

超高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中3种非法添加的解热镇痛药物

梁少东*, 刘莉丽, 伍国怡, 张 铨, 蒋居琼

(北海市食品药品检验所, 北海 536000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中3种非法添加解热镇痛药(阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛)的分析方法。**方法** 样品经0.1%(V:V)甲酸-甲醇超声提取后,以乙酸铵-乙腈为流动相进行梯度洗脱。采用多反应监测模式监测(multiple reaction monitoring, MRM),负离子模式扫描,外标法进行定量检测。**结果** 3种待测化合物在相应的线性范围内线性关系良好,相关系数大于0.997;检出限范围为0.01~0.04 mg/kg,定量限范围为0.03~0.14 mg/kg。在3个添加水平下,3种化合物的平均回收率为94.5%~102.0%,相对标准偏差为2.37%~8.86% (n=6)。**结论** 该方法简单、重复性好、灵敏度高,适用于凉茶中阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛非法添加的检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法;凉茶;解热镇痛药

Determination of 3 kinds of illegally added antipyretic and analgesic drugs in herbal tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIANG Shao-Dong*, LIU Li-Li, WU Guo-Yi, ZHANG Quan, JIANG Ju-Qiong

(Beihai Food and Drug Inspection Institute, Beihai 536000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 3 kinds of illegally added antipyretic and analgesic drugs (aspirin, ibuprofen and indomethacin) in herbal tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by 0.1% (V:V) formic acid methanol, and then eluted by gradient with ammonium acetate acetonitrile as mobile phase. The samples were monitored by multiple reaction monitoring mode (MRM), scanned by negative ion mode, and quantitative detected by external standard method. **Results** The 3 compounds showed good linear relationships in the corresponding linear ranges with all the correlation coefficients greater than 0.997. The limits of detection were 0.01–0.04 mg/kg, and the limits of quantitation were 0.03–0.14 mg/kg. Under the 3 addition levels, the average recoveries of 3 compounds were 94.5%–102.0%, and the relative standard deviations were 2.37%–8.86% (n=6). **Conclusion** This method is simple, reproducible and sensitive, which can be used for detection of aspirin, ibuprofen and indomethacin illegally added in herbal tea.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; herbal tea; antipyretic and analgesic drugs

*通信作者: 梁少东, 工程师, 主要研究方向为食品安全分析。E-mail: 34697171@qq.com

*Corresponding author: LIANG Shao-Dong, Engineer, Beihai Food and Drug Inspection Institute, Beihai 536000, China. E-mail: 34697171@qq.com

0 引言

凉茶,是一种以草药为原料熬煮,具有清热解毒的功能性饮料,深受两广人民的喜爱。2005 年底,凉茶已入选为国家非物质文化遗产。据报道,近年来有不法商贩受利益驱使,为了达到“起效快”的目的,在凉茶中非法添加某些具有清热解毒功能的化学药物^[1]。消费者如果长期饮用此类含有非法添加化学药物的凉茶,会对身体产生不利的影响^[2]。因此,有必要加强凉茶中非法添加解热镇痛类药物的检测工作。

针对解热镇痛类药物,目前主要的检测方法有薄层色谱法(thin layer chromatography, TIC)^[3],高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[4-9],超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)^[10-15]。其中, TIC 无法实现多种化合物的定量检测, HPLC 对于一些基质复杂的成分难以区分,抗干扰能力不强。而 UPLC-MS/MS 具有抗干扰能力强、待测物质不需要与干扰组分完全色谱分离的特点,可以通过不同的质荷比得到单一组分的色谱图,还可以通过二级质谱对结构进一步确证。有文献已经对凉茶中非法添加的解热镇痛类药物进行了研究^[16-17],但将常见的阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛纳入检测范围的研究比较少。

鉴于此,本研究建立凉茶中阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛 3 种非法添加解热镇痛药物的分析方法,丰富凉茶中非法添加化学药物的研究,并对市面上零售的凉茶进行测定,以期凉茶的日常监督提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

