

固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定 医用冷敷贴中 17 个添加化学物质*

彭彦¹, 杨直¹, 成立², 林丽琴¹, 陈刘伟¹

(1. 杭州市食品药品检验科学研究院, 杭州 310022; 2. 湖北省药品监督管理局药品审评检查中心, 武汉 430077)

摘要 目的: 采用固相萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱(SPE - UPLC - MS/MS)法建立医用冷敷贴中 17 个化学物质的检测方法, 该法适用于常见医用冷敷贴基质。方法: 重点考察了固相萃取柱类型、洗脱溶剂种类及溶剂用量。样品用甲醇超声提取后, 与水以 1:9 的比例混合, 经 Agilent Bond Elut HLB 固相萃取柱净化, 以甲醇 - 异丙醇(1:1)进行洗脱, 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱, 以乙腈 - 0.1% 甲酸溶液(含 0.5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵)为流动相进行分离。在电喷雾离子源(ESI)正负离子模式下电离, 多反应监测(MRM)模式下测定。结果: 17 个化合物在相应的测定范围内呈良好的线性关系, 相关系数(*r*)均大于 0.99, 该方法的检测限(LOD)为 0.01 ~ 13.32 μg · g⁻¹, 定量限(LOQ)为 0.02 ~ 26.64 μg · g⁻¹。在 3 种加样水平下, 回收率范围为 77.7% ~ 108.5%, RSD(*n* = 6)为 0.62% ~ 4.7%。应用本方法对 35 批次医用冷敷贴样品进行分析检测, 结果 8 批次检出双氯芬酸钠, 每片检出量为 0.09 ~ 27.55 mg。结论: 该方法简便, 准确度高, 灵敏度好, 可用于医用冷敷贴中非法添加化学药物的检测, 为检测医用冷敷贴中的非法添加提供了技术支持。
关键词: 超高效液相色谱 - 串联质谱(UPLC - MS/MS); 固相萃取(SPE); 糖皮质激素; 解热镇痛; 麻醉剂; 医用冷敷贴

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)11 - 1983 - 09
doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0212

Determination of 17 chemicals in medical cold compress by solid phase extraction - ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*

PENG Yan¹, YANG Zhi¹, CHENG Li², LIN Li - qin¹, CHEN Liu - wei¹

(1. Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China;
2. Evaluation and Inspection Center of Hubei Medical Products Administration, Wuhan 430077, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of 17 kinds of anti - allergic compounds in medical cold compress by solid phase extraction - ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry(SPE - UPLC - MS/MS). Common medical cold compress matrices were suitable for this new method. **Methods:** Three pretreatment methods were compared: prime pass - through column purification, SPE purification including HLB and MCX solid - phase extraction. The pretreatment was optimized by focusing on the kind of solid - phase extraction, the type and volume of elution solvents. The analytes were extracted using

* 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(2021027)
第一作者 Tel:18667178751; E - mail:py19871003@163.com

methanol and then mixed with water at the ratio of 1:9 in volume, purified with an Agilent Bond Elut HLB column. Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column was used with 0.1% formic acid (with 0.5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate) – acetonitrile as mobile phases by gradient elution for separating 17 compounds. Detection was carried out by positive and negative electrospray ionization (ESI) mass spectrometer in multiple reaction monitor (MRM) mode. **Results:** All the 17 kinds of compounds showed good linearity in their reasonable ranges ($r > 0.99$), the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.01 – 13.32 μg · g⁻¹ and 0.02 – 26.64 μg · g⁻¹, respectively. The average recoveries of at three spiked levels were in range of 77.7% – 108.5%, with RSDs ($n = 6$) were 0.62% – 4.7%. The content range of diclofenac sodium in positive samples was 0.09 – 27.55 mg per tablet. **Conclusion:** The method is simple, sensitive and reliable, and is suitable for determination of 17 illegally add chemical drugs in medical cold compress. Moreover, the method might provide technological support for the detection of illegal additions in medical cold compress.

Keywords: ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); solid phase extraction (SPE); glucocorticoids; antipyretic and analgesic; anesthetic; medical cold compress

按《医疗器械分类目录》，医用冷敷贴的定义为“通常由降温物质和各种形式的外套及固定器具组成”，其中降温物质不应含有发挥药理学、免疫学或者代谢作用的成分。但在实际应用中，医用冷敷贴存在成分和备案不一，虚假宣传的情况，易被企业套用成械字号面膜或中药贴膏等非医疗器械产品，对外宣称械字号面膜主要用于保湿补水，中药贴膏主要用于缓解疼痛。前期市场抽验发现，某些商家为牟利，擅自非法添加糖皮质激素类、麻醉类、解热镇痛类成分，以迅速达到美白、消炎及缓解疼痛的功效^[1]。我国^[2]、东盟^[3]等国家及地区均在法规中将激素、麻醉类明确列为禁用组分。

