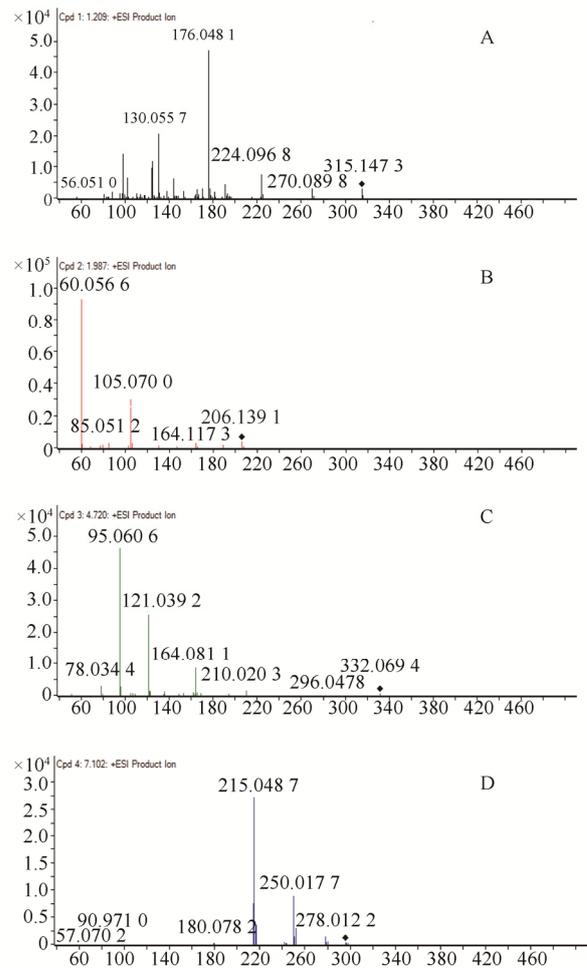


图3 混合对照品二级质谱图
A-雷尼替丁；B-苯乙双胍；C-吡罗昔康；D-双氯芬酸钠。
Fig. 3 Full MS2 spectra of mixed reference substance
A-ranitidine; B-phenformin; C-piroxicam; D-diclofenac sodium.

3.3.3 仪器精密度试验 取“2.3.2”项下混合对照品溶液连续进样6次，计算雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠的峰面积RSD分别为2.80%，2.62%，2.85%，2.95%($n=6$)。表示仪器精密度良好。

3.3.4 稳定性试验 取供试品溶液，分别在制备后0, 2, 4, 8, 12 h进样测定，测定雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠的峰面积，其峰面积RSD分别为0.93%，1.03%，1.30%($n=5$)。表明样品的稳定性较好。

3.3.5 检出限与定量限 因不同化学成分的检出限除取决于其本身的性质，还与离子化效率有很大相关性，取“2.3.2”项下对照品溶液逐级稀释后测定，分别计算雷尼替丁、苯乙双胍、吡罗昔康、双氯芬酸钠的检出限(以 $S/N=3$)和定量限(以 $S/N=10$)。结果见表2。

表 2 4 种化学物质的线性、范围及检出限

Tab. 2 Linearity, ranges and detection limit of the four components

组分	标准曲线	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
雷尼替丁	$Y=998\ 658X+339\ 745$	0.999 2	2.184~39.312	0.054 1	0.109
苯乙双胍	$Y=838\ 790X+2\times 10^6$	0.999 6	10.290~37.044	0.051 1	0.103
吡罗昔康	$Y=332\ 046X+756\ 037$	0.999 5	4.038~72.684	0.081 1	0.202
双氯芬酸钠	$Y=26\ 360X+184\ 997$	0.999 7	10.086~181.548	0.834 0	1.680

3.3.6 回收率试验 精密称取样品(孟氏哮喘灵胶囊)0.1 g, 分别加入 80%, 100%, 120%对照品各 3 份。按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液。按“2.1”和“2.2”项下条件进行检测, 记录峰面积, 按照外标法计算。计算雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠、盐酸苯乙双胍的平均回收率分别为 99.8%, 98.5%, 102.3%, 98.2%, RSD 分别为 2.78%, 2.83%, 2.63%, 2.32%($n=9$)。结果表明, 雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠、苯乙双胍的回收率良好。

3.4 样品中非法添加化学物质的定量测定

取百草糖和孟氏哮喘灵胶囊样品, 按照“2.3.2”项下分别制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 按外标法计算, 测定其 4 种化学成分的含量。每个样品各测定 3 份, 测定结果见表 3。

表 3 中成药中非法添加化学物质的含量测定结果($n=3$)

Tab. 3 Determination results of chemical substances illegally added in traditional Chinese medicines ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

