

好, 所以选定加热回流为提取方法, 比较加热回流 30, 60, 90, 120 min 的提取效果, 发现提取效果与回流时间基本没影响, 为了节省时间, 所以选定提取时间为 30 min。

REFERENCES

- [1] SHU X, YE Y J, et al. Determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside in Yiganfuzheng capsule [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2013, 5(19): 1652-1653.
- [2] PAN Li m, XU X y. Determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside in *Polygonum multiflorum* Thumb. and Jiangzhongmai Tablet by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2003, 25(12): 974-976.
- [3] LU Y R, DENG Q H, CHE Q F, et al. Quantitative determination of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glucoside in *Polygonum Multiflorum* and its preparation [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 1998, 21(6): 31-33.
- [4] LIU Y F, YANG X J, TIAN X, et al. HPLC simultaneous determination of two active components in the roots of *Polygala tenuifolia* Willd [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 5(26): 716-719.
- [5] YANG G H, SUN X F. Studies on quantitative determination of senegenin in Radix Polygalae by RP-HPLC [J]. Chin Pharm Anal(药物分析杂志), 2001, 21(4): 260-263, 309.
- [6] LI J, DONG X B, JIANG Y, et al. HPLC determination of total saponins in Radix Polygalae [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(9): 1329-1332.
- [7] China Food and Drug Administration. China drug standard WS3-752(Z-209)-2006(Z). 2006: 71-72.

收稿日期: 2014-03-06

中药洗剂中非法添加 16 种肾上腺皮质激素的 LC-MS 检测方法研究

潘军(滨州市食品药品检验检测中心, 山东 滨州 256618)

摘要: 目的 建立检查中药洗剂中非法添加肾上腺皮质激素的 LC-MS 方法。方法 采用液相色谱-三重四极杆质谱联用仪同时检测中药洗剂中非法添加 16 种肾上腺皮质激素类化学成分。进行定性和定量分析, 并进行方法学验证。结果 16 种常被用于非法添加的肾上腺皮质激素类药物在色谱柱中得到了良好的分离, 再配合产物离子质谱图进行定性, 利用多反应监测模式的峰面积进行定量计算, 专属性强, 精密度良好, 回收率和线性关系满足分析要求。结论 该方法简便、准确, 可以用于中药洗剂中非法添加肾上腺皮质激素类化学成分的实验室筛查。

关键词: 中药洗剂; 肾上腺皮质激素; 液质联用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)11-1391-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.024

Study on LC-MS Method for Detection of 16 Kinds of Adrenal Cortical Hormone Illegally Added in Chinese Medicinal Lotions

PAN Jun(Binzhou Institute for Drug Control, Binzhou 256618, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a specialized detecting method for the adrenal cortical hormone added illegally in Chinese medicinal lotion. **METHODS** Used LC-MS/MS to simultaneous detect 16 components added illegally in Chinese medicinal lotion. Though qualitative and quantitative analysis, validated a methodology. **RESULTS** Each of the 16 chemical components separated in chromatographic column, at the same time, used the two grade mass spectrum for qualitative and the peak area of multiple reaction monitoring mode for quantitative calculation, it's recovery and linear relationship met the demand of screening. **CONCLUSION** This method is simple and accurate to detect chemical components of the adrenal cortical hormone added illegally in Chinese medicinal lotion.

KEY WORDS: Chinese medicinal lotion; adrenal cortical hormone; LC-MS

肾上腺皮质激素是一类具有甾体基本母核的甾体化合物, 它们与糖、脂肪、蛋白质的代谢和生长发育等有密切关系^[1]。肾上腺皮质激素类药

物具有抑制免疫应答、抗炎、抗休克等作用。随着中成药制剂种类的增多, 中成药制剂在皮肤病和关节炎的治疗中得到了广泛的应用。洗剂是治

疗关节炎和皮肤病的常用剂型，配制工艺简单，在一些诊所配制的“老中医秘方”中尤为多见。肾上腺皮质激素类药物多数具有明显的抗炎作用，又可透过表皮到达皮下血管发挥作用。在商业利益的驱使下，为使制剂具有明显、快速的疗效，近年来出现了一些在中成药制剂中添加肾上腺皮质激素类药物，而在药品说明书中却未注明。肾上腺皮质激素本身具有影响水、盐代谢的不良反应^[2]，与其他药物合用还会出现许多其他的不良反应^[3]，长期使用会对患者身体健康造成损害^[4]。