SCIEX TRIPLE QUAD™ 4500 三重四级杆质谱仪(配有电喷雾离子源)(美国 Applied Biosystems 公司); XSE205 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); AS30T 超声波清洗器(安莱立思仪器科技上海有限公司)。

阿司匹林标准品(纯度 99.8%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 布洛芬、吲哚美辛标准品(纯度 100%, 中国药品生物

制品检定研究所); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸、乙酸铵(色谱纯, 上海安谱公司)。实验用水为娃哈哈纯净水。

凉茶样品为市场零售感冒茶、清热解毒茶等 15 份样品。

1.2 标准溶液的配制

精密称取布洛芬, 吲哚美辛各 10.0 mg, 分别置于 50 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度线, 配制成质量浓度为 200 mg/L 的标准储备液; 精密称取阿司匹林 10.0 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 用 0.1% 甲酸甲醇定容至刻度线, 配制成质量浓度为 200 mg/L 的标准储备液。使用时根据需要吸取适量的各化合物标准储备液混合, 用 0.1% 甲酸甲醇稀释成质量浓度为 10.0 mg/L 的混合作液。用空白基质稀释, 使工作曲线浓度分别为 0.02、0.05、0.10、0.20、0.50 mg/L。

1.3 样品处理

准确称取 2.00 g 样品于 20 mL 容量瓶中, 加入 0.1% 甲酸甲醇适量, 摇匀后, 超声提取

10 min, 定容至刻度, 过微孔滤膜(0.22 μm), 待测定。

1.4 色谱条件

色谱柱: CNW Athena UHPLC C₁₈(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C; 流动相: A 相: 5 mmol/L 乙酸铵溶液, B 相: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~1 min, 95%A, 1~6.5 min, 15%A, 6.5~8.5 min, 5%A, 8.5~8.51 min, 95%A, 8.51~10 min, 95%A; 进样量: 5 μL。

1.5 质谱条件

电喷雾离子源: 负离子模式, 多反应检测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 喷雾电压(ion spray voltage, IS): -4500 V; 离子源温度: 450 °C; 帘气(curtain gas, CUR)流速: 38 L/min; 雾化气(ion source gas 1, GS1)流速: 45 L/min; 辅助加热气(ion source gas 2, GS2)流速: 40 L/min; 射入电压(entrance potential, EP): -10 V; 碰撞室射出电压(collission exit potential, CXP): -12 V; 质谱采集参数见表 1。

表 1 3 种化合物质谱优化参数

Table 1 Mass spectrometry optimization parameters of 3 kinds of compounds

序号	化合物	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	入簇电压/V	碰撞电压/V
1	阿司匹林	3.66	136.9	92.9 [*] , 65.0	-45	-19, -35
2	吲哚美辛	5.76	356.0	311.9 [*] , 296.9	-83	-12, -27
3	布洛芬	6.03	204.9	161.0 [*] , 159.0	-20	-9.0, -8.5

注: *为定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

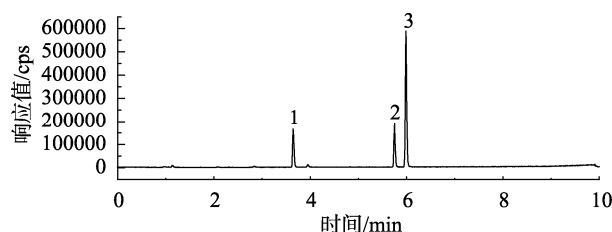
分别将 3 种化合物配制成 0.50 mg/L 浓度的标准溶液, 用注射泵进样分析目标化合物, 在负离子模式下进行全扫描, 确定 3 种化合物的母离子, 再给予一定的碰撞能量, 扫描二级子离子, 选取丰度较高的 2 个子离子分别为定量和定性离子, 最后以 MRM 模式优化最佳去簇电压 (declustering potential, DP) 和碰撞能量 (collision energy, CE)。优化后的质谱参数见表 1。

