

超高效液相色谱-串联质谱法检测具有 治疗镇咳平喘功效的药物成分

孙晓飞, 宋大贺, 丁 健*, 刘淑艳, 张 宁

(大连海关, 大连 116001)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法检测镇咳平类药物中 4 种药物成分的检测方法。**方法** 采用 C₁₈ 色谱柱进行分离, 以水(2 mmol/L 甲酸铵-50 mmol/L 甲酸)-乙腈(2 mmol/L 甲酸铵-50 mmol/L 甲酸)作为流动相进行梯度洗脱, 采用正离子电喷雾, 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行定性定量测定。**结果** 在线性范围 0.05~2 µg/g 区间内, 方法相关性较好, 检出限为 0.02 µg/g, 定量限为 0.05 µg/g。方法回收率为 85%~103%, 相对标准偏差为 1.02%~3.69%。**结论** 方法灵敏度好、精密度高、操作简便, 适合应用于此类保健食品中非法添加药物成分的检测。

关键词: 保健食品; 非法添加; 镇咳平喘; 超高效液相色谱-串联质谱法

Detection of medicinal components with anti-tussive and anti-asthmatic effects by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SUN Xiao-Fei, SONG Da-He, DING Jian*, LIU Shu-Yan, ZHANG Ning

(Dalian Administration of Customs, Dalian 16001)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of four drug components in anti-tussive and anti-asthmatic by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** The C₁₈ chromatographic column was used for separation. Gradient elution was performed using water (2 mmol/L ammonium formate-50 mmol/L formic acid)-acetonitrile (2 mmol/L ammonium formate-50 mmol/L formic acid) as the mobile phase. Positive ion electrospray and multiple reaction monitoring (MRM) were used for qualitative and quantitative determination. **Results** The correlation was good in the linear range of 0.05–2 µg/g, the limit of detection was 0.02 µg/g, the limit of quantitative was 0.05 µg/g. The recoveries were 85%–103% and the RSDs were 1.02%–3.69%. **Conclusion** The method has good sensitivity, high precision and simple operation, which is suitable for the detection of illegally added drug components in this kind of health food.

KEY WORDS: health food; illegal addition; anti-cough and anti-asthma; ultra performance liquid phase-tandem mass spectrometry

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2019-ZD-0870)、大连海关科研项目(2020DK04)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of Liaoning (2019-ZD-0870), Research Project of Dalian Customs (2020DK04)

*通信作者: 丁健, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhiyu0718@163.com

*Corresponding author: DING Jian, Senior Engineer, Dalian Customs, No.60, Changjiang-east Road, Zhongshan District, Dalian 116001, China. E-mail: zhiyu0718@163.com

0 引 言

我国中成药和保健食品的消费市场广大,据中商研究院发布的研究报告显示,预计 2020 年我国保健食品行业市场规模将突破 4000 亿元^[1]。保健食品是一类具有增加抵抗机能、增强免疫能力、抵抗病毒对人体的侵害、预防癌症的功能性食品。随着保健食品市场的迅猛发展,问题也逐渐凸显。保健食品质量良莠不齐,虚假宣传数见不鲜,假冒伪劣保健食品泛滥^[2-4]。近年来,患有呼吸系统疾病的人越来越多,市面上的镇咳平喘类药物也层出不穷,伪麻黄碱、盐酸二氧丙嗪、沙丁胺醇以及盐酸去甲基伪麻黄碱等 4 种化学成分具有镇咳并平喘、祛痰、抗胆胺和局麻作用,镇咳作用较强^[5-8],经常应用在治疗呼吸系统疾病领域中,但同时这些化学成分在服用过程中存在一些禁忌,而有些非法中成药及保健类食品为达到较高疗效,将这些药物甚至超量加入其中,对消费者身体健康造成巨大危害^[9-12]。非法添加化学药物的现象已经越来越受到重视,非法添加检测技术研究 and 应用取得了一定的进展,但对于一些化学成分尚未建立有效的检测方法。所以,本研究选取 4 种化学成分进行检测分析,建立超高效液相色谱-串联质谱法方法检测镇咳平喘类药物,以期为人们食品以及生命财产安全提供有力保障。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器及设备