目前国内外关于糖皮质激素的检测多集中在化妆品，方法以液相色谱 – 串联质谱法^[4-12]为主，其选择性好，灵敏度高，特异性强，能够快速准确测定化合物，已成为化妆品标准采用的主流分析仪器。解热镇痛类的研究多集中在保健食品及中成药中，方法主要有液相色谱 – 高分辨质谱法^[13]、表面增强拉曼光谱法^[14]、高效液相色谱法^[15]、液相色谱 – 串联质谱法^[16-17]等。针对非法添加糖皮质激素、局部麻醉剂、解热镇痛类化合物的情况，国家出台了一系列标准，但医疗器械不适用于上述标准。由于医疗器械样品基质主要为有黏附力的膏体层及表面活性剂等，需选择适宜的前处理方法减少基质的干扰，故针对医用冷敷贴非法添加亟待开展相关研究。

本研究采用固相萃取技术，运用超高效液相色

谱串联三重四极杆质谱法，对医用冷敷贴中非法添加的糖皮质激素类、麻醉类及解热镇痛类等 17 个化学成分建立了一种快速、高效的定量检测方法，为医用冷敷贴的监管提供了技术支持。

1 仪器与试剂

超高效液相串联三重四极杆质谱仪配有 DGU – 20A 液相色谱系统和 8050 MS/MS 质谱系统 (岛津公司); Milli – Q 超纯水器 (Millipore 公司); KQ5200V 超声波清洗器 (功率 200 W, 频率 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); Mettler XS205DU 电子天平 (精度 0.01 mg, Mettler Toledo 公司)。

乙腈、甲醇 (色谱级, Merck 公司), 乙酸铵 (分析纯, TCI 公司), 甲酸 (质谱级, ACS 公司); Waters Prime HLB 固相萃取柱和 Waters Oasis MCX 混合型阳离子交换固相萃取柱, 规格均为 3 cc/60 mg, 沃特世科技有限公司; Bond Elut HLB 固相萃取柱, 规格 3 cc/60 mg, 安捷伦科技有限公司。35 批次样品, 其中 28 批购于线上, 7 批购于线下; 对照品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品储备液 精密称取各化合物对照品适量, 用甲醇溶解并稀释成终质量浓度为 0.4 mg · mL⁻¹ (吡罗昔康、对乙酰氨基酚、氯倍他索丙酸酯、盐酸普鲁卡因、利多卡因、盐酸丁卡因、甲氧苄啶)、2.0 mg · mL⁻¹ (地塞米松、曲安奈德、萘普生、醋酸曲安奈德、双氯芬酸钠、吲哚美辛、保泰松、

表 1 17 个化合物对照品信息
Tab. 1 Information of 17 reference compounds

化合物 (compound)	CAS 号 (CAS No.)	分子式 (formula)	M_r	厂家 (supplier)	批号 (batch No.)	纯度 (purity)/%
对乙酰氨基酚(paracetamol)	103-90-2	C ₈ H ₉ NO ₂	151.16	NIFDC	100018-202312	100.0
盐酸普鲁卡因(procaine hydrochloride)	51-05-8	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₂ ·HCl	272.77	NIFDC	100424-201603	99.2
利多卡因(lidocaine)	137-58-6	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.34	NIFDC	100342-202006	99.7
苯佐卡因(benzocaine)	94-09-7	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19	NIFDC	100454-201602	99.9
盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride)	136-47-0	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂ ·HCl	300.83	NIFDC	100456-201602	100.0
地塞米松(dexamethasone)	50-02-2	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.47	NIFDC	100129-201907	99.8
吡罗昔康(piroxicam)	36322-90-4	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	331.35	NIFDC	100177-201704	99.5
曲安奈德(triamcinolone acetonide)	76-25-5	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	434.50	NIFDC	100055-202105	99.3
甲氧苄啶(trimethoprim)	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290.32	NIFDC	100031-202207	99.8
醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide acetate)	3870-07-3	C ₂₆ H ₃₃ FO ₇	476.54	NIFDC	100125-202007	98.4
氯倍他索丙酸酯(clobetasol propionate)	25122-46-7	C ₂₅ H ₃₂ ClFO ₅	466.97	Dr. Ehrenstorfer	G1069514	98.9
保泰松(phenylbutazone)	50-33-9	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	308.37	NIFDC	100481-201702	99.8
阿司匹林(aspirin)	50-78-2	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	NIFDC	100113-201706	99.8
布洛芬(ibuprofen)	15687-27-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.28	NIFDC	100179-202308	99.8
萘普生(naproxen)	22204-53-1	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230.26	NIFDC	100198-201706	100.0
双氯芬酸钠(diclofenac sodium)	15307-79-6	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	318.13	NIFDC	100334-201803	100.0
吲哚美辛(indometacin)	53-86-1	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357.79	NIFDC	100258-202105	99.9

注(note): NIFDC. 中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)