化学组分含量	百草糖	孟氏哮喘灵胶囊
雷尼替丁	2.26	0.85
苯乙双胍	13.79	-
吡罗昔康	-	1.05
双氯芬酸钠	-	15.12

4 讨论

4.1 色谱柱的选择

笔者比较了 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)和 Thermo BDS Hypensil C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm), 选择试验分离效果好、出峰时间短、组分子响应较高的色谱柱, 最终确认采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 柱。

4.2 流动相的选择

笔者考察了乙腈-0.1%甲酸、甲醇-水、乙腈-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵、甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(含

0.1%甲酸)等。通过分析试验结果的峰形, 发现使用甲醇的效果比乙腈好, 因为甲醇中含有质子, 其有利于样品物质的离子化。乙酸铵盐溶液缓冲体系有利于物质在相对稳定的 pH 条件下离子化, 同时它具有挥发性, 对仪器损害程度较小。在乙酸铵盐溶液中加入适量甲酸, 其有助于提高物质质谱信号响应。最终选择流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹ 的乙酸铵(含 0.1%甲酸)溶液。

5 结论

本实验基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术, 只需 11 min 就可以快速、准确鉴定百草糖中违法掺入雷尼替丁与苯乙双胍; 孟氏哮喘灵胶囊中违法掺入雷尼替丁、吡罗昔康、双氯芬酸钠成分。依据百草糖的说明书, 此药用法用量为每日 2 次, 一次 1~2 粒。按最大量算, 则患者每日服用雷尼替丁 4.52 mg、苯乙双胍 27.58 mg; 孟氏哮喘灵胶囊的用法用量规定每日 2 次, 一次 1~2 粒, 通过计算, 患者每日服用雷尼替丁 1.7 mg、吡罗昔康 2.10 mg、双氯芬酸钠 30.24 mg。此类违法掺入的化学物质未经过临床验证, 患者在不知情的情况下, 长期服用此类药物, 会损害人体健康。本方法适用于中成药中违法掺入雷尼替丁和降糖类药物的测定, 方法简单、高效、快速。并且可为科研工作人员与药物分析人员提供一些参考价值。

REFERENCES

- [1] HUANG B B, XU M Z, YANG Q Y, et al. Review of the approved supplementary testing methods and items on identifying adulterated chemical substances in traditional Chinese medicine preparations and herbal medicines [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(9): 1701-1708.
- [2] 国家药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件[S]. 2009031, 2009025, 2009029.
- [3] CHEN X H, QIN J, SU J, et al. Determination of 8 kinds of chemical medicines illegally added in traditional Chinese medicines for relieving cough and asthma by UPLC-Q-TOF [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(4): 64-67.

- [4] QIU Y J, CAO W L, FANG L. Determination of 8 illegal added chemical composition in the slimming health food by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药 学), 2017, 34(10): 1441-1446.
- [5] LUO T S, SHI G L, HU J Y, et al. Detection of 10 anti-rheumatic constituents illegally added in Chinese traditional medicine and health products by UPLC-MS/MS [J]. Drugs Clin(药物评价研究), 2017, 40(11): 1576-1580.
- [6] PENG Y W, SHEN L H, WANG L, et al. Detection of oxytetracycline, chlorpheniramine maleate and prednisone acetate in two Chinese traditional patent medicines by UPLC/Q-TOF-MS [J]. Chin Tradi Pat Med(中成药), 2015, 37(9): 1959-1964.
- [7] ZOU Y H, ZHU G L. Determination illegal added diclofenac in slimming health care products by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药 学), 2016, 33(8): 1048-1051.
- [8] KISZKIEL I, STARCZEWSKA B, LEŚNIEWSKA B, et al. Extraction of ranitidine and nizatidine with using imidazolium ionic liquids prior spectrophotometric and chromatographic detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 106(3): 85-91.
- [9] 李桂花, 焦森森. 雷尼替丁联合特色护理治疗胃溃疡的疗效分析[J]. 国际护理学杂志, 2016, 35(19): 2733-2735.
- [10] YU J, ZHANG L, XU G B. Determination of nizatidine, cimetidine, famotidine, ranitidine hydrochloride and lafutidine illegally mixed into ShiliuJianwei capsules [J] Drug Stand Chin(中国药品标准), 2012, 13(2): 114-117.
- [11] SHEN L H, PENG Y W, CHEN G Q. Rapid detection of phenformin hydrochloride, glibenclamide and pioglitazone hydrochloride illegally mixed in traditional chinese medicinal preparation for antidiabetics by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药 学), 2016, 33(9): 1160-1165.

收稿日期: 2018-11-12

(本文责编: 李艳芳)

中国现代应用药 学
http://www.chinjmap.com