

HPLC – MS/MS 法同时测定中药口服液体制剂中 45 种添加剂

唐维英¹, 魏宇涛^{2,3*}, 温泉^{2,3}, 徐峰^{2,3}, 李澍才^{2,3}

(1. 四川省药品检验研究院, 药物制剂体内外相关性技术研究国家药监局重点实验室, 成都 611731;

2. 四川省食品检验研究院, 成都 611731; 3. 国家市场监管重点实验室(白酒监管技术), 成都 611731)

摘要 目的: 建立并优化了高效液相色谱 – 串联质谱(HPLC – MS/MS)同时测定中药口服液体制剂中 45 种添加剂化合物的分析方法。方法: 样品经乙腈 – 甲醇(9:1)(含 0.1% 甲酸)超声提取, Agilent Eclipse Plus C₁₈(150 mm × 3.0 mm, 1.8 μm)色谱柱进行分离, 以甲醇和 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵为流动相梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正、负离子同时扫描, 动态多反应监测模式, 保留时间和离子丰度比进行定性分析以及外标法定量。结果: 在优化的色谱 – 质谱条件下, 45 种添加剂化合物在 5 ~ 2 000 ng · mL⁻¹ 范围内线性良好 ($r \geq 0.992$); 方法定量限为 0.2 ~ 4.0 mg · kg⁻¹; 各待测物在空白样品中不同加标水平下的平均回收率为 75.4% ~ 118.4%; RSD 为 0.70% ~ 9.8%。应用该方法对从药房购买的 20 批中药口服液体制剂样品进行检测, 其中 6 批次样品检出苯甲酸, 含量为 0.13% ~ 0.27%, 7 批次样品分别检出山梨酸、肉桂酸、甜蜜素、4 – 羟基苯甲酸乙酯、安赛蜜、脱氢乙酸和糖精钠。结论: 建立的高通量检测方法灵敏、前处理简便、快速、准确度高、回收率稳定, 能有效降低检测成本, 可用于中药口服液体制剂中多种添加剂化合物的同时快速筛查。**关键词:** 添加剂; 中药口服液体制剂; 高效液相色谱 – 串联质谱; 高通量; 动态多反应监测

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2024)03 – 0501 – 11

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024.03.16

Simultaneous determination of 45 additives in oral liquid preparations of traditional Chinese medicine by HPLC – MS/MS

TANG Wei – ying¹, WEI Yu – tao^{2,3*}, WEN Quan^{2,3}, XU Feng^{2,3}, LI Shu – cai^{2,3}

(1. Sichuan Institute of Drug Control, NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products in Vitro and in Vivo Correlation,

Chengdu 611731, China; 2. Sichuan Institute of Food Inspection, Chengdu 611731, China;

3. Key Laboratory of Baijiu Supervising Technology for State Market Regulation, Chengdu 611731, China)

Abstract Objective: To establish an high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS) method for the simultaneous determination of 45 additives in oral liquid preparations of traditional Chinese medicine. **Methods:** The samples were ultrasonically extracted by acetonitrile – methanol (9:1) (containing 0.1% formic acid). The separation was carried out on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ chromatographic column (150 mm × 3.0 mm, 1.8 μm) using gradient elution of methanol – 5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate. The compounds were scanned and detected simultaneously by electrospray ionization(ESI) ion source in both positive ion and negative ion mode under dynamic multiple reaction monitoring. The retention time and ion ratio were used

* 通信作者 Tel:1832807329; E – mail:314474984@qq.com

第一作者 Tel:18382093778; E – mail:1016506196@qq.com

for qualitative analysis and the external standard method was adopted for quantification. **Results:** The good linear relationship of peak area was observed for the 45 additives with correlation coefficients ≥ 0.992 in the concentration range of $5 - 2\ 000\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the limits of quantitation were between $0.2\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $4.0\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ under the above chromatographic and mass spectrometric conditions. The average recoveries of the blank samples at different added levels ranged from 75.4% to 118.4% with RSDs of 0.70%–9.8%. The method was used to detect 20 batches of oral liquid preparations of traditional Chinese medicines purchased from pharmacies. Benzoic acid was detected in 6 batches with the contents of benzoic acid from 0.13% to 0.27%, and sorbic acid, trans-cinnamic acid, molasses, ethyl 4-hydroxybenzoate, acesulfame potassium, dehydroacetic acid and saccharin sodium were detected in 7 batches of samples respectively. **Conclusion:** The established high-throughput detection method is sensitive, simple and fast in pre-treatment, with high accuracy, stable recovery and reduced detection cost effectively. It can be used for the simultaneous rapid screening of multiple additives in oral liquid preparations of traditional Chinese medicine.

Keywords: additives; oral liquid preparations of traditional Chinese medicine; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; high throughput; dynamic multiple reaction monitoring

随着医药行业的快速发展,各种中药口服液体制剂产品日益增多。由于中药口服液体制剂中含有大量水体基质容易滋生细菌引起腐败变质^[1-2],为了抑菌杀菌和延长保质期,常常会加入一些防腐剂和抗氧化剂如山梨酸、尼铂金类、苯扎氯铵类、叔丁基羟基茴香醚等^[3-4]。此外,由于中药本身的苦味加上工艺中酸碱试剂的加入产生的刺激性气味,会极大降低中药口服液体制剂的综合口感,为了改善其口感,尤其在一些儿童口服液体制剂中通常会加入一些如阿斯巴甜、安赛蜜、甜菊糖苷等甜味剂作为矫味剂^[5]。虽然在中药口服液体制剂生产过程中允许使用添加剂,但2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)四部中明确规定了部分添加剂的允许使用限量,但未明确其检测方法^[6]。添加剂使用不当或滥用,不但直接影响中药口服液体制剂的口感和储存效果,更直接影响其质量与疗效,也对人体健康和用药安全构成潜在威胁^[2,6-10]。

目前,添加剂的检测研究主要集中在化妆品、食品和工业产品领域中,或者只是针对单一添加剂种类进行研究,鲜有对中药口服液体制剂中多种添加剂的研究报道^[10-14]。因此,急需建立一套中药口服液体制剂中多种添加剂的高通量筛查技术,以解决此类药品监管薄弱问题。高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)结合了液相色谱对复杂机体化合物的高分离能力以及质谱独特的选择性、灵敏度、相对分子质量及结构信息于一体的特点,使其具有应用

范围广、检测灵敏度高、分析周期短、定性定量准确以及能有效避免假阴性、假阳性等优点^[4,15-16]。本研究以中药口服液中常用添加剂为研究对象,建立了能同时检测45种添加剂的高通量筛查方法。该方法灵敏度高,准确、快速,可用于中药口服液体制剂中添加剂的快速筛查,为药品监管提供了强有力的技术支持。