布洛芬)、4.0 mg·mL⁻¹(苯佐卡因)、6.0 mg·mL⁻¹(阿司匹林)的单一成分对照品储备液,置-4℃冰箱中保存备用。

混合对照品储备液(临用现配):精密量取各单一成分对照品储备液适量,用甲醇稀释成每1 mL含阿司匹林2.4 mg,含布洛芬、萘普生约500 μg,含地塞米松、苯佐卡因约80 μg,含吲哚美辛、曲安奈德醋酸酯、双氯芬酸钠约40 μg,含曲安奈德、氯倍他索丙酸酯、保泰松约20 μg,含吡罗昔康、对乙酰氨基酚、盐酸普鲁卡因、利多卡因约10 μg,含甲氧苄啶约1.6 μg,含盐酸丁卡因约0.3 μg的混合溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液 取样品1片,以纱布覆盖黏性层,用剪刀剪成约1×1 cm²的大小后,置20 mL量瓶中,加入甲醇10 mL,超声(200 W,40 kHz)提取处理20 min,放冷至室温后,用甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm滤膜过滤;精密量取续滤液1.0 mL,加水9.0 mL混匀,转移至Bond Elut HLB小柱中,待溶液完全通过后,用水2 mL淋洗,抽至近干,用甲醇-异丙醇(1:1)4 mL洗脱,抽干,收集洗脱液,经0.22 μm滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2 仪器条件

2.2.1 色谱条件 采用Waters BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,以乙腈(A)-0.1%甲酸溶

液(含0.5 mmol·L⁻¹乙酸铵)(B)为流动相,梯度洗脱(0~1 min,70%B;1~2 min,70%B→60%B;2~3 min,60%B→5%B;3~8 min,5%B;8~9 min,5%B→70%B;9~12 min,70%B),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温40℃,进样量1 μL。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子或负离子模式,多反应监测(MRM)模式,离子源温度250℃,毛细管电压3.5 kV,干燥气流量10 L·min⁻¹,鞘气温度250℃,雾化气流速10 L·min⁻¹。17种化合物的质谱参数见表2。

分别取“2.1”项下混合对照品溶液和供试品溶液,注入液相色谱质谱联用仪进行测定,记录色谱图(图1)。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下混合对照品储备液适量,用甲醇-异丙醇(1:1)稀释,配制8个浓度点的混合对照品溶液,分别按“2.2”项下色谱-质谱条件进行分析,以被测化合物定量离子对的峰面积Y为纵坐标,对照品质量浓度X(ng·mL⁻¹)为横坐标进行线性回归拟合,得到线性方程和相关系数(r)。结果(表3)表明,17个化合物在各自线性范围内线性关系良好。

表 2 17 个化合物离子对及相关质谱参数

Tab. 2 Ion pairs and mass spectrum parameters of 17 compounds

化合物 (compound)	离子模式 (mode of ion)	前体离子 (precursor ion) m/z	子离子 (product ion) m/z	Q1 预四极杆电压 (Q1 Pre Bias)/V	CE/ V	Q3 预四极杆电压 (Q3 Pre Bias)/V
对乙酰氨基酚(paracetamol)	+	152.30	110.20*	-11.0	-20.0	-22.0
			93.20	-11.0	-23.0	-18.0
盐酸普鲁卡因(procaine hydrochloride)	+	236.50	100.30*	-17.0	-17.0	-19.0
			120.20	-16.0	-26.0	-12.0
利多卡因(lidocaine)	+	234.50	86.15*	-17.0	-22.0	-16.0
			58.20	-22.0	-35.0	-26.0
苯佐卡因(benzocaine)	+	166.00	138.15*	-12.0	-16.0	-26.0
			77.05	-12.0	-27.0	-30.0
盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride)	+	265.20	176.20*	-13.0	-18.0	-21.0
			72.10	-13.0	-25.0	-30.0
地塞米松(dexamethasone)	+	393.00	355.30*	-15.0	-13.0	-24.0
			146.95	-14.0	-28.0	-10.0
吡罗昔康(piroxicam)	+	332.25	121.20*	-25.0	-21.0	-26.0
			164.20	-14.0	-17.0	-29.0
曲安奈德(triamcinolone acetonide)	+	435.20	397.30*	-16.0	-16.0	-15.0
			339.20	-10.0	-16.0	-25.0
甲氧苄啶(trimethoprim)	+	291.10	230.20*	-14.0	-24.0	-25.0
			261.20	-14.0	-25.0	-27.0
醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide acetate)	+	477.20	339.10*	-11.0	-15.0	-17.0
			321.25	-11.0	-20.0	-22.0
氯倍他索丙酸酯(clobetasol propionate)	+	467.00	373.10*	-13.0	-13.0	-18.0
			355.25	-17.0	-15.0	-24.0
保泰松(phenylbutazone)	+	309.35	77.15*	-13.0	-55.0	-29.0
			160.25	-12.0	-21.0	-11.0
阿司匹林(aspirin)	-	179.00	137.10*	21.0	9.0	22.0
			93.00	24.0	21.0	19.0
布洛芬(ibuprofen)	-	205.00	161.15*	16.0	11.0	14.0
			131.20	15.0	17.0	21.0
萘普生(naproxen)	-	229.00	169.25*	26.0	31.0	17.0
			170.30	25.0	14.0	19.0
双氯芬酸钠(diclofenac sodium)	-	294.15	250.20*	14.0	14.0	11.0
			214.20	14.0	20.0	22.0
吲哚美辛(indometacin)	-	356.20	312.25*	18.0	11.0	22.0
			297.25	18.0	19.0	21.0

注(note): * 为定量离子(* quantitative ions)