本实验对 16 种常见的可能用于非法添加的肾上腺皮质激素进行研究，建立可同时检测 16 种肾上腺皮质激素类非法添加物的快速筛查方法。采用液相色谱-三重四极杆质谱联用技术对被检测成分进行定性、定量分析，灵敏度高，专属性强，适用于实验室工作人员对市场上的中药洗剂进行筛查。

1 仪器与试剂

SHIMADZU LC-MS/MS 8030 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(ESI 离子源)。茚蒲洗液(甘肃益尔药业股份有限公司，规格：100 mL，批号：131008)；乙腈(美国 TEDIA 公司，色谱纯，批号：1203366)；重蒸水(自制)；甲酸(天津市博迪化工有限公司，分析纯，批号：121001)；对照品均购自于中国食品药品检定研究院，含量：100%，批号见表 1。

表 1 通常用于非法添加的肾上腺皮质激素类药物
Tab. 1 The adrenal cortical hormone drugs usually added illegally

编号	名称	批号	化学式	CAS 号
1	地塞米松	0129-9702	C ₂₂ H ₂₉ FO	50-02-2
2	醋酸地塞米松	100122-200805	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	1177-87-3
3	可的松	101128-201001	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	53-06-5
4	氢化可的松	100152-200206	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	50-23-7
5	醋酸可的松	0123-9302	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	50-04-4
6	醋酸氢化可的松	100013-0106	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	50-03-3
7	醋酸氟氢可的松	009-8702	C ₂₃ H ₃₁ FO ₆	514-36-3
8	泼尼松	100199-199401	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	53-03-2
9	醋酸泼尼松	012-9204	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	125-10-0
10	泼尼松龙	0153-9302	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	50-24-8
11	醋酸泼尼松龙	100124-200303	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	52-21-1
12	醋酸氟轻松	10010-0206	C ₂₆ H ₃₂ F ₂ O ₇	356-12-7
13	倍他米松	10118-9502	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	378-44-9
14	曲安西龙	100333-200201	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	124-94-7
15	曲安奈德	100055-201103	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	76-25-5
16	醋酸曲安奈德	100125-200404	C ₂₆ H ₃₃ FO ₇	3870-07-3

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱：SHIMADZU Shimpack VP-ODS(150 mm×2.0 mm, 5 μm)；流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B)，梯度洗脱，0 min，25.0%A，40 min，40.0%A；运行时间为 10.0 min；流速为 0.4 mL·min⁻¹；柱温箱温度为 40.0 ℃；进样量为 2.0 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)，喷雾针位置 1.5 mm；离子源接口电压：4.5 kV；雾化气：氮气 3.0 L·min⁻¹；干燥气：氮气 12.0 L·min⁻¹；碰撞气：氩气(99.999%)；脱溶剂管温度：250 ℃；加热模块温度：400 ℃；扫描模式：多反应监测模式正离子扫描；驻留时间：50.0 ms；分析时间：40 min；MRM 参数见表 2。16 种肾上腺皮质激素类非法添加药物的产物离子质谱图见图 1，总离子流图见图 2。

表 2 肾上腺皮质激素类药物 MRM 参数表
Tab. 2 The MRM argument list of adrenal cortical hormone drugs