AB 4000 QTRAP 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国应用生物系统公司); ELMA TI-H-15 超声波清洗机(德国 Elma 公司); TECHNE SNHCONC/1 氮吹仪(德国 Techne 公司); BSA323S-CW 分析天平(德国赛多利斯公司); COMFORT II 超纯水仪(德国赛多利斯公司)。

1.1.2 材料与试剂

4 种标准品:伪麻黄碱、盐酸二氧丙嗪、沙丁胺醇、盐酸去甲基伪麻黄碱,详细信息见表 1。

甲醇、乙腈(色谱纯,德国赛默飞公司); 甲酸(色谱纯)、甲酸(优级纯)、甲酸铵(色谱纯)(天津科密欧化学试剂有限公司)。

1.1.3 样品来源

实际检测样品分别为肺宁颗粒,肺力咳及消炎止咳片,均购自大连海王星辰药店。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:安捷伦 C₁₈ 液相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 流动相:A:水(2 mmol/L 甲酸铵, 50 mmol/L 甲酸), B:乙腈(2 mmol/L 甲酸铵, 50 mmol/L 甲酸); 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 40 ℃。梯度洗脱程序见表 2。

1.2.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源; 扫描模式:正离子模式; 反应方式:多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 离子源温度: 450 ℃; 离子化电压: 5500 V; 气帘气: 35 psi; 喷雾器: 50 psi; 碰撞气: 55 psi; 质谱参数见表 3。

1.2.3 标准品的配制

分别精密称取 4 种止咳平喘类药物对照品,各 10 mg,用甲醇溶解,置于 10 mL 容量瓶中,定容,制成 1.0 mg/mL 的单标溶液。分别精密量取 1.0 mL 4 种标准溶液,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释成浓度为 10.0 μg/mL 的 4 种止咳平喘类药混合标准储备液。

1.2.4 样品的前处理

称取约 0.5 g 研磨后的待测样品于 10 mL 带盖玻璃试管中,加入 5 mL 甲醇,涡旋振荡 30 s,再超声提取 10 min,离心后将上清液移入 10 mL 容量瓶中,再向离心管中加入 5 mL 甲醇,重复提取,合并上清液置容量瓶中,加入甲醇补足 10 mL。混匀后取 1 mL 于 65 ℃氮气流下吹干,再用 1 mL 初始比例流动相溶解残留物,经 0.45 μm 针头滤器过滤后,待进样分析。

1.2.5 标准曲线的绘制

准确移取适量混合标准储备液,使用空白基质提取液稀释成浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 ng/mL 的系列标准工作溶液。上机测定,记录数据,以浓度(ng/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

表 1 4 种标准品信息
Table 1 Information of four standard products

	中文名称	英文名称	化学文摘社号	分子式	分子量	纯度/%
1	伪麻黄碱	pseudoephedrine	90-82-4	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.23200	99.8
2	盐酸二氧丙嗪	dioxopromethazine hydrochloride	13754-15-9	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂ S	316.41800	99.4
3	沙丁胺醇	ventolin	18559-94-9	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239.31	99.9
4	盐酸去甲基伪麻黄碱	norpseudoephedrine hydrochloride	2153-98-2	C ₉ H ₁₃ NO.HCl	187.66656	98.7

表 2 液相色谱的梯度洗脱程序
Table 2 Gradient elution program of liquid chromatography

时间/min	A/%	B/%
0~1	90	10
1~6	90~10	10~90
6~9	10	90
9~10	90	10

1.2.6 加标回收率实验及精密度实验

制备 3 份样品溶液, 分别向其中加入 100、200 和

400 μL 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准工作溶液, 分别同时制备 10 组平行样, 进行检测, 计算回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

分别对 4 种化合物的标准物质进行质谱条件的优化, 质谱条件见表 2。选取特征明显并且信号响应较强的碎片离子作为定性及定量离子, 色谱图见图 1~4。

结果显示, 4 种化学物质在短时间内出现典型色谱峰, 检测灵敏度均可满足检测需求, 且特异性良好。

表 3 4 种镇咳平喘类物质的质谱优化参数
Table 3 Mass spectrum optimization parameters of four antitussive and antiasthmatic substances

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/eV	碰撞能量/eV
伪麻黄碱	166.2	148.1*117.1	44	16 28
盐酸二氧丙嗪	317.2	86*166.9	75	12 25
沙丁胺醇	240.1	148*166.1	55	27 20
盐酸去甲基伪麻黄碱	152.1	134*117.1	35	15 27