2.3.2 检测限与定量限 精密量取混合对照品溶液适量,加入阴性样品(批号 220420,陕西佰傲再生医学有限公司)中,照“2.1.2”项下方法配制溶液,按“2.2”项下色谱-质谱条件进行分析,以信噪比为 3 和 10 时的含量作为 17 个化合物的检测限(LOD)和

定量限(LOQ),结果见表 3。

2.3.3 回收率试验 取“2.3.2”项下的阴性样品,分别添加低、中、高 3 个浓度水平的混合对照品溶液,每个浓度水平按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试溶液,进样测定,计算 17 个化合物回收率和 RSD,结果见表 4。

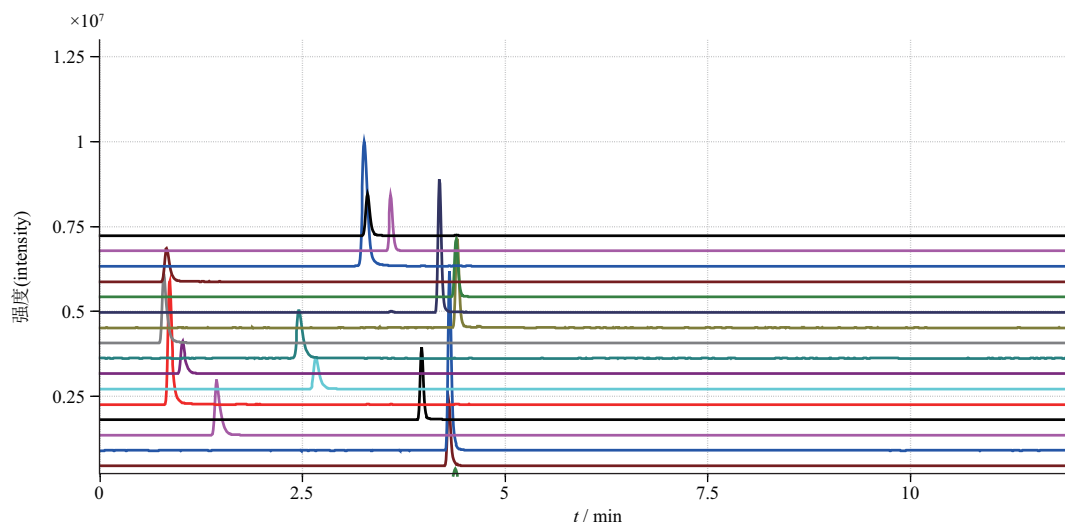


图 1 MRM 模式下 17 个化合物总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of 17 compounds in MRM mode

表 3 17 个目标化合物的回归方程、相关系数、检出限和定量限

Tab. 3 Regression equations, correlation coefficients (*r*), LODs and LOQs of 17 target compounds

化合物 (compound)	线性范围 (linear range)/(ng · mL ⁻¹)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	LOD/ (μg · g ⁻¹)	LOQ/ (μg · g ⁻¹)
对乙酰氨基酚(paracetamol)	7.48 ~ 897.02	$Y = 3.579 \times 10^3 X + 8.908 \times 10^4$	0.998 3	0.14	0.29
盐酸普鲁卡因(procaine hydrochloride)	4.92 ~ 590.25	$Y = 6.541 \times 10^3 X + 6.428 \times 10^4$	0.998 4	0.05	0.19
利多卡因(lidocaine)	4.88 ~ 585.76	$Y = 5.778 \times 10^3 X + 4.864 \times 10^4$	0.998 3	0.10	0.19
苯佐卡因(benzocaine)	31.95 ~ 3 833.60	$Y = 8.792 \times 10^2 X + 4.153 \times 10^4$	0.999 6	0.63	1.25
盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride)	0.17 ~ 20.52	$Y = 1.587 \times 10^5 X + 7.380 \times 10^4$	0.999 8	0.01	0.02
地塞米松(dexamethasone)	40.65 ~ 4 878.22	$Y = 5.999 \times 10^2 X + 1.429 \times 10^4$	0.999 8	0.40	1.59
吡罗昔康(piroxicam)	4.08 ~ 489.59	$Y = 9.773 \times 10^3 X - 1.396 \times 10^4$	0.999 6	0.04	0.16
曲安奈德(triamcinolone acetonide)	13.62 ~ 1 634.48	$Y = 1.663 \times 10^3 X + 2.673 \times 10^4$	0.999 5	0.13	0.53
甲氧苄啶(trimethoprim)	0.80 ~ 95.52	$Y = 6.298 \times 10^4 X + 6.042 \times 10^4$	0.999 6	0.01	0.02
醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide acetate)	23.69 ~ 2 843.37	$Y = 2.100 \times 10^4 X + 8.672 \times 10^4$	0.999 3	0.23	0.46
氯倍他索丙酸酯(clobetasol propionate)	6.33 ~ 1 034.68	$Y = 2.482 \times 10^3 X + 1.002 \times 10^5$	0.996 7	0.17	0.34
保泰松(phenylbutazone)	7.57 ~ 908.58	$Y = 5.138 \times 10^3 X + 9.688 \times 10^4$	0.996 8	0.07	0.15
阿司匹林(aspirin)	1.21 ~ 145.10	$Y = 3.284 \times 10^4 X + 6.038 \times 10^4$	0.996 3	11.84	23.67
布洛芬(ibuprofen)	339.96 ~ 40 975.16	$Y = 26.11X + 1.473 \times 10^4$	0.996 8	13.32	26.64
萘普生(naproxen)	246.64 ~ 29 596.80	$Y = 101.9X - 2.771 \times 10^4$	0.999 7	2.42	4.83
吲哚美辛(indometacin)	16.51 ~ 1 981.38	$Y = 1.897 \times 10^3 X + 5.95 \times 10^4$	0.999 2	0.16	0.32
双氯芬酸钠(diclofenac sodium)	22.35 ~ 2 682.40	$Y = 5.172 \times 10^3 X - 1.294 \times 10^4$	0.999 9	0.22	0.44