名称	前体离子 质荷比/ m/z	产物离子 质荷比/ m/z	Q1 电压/V	碰撞池 电压/V	Q3 电压/V
地塞米松	393.20	373.10*	-30	-11	-18
		355.10	-30	-13	-25
醋酸地塞米松	435.20	415.15*	-24	-10	-21
		397.15	-24	-13	-20
可的松	361.20	163.05*	-19	-27	-17
		121.05	-19	-37	-24
氢化可的松	363.20	121.10*	-20	-25	-24
		327.10	-20	-17	-23
醋酸可的松	403.20	163.05*	-21	-28	-17
		343.10	-21	-22	-25
醋酸氢化可的松	405.20	309.10*	-23	-18	-22
		327.05	-23	-19	-23
醋酸氟氢可的松	423.20	239.10*	-13	-29	-16
		143.15	-13	-43	-15
泼尼松	359.20	341.00*	-30	-13	-25
		147.05	-30	-27	-30
醋酸泼尼松	401.20	295.00*	-30	-16	-21
		313.10	-30	-14	-22
泼尼松龙	361.20	343.05*	-30	-12	-24
		147.05	-30	-22	-15
醋酸泼尼松龙	403.20	385.15*	-30	-11	-28
		147.05	-30	-26	-30
醋酸氟轻松	495.15	121.20*	-15	-34	-24
		337.00	-15	-21	-16
倍他米松	393.20	373.10*	-30	-9	-18
		355.10	-30	-12	-26
曲安西龙	395.20	375.10*	-30	-11	-19
		357.05	-30	-16	-17
曲安奈德	435.20	415.15*	-30	-11	-21
		397.10	-30	-17	-29
醋酸曲安奈德	477.20	457.10*	-30	-11	-23
		339.10	-30	-16	-24

注：*为定量离子。
Note: * was quantification ions.