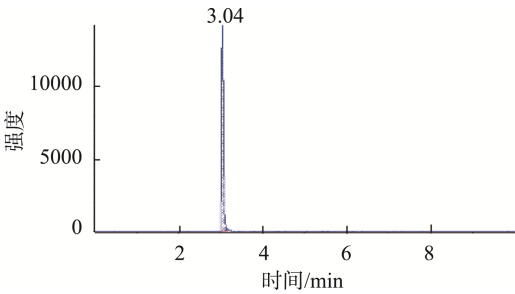


图 1 盐酸二氧丙嗪色谱图(1.0 ng/mL)
Fig.1 Chromatogram of dioxoprazine hydrochloride (1.0 ng/mL)

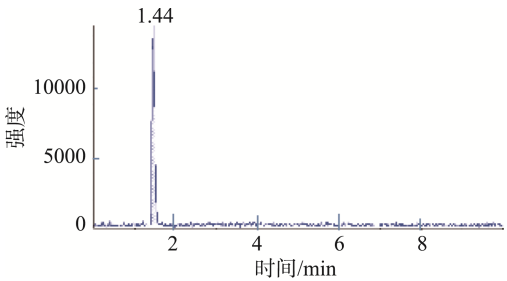


图 3 伪麻黄碱色谱图(1.0 ng/mL)
Fig.3 Chromatogram of pseudoephedrine (1.0 ng/mL)

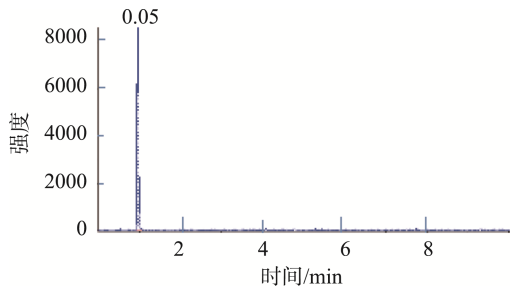


图 2 沙丁胺醇色谱图(1.0 ng/mL)
Fig.2 Chromatogram of ventolin (1.0 ng/mL)

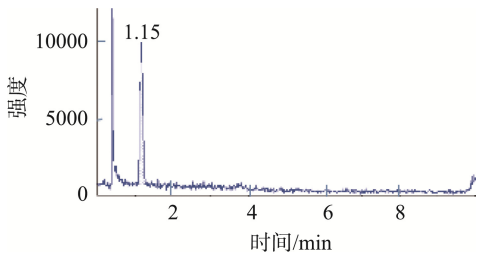


图 4 盐酸去甲基伪麻黄碱色谱图(1.0 ng/mL)
Fig.4 Chromatogram of norpseudoephedrine hydrochloride (1.0 ng/mL)

2.2 方法的线性范围与检出限

标准曲线的范围通常会受到仪器灵敏度及最大信号强度的限制,本研究使用 AB 4000 QTrap, 由表 4 中可知, 由于当进样浓度在 200 ng/mL 时, 信号强度接近仪器上限, 有一定程度失真, 导致标准曲线的线性系数 r^2 无法满足要求。当选取标准曲线范围在 1~100 ng/mL 时, 标准曲线的线性符合度 r^2 可以满足要求, 但在进样浓度为 1 ng/mL 时, 各化合物的回收率为: 伪麻黄碱 75.02%, 盐酸二氧丙嗪 93.06%, 沙丁胺醇 47.22%, 盐酸去甲基伪麻黄碱 39.66%, 其中沙丁胺醇和盐酸去甲基伪麻黄碱的回收率不能满足定量检测的需求。当选取标准曲线

范围在 2.5~100 ng/mL 时, 标准曲线的线性符合度 r^2 及各点的回收率均可以满足要求, 4 种化合物标准曲线见图 5~8。通过公式(1)可得出样品检出限可达到 0.02 $\mu\text{g/g}$, 定量限均可达到 0.05 $\mu\text{g/g}$ 。

$$X = \frac{A \times C \times V}{m \times 1000}$$

(1)