1 仪器与试液

1.1 仪器 Agilent 1290-6495 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪, Agilent 公司; X3R 高速离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; IRM IDH30 超声仪, IRM Technology GmbH 公司; IKA MS3 涡旋混合器, IKA 公司。甲酸、乙腈、甲醇、乙酸铵均为色谱纯, Thermo Fisher Scientific 公司; 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 试药 混合对照品 1: 苯甲酸、山梨酸、纳他霉素、脱氢乙酸、邻苯基苯酚混合对照品溶液, 浓度均为 $1\ 000\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 北京曼哈格生物科技有限公司。

混合对照品 2: 肉桂酸、4-氯-3,5-二甲基苯酚(对氯间二甲酚)混合对照品溶液, 浓度均为 $1\ 000\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 天津阿尔塔科技有限公司。

混合对照品 3: 三氯卡班、4-氯-3-甲基苯酚(对氯间甲酚)、苜氯酚、溴氯芬、4-羟基苯甲酸甲酯、4-羟基苯甲酸乙酯、4-羟基苯甲酸丙酯、4-羟基苯甲酸异丙酯、4-羟基苯甲酸丁酯、4-羟基苯甲酸异丁酯、三氯生、2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇(布

罗波尔)、2,4-二氯苯氧乙酸、苯氧乙酸、甲基异噻唑啉酮、甲基氯异噻唑啉酮、碘丙炔醇丁基氨甲酸酯、氯咪巴唑、苄索氯铵、十四烷基二甲基苄基氯化铵、十六烷基二甲基苄基氯化铵、4-羟基苯甲酸戊酯、十二烷基二甲基苄基氯化铵、4-羟基苯甲酸苯酯、4-羟基苯甲酸苄酯、噻苯咪唑、月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐混合对照品溶液,浓度均为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,北京曼哈格生物科技有限公司。

混合对照品 4: 纽甜、阿斯巴甜、糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、没食子酸丙酯、丁基羟基茴香醚、阿力甜混合对照品溶液,浓度均为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,天津阿尔塔科技有限公司。

混合对照品 5: 甜菊糖苷、瑞鲍迪武 A、爱德万甜混合对照品溶液,浓度均为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,天津阿尔塔科技有限公司。

实验样品: 中药口服液体制剂,购自药房。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 分别准确吸取混合对照品 1 溶液 0.025 mL、混合对照品 2 溶液 0.01 mL 以及混合对照品 3 溶液 0.05 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品中间液 A;准确吸取混合对照品 4 溶液 0.1 mL 以及混合对照

品 5 溶液 0.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品中间液 B。

2.2 供试品溶液制备 称取混合均匀的样品 1 g (精确至 0.001 g),置 50 mL 离心管中,加入乙腈-甲醇(9:1)(含 0.1% 甲酸) 15 mL,涡旋混匀 5 min,超声(功率 500 W,频率 40 kHz)提取 10 min,置于高速离心机中 $9000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,将上清液转移至 20 mL 量瓶中,用乙腈-甲醇(9:1)(含 0.1% 甲酸)定容至刻度,摇匀,取上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜,续滤液供液相色谱-串联质谱仪分析。

2.3 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C_{18} (150 mm \times 3.0 mm, $1.8 \mu\text{m}$) 色谱柱。柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,进样体积 $5 \mu\text{L}$,流动相 A: $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵-水溶液,流动相 B: 甲醇,梯度洗脱(0 ~ 1.0 min, 10% B; 1 ~ 3.0 min, 60% B; 3.0 ~ 6.0 min, 60% B; 6.0 ~ 18 min, 95% B; 18 ~ 22 min, 95% B),流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.4 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);正、负离子模式同时扫描,动态多反应监测模式(DMRM),毛细管电压 3.0 kV,干燥气温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$,干燥气流量 $11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,雾化气压力 0.31 MPa,鞘气温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$,鞘气流量 $11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。45 种添加剂化合物监测离子对及碰撞能量(CE)参数见表 1。

表 1 45 种添加剂化合物的质谱参数

Tab.1 The Mass spectrometry parameters of 45 additives

化合物 (compound)	母离子(子离子) [precursor ion(daughter ion)] m/z	碰撞电压 (collision energy)/ V	采集模式 (acquisition mode)	保留时间 (retention times)/min
苯甲酸(benzoic acid)	121(121 [*] ,77)	5/7	-	4.714
三氯卡班(triclocarban)	312.9(159.8 [*] ,125.8)	6/10	-	17.876
对氯间甲酚(4-chloro-3-methylphenol)	140.9(35 [*] ,140.9)	15/10	-	11.250
对氯间二甲酚(4-chloro-3,5-dimethylphenol)	155.1(34.9 [*] ,118.8)	51/16	-	13.289
邻苯基苯酚(o-phenylphenol)	168.9(114.6 [*] ,93.1)	35/46	-	12.674
苄氯酚(4-chloro-2-benzyl phenol)	217(180.9 [*] ,153)	20/20	-	16.057
溴氯芬(bromo chlorfen)	424.8(204.8 [*] ,207)	6/6	-	16.784
山梨酸(sorbic acid)	110.9(110.9 [*] ,66.9)	5/5	-	5.128
脱氢乙酸(dehydroacetic acid)	167(83 [*] ,123)	5/15	-	5.103
4-羟基苯甲酸甲酯(methyl 4-hydroxybenzoate)	150.7(136 [*] ,92)	10/8	-	7.082
4-羟基苯甲酸乙酯(ethyl 4-hydroxybenzoate)	165(92.4 [*] ,137)	26/19	-	8.727
4-羟基苯甲酸丙酯(propyl 4-hydroxybenzoate)	179(91.8 [*] ,135.8)	15/25	-	11.042
4-羟基苯甲酸丁酯(butyl 4-hydroxybenzoate)	193(137 [*] ,92.1)	20/27	-	13.249
4-羟基苯甲酸异丙酯(isopropyl 4-hydroxybenzoate)	179(136 [*] ,92)	23/30	-	10.250
4-羟基苯甲酸异丁酯(isobutyl 4-hydroxybenzoate)	193(137.9 [*] ,2.1)	20/27	-	13.065
肉桂酸(trans-cinnamic acid)	146.9(102.8 [*] ,77.1)	10/20	-	5.617

表 1(续)