2.3.4 精密度试验 取“2.3.3”项下 3 个浓度点的加标溶液,每个浓度水平平行测定 6 次,测得 17 个化合物峰面积 RSD 为 0.60%~4.6% ($n=6$),具体结果见表 4。

2.3.5 稳定性试验 照“2.3.3”项下方法制备 3 个浓度点的阳性供试品溶液,分别于室温下避光放置 0、2、4、6、8、10、12 h 进行测定,记录峰面积,结果 17 个化合物 12 h 内峰面积的 RSD 均小于 10% ($n=6$),

表 4 17 个目标化合物在医用冷敷贴中的回收率及 RSD ($n=6$)
Tab. 4 Spiked recoveries and RSD of 17 target compounds in medical cold compress

化合物 (compound)	理论浓度 (theoretical concentration)/(ng · mL ⁻¹)			平均回收率 (average recovery)/%			RSD/%		
	高	中	低	高	中	低	高	中	低
	(high)	(medium)	(low)	(high)	(medium)	(low)	(high)	(medium)	(low)
对乙酰氨基酚(paracetamol)	598.016	149.504	29.901	98.2	96.0	93.6	1.3	2.6	3.3
盐酸普鲁卡因(procaine hydrochloride)	393.499	98.375	19.675	84.6	81.9	79.9	2.0	2.4	2.5
利多卡因(lidocaine)	390.505	97.626	19.525	95.9	90.0	86.1	2.7	2.8	3.9
苯佐卡因(benzocaine)	2 555.735	638.934	127.787	94.5	92.2	90.2	1.6	2.3	4.7
盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride)	13.683	3.421	0.684	96.5	89.2	86.4	2.5	2.5	1.5
地塞米松(dexamethasone)	3 252.149	813.037	162.608	101.5	93.0	91.7	2.5	3.0	3.9
吡罗昔康(piroxicam)	326.393	81.598	16.320	92.3	84.6	90.2	1.9	1.7	3.2
曲安奈德(triamcinolone acetonide)	1 089.656	272.414	54.483	103.9	98.7	97.4	0.62	2.9	4.6
甲氧苄啶(trimethoprim)	63.680	15.920	3.184	86.3	81.4	77.7	2.2	1.7	1.8
醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide acetate)	1 895.578	473.894	94.779	92.6	84.5	87.9	2.8	2.7	3.1
氯倍他索丙酸酯(clobetasol propionate)	689.787	172.447	34.489	97.0	108.1	100.8	1.9	2.3	4.2
保泰松(phenylbutazone)	605.720	151.430	30.286	88.7	85.7	90.7	2.4	1.9	2.3
阿司匹林(aspirin)	96 734.144	24 183.536	4 836.707	101.1	106.2	101.2	1.8	2.2	1.9
布洛芬(ibuprofen)	27 196.78	6 799.194	1 359.839	108.5	100.2	96.2	1.9	1.6	4.6
萘普生(naproxen)	19 731.2	4 932.8	986.56	105.1	94.9	101.6	1.7	2.9	1.5
吲哚美辛(indometacin)	1 320.918	330.229	66.046	92.7	92.2	101.7	2.5	2.9	4.1
双氯芬酸钠(diclofenac sodium)	1 788.267	447.067	89.413	103.9	96.3	100.7	1.1	1.4	1.1

表明供试品溶液在室温下 12 h 内稳定性良好。

2.4 样品测定分析

基于上述建立的方法,对收集到的线上、线下共计 35 批次的样品进行筛查,每份样品平行称取 2 份,按“2.1.2”项下方法进行处理,采用所建立的超高效液相色谱-串联质谱联用法进行定量检测,结果表明 8 批次样品中检出双氯芬酸钠,每片检出量由小到大依次为 0.09、1.56、4.36、5.18、5.24、6.35、7.41、27.55 mg。

3 分析与讨论

3.1 提取方法的选择

膏药贴因其一面为具有黏附力的膏体层,不易剪碎导致很难取样均匀。实验采用纱布覆盖膏药贴的黏性层,再用剪刀将其剪成约 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的大小后,整片用提取剂浸泡提取,纱布为松散的开放式编制,不影响膏药与提取剂的接触。甲醇为较常见的提取溶剂,针对各化合物性质以及前期对照品溶液配制情况发现,17 个待测化合物在甲醇中的溶解性均较好。实验也考察了不同提取方法(超声、涡旋提取)