2.2 色谱条件的优化

本研究考察了柱 1: Athena UHPLC C₁₈(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), 柱 2: ZORBAX SB-C₁₈(2.1 mm×150 mm, 5 μm), 以及柱 3: Atlantis T3(2.1 mm×150 mm, 3 μm), 发现乙腈-乙酸铵流动相体系内, 柱 1 对阿司匹林峰型最尖锐, 且响应相对最高, 且吲哚美辛和布洛芬分离度良好, 结果如图 1 所示。柱 2 和柱 3, 阿司匹林相应较低, 而且吲哚美辛和布洛芬在色谱图上不能达到基线分离, 结果如图 2 所示。故本实验选择 Athena UHPLC C₁₈ 柱进行分离。

由于本实验采用了 MRM 负离子模式, 故流动相考察了水-甲醇、乙酸铵-甲醇、水-乙腈、乙酸铵-乙腈 4 种流动相体系。在水-甲醇、水-乙腈流动相体系中, 3 种化合物的峰型均存在峰型拖尾, 峰宽变大的现象。在甲醇-乙酸铵流动相体系, 吲哚美辛和布洛芬出峰时间偏后, 在高有机相比例出峰, 在此时间段也是样品杂质被洗脱最多的时间段。乙酸铵-乙腈流动相体系, 3 种化合物出峰时间适中, 且峰型尖锐, 在色谱图上体现完全分离。故本实验最终选择了乙酸铵-乙腈作为流动相。

在实验过程发现, 阿司匹林容易出现双峰, 且不稳定。经研究, 阿司匹林容易水解^[18], 导致此现象。因此, 在配制阿司匹林标准储备液时, 用 0.1% 甲酸甲醇可以保持阿司匹林的稳定, 提高其在质谱的响应度。



注: 1. 阿司匹林; 2. 吲哚美辛; 3. 布洛芬。

图 1 3 种化合物混合标准溶液(0.20 mg/L)使用 Athena UHPLC C₁₈ 的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig.1 UPLC-MS/MS chromatogram of a mixed standard solution of the 3 compounds (0.20 mg/L) using Athena UHPLC C₁₈

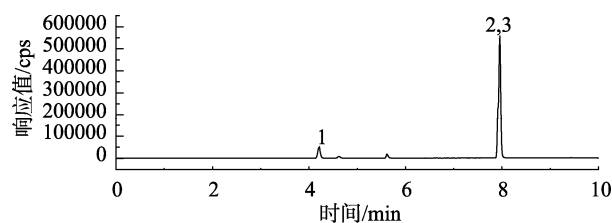


图 2 3 种化合物混合标准溶液(0.20 mg/L)使用 ZORBAX SB-C₁₈ 和 Atlantis T3 的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig.2 UPLC-MS/MS chromatogram of a mixed standard solution of the 3 compounds (0.20 mg/L) using ZORBAX SB-C₁₈ and Atlantis T3

2.3 方法学验证

以各组分的质量浓度为横坐标, 定量离子的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果显示, 在相应的线性浓度范围内, 定量离子峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 3 种化合物相关系数 r 均在 0.997 以上。以 $S/N=3$ 计算检出限, $S/N=10$ 计算定量限, 结果见表 2。检出限(limit of detection, LOD) 范围为 0.01~0.04 mg/kg, 定量限 (limit of quantification, LOQ) 范围为 0.03~0.14 mg/kg, 方法灵敏度较高。在阴性凉茶中分别添加 3 个水平的待测物, 每个水平平行测定 6 次, 考察方法的回收率和精密性。结果显示, 方法回收率为 94.5%~102.0%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.37%~8.86% ($n=6$), 方法精密性较高。结果见表 3。

表 2 线性范围、线性方程、相关系数(r)、检出限和定量限
Table 2 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r), LODs and LOQs