其中: X : 样品中目标化合物的浓度, $\mu\text{g/g}$;
 A : 溶液中目标化合物的浓度, ng/mL ;
 C : 稀释倍数;
 V : 式样提取溶液定容体积, mL ;
 m : 称样质量, 单位 g 。

表 4 4 种化合物标准曲线范围与线性符合度
Table 4 Standard curve range and linearity coincidence degree of four kinds of compounds

化合物名称	标准曲线范围 1~200 ng/mL 线性符合度 r^2	标准曲线范围 1~100 ng/mL 线性符合度 r^2	标准曲线范围 2.5~100 ng/mL 线性符合度 r^2
伪麻黄碱	0.9891	1.0000	1.0000
盐酸二氧丙嗪	0.9946	1.0000	1.0000
沙丁胺醇	0.9982	0.9999	1.0000
盐酸去甲基伪麻黄碱	0.9942	0.9999	1.0000

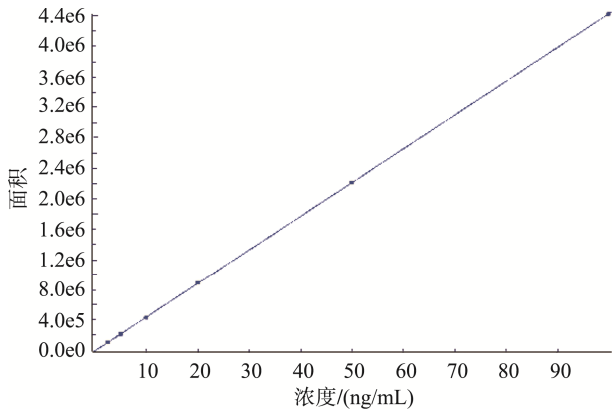


图 5 盐酸二氧丙嗪标准曲线
Fig.5 Standard curve of dioxypromazine hydrochloride

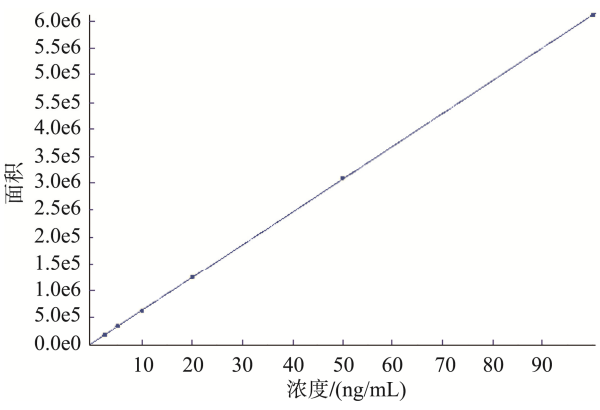


图 7 伪麻黄碱标准曲线
Fig.7 Standard curve of pseudoephedrine

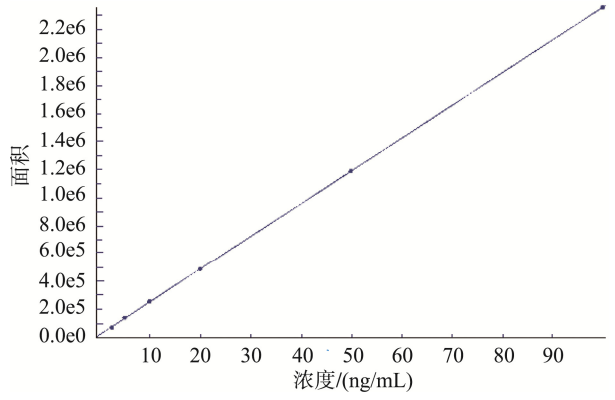


图 6 沙丁胺醇标准曲线
Fig.6 Standard curve of salbutamol

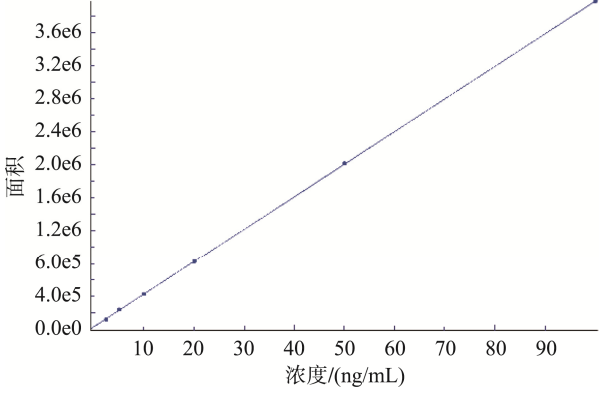


图 8 盐酸去甲基伪麻黄碱标准曲线
Fig.8 Standard curve of desmethylpseudoephedrine hydrochloride

2.3 方法的灵敏度与回收率

采用建立的检测方法对 4 种化合物回收率及精密密度进行检测, 10 次检测结果见表 5, 结果显示检测回收率为 85%~103%, RSD 为 1.02%~3.69%。