化合物 (compound)	母离子(子离子) [(precursor ion(daughter ion)] <i>m/z</i>	碰撞电压 (collision energy)/ V	采集模式 (acquisition mode)	保留时间 (retention times)/min
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)	219(161*,125)	10/18	-	6.982
苯氧乙酸(phenoxyacetic acid)	151(107*,93.1,65.1)	13/18/40	-	5.071
纽甜(neotame)	377(345.1*,301.2,199.8)	17/25/25	-	12.224
阿斯巴甜(aspartame)	293(260.9*,199.9)	13/20	-	6.021
三氯生(triclosan)	288.9(36.9*,34.9)	10/10	-	17.929
布罗波尔(2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)	169.9(87.9*,80.8)	10/20	-	5.355
甲基异噻唑啉酮(methyl isothiazolinone)	116(100.9*,84.9)	26/32	-	4.350
甲基氯异噻唑啉酮(methyl chlorisothiazolinone)	150(86.9*,58)	47/31	+	5.512
碘丙炔醇丁基氨甲酸酯(iodopropynol butyl carbamate)	282(164.8*,57.1)	15/10	+	10.449
氯咪巴唑(climazol)	293(197*,69.1)	4/8	+	14.624
苄索氯铵(benzal chloramine)	412.4(320*,91.1)	6/15	+	17.557
十四烷基二甲基苄基氯化铵(tetradecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	332.3(240.3*,91.1)	2/5	+	18.830
十六烷基二甲基苄基氯化铵(cetalkonium chloride)	360.4(268.3*,91.1)	2/6	+	20.547
纳他霉素(natamycin)	666.3(503.2*,485.2)	10/10	+	10.747
4-羟基苯甲酸戊酯(4-hydroxybenzoic acid <i>n</i> -pentyl ester)	206.6(135.9*,91.8)	23/32	+	15.134
十二烷基二甲基苄基氯化铵(dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	304.3(212.1*,91.2,58.1)	5/6	+	16.750
4-羟基苯甲酸苯酯(4-hydroxybenzoic acid phenyl ester)	212.6(92.9*,64.9)	15/50	-	12.049
4-羟基苯甲酸苄酯(4-hydroxybenzoic acid benzyl ester)	227.2(136*,92.3)	8/8	-	13.148
噻苯咪唑(thiabendazole)	202.1(175*,131.1)	15/15	+	7.927
月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(ethyl lauroyl arginate hydrochloride)	385.3(368*,326.3)	8/13	+	16.788
糖精钠(saccharin sodium)	182.2(105.9*,62.1,41.8)	26/33/54	-	4.545
甜蜜素(molasses)	178.1(95.9*,79.9)	2/28/37	-	5.204
安赛蜜(acesulfame potassium)	161.8(81.9*,77.9)	19/41	-	3.948
没食子酸丙酯(propyl gallate)	211(168.7*,124.2)	7/9	-	6.794
丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole)	179.3(164*,149)	17/23	-	13.345
甜菊糖苷(stevioside)	803.5(641.4*,479.2,316.9)	40/80/80	-	14.174
瑞鲍迪甙 A(rebaudioside A)	965.3(803.1*,640.8)	55/63	-	14.188
阿力甜(alitame)	330.3(312.2*,167.3)	19/30	-	7.216
爱德万甜(edwin sweet)	457.2(457.2*,244.1,200)	3/26/30	-	8.747

注(note):*.定量离子(quantitative ion)

2.5 线性范围与定量限

分别精密量取一定体积的混合对照品中间液 A 和 B,配制成 45 种目标化合物浓度在 5~2 000 ng·mL⁻¹之间的系列混合对照品溶液进行测定,以目标组分的峰面积 *Y* 对相应的浓度 *X*(ng·mL⁻¹)绘制标准曲线,其 *r* 均大于 0.992。以信噪比(*S/N*)≥10 的作为方法的定量限(LOQ),其线性方程和定量限

见表 2。

2.6 精密度 分别取质量浓度约为 10、20、50 ng·mL⁻¹的各混合对照品溶液(各化合物浓度有所差别与其定量限相一致),按“1.4”项下色谱条件分别连续测定 6 次,结果(表 3)45 个目标化合物峰面积的 RSD 均 < 5.0%,表明仪器精密度良好。