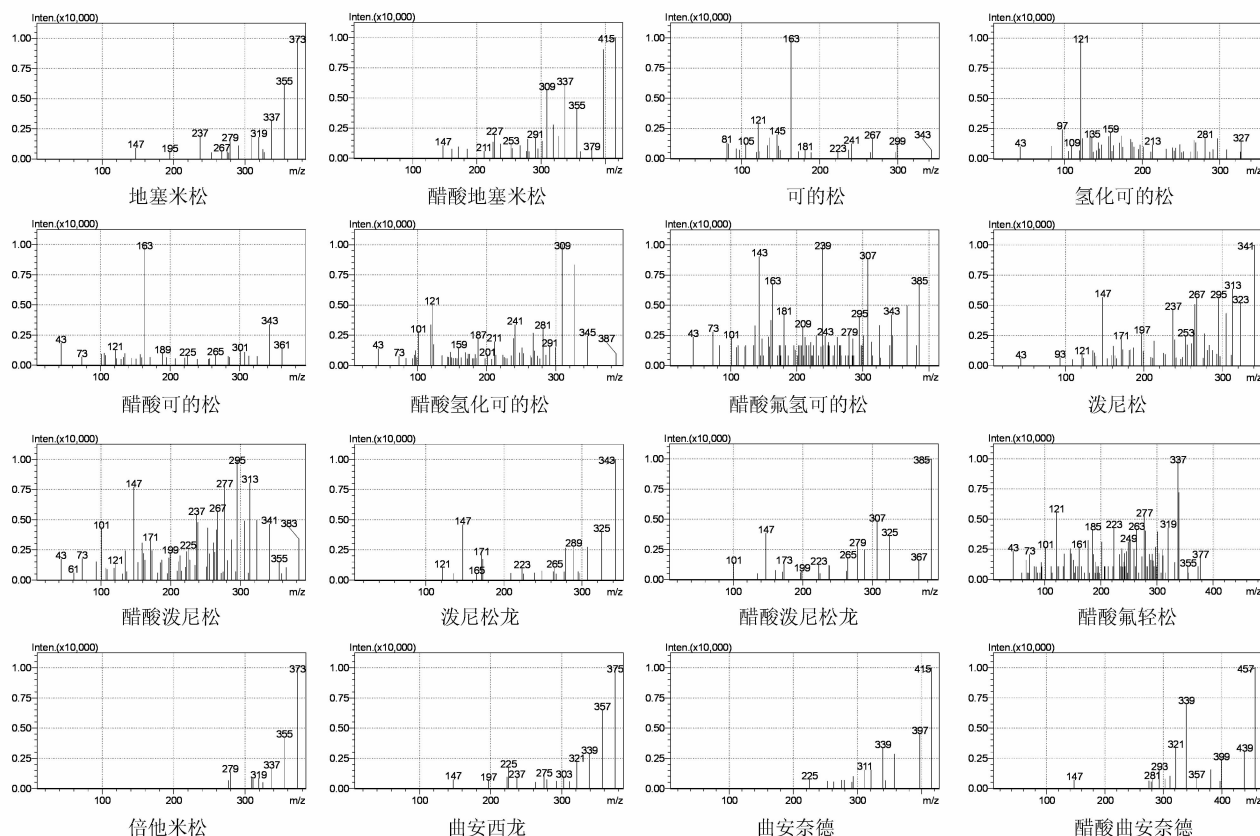


图 1 16 种肾上腺皮质激素类非法添加药物的产物离子质谱图

Fig. 1 The product ion mass spectrum of adrenal cortical hormone drugs

2.2 样品制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取 16 种肾上腺皮质激素对照品，用乙腈-水-甲酸(30:70:0.1)溶解，并稀释至含对照品各为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液作对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取试样 5 mL，加乙腈-水-甲酸(30:70:0.1)溶解并定容至 50 mL，过滤，续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验 选用茯蒲洗液作为阴性样品，按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法，分别制备阴性样品及含有 16 种激素的阳性样品供试品溶液。按“2.1”项下条件进行实验，结果阳性样品均检出目标成分，阴性样品无干扰。

2.3.2 仪器精密度试验 分别取 16 种对照品溶液连续进样 5 次，16 种成分的 MRM 色谱峰的峰面积 RSD 均 $<2\%$ ，保留时间 RSD 均 $<0.4\%$ ，结果表明精密度良好，满足分析要求，结果见表 3。

2.3.3 回收率试验 在阴性样品中添加 16 种肾上腺皮质激素对照品，添加水平为 0.1, 0.5, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，用本方法平行测定 5 次。16 种成分平均回收率在

69%~101%，RSD 均 $<5\%$ ，表明本方法准确度能够满足快速筛查的需要，结果见表 3。

表 3 精密度和回收率试验

Tab. 3 Precision experiment and average recovery test

编号	仪器精密度		平均回收率/%
	峰面积 RSD/%	保留时间 RSD/%	
1	0.6	0.2	100.5
2	1.3	0.2	82.3
3	0.4	0.3	99.1
4	0.4	0.3	95.6
5	0.8	0.2	79.3
6	0.6	0.2	69.9
7	0.6	0.2	81.6
8	0.4	0.3	96.9
9	0.8	0.2	78.1
10	0.4	0.3	99.1
11	0.6	0.2	85.6
12	1.2	0.1	81.0
13	0.5	0.2	70.8
14	0.2	0.3	99.5
15	0.6	0.2	98.9
16	1.2	0.2	90.6

2.3.4 线性关系考察 分别取对照品溶液 1, 2, 4, 8, 10 μL ，进样，其他分析条件按“2.1”项下参数测定，以进样量(μL)为横坐标(X)，对照品峰面积积分值为纵坐标(Y)进行线性回归，相关系数 r

均 $\geq 0.99(n=5)$, 表明 16 种肾上腺皮质激素类药物在 1~10 μL 内线性关系满足筛查需求。

2.3.5 检测限 按信噪比(S/N)为 3 计算, 16 种肾上腺皮质激素类非法添加物检测限均 $<0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 按信噪比(S/N)为 10 计算, 16 种肾上腺皮质激素类非法添加物定量限均 $<1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

在流动相的选择上, 本实验中的肾上腺皮质激素有 8 种为酯化衍生物, 在流动相中加入挥发性有机酸可提高离子化效率, 同时也有利于酯类样品的稳定。与乙酸比较, 甲酸的分子量较小, 酸性较强, 更有利于样品的离子化和质谱的解析。一般情况下, 使用乙腈比甲醇的离子化效率高, 而且乙腈的黏度较低, 更有利于细小液滴的形成, 所以本实验选择乙腈作有机相, 0.1%甲酸作水相的流动相组成。使用梯度洗脱条件可使被测组分有较好的分离效果, 见图 2。