化合物	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数(r)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
阿司匹林	0.02~0.50	$Y=1.7854 \times 10^6 X - 3.079 \times 10^3$	0.9991	0.04	0.14
吲哚美辛	0.02~0.50	$Y=3.4395 \times 10^6 X - 1.022 \times 10^4$	0.9977	0.01	0.03
布洛芬	0.02~0.50	$Y=1.5794 \times 10^6 X - 4.937 \times 10^3$	0.9996	0.01	0.03

表 3 阴性凉茶样品中加标回收率及相对标准偏差($n=6$)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations of spiked negative herbal tea samples ($n=6$)

化合物	添加量/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
阿司匹林	0.20	94.5	8.86
	0.40	99.8	3.50
	1.00	101.8	4.17
吲哚美辛	0.20	102.0	8.19
	0.40	99.8	2.84
	1.00	101.5	3.95
布洛芬	0.20	102.0	7.71
	0.40	100.8	2.37
	1.00	97.5	6.12

2.4 实际样品监测情况

在市区随机购买的标称具有清热解毒功能凉茶 15 份。所有凉茶没有检出有阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛成分。

3 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛 3 种解热镇痛化合物的测定方法。本方法前处理简单,仅需要稀释,超声,过滤,即可上机定性定量,且重复性好、灵敏度高,可用于实际工作凉茶中非法添加阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛这 3 种解热镇痛药的监测。

参考文献

- 尹佳, 黎星, 张涛, 等. 网购凉茶中非法添加抗风湿类药物状况分析及对策探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(18): 4964-4970.
YIN J, LI X, ZHANG T, *et al.* Status analysis and countermeasure discussion of illegal addition of anti-rheumatic drugs in the herbal teas purchased online [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(18): 4964-4970.
- 程凯, 徐珽, 唐尧, 等. 氯苯那敏致不良反应 45 例文献分析[J]. 中国药业, 2009, 18(19): 52-53.
CHENG K, XU T, TANG R, *et al.* Literature analysis of ADRs caused by chlorphenamine [J]. *Chin Pharm*, 2009, 18(19): 52-53.
- 李惠敏. 薄层色谱法快筛抗风湿类中药制剂和保健食品中 4 种解热镇痛成分[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(8): 16-17.
LI HM. TIC quick screening of anti-rheumatic agents and health foods traditional Chinese medicine in the four kinds of antipyretic analgesic ingredients [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2010, 4(8): 16-17.
- 刘志辉. HPLC 法同时测定抗风湿类中成药及保健品中非法添加 9 种解热镇痛类化学药物[J]. 中国药师, 2015, 18(7): 1116-1119.
LIU ZH. Simultaneous determination of nine antipyretic analgesic drugs illegally added into anti-rheumatic traditional Chinese medicines and health products by HPLC [J]. *Chin Pharm*, 2015, 18(7): 1116-1119.
- 张浩然, 徐汀, 张亦菲, 等. 清热解毒类中成药中非法添加吲哚美辛的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(6): 49-55.
ZHANG HR, XU T, ZHANG YF, *et al.* Determination of indomethacine illegally added in traditional Chinese Medicine by HPLC-PDA [J]. *Chin J Vet Drug*, 2020, 54(6): 49-55.
- 温家欣, 陈林, 赖宇红, 等. 高效液相色谱法同时快速测定凉茶中 11 种非法添加化学药物[J]. 分析测试学报, 2016, 35(3): 285-291.
WEN JX, CHEN L, LAI YH, *et al.* Rapid and simultaneous analysis of 11 adulterated drugs in herbal tea by HPLC [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(3): 285-291.
- 张圣杰. 高效液相法同时测定阿司匹林类药物中有效成分含量及游离水杨酸的限量检测效果分析[J]. 中国社区医师, 2020, 36(27): 4-5.
ZHANG SJ. Analysis of the detection effect of simultaneous determination of active components and free salicylic acid in aspirin by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Chin Commun Doc*, 2020, 36(27): 4-5.
- 宁素云, 郭兴杰, 张虹, 等. HPLC 法同时检测清热解毒类中成药中非法添加的 9 种化学药品[J]. 中国药事, 2009, 23(9): 907-910.
NING SY, GUO XJ, ZHANG H, *et al.* Detection of 9 illegal components in traditional Chinese medicine by HPLC [J]. *Chin Pharm Aff*, 2009, 23(9): 907-910.
- 江琦, 王邱, 罗丹. 高效液相色谱法同时测定凉茶中 10 种非法添加化学药物的含量[J]. 广东化工, 2018, 45(9): 225-227.
JIANG Q, WANG Q, LUO D. Determination of ten chemical drugs illegally added in herbal tea by HPLC [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2018, 45(9): 225-227.
- 胡佳哲, 何嘉雯, 黄淑霞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中 6 种非法添加化合物[J]. 分析试验室, 2020, 39(12): 1461-1466.
HU JZ, HE JW, HUANG SX, *et al.* Determination of 6 compounds illegally added in herbal tea by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Lab*, 2020, 39(12): 1461-1466.
- 宋宁宁, 张科明, 刘向红, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定凉茶中非法添加的 12 种化学药物[J]. 色谱, 2015, 33(10): 1026-1031.
SONG NN, ZHANG KM, LIU XH, *et al.* Determination of twelve chemical drugs illegally added in herbal tea by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with modified QuEChERS [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(10): 1026-1031.
- 谭亚男, 辜慧, 徐峰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定白酒、配制酒中 58 种解热镇痛类非法添加化学药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6614-6622.
TAN YN, GU H, XU F, *et al.* Determination of 58 antipyretic and analgesic drugs illegally added in liquor and prepared liquor by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(18): 6614-6622.
- 胡青, 崔益冷, 张甦, 等. 液质联用法测定解热镇痛类中药及保健品中非法添加化学药品的研究[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1547-1550.
HU Q, CUI YL, ZHANG S, *et al.* Detection of chemical drugs added illegally into analgesic-antipyretic traditional Chinese medicines and health food by LC/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2009, 31(10): 1547-1550.
- 张宏峰, 彭荣飞, 罗晓燕, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定散装凉茶中非法添加的 6 种化学药物[J]. 中国卫生检验杂志,

