

## HPLC-DAD-MS/MS 检测止咳平喘类中药制剂中 非法添加的 12 种化学药品

李奕婧<sup>1</sup>, 李晓琳<sup>2</sup>, 韩家忠<sup>1</sup>, 徐玉文<sup>3\*</sup>

(1. 滨州市食品药品检验检测中心, 山东 滨州 256602; 2. 烟台毓璜顶医院, 山东 烟台 264000;  
3. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101)

**摘要:** 建立止咳平喘类中药制剂中非法添加的 12 种化学药品的快速筛选方法。采用液相色谱-串联质谱法, 以 Kromasil100-5C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 流动相采用 0.3% 甲酸铵 (用甲酸调至 pH 2.97) 和甲醇进行梯度洗脱, 电喷雾电离 (ESI)、全扫描一级质谱和全扫描二级质谱扫描方式, 对止咳平喘类中药制剂中非法添加的 12 种化学药品进行筛选分析。建立了快速分离、检测止咳平喘类中药制剂中非法添加的 12 种化学药品的的方法, 检测限低于 50 ng。该方法专属性强、灵敏度高, 适用于止咳平喘类中药制剂中非法添加化学药品的筛选及确证工作。

**关键词:** 止咳平喘中药制剂; HPLC-DAD-MS/MS; 非法添加物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0959-05

## Screening for 12 mixed illegally cough-relieving chemical composition in anti-cough and antiasthmatic traditional Chinese medicines by HPLC-DAD-MS/MS

LI Yi-jing<sup>1</sup>, LI Xiao-lin<sup>2</sup>, HAN Jia-zhong<sup>1</sup>, XU Yu-wen<sup>3\*</sup>

(1. Binzhou Center for Food and Drug Control, Binzhou 256602, China; 2. Yantai Yuhuangding Hospital,  
Yantai 264000, China; 3. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

**Abstract:** This study was designed to establish a high performance liquid chromatography (diode array detector, DAD)-tandem mass chromatography (HPLC-DAD-MS/MS) method for the simultaneously screening 12 kinds of cough-relieving chemical drugs illegally added in anti-cough and antiasthmatic traditional Chinese medicines. This method involved liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The separation was conducted by Kromasil100-5C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the mobile phase was consisted of 0.3% ammonium formate (pH 2.97) and methanol. After separated by HPLC, the suspected components were analyzed by MS/MS and DAD and ultra scan was used to identify these illegally added drugs. A fast and sensitive HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneously screening for illegal chemical compositions was established. The LOD of these substances were below 50 ng. The method was sufficiently selective and sensitive to detect illegal chemical compositions in anti-cough and antiasthmatic traditional Chinese medicines.

**Key words:** anti-cough and antiasthmatic traditional Chinese medicine; HPLC-DAD-MS/MS; illegal chemical composition

收稿日期: 2016-11-30; 修回日期: 2017-02-02.

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项资助项目 (2012YQ180132).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-531-81216516, E-mail: 13553158409@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1130

哮喘已成为当今社会最普遍的一种疾病<sup>[1]</sup>。截止2013年11月,全球已有2.35亿人罹患哮喘<sup>[2]</sup>。由于环境污染等原因,哮喘患者的数量正逐年上升。虽然医药事业发展迅速,新药数量越来越多。然而,对于哮喘等慢性疾病而言,药物研发尚无重大突破。不法分子利用国人倾向于相信中药制剂具有低毒、低不良反应的心态,向中药制剂中违法添加化学药品,冠以“新、特药”的幌子误导消费者,不仅对大众的健康产生了严重的威胁,还对医药市场的有序发展造成了不良的影响。相对于化学药品而言,中药制剂成分较为复杂,而且各成分之间可能存在相互干扰,而药品检测质量标准不够完善,使药品检测受到一定的限制。

近年来,在止咳平喘类中药制剂中非法添加化学药品的现象屡有发生。除了盐酸二氧丙嗪<sup>[3]</sup>、磷酸苯丙哌林<sup>[4,5]</sup>、枸橼酸喷托维林<sup>[4,5]</sup>、硫酸特布他林<sup>[3,6]</sup>、富马酸酮替芬<sup>[3,7]</sup>、盐酸克伦特罗<sup>[3,7]</sup>等具有止咳平喘作用的化学药品可能被人为添加在所谓的“纯中药制剂”中。不法分子为了达到一定的治疗效果,还可能在该类制剂中加入盐酸氨溴索<sup>[3,8]</sup>、盐酸苯海拉明<sup>[4,5]</sup>、马来酸氯苯那敏<sup>[4,5]</sup>、磺胺甲噁唑<sup>[5]</sup>、地西洋<sup>[5]</sup>和醋酸泼尼松<sup>[5]</sup>等。