表 2 45 种化合物的线性关系和定量限

Tab.2 The linear relationships and limits of quantification of 45 compounds

化合物 (compound)	线性范围 (linear range)/(ng · mL ⁻¹)	线性方程 (regression equation)	<i>r</i>	LOQ/ (mg · kg ⁻¹)
苯甲酸(benzoic acid)	25 ~ 1 000	$Y = 604.5X + 3.235 \times 10^3$	0.993 9	1.0
三氯卡班(triclocarban)	5 ~ 200	$Y = 2.356 \times 10^4 X + 6.542 \times 10^4$	0.999 5	0.2
对氯间甲酚(4-chloro-3-methylphenol)	5 ~ 200	$Y = 69.24X - 3.332 \times 10^3$	0.997 2	0.2
对氯间二甲酚(4-chloro-3,5-dimethylphenol)	10 ~ 400	$Y = 14.40X + 12.50$	0.999 6	0.4
邻苯基苯酚(<i>o</i> -phenylphenol)	25 ~ 1 000	$Y = 8.58X - 77.43$	0.999 9	1.0
苄氯酚(4-chloro-2-benzyl phenol)	5 ~ 200	$Y = 884.6X + 662.4$	0.999 6	0.2
溴氯芬(bromo chlorfen)	5 ~ 200	$Y = 374.0X + 134.2$	0.999 5	0.2
山梨酸(sorbic acid)	25 ~ 1 000	$Y = 5.75X + 28.50$	0.992 8	1.0
脱氢乙酸(dehydroacetic acid)	25 ~ 1 000	$Y = 21.19X + 140.5$	0.999 1	1.0
4-羟基苯甲酸甲酯(methyl 4-hydroxybenzoate)	5 ~ 200	$Y = 2.264 \times 10^3 X - 1.572 \times 10^3$	0.999 9	0.2
4-羟基苯甲酸乙酯(ethyl 4-hydroxybenzoate)	5 ~ 200	$Y = 2.929 \times 10^3 X - 4.536$	0.999 4	0.2
4-羟基苯甲酸丙酯(propyl 4-hydroxybenzoate)	5 ~ 200	$Y = 5.167 \times 10^3 X - 3.896 \times 10^3$	0.999 6	0.2
4-羟基苯甲酸丁酯(butyl 4-hydroxybenzoate)	5 ~ 200	$Y = 1.138 \times 10^4 X + 257.97$	0.999 6	0.2
4-羟基苯甲酸异丙酯(isopropyl 4-hydroxybenzoate)	5 ~ 200	$Y = 7.966 \times 10^3 X - 7.577 \times 10^4$	0.993 9	0.2
4-羟基苯甲酸异丁酯(isobutyl 4-hydroxybenzoate)	5 ~ 200	$Y = 1.201 \times 10^4 X - 4.158 \times 10^4$	0.993 0	0.2
肉桂酸(<i>trans</i> -cinnamic acid)	10 ~ 400	$Y = 83.80X + 243.4$	0.999 8	0.4
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)	5 ~ 200	$Y = 988.2X - 81.44$	0.999 6	0.2
苯氧乙酸(phenoxyacetic acid)	5 ~ 200	$Y = 24.96X + 308.0$	0.999 9	0.2
纽甜(neotame)	50 ~ 1 000	$Y = 123.5X - 3.511 \times 10^3$	0.999 7	2.0
阿斯巴甜(aspartame)	50 ~ 1 000	$Y = 95.51X - 4.198 \times 10^3$	0.999 7	2.0
三氯生(triclosan)	5 ~ 200	$Y = 292.65X + 498.70$	0.999 8	0.2
布罗波尔(2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)	5 ~ 200	$Y = 29.04X + 36.48$	0.999 5	0.2
甲基异噻唑啉酮(methyl isothiazolinone)	5 ~ 200	$Y = 1.183 \times 10^3 X - 2.889 \times 10^3$	0.999 3	0.2
甲基氯异噻唑啉酮(methyl chlorisothiazolinone)	5 ~ 200	$Y = 140.8X - 365.1$	0.999 9	0.2
碘丙炔醇丁基氨基甲酸酯(iodopropynol butyl carbamate)	5 ~ 200	$Y = 1.103 \times 10^4 X + 781.9$	1.000	0.2
氯咪巴唑(climazol)	5 ~ 200	$Y = 1.599 \times 10^4 X + 1.489 \times 10^4$	0.999 9	0.2
苄索氯铵(benzal chloramine)	5 ~ 200	$Y = 8.043 \times 10^3 X + 5.556 \times 10^3$	0.999 8	0.2
十四烷基二甲基苄基氯化铵(tetradecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	5 ~ 200	$Y = 8.070 \times 10^3 X + 9.419 \times 10^3$	1.000 0	0.2
十六烷基二甲基苄基氯化铵(cetalkonium chloride)	5 ~ 200	$Y = 6.147 \times 10^3 X + 1.451 \times 10^4$	0.999 7	0.2
纳他霉素(natamycin)	25 ~ 1 000	$Y = 27.95X - 457.9$	0.999 7	1.0
4-羟基苯甲酸戊酯(4-hydroxybenzoic acid <i>n</i> -pentyl ester)	5 ~ 200	$Y = 996.3X - 804.0$	0.999 7	0.2
十二烷基二甲基苄基氯化铵(dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	5 ~ 200	$Y = 1.173 \times 10^4 X + 2.385 \times 10^4$	1.000	0.2
4-羟基苯甲酸苯酯(4-hydroxybenzoic acid phenyl ester)	5 ~ 200	$Y = 3.601 \times 10^3 X - 110.9$	0.999 8	0.2
4-羟基苯甲酸苄酯(4-hydroxybenzoic acid benzyl ester)	5 ~ 200	$Y = 7.297 \times 10^3 X + 637.3$	0.999 8	0.2
噻苯咪唑(thiabendazole)	5 ~ 200	$Y = 4.377 \times 10^4 X - 199.3$	0.999 8	0.2
月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(ethyl lauroyl arginate HCL)	5 ~ 200	$Y = 1.594 \times 10^4 X + 2.151 \times 10^4$	0.999 9	0.2
糖精钠(saccharin sodium)	50 ~ 1 000	$Y = 257.4X + 2.363 \times 10^3$	0.995 2	2.0
甜蜜素(molasses)	50 ~ 1 000	$Y = 277.6X - 5.416 \times 10^3$	0.999 3	2.0
安赛蜜(acesulfame potassium)	50 ~ 1 000	$Y = 268.5X - 4.845 \times 10^3$	0.992 7	2.0
没食子酸丙酯(propyl gallate)	50 ~ 1 000	$Y = 754.8X - 2.062 \times 10^4$	0.999 8	2.0
丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole)	50 ~ 1 000	$Y = 90.41X - 1.626 \times 10^3$	0.998 8	2.0
甜菊糖苷(stevioside)	100 ~ 2 000	$Y = 195.1X - 1.578 \times 10^4$	0.999 5	4.0
瑞鲍迪甙 A (rebaudioside A)	100 ~ 2 000	$Y = 12.42X - 1.134 \times 10^3$	0.999 5	4.0
阿力甜(alitame)	50 ~ 1 000	$Y = 323.7X - 9.182 \times 10^3$	0.997 9	4.0
爱德万甜(edwin sweet)	100 ~ 2 000	$Y = 5.21X - 407.8$	0.999 9	4.0