- 2017, 27(16): 2287–2290, 2294.
- ZHANG HF, PENG RF, LUO XY, *et al.* Determination of six chemical drugs illegally added in herbal tea by QuEChERS method coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(16): 2287–2290, 2294.
- [15] 唐维英, 黄泽玮, 钱广生, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶、代用茶和饮料食品中 63 种非法添加化合物[J]. *色谱*, 2018, 36(12): 1245–1260.
- TANG WY, HUANG ZW, QIAN GS, *et al.* Determination of 63 compounds illegally added in tea, substitute tea and beverage foods by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(12): 1245–1260.
- [16] 罗伟, 杜俊威, 林秋凤, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中 20 种非法添加化学药物[J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(6): 43–47.
- LUO W, DU JW, LIN QF, *et al.* Determination of twenty chemical drugs illegally added in herbal tea by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Asia-Pacific Tradit Med*, 2020, 16(6): 43–47.
- [17] 丁建兰, 黄宁, 黄恩堂, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法测定茶及茶饮品中解热镇痛药物[J]. *食品与药品*, 2019, 21(6): 479–482.
- DING JL, HUANG N, HUANG ET, *et al.* Determination of antipyretic and analgesic drugs in tea and tea drinks by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Drug* 2019, 21(6): 479–482.
- [18] 彭翱, 周辉, 江骥, 等. LC-MS/MS 法定量测定人血浆中阿司匹林及其代谢产物水杨酸[J]. *分析测试学报*, 2007, (S1): 4–6.
- PENG A, ZHOU H, JIANG J, *et al.* Quantitation of aspirin and salicylic acid in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2007, (S1): 4–6.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



梁少东, 工程师, 主要研究方向为食品安全分析。

E-mail: 34697171@qq.com