快速有效的检测中药制剂中是否存在非法添加化学药品业已成为药品检测的一个热点。文献报道有TLC法<sup>[3,4]</sup>与HPLC法<sup>[7,9]</sup>快速筛查中药制剂非法添加情况。本文采用液相色谱-串联质谱联用技术<sup>[10,11]</sup>,同时应用二极管阵列检测器进行检测,建立了同时检测止咳平喘类中药制剂中非法添加的12种化学药品的的方法。本方法专属性强、灵敏度高、准确度好,为快速筛选止咳平喘类中药制剂中非法添加化学成分提供了可靠的技术保障。

此外,部分药品如马来酸氯苯那敏<sup>[12,13]</sup>、地西洋<sup>[13,14]</sup>、磺胺甲噁唑<sup>[14]</sup>、醋酸泼尼松<sup>[12,14]</sup>等,除了在止咳平喘类中药制剂中存在非法添加现象,在抗炎镇痛类及抗风湿类中药制剂中也存在非法添加现象。故本法可以为其他类别中药制剂的非法添加检测提供参考。

## 材料与方法

**仪器** 美国 Agilent 1200/6320 Ion Trap LC-MS/MS (泵、自动进样器、二极管阵列检测器、柱温箱、电喷雾离子源、离子阱质量分析器及 ChemStation 工作站) 液质联用仪。

**药品与试剂** 对照品: 醋酸泼尼松 (100012-200706)、盐酸苯海拉明 (100066-200807)、磷酸苯丙

哌林 (0237-9701)、硫酸特布他林 (100273-199701)、盐酸二氧丙嗪 (10299-0001)、富马酸酮替芬 (100230-200602)、枸橼酸喷托维林 (100432-200401)、盐酸氨溴索 (100599-201203)、盐酸克伦特罗 (100072-200402) 和马来酸氯苯那敏 (100047-200606) 均由中国食品药品检定研究院提供; 地西洋 (1230-9601) 由国家麻醉品实验室提供; 磺胺甲噁唑 (130521) 由山东省食品药品检验研究院提供。甲醇、甲酸铵及甲酸均为色谱纯, 水为超纯水。9批样品分别产自河北、云南、广西、安徽、内蒙古等地的止咳平喘类中药制剂。

**色谱条件** 色谱柱: Kromasil 100-5C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 及 Phenomenex ODS3 柱 (250 mm × 4.6mm, 5 μm)。流动相 A: 0.3% 甲酸铵溶液 (用甲酸调至 pH 2.97); 流动性 B: 甲醇; A-B 为 0~5 min, 90 : 10→75 : 25; 5~25 min, 75 : 25→40 : 60; 25~40 min, 40 : 60; 40~40.1 min, 40 : 60→30 : 70; 40.1~50 min, 30 : 70; 50~50.1 min, 30 : 70→90 : 10; 共 70 min。流速: 0.7 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 35 °C; 检测波长: 225 nm。DAD 检测器, 扫描范围: 190~400 nm。

**质谱条件** 电喷雾离子源 (ESI); 分流比 3 : 1; 正离子模式; 雾化气压力: 33.0 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 干燥气流速: 12.0 mL·min<sup>-1</sup>; 干燥气温度: 300 °C; 毛细管电压: 3.5 kV; 破碎幅度: 1.00 V; 扫描方式采用全扫描一级质谱、全扫描二级质谱; 质量数范围: 50~450。12种对照品的准分子离子及主要碎片离子质荷比信息如表1所示。

**Table 1** MS experimental data of the chemical drugs

Drug	Quasi-molecular ion peak	Major fragment ion peak
Terbutaline sulfate	225.8	208.7 169.5 152.6
Sulfamethoxazole	253.6	187.5 159.7 130.6
Clenbuterol hydrochloride	278.7	260.7 202.5
Dioxopromethazine hydrochloride	316.8	271.7
Benproperine phosphate	309.8	224.7
Ambroxol hydrochloride	378.7	263.4
Chlorphenamine maleate	274.7	229.6
Diphenhydramine hydrochloride	255.6	167.5
Pentoxeryverine citrate	333.9	216.7 144.6
Ketotifen fumarate	309.9	125.6
Prednisone acetate	401.0	383.9 341.9
Diazepam	284.7	258.7

## 溶液配制

**对照品贮备液的配制** 精密称取盐酸克伦特罗 15.44 mg、盐酸二氧丙嗪 21.09 mg、磷酸苯丙哌林 13.38 mg、盐酸氨溴索 15.50 mg、马来酸氯苯那敏 16.25 mg、醋酸泼尼松 15.03 mg、地西洋 12.25 mg、硫酸特布他林 21.09 mg、磺胺甲噁唑 20.94 mg、盐酸苯海拉明 19.38 mg、枸橼酸喷托维林 39.98 mg 及富马酸酮替芬 25.31 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**对照品溶液的配制** 取对照品贮备液 1 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 用流动相 A-B (60 : 40) 稀释至刻度, 即得。

**供试品溶液的配制** 取样品 10 粒 (片/包), 混匀, 研细, 取约相当于一次口服剂量, 加甲醇 50 mL, 超声 10 min 并不断振摇, 放冷至室温, 滤过; 取续滤液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相 A-B (60 : 40) 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