及不同超声时间(5、10、15、20、25、30 min)对 17 个化合物回收率的影响,发现随着提取时间的延长,提取得到的添加物组分呈现上升后平缓的趋势,即在提取时间为 20 min 后,延长提取时间对提取效果的增效并不明显。

3.2 流动相的选择

流动相种类、pH、比例等都会影响化合物的峰形、保留时间以及响应。本实验比较了甲醇、乙腈作为有机相,水、氨溶液、甲酸及乙酸溶液、挥发性缓冲盐(乙酸铵溶液)作为水相时各化合物的峰形以及响应情况。

结合前期质谱条件优化的情况,发现 17 个化合物共有 2 种电离模式,故优先选择了水为水相进行测试,比较了乙腈及甲醇作为有机相时各峰的峰形,结果发现不管是采用乙腈还是甲醇,吡罗昔康、丁卡因、利多卡因等均出现了严重的拖尾、分叉情况,负离子模式的阿司匹林、布洛芬响应低,且甲醇-水系统压力高。为提高负离子响应,测试了以 0.1% 氨溶液作为水相,甲醇、乙腈分别作为有机相

时各化合物的峰形,结果发现2个系统部分组分均出现了裂峰的情况。采用0.1%甲酸溶液为水相,负离子模式的化合物响应降低,但以乙腈作为有机相时,各峰的峰形较上述其他各条件稍有改善,少数化合物有拖尾现象,而在水相中加入少量乙酸铵能消除这种拖尾现象,分析其原因可能是甲酸与乙酸铵形成缓冲体系,改善组分的峰形。进一步实验发现,乙酸铵的浓度过大反而会降低部分目标化合物的离子化效率,故结合上述测试的情况,在兼顾17个化合物峰形以及灵敏度的情况下,选用乙腈-0.1%甲酸溶液(含 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵)为流动相。

3.3 固相萃取小柱的选择

样品基质可能会影响目标化合物的响应,造成目标化合物响应增强或抑制的情况,为降低基质效应的影响,本实验采用了固相萃取的方式对样品前处理方法进行优化,在减少样品基质干扰的同时达到富集的目的。结合化合物结构特征及 pK_a 值,选择了符合多数化合物可能适合的固相萃取柱(HLB固相萃取柱、MCX混合型阳离子交换固相萃取

柱)。MCX混合型阳离子交换固相萃取柱兼有离子吸附和反相吸附混合作用力,适用于 pK_a 值为2~10的化合物;Agilent Bond Elut HLB萃取柱由亲水亲脂平衡材料聚合而成,对极性和非极性的化合物均有一定的保留。不管选择哪种类型的固相萃取柱,吲哚美辛的回收率均低于30%,收集前处理过程中每一步的液体均未检出吲哚美辛,考虑吲哚美辛未能被洗脱完全,而其余组分采用HLB一步法或三步法,回收率结果差异不大;采用MCX固相萃取柱时,对乙酰氨基酚的回收率仅为36.0%,其余15个化合物的回收率在77.2%~157.0%,见图2。考虑HLB一步法可优化的参数少,HLB三步法的初筛结果优于MCX固相萃取柱,本实验进一步比较了不同类型及不同体积洗脱液对各化合物回收率的影响,见图3。结果发现,不管甲醇还是乙腈,2 mL洗脱液无法将化合物完全洗脱,采用甲醇-异丙醇(2:1)4 mL洗脱时,阿司匹林出现了裂峰的情况,结合回收率的结果及各峰峰形,最终选择甲醇-异丙醇(1:1)4 mL进行洗脱,所有化合物的回收率均在83%~112%。