表3 精密度与稳定性
Tab.3 Precision and stability

化合物 (compound)	精密度(precision), RSD/%			稳定性 (stability), RSD/%
	10 ng · mL ⁻¹	20 ng · mL ⁻¹	50 ng · mL ⁻¹	
苯甲酸(benzoic acid)	4.4	2.7	1.8	4.8
三氯卡班(triclocarban)	0.7	1.9	1.7	0.6
对氯间甲酚(4-chloro-3-methylphenol)	1.4	2.9	3.7	4.4
对氯间二甲酚(4-chloro-3,5-dimethylphenol)	4.7	3.5	4.2	4.7
邻苯基苯酚(o-phenylphenol)	2.9	4.8	4.5	4.8
苄氯酚(4-chloro-2-benzyl phenol)	4.6	4.1	3.2	4.1
溴氯芬(bromo chlorfen)	0.7	2.2	2.3	0.9
山梨酸(sorbic acid)	4.5	4.8	3.5	4.9
脱氢乙酸(dehydroacetic acid)	4.7	4.4	3.1	4.8
4-羟基苯甲酸甲酯(methyl 4-hydroxybenzoate)	2.5	1.2	0.9	1.9
4-羟基苯甲酸乙酯(ethyl 4-hydroxybenzoate)	3.6	0.6	0.9	2.2
4-羟基苯甲酸丙酯(propyl 4-hydroxybenzoate)	3.3	0.4	1.9	1.7
4-羟基苯甲酸丁酯(butyl 4-hydroxybenzoate)	1.5	1.8	3.1	2.8
4-羟基苯甲酸异丙酯(isopropyl 4-hydroxybenzoate)	1.5	2.7	3.7	4.1
4-羟基苯甲酸异丁酯(isobutyl 4-hydroxybenzoate)	3.9	4.8	2.7	4.8
肉桂酸(trans-cinnamic acid)	4.1	2.5	3.3	4.7
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)	3.9	4.4	4.9	3.1
苯氧乙酸(phenoxyacetic acid)	2.2	3.8	1.7	1.9
纽甜(neotame)	4.7	3.1	1.9	0.9
阿斯巴甜(aspartame)	2.1	3.9	4.7	3.8
三氯生(triclosan)	0.9	2.2	1.7	3.1
布罗波尔(2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)	4.7	2.9	4.2	3.6
甲基异噻唑啉酮(methyl isothiazolinone)	4.9	4.6	4.2	3.9
甲基氯异噻唑啉酮(methyl chlorisothiazolinone)	1.9	0.7	3.1	2.1
碘丙炔醇丁基氨基甲酸酯(iodopropynol butyl carbamate)	4.4	2.9	3.6	1.8
氯咪巴唑(climazol)	3.8	2.7	4.1	4.7
苄索氯铵(benzal chloramine)	3.9	2.3	4.1	3.6
十四烷基二甲基苄基氯化铵(tetradecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	4.3	0.9	3.2	2.1
十六烷基二甲基苄基氯化铵(cetalkonium chloride)	4.8	3.7	1.8	2.3
纳他霉素(natamycin)	4.3	4.7	3.4	3.7
4-羟基苯甲酸戊酯(4-hydroxybenzoic acid n-pentyl ester)	0.6	2.8	1.6	3.1
十二烷基二甲基苄基氯化铵(dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	1.8	4.4	3.5	1.7
4-羟基苯甲酸苯酯(4-hydroxybenzoic acid phenyl ester)	2.3	0.7	1.3	0.6
4-羟基苯甲酸苄酯(4-hydroxybenzoic acid benzyl ester)	1.7	2.5	1.1	1.4
噻苯咪唑(thiabendazole)	3.5	2.9	1.9	2.9
月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(ethyl lauroyl arginate hydrochloride)	3.4	4.5	3.4	3.9
糖精钠(saccharin sodium)	4.9	4.6	3.8	4.9
甜蜜素(molasses)	3.7	2.3	4.1	3.1
安赛蜜(acesulfame potassium)	4.7	3.4	2.9	4.6
没食子酸丙酯(propyl gallate)	1.9	3.2	2.7	3.1
丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole)	3.3	4.1	1.6	2.9
甜菊糖苷(stevioside)	4.7	3.4	1.3	2.1
瑞鲍迪甙A(rebaudioside A)	3.2	2.6	4.2	3.9
阿力甜(alitame)	4.5	2.9	3.7	3.1
爱德万甜(edwin sweet)	3.1	3.7	1.2	2.4
爱德万甜(edwin sweet)	3.1	3.7	1.2	2.4

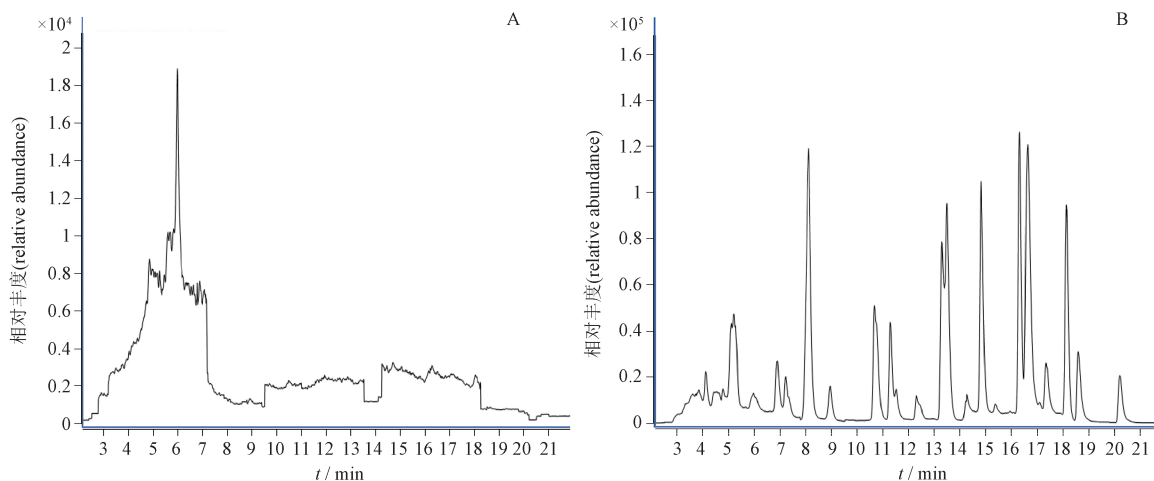


图 1 空白基质(A)与空白基质加标(B)定量离子对色谱图

Fig. 1 Quantitative ion pair chromatograms of blank matrix(A) and blank matrix added with standards(B)

2.7 稳定性 取质量浓度约为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各混合对照品溶液,分别放置 0、2、4、8、12 及 24 h 后,按“1.4”项下色谱条件分别进样进行测定,通过峰面积计算 45 个化合物的 RSD 均 $< 5.0\%$,表明在 24 h 内各化合物稳定性较好,其结果见表 3。

2.8 方法特异性 取市售经检查不含上述 45 种添加剂的中药口服液作为空白基质,考察了口服液空白基质和添加 45 个化合物组分后的色谱图。结果

如图 1~3 所示,表明中药口服液基质中存在的物质对本方法化合物基本没有干扰。

2.9 加标回收率与精密度 在空白样品中分别添加低、中、高 3 个浓度化合物,每个添加水平重复测定 6 次,计算平均加标回收率和日内精密度,结果见表 4。45 个化合物各添加水平的平均回收率为 $75.4\% \sim 118.4\%$; RSD 为 $0.70\% \sim 9.8\%$,均能满足定量分析的要求。

表 4 45 个化合物在中药口服液基质中的回收率和精密度 ($n=6$)

Tab. 4 Recoveries and RSDs of 45 compounds in oral liquid preparations of traditional Chinese medicine

化合物 (compound)	$0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		$0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		$1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	回收率 (recovery)/%	RSD/ %	回收率 (recovery)/%	RSD/ %	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
苯甲酸(benzoic acid)	77.5	6.8	86.2	6.8	90.2	5.6
三氯卡班(triclocarban)	77.3	9.3	99.2	1.7	114.5	5.6
对氯间甲酚(4-chloro-3-methylphenol)	75.8	6.4	84.8	7.7	111.7	6.3
对氯间二甲酚(4-chloro-3,5-dimethylphenol)	79.3	8.2	101.2	4.4	112.8	5.5
邻苯基苯酚(o-phenylphenol)	99.1	7.3	117.8	5.8	112.2	3.7
苯氯酚(4-chloro-2-benzyl phenol)	77.2	5.1	91.4	8.1	111.8	4.3
溴氯芬(bromo chlorfen)	108	2.2	112.3	4.7	109.8	5.7
山梨酸(sorbic acid)	76.5	7.8	85	5.8	89.7	4.4
脱氢乙酸(dehydroacetic acid)	109.7	7.4	113.1	5.2	91.8	4.9
4-羟基苯甲酸甲酯(methyl 4-hydroxybenzoate)	95.5	4.2	88.9	1.7	91.8	3.8
4-羟基苯甲酸乙酯(ethyl 4-hydroxybenzoate)	110.8	0.60	100.9	6.1	101.7	2.7
4-羟基苯甲酸丙酯(propyl 4-hydroxybenzoate)	103.3	5.4	107.9	2.9	110.8	1.3
4-羟基苯甲酸丁酯(butyl 4-hydroxybenzoate)	102.5	9.8	107.3	6.6	115.8	7.3
4-羟基苯甲酸异丙酯(isopropyl 4-hydroxybenzoate)	98.5	6.7	104.7	9.3	112.2	4.1