3 结论与讨论

本研究建立了检测具有镇咳平喘功效的化学物质中的超高效液相-串联质谱方法。方法检出限均可达到

0.02 μg/g, 定量限均可达到 0.05 μg/g。在线性范围 0.05~2 μg/g 区间内, 均可达到良好的灵敏度、精密密度、回收率, 且操作简便, 抗干扰力强, 适用性强。目前止咳平喘类中成药和保健食品中可能添加的化学成分品种也越来越多, 亟需提高保健品中非法添加化学药物的检测水平, 该方法的建立为打击保健食品中非法添加药物成分提供有力技术支撑, 为食品安全监管部门提供技术保障, 为保护保健食品安全具有重要意义^[13-15]。

表 5 4 种化合物 10 次检测结果回收率及精密密度
Table 5 Recoveries and precision of ten test results of four compounds

添加水平 /μg/g	10 次检测结果%							
	伪麻黄碱		盐酸二氧丙嗪		沙丁胺醇		盐酸去甲基伪麻黄碱	
	回收率平均值/%	精密密度/%	回收率平均值/%	精密密度/%	回收率平均值/%	精密密度/%	回收率平均值/%	精密密度/%
0.2	96.9	1.78	93.9	1.28	87.3	3.54	99.4	2.80
0.4	94.4	1.90	99.5	2.02	90.5	3.69	100.4	1.92
0.8	98.5	2.16	91.1	1.02	93.3	2.98	97.4	1.76

参考文献

[1] 中国食品安全网. 预计到 2020 年我国保健食品行业市场规模将突破 4000 亿元 [EB/OL]. [2019-12-20]. <https://www.cfsn.cn/front/web/site.newshow?Hyid=12&newsid=18563>.
China Food Safety Net. It is estimated that the market size of my country's health food industry will exceed 400 billion yuan by 2020 [EB/OL]., [2019-12-20]. <https://www.cfsn.cn/front/web/site.newshow?hyid=12&newsid=18563>.

[2] 李兴东, 巩伟. 平喘镇咳中成药中几种非法添加的化学药品检验分析[C]// 国际数字医学会数字中医药分会成立大会暨首届数字中医药学术交流会, 2016.
LI XD, GONG W. Test and analysis of several illegally added chemicals in Chinese patent medicine for anti-asthma and antitussive [C]// The inaugural meeting of digital chinese medicine branch of international digital medical association and the first digital chinese medicine academic exchange meeting, 2016.

[3] 陈东洋, 张昊, 冯家力, 等. 保健食品中违禁药物检验技术研究进展[J]. 色谱, 2020, (8): 880-890.
CHEN DY, ZHANG H, FENG JL, *et al.* Advances in technologies for determination of illegal drugs in health food [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, (8): 880-890.

[4] 火婷, 胡玥, 高旭东, 等. 保健食品中非法添加物检测的前处理及分析方法研究进展[J]. 分析测试技术与仪器, 2020, 26(1): 49-55.
HUO T, HU Y, GAO XD, *et al.* Advances in sample pretreatment and analytical methods for detection of illegal additives in health care foods [J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2020, 26(1): 49-55.

[5] 张勇仓, 张成栋, 刘兰, 等. HPLC 法测定藏麻黄中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(10): 30-32.
ZHANG YC, ZHANG CD, LIU L, *et al.* Determination of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in tibetan ephedra by HPLC [J]. *J Med Pharm Chin Minorities*, 2020, 26(10): 30-32.