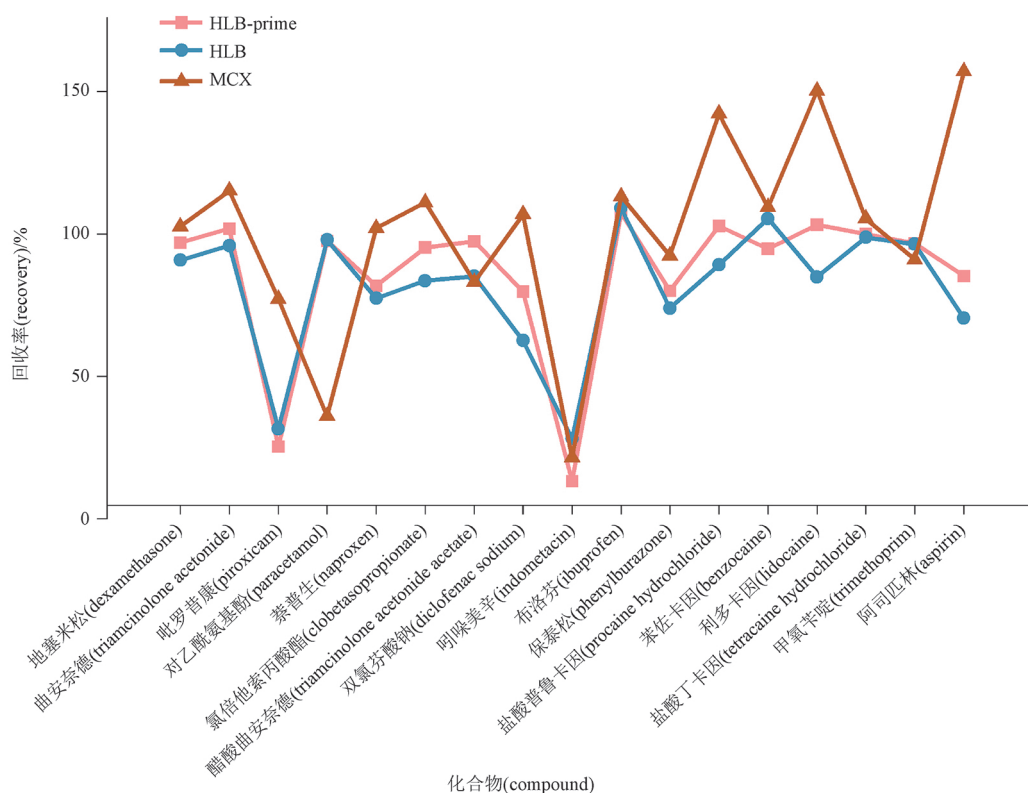


图2 3种SPE柱提取各化合物回收率

Fig. 2 Recoveries of compounds extracted by three kinds of SPE column

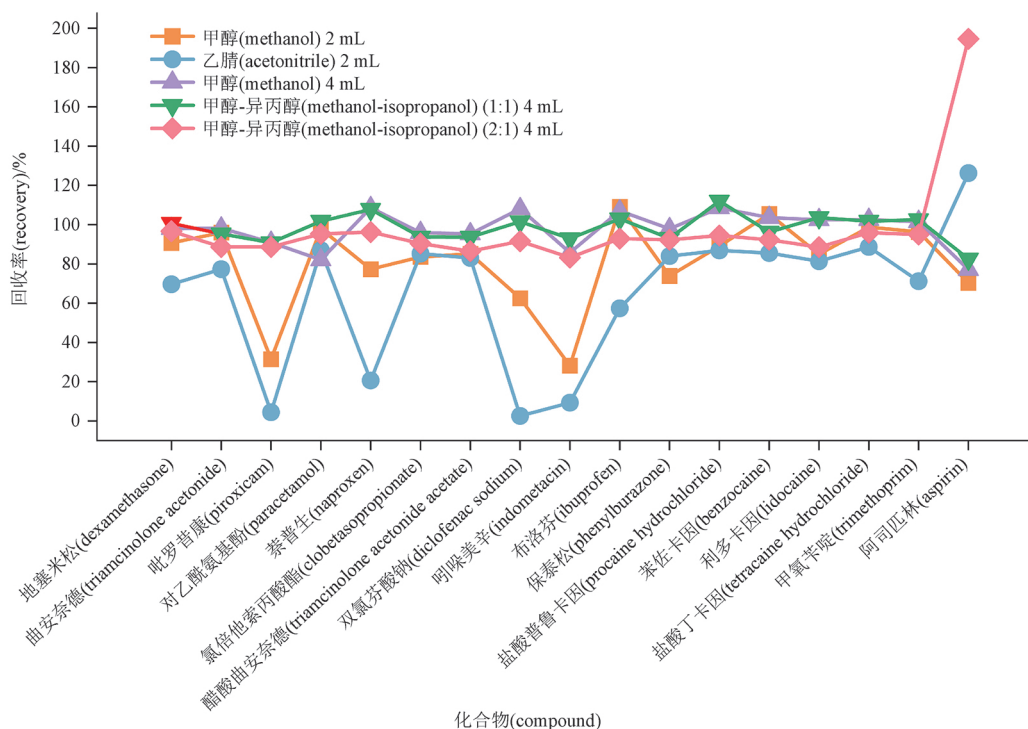


图3 不同洗脱液淋洗后各化合物回收率

Fig. 3 Recoveries of compounds treated with different kinds of elution solution

4 结论

本研究建立了 UPLC - MS/MS 测定医用冷敷贴中 17 个化合物的检测方法,该方法具有快速、高效、准确的特点,仪器可在 12 min 内能完成 17 个非法添加类化合物的筛查和定量检测,大大提高了工作效率,可在实际应用中,对样品进行快速筛查,为医用冷敷贴风险监测提供有力的技术支持,并为其他医疗器械非法添加的检测提供了解决方案。

参考文献

- 段杨. 化妆品面膜与“医用冷敷贴”科学监管之思考[J]. 香料香精化妆品, 2023(5):40
DUAN Y. Reflection on scientific supervision of cosmetic mask and medical cold compress[J]. Flavour Frag Cosmet, 2023(5):40
- 国家食品药品监督管理局. 化妆品安全技术规范(2015 年版)[M]. 北京:中国标准出版社, 2016
China Food and Drug Administration. Safety and Technical Stands for Cosmetics(2015 Edition) [M]. Beijing:Chinese Specification Press, 2016
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 译. 东盟化妆品规范[M]. 北京:中国计量出版社, 2010
Translated by General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Association of Southeast Asian Nations (ASEAN) Cosmetics Regulation