表 4(续)

化合物 (compound)	0.2 mg · kg ⁻¹		0.4 mg · kg ⁻¹		1.0 mg · kg ⁻¹	
	回收率 (recovery)/%	RSD/ %	回收率 (recovery)/%	RSD/ %	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
4-羟基苯甲酸异丁酯(isobutyl 4-hydroxybenzoate)	83.9	7.8	91.9	8.4	89.3	6.6
肉桂酸(<i>trans</i> -cinnamic acid)	76.6	9.5	86.7	8.4	93.2	7.1
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)	114.1	9.4	118.7	7.3	107.1	5.5
苯氧乙酸(phenoxyacetic acid)	78.2	7.9	109.3	7.3	98.4	4.5
纽甜(neotame)	77.6	6.7	87.3	5.6	107.3	5.8
阿斯巴甜(aspartame)	86.3	5.9	89.3	4.4	106.2	4.3
三氯生(triclosan)	90.2	9.2	104.1	7.7	110.5	4.8
布罗波尔(2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol)	90.2	7.7	101.3	5.1	84.9	3.8
甲基异噻唑啉酮(methyl isothiazolinone)	87.1	9.6	89.3	6.5	90.8	5.7
甲基氯异噻唑啉酮(methyl chlorisothiazolinone)	78.2	3.6	84.8	6.7	89.6	0.9
碘丙炔醇丁基甲酸酯(iodopropynol butyl carbamate)	75.4	5.9	83.6	4.2	90.2	4.4
氯咪巴唑(climazol)	97.8	3.7	107.1	6.8	116.4	1.6
苄索氯铵(benzal chloramine)	82.3	5.3	100.2	2.8	115.8	6.8
十四烷基二甲基苄基氯化铵(tetradecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	89.3	8.9	103.2	5.0	112.6	6.9
十六烷基二甲基苄基氯化铵(cetalkonium chloride)	108.5	9.7	97.8	6.3	113.4	5.1
纳他霉素(natamycin)	86.3	6.1	117.4	4.9	108.5	5.6
4-羟基苯甲酸戊酯(4-hydroxybenzoic acid n-pentyl ester)	113.5	2.8	108.6	7.9	102.3	5.5
十二烷基二甲基苄基氯化铵(dodecyl dimethyl benzyl ammonium chloride)	97.8	7.4	112.9	2.7	106.7	5.3
4-羟基苯甲酸苯酯(4-hydroxybenzoic acid phenyl ester)	102.8	0.7	111.7	6.5	108.6	4.1
4-羟基苯甲酸苄酯(4-hydroxybenzoic acid benzyl ester)	101.1	7.3	116.9	2.8	111.4	5.7
噻苯咪唑(thiabendazole)	93	3.9	114.9	7.2	103.1	4.8
月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(ethyl lauroyl arginate hydrochloride)	108.4	7.9	92.6	7.3	104.2	5.9
糖精钠(saccharin sodium)	77.9	6.4	83.8	4.1	96.8	5.4
甜蜜素(molasses)	76.7	6.3	87.4	6.6	90.1	5.1
安赛蜜(acesulfame potassium)	80.2	5.4	88.7	6.5	93.2	5.0
没食子酸丙酯(propyl gallate)	116.9	6.2	81.2	4.3	94	5.1
丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole)	76.3	6.1	84.5	6.5	89.7	5.7
甜菊糖苷(stevioside)	80.4	5.9	85.3	5.6	94.2	4.5
瑞鲍迪甙 A(rebaudioside A)	80.2	4.7	88.6	4.9	91.3	3.2
阿力甜(alitame)	75.8	6.5	83.2	3.4	90.3	4.7
爱德万甜(edwin sweet)	79.5	6.4	93.2	4.5	89.7	4.8

2.10 实际样品测定 采用本实验建立的方法,对从药房购买的 20 批中药口服液体剂样品进行检测,其中 3 批次清热解毒口服液、1 批次桔梗清咽合剂、1 批次气血康口服液以及 1 批次射麻口服液样品中检出苯甲酸,含量为 0.13%~0.27%;2 批次小儿

解表口服液样品中检出山梨酸、肉桂酸、甜蜜素;1 批次抗病毒口服液、1 批次甘草口服液、1 批次强力枇杷露样品中检出 4-羟基苯甲酸乙酯和安赛蜜;1 批次清热解毒口服液、1 批次小儿清热止咳口服液样品检出脱氢乙酸和糖精钠,其中不少样品的标签与说

说明书中均未注明含有相关添加剂化合物,其余样品未检出添加剂化合物。

3 分析与讨论

3.1 色谱条件的优化 实验中选择采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子同时扫描模式对45个化合物化合物进行了一级质谱全扫描和子离子扫描分析,筛选出响应较高的碎片离子作为目标化合物的定量、定性离子,同时筛选出最佳碰撞能量值。为了避免样品检测中出现假阳性的风险,在满足质谱响应和峰形的前提下,应尽可能多地采集一些目标化合物的碎片离子,从提高检测的准确性。由于目标化

合物较多以及对应的碎片离子也较多,采用传统的多反应监测方法(MRM)可能会使目标化合物碎片离子的色谱峰采集点不够,造成峰形差和灵敏度低,影响定性和定量结果准确。因此,实验中采用了动态多反应监测方法(DMRM),该模式采用保留时间和保留时间窗口2个参数,可以实现以目标化合物出峰时间为中心,在相应保留时间窗口范围内仅对单一目标化合物进行扫描,确保目标化合物色谱峰完整性的同时,提高了检测灵敏度和定性定量的准确性^[17]。45种添加剂总离子流图见图2,定量离子对色谱图见图3。