[6] 徐硕, 徐文峰, 金鹏飞, 等. 止咳平喘类中成药和保健品中非法添加化学药物检测技术的研究进展[J]. 中南药学, 2017, 15(6): 798-803.
XU S, XU WF, JIN PF, *et al.* Analytical technologies for illegal adulterated chemical substances in antitussive and antiasthmatic Chinese patent medicines and health foods [J]. *Central South Pharm*, 2017, 15(6): 798-803.

[7] 王贞媛, 李丹, 文红梅, 等. LC-MS/MS 法快速筛选保健食品中非法添加的 18 种止咳平喘化学成分[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 172-175.
WANG ZY, LI D, WEN HM, *et al.* LC-MS/MS method for rapid screening of 18 illegally added cough and asthma chemical ingredients in health food [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2012, 30(1): 172-175.

[8] 宋晓婉, 刘坤, 宋旭凤, 等. HPLC-MS/MS 法检测减肥类保健食品中 4 种致泻类非法添物[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 346-349.
SONG XW, LIU K, SONG XF, *et al.* Determination of four diarrheal components illegally added in slimming functional products by HPLC-MS/MS method [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(5): 346-349.

[9] 庞小莲, 黎强. 保健食品中非法添加药物检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(8): 2470-2474.
PANG XL, LI Q. Reaearch progress on detection technology of illegally added drugs in health food [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(8): 2470-2474.

[10] 金鑫, 朱志英. HPLC 法快速测定保健食品中化学药物添加的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 201-208.
JIN X, ZHU ZY. Rapid determination of chemical drugs addition in health food by HPLC [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(21): 201-208.

[11] 励炯, 贾彦博, 邱红钰, 等. 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.

- LI J, JIA YB, QIU HY, *et al.* Determination of eight antidepressants illegally added in tranquilizing traditional Chinese medicine and health food by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2019, 36(8): 956-960.
- [12] 王伟姣, 龙凌云, 姜成君, 等. UPLC-MS/MS 法测定保健食品中添加的 114 个化学药[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(12): 2157-2170.
- WANG WJ, LONG LY, JIANG CJ, *et al.* Determination of 114 chemical drugs added into health foods by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(12): 2157-2170.
- [13] 马晓彬. 平喘镇咳中成药中几种非法添加的化学药品检验分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(57): 1-2.
- MA XB. Test and analysis of several illegally added chemicals in Chinese patent medicine for anti-asthma and antitussive [J]. *World Latest Med Inform (Electronic Version)*, 2018, 18(57): 1-2.
- [14] 何艳, 胡小祥, 汪毅, 等. HPLC 法同时测定风寒感冒颗粒中 7 种成分[J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2272-2275.
- HE Y, HU XX, WANG Y, *et al.* Simultaneous determination of seven constituents in fenghan ganmao granules by HPLC [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2020, 42(9): 2272-2275.
- [15] 王子凌云, 梁琨, 李国文. HPLC 法测定芩杏清热止咳颗粒中 8 种成

分[J]. *中成药*, 2019, 41(5): 995-999.

WANG ZLY, LIANG K, LI GW. Determination of eight constituents in Qinxing Qingre Zhike Granules by HPLC [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2019, 41(5): 995-999.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



孙晓飞, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为食品检验。

E-mail: xiaofei812521@163.com



丁 健, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: zhiyu0718@163.com

“饮料品质控制及检测分析”专题征稿函

饮料工业是我国食品工业的重要组成部分, 与人民物质生活息息相关。近年来, 随着人们物质生活水平的不断提高, 对饮料的品质要求也在不断提升, 好喝与安全已经成为一种潮流与时尚。

近年来的塑化剂风波、勾兑门、农残门、致癌门等诸多事件或多或少地困扰着饮料行业发展, 饮料品质安全问题越来越得到社会和广大消费者的关注。

鉴于此, 本刊特别策划“饮料品质控制及检测分析”专题, 主要围绕饮料产业发展现状、饮料加工过程中质量控制与品质安全管理、饮料质量检测标准、饮料中有毒有害物质的检测方法、饮料包装材料等或您认为本领域有意义问题展开讨论, 计划在 2021 年 3/4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心 吴永宁 研究员和专题主编北京市营养源研究所 许洪高 研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力, 综述及研究论文均可。请在 2021 年 2 月 28 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题饮料品质控制及检测分析):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2021 专题: 饮料品质控制及检测分析”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: 饮料品质控制及检测分析专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部