[M]. Beijing: China Metrology Press, 2010

- 梁静文. 化妆品中 10 种糖皮质激素的液质检测方法[J]. 广州化工, 2022, 50(24):112
LIANG JW. Determination of 10 glucocorticoids in cosmetics by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Guangzhou Chem Ind, 2022, 50(24):112
- 杜远东, 穆思芊, 丁伟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测中药软膏剂中 9 种糖皮质激素[J]. 中国药业, 2022, 31(5):96
DU YD, MU SQ, DING W, *et al.* Simultaneous determination of nine glucocorticoids in herbal ointment by HPLC - MS/MS [J]. China Pharm, 2022, 31(5):96
- 许晓辉, 王小乔, 赵波, 等. 通过式固相萃取 - UPLC - MS/MS 法测定育发液中 35 种糖皮质激素[J]. 日用化学工业, 2022, 52(4):444
XU XH, WANG XQ, ZHAO B, *et al.* Filtered solid phase extraction - UPLC - MS/MS for determination of 35 glucocorticoids in hair - rearing solutions[J]. China Surf Deterg Cosmet, 2022, 52(4):444
- 马亮波, 孙宇, 朱桂芳, 等. 固相萃取 - 超高效液相色谱串联质谱法测定化妆品中国标方法以外的 42 种糖皮质激素[J]. 日用化学工业, 2023, 53(7):849
MA LB, SUN Y, ZHU GF, *et al.* Determination of 42 glucocorticoids beyond the national standard method in cosmetics by solid phase extraction - liquid chromatography tandem mass spectrometry

- [J]. *China Surf Deterg Cosmet*, 2023, 53 (7):849
- [8] 赵倩茹, 刘骅, 孟雅萍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中 83 种糖皮质激素[J]. 色谱, 2023, 41(12):1084
ZHAO QR, LIU H, MENG YP, *et al.* Simultaneous determination of 83 glucocorticoids in cosmetics by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2023, 41(12):1084
- [9] 杨飘飘, 黄伟, 李丽霞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品新型糖皮质激素氯倍他索乙酸酯[J]. 色谱, 2023, 41(3):250
YANG PP, HUANG W, LI LX, *et al.* Determination of new glucocorticoid called clobetasol acetate in cosmetics by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Chromatogr*, 2023, 41(3):250
- [10] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. QuEChERS-同位素稀释-液相色谱-高分辨飞行时间质谱法高通量筛查化妆品中 86 种糖皮质激素[J]. 分析化学, 2017, 45(9):1381
LUO HT, HUANG XL, WU HQ, *et al.* High throughput screening of 86 kinds of glucocorticoids in cosmetics using QuEChERS and isotope dilution-liquid chromatography coupled to high resolution time-of-flight mass spectrometry[J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45(9):1381
- [11] LONG HJ, XIAO QY, JING H, *et al.* Screening for illegal addition of glucocorticoids in adulterated cosmetic products using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with precursor ion scanning[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2021, 35(3):e8999
- [12] SADOK I, OZGA K, KLICH D, *et al.* A validated LC-MS/MS method for simultaneous determination of key glucocorticoids in animal hair for applications in conservation biology [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):23089
- [13] 陈晓颀, 涂奇军, 覃桂, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法测定中药及保健食品中 17 种非法添加的解热镇痛及止咳类药物[J]. 中国药师, 2021, 24(10):1938
CHEN XY, TU QJ, QIN G, *et al.* Rapid determination of 17 anti-inflammatory, analgesic and antitussive chemicals illegally added to herbal products and dietary supplements by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. *China Pharm*, 2021, 24(10):1938
- [14] 宋健. 表面增强拉曼光谱法快速检测中成药中吡罗昔康[J]. 化学分析计量, 2020, 29(2):49
SONG J. Rapid detection of piroxicam in proprietary Chinese medicine by surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *Chem Anal Meter*, 2020, 29(2):49
- [15] 魏秀丽, 张志民, 张传津, 等. 超高效液相色谱-二极管阵列法测定清肺止咳散中非法添加的 4 种解热镇痛药[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(2):49
WEI XL, ZHANG ZM, ZHANG CJ, *et al.* Determination of four kinds of antipyretic and analgesic drugs illegally added in Qing-feizhike powder by UPLC-PDA method [J]. *J Tradit Chin Vet Med*, 2020, 39(2):49
- [16] 辜慧, 杜钢, 李澍才, 等. UPLC-MS/MS 法检测中药制剂中的 27 种非法添加化药成分[J]. 中国测试, 2021, 47(7):49
GUO H, DU G, LI SC, *et al.* Determination of 27 chemicals added illegally in traditional Chinese medicines by UPLC-MS/MS [J]. *China Meas Test*, 2021, 47(7):49
- [17] 左甜甜, 张琳琳, 金红宇, 等. UPLC-MS/MS 检测益心酮片中 37 个非法添加解热镇痛类化合物[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10):1739
ZUO TT, ZHANG LL, JIN HY, *et al.* Detection of 37 compounds illegally added in Yixintong tablets by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(10):1739

(本文于 2024 年 3 月 30 日收到)