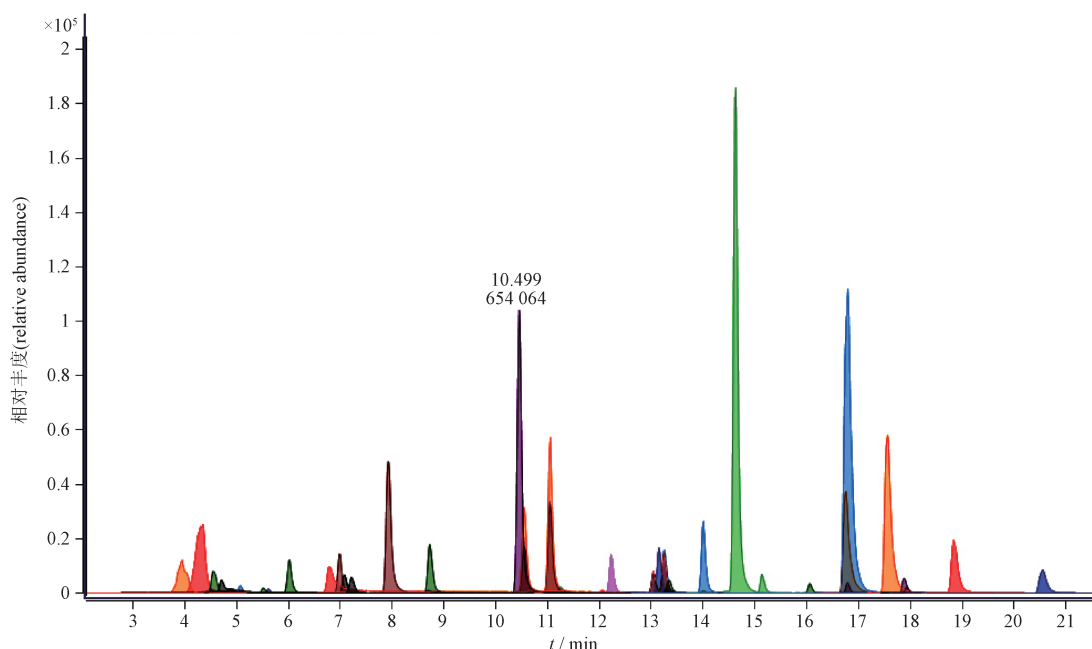


图2 45个化合物的总离子流图

Fig.2 TIC chromatogram of 45 compounds

3.2 提取条件的优化 研究中考察了不同提取试剂、混合比例以及不同甲酸浓度对目标化合物提取效果的影响,单独采用甲醇或者乙腈作为提取试剂时,甲基异噻唑啉酮、纳他霉素、苯甲酸、噻苯咪唑等化合物的峰形较差,综合考虑各化合物峰形及分离情况,采用乙腈-甲醇(9:1)提取。同时,进一步考察了甲酸浓度对目标化合物提取效果的影响,不加甲酸时山梨酸、对氯间甲酚、对氯间二甲酚、邻苯基苯酚等化合物响应差;甲酸浓度过高,安赛蜜、糖精钠、甜蜜素的峰形差,无法准确定量分析,考虑到各目标化合物的峰形以及响应,最终采用

0.1%甲酸。

4 结论

采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术,建立能同时检测中药口服液液体制剂中45种添加剂的高通量筛查方法,解决了目前中药口服液体制剂中添加剂一次性检测化合物少、检验方法不完善的缺陷,该方法操作简便、准确,检测成本较低,极大提高了中药口服液体制剂中多种添加剂的定性定量检测效率,能快速反映产品中添加剂的实际添加情况,对监测药品中添加剂的使用情况具有重要的意义。