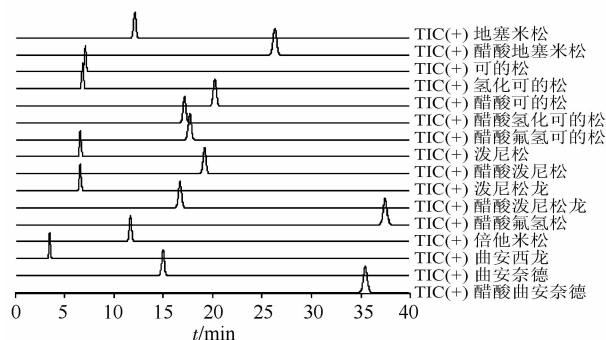


图 2 16 种肾上腺皮质激素对照品溶液的总离子流图
Fig. 2 TIC of standard solution of adrenal cortical hormones

正负离子模式的选择, 经过试验发现负离子模式灵敏度较低且质谱图所提供的信息量较小, 不利于被检测物质的定性, 故本实验采用正离子

扫描模式。

非法添加化学药品要保证其有效性, 须使添加物的浓度达到药物的起效浓度, 因此添加化学物质的浓度通常较高, 易被分析仪器检出^[5]。考虑到肾上腺皮质激素类药物局部外用的临床治疗浓度多为 0.01%~0.25%^[6], 因此本实验在对照品溶液浓度的选择上采用了 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在回收率试验中, 导致回收率偏低的可能原因有 2 个。一是由于中药制剂成分复杂, 在通过 ESI 源进行离子化过程中容易产生比较明显的基质效应。而本实验主要针对快速筛查, 为了提高筛查效率, 对供试品的前处理步骤简单, 没有纯化去杂的过程。故在回收率实验中, 对照品加入中药制剂后, 由于基质效应对离子源的离子化效率产生负面影响, 导致回收率偏低。二是部分肾上腺皮质激素的酯化衍生物在溶液中稳定性不好, 发生了水解。

REFERENCES

- [1] YOU Q D. Pharmaceutical Chemistry(药物化学) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 580-581.
- [2] MALCOLM G P. Steroid Hormone Action [M]. New York: Oxford, 1993.
- [3] ZHOU B, LIU J, ZHU J et al. Adverse reactions and complications of glucocorticoid drugs [J]. China Pharm(中国药业), 2002, 11(6): 43-44.
- [4] SCHAKMAN O, GILSON H, KALISTA S, et al. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids [J]. Horm Res, 2009, 72(Suppl 1): 36-41.
- [5] LUO J W, YAN L Q, LI Y H, et al. Determination of minoxidil illegally adulterated in cosmetics by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(6): 655-657.
- [6] WU Z H, GUO H W. The progress of mechanism and application in dermatology of glucocorticoid [J]. J Dermatol Venereol(皮肤病与性病), 2011, 33(6): 323-324.

收稿日期: 2014-01-05

2015 年《中国海洋药物》征订启事

《中国海洋药物》杂志创刊于 1982 年, 是由中国科学技术协会主管、中国药学会主办、中国海洋大学编辑出版, 国内外公开发行的科技学术期刊。是国内唯一具有海洋特色的中药学类核心期刊, 中国科技核心期刊、中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)、中国学术期刊(光盘版)(CAJ-CD)来源期刊, 并被美国《化学文摘》(CA)、联合国《水科学和渔业文摘》(ASFA)等收录。

栏目设置: 本刊设有研究报告、研究简报、综述、消息动态等栏目, 内容包括海洋药物科学研究的新成果、新技术、新方法和新资讯。可为从事海洋医药、卫生、化工、水产、食品等领域的专业技术人员提供帮助和参考。

《中国海洋药物》为双月刊, 每期定价 16.00 元, 全年 96.00 元。国际连续出版物号 ISSN1002-3461, 国内统一刊号 CN37-1155/R。国内邮发代号: 24-57, 国外代号: BM1277, 中国国际图书贸易总公司发行。欢迎广大读者通过当地邮局订阅。

地址: 青岛市鱼山路 5 号; 邮编: 266003; 电话: (0532)82031949; 传真: (0532)82031949; 电子信箱: zghyyw@ouc.edu.cn; 网址: <http://hyw.journalsystem.net>。