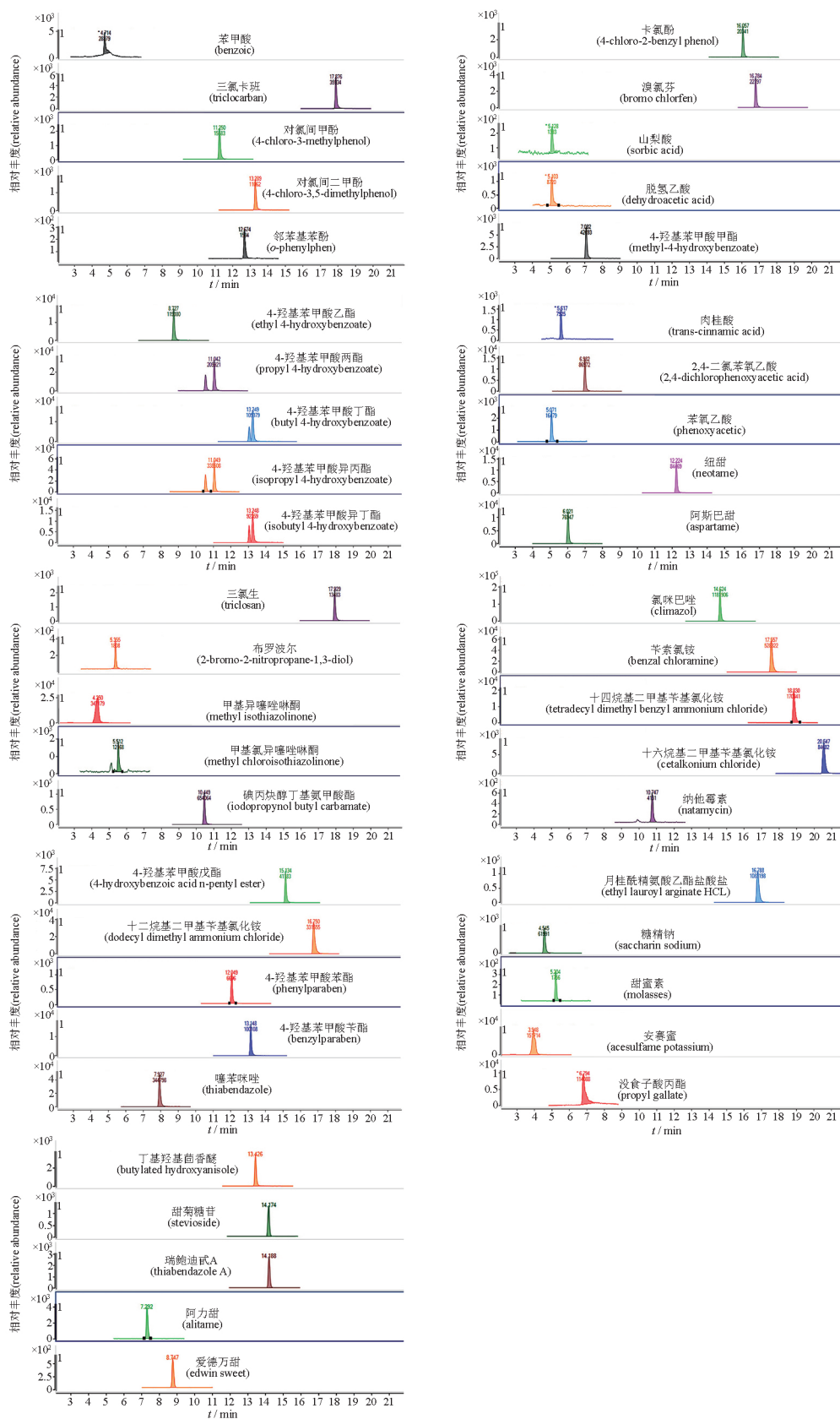


图 3 45 个化合物的定量离子对色谱图

Fig. 3 Quantitative ion pair chromatograms of 45 additives

参考文献

- [1] 李春蓉, 吴晓玲, 刘晓玲. 药品口服液中防腐剂抗菌防腐效力的测定[J]. 中国药师, 2003, 6(9): 561
LI CR, WU XL, LIU XL. Determination of antibacterial and anticorrosive efficacy of preservatives in drug oral liquid [J]. *China Pharm*, 2003, 6(9): 561
- [2] 丁茂柏. 防腐剂: 过量使用有危害[J]. 安全与健康, 2011, 26(17): 54
DING MB. Preservatives: overcommit can be harmful [J]. *Saf Health*, 2011, 26(17): 54
- [3] 王兆基, 关锡耀, 汪洁, 等. 液相色谱法测定口服中成药制剂中防腐剂含量[J]. 中成药, 2000, 22(5): 22
WANG ZJ, GUAN XG, WANG J, *et al.* Determination of preservative content in oral traditional Chinese patent medicine preparation by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2000, 22(5): 22
- [4] 马传江. 高效液相色谱-串联质谱法测定中药口服液中 23 种防腐剂[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1651
MA CJ. Simultaneous determination of 23 preservatives in traditional Chinese medicine oral liquid by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(9): 1651
- [5] 陆影, 曾敬其, 马金辰, 等. 中药大品种制造关键质量属性表征: 滋味质量属性的小儿感冒口服液口感配方优化策略研究与应用[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(13): 3488
LU Y, ZENG JQ, MA JC, *et al.* Critical quality attribute characterization of big brand TCM: taste formulation optimization strategy and application of Xiaoe Ganmao oral liquid based on taste quality attribute [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(13): 3488
- [6] 许有诚, 赵庄, 李丹凤. MEKC 法同时测定中药口服液体制剂中 10 种防腐剂和甜味剂含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 798
XU YC, ZHANG Z, LI DF. Simultaneous determination of 10 preservatives and sweeteners in oral liquid preparation of traditional Chinese medicine by MEKC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2023, 40(6): 798
- [7] 李会军, 刘伟强. 中药液体制剂中防腐剂的应用[J]. 中国野生植物资源, 1998, 17(4): 48
LI HJ, LIU WQ. Application of preservatives in liquid preparations of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Wild Plant Resources*, 1998, 17(4): 48-50
- [8] 陈安东, 吴兆伟, 余倩, 等. GC/MS 法同时分析液体制剂及口服液型保健品中 31 种防腐剂和抗氧化剂[J]. 质谱学报, 2014, 35(5): 438
CHEN AD, WU ZW, YU Q, *et al.* Simultaneous determination of 31 preservatives and antioxidants in liquid preparation and healthcare dietetic liquid by GC/MS [J]. *J Chin Mass Spect Soc*, 2014, 35(5): 438
- [9] 曾波, 陈睿彦, 李艳, 等. 气相色谱法同时测定中药口服液体制剂中的丙酸、山梨酸和苯甲酸[J]. 中国现代中药, 2017, 19(3): 439
ZENG B, CHEN RY, LI Y, *et al.* Simultaneous determination of propionic acid, sorbic acid and benzoic acid in oral liquid preparation of traditional Chinese medicine by capillary gas chromatography [J]. *Mod Chin Med*, 2017, 19(3): 439
- [10] 王亚琼, 钟水生, 周震宇, 等. HPLC-DAD-CAD 双检测器联用定量筛查清热解毒口服液中 14 个添加剂成分[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(12): 2136
WANG YQ, ZHONG SS, ZHOU ZY, *et al.* Quantitative screening of 14 additive components in Qingrejiedu oral liquid by HPLC-DAD-CAD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(12): 2136
- [11] 李健华, 黄锦波. 气相色谱法同时测定日化工业废水中 16 种防腐剂[J]. 化学分析计量, 2023, 32(6): 74
LI JH, HUANG JB. Simultaneous determination of 16 kinds of preservatives in waste water from daily chemical industry by gas chromatography [J]. *Chem Anal Meter*, 2023, 32(6): 74
- [12] 王骏, 胡梅, 张卉, 等. 超高效液相色谱快速测定饮料中的 16 种食品添加剂[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 195
WANG J, HU M, ZHANG H, *et al.* Rapid determination of sixteen kinds of food additives in beverages by ultra performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2010, 31(2): 195
- [13] 陈琦, 黄峻榕, 凌云, 等. 全二维气相色谱/飞行时间质谱快速定性筛查食品 32 种防腐剂和抗氧化剂[J]. 分析化学, 2011, 39(5): 723
CHEN Q, HUANG JR, LING Y, *et al.* Fast qualitative analysis of 32 preservatives and antioxidants in food sample by comprehensive two dimensional gas chromatography coupled time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(5): 723
- [14] 郑荣, 茹歌, 王柯. 高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 16 种防腐剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(19): 2758-2761
ZHENG R, RU G, WANG K. Simultaneous determination of 16 preservatives in cosmetics by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 26(19): 2758
- [15] 郑娟梅, 王警, 莫紫梅, 等. 高效液相-质谱联用技术在食品添加剂检测中的应用及研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2020, 394(5): 56
ZHENG JM, WANG J, MO ZM, *et al.* Application and research progress of high-performance liquid chromatography mass spectrometry in determination of food additives [J]. *Cereal Feed Ind*, 2020, 394(5): 56
- [16] 陈燕, 吕沈亮, 李永吉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中 30 种食品添加剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(2): 134
CHEN Y, LÜ SL, LI YJ, *et al.* Simultaneous determination of thirty food additives in food by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2021, 31(2): 134
- [17] 苏燕, 魏宇涛, 李澍才, 等. 超高效液相色谱串联质谱同时测定豆芽、豆干、火锅底料中喹诺酮类、磺胺类、硝基咪唑类、四环素类 42 种抗生素药物[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(1): 65
SU Y, WEI YT, LI SC, *et al.* Simultaneous determination of 42 antibiotics of quinolones, sulfonamides, nitroimidazoles and tetracycline in bean sprouts, dried tofu and hot pot seasoning by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2023, 35(1): 65

(本文于 2023 年 8 月 11 日收到)