## 方法学考察

**专属性** 取制剂处方项下中药材适量, 加水-甲醇 (60 : 40) 200 mL 超声 30 min, 过滤, 即得专属性实验贮备液。取专属性实验贮备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用流动相 A-B (60 : 40) 稀释至刻度, 摇匀, 即得专属性实验阴性溶液。取专属性实验贮备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别加入对照品贮备液 1 mL, 用流动相 A-B (60 : 40) 稀释至刻度, 摇匀, 即得专属性实验阳性溶液。精密量取专属性实验阴性溶液、专属性实验阳性溶液各 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 采用 Kromasil100-5C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 以保留时间和分离度进行考察。

**检测限与定量限** 取对照品溶液适量, 加流动相 A-B (60 : 40) 逐级稀释制成适宜浓度的溶液, 采用 Kromasil100-5C18 柱, 按信噪比 3 计算检测限; 按信噪比 10 计算定量限。

**精密度** 精密量取对照品溶液 20  $\mu$ L, 采用 Kromasil100-5C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD%。

**线性与范围** 取对照品贮备液适量, 加流动相 A-B (60 : 40) 配制一系列线性实验溶液。采用 Kromasil100-5C18 柱, 分别取各线性实验溶液注入液相色谱仪测定, 以浓度和相应的峰面积进行线性回归分析, 计算线性与范围。

**回收率** 取对照品贮备液 0.8、1.0 和 1.2 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 用供试品溶液稀释至刻度, 作为回收率实验溶液 (配制相当于各对照品浓度 80%、

100% 和 120% 的溶液)。采用 Kromasil100-5C18 柱, 按“色谱条件”项下操作, 计算 12 种化学药品的平均回收率 ( $n=3$ )。

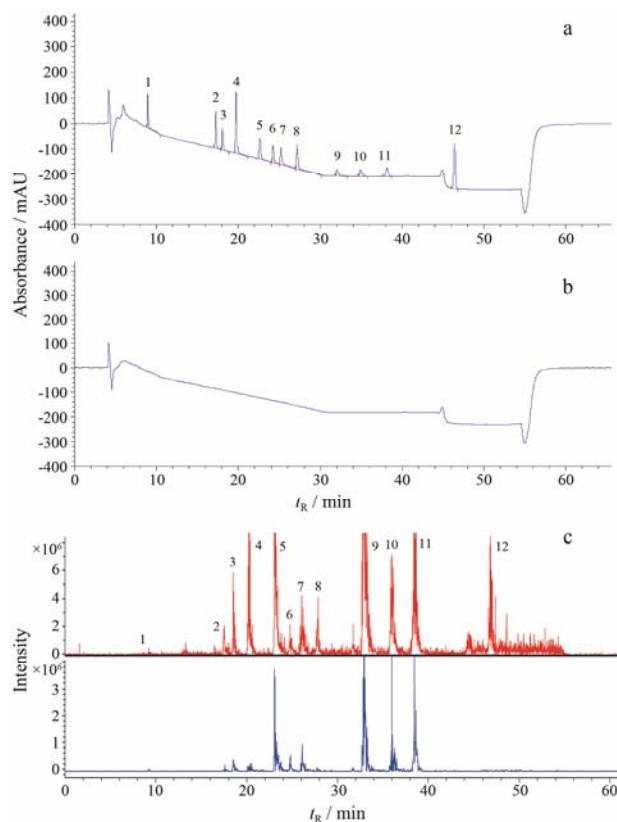
**耐用性** 精密量取对照品溶液 20  $\mu$ L, 选用 Phenomenex ODS3 柱, 按“色谱条件”项下操作, 记录色谱图。

**样品测定** 精密量取供试品溶液与对照品溶液各 3  $\mu$ L, 按“色谱条件”及“质谱条件”项下操作, 按随行标准曲线计算含量。

## 结果

### 1 方法学验证

**1.1 专属性** 专属性实验表明, 12 种化学药品分离度良好, 见图 1。说明本法专属性强, 适用于止咳平喘类中药制剂中非法添加化学成分的测定。



**Figure 1** HPLC chromatograms of the exclusion test ( $\lambda=225$  nm). a: Positive solution of the exclusion test; b: Negative solution of the exclusion test; c: Total ion current. 1: Terbutaline sulfate (8.93 min); 2: Sulfamethoxazole (17.23 min); 3: Clenbuterol hydrochloride (18.05 min); 4: Dioxopromethazine hydrochloride (19.70 min); 5: Benproperine phosphate (22.60 min); 6: Ambroxol hydrochloride (24.23 min); 7: Chlorphenamine maleate (25.18 min); 8: Diphenhydramine hydrochloride (27.15 min); 9: Pentoxeryverine citrate (32.04 min); 10: Ketotifen fumarate (34.92 min); 11: Prednisone acetate (38.16 min); 12: Diazepam (46.40 min)

**Table 2** Technology experimental data of the 12 kinds of chemical drugs

Drug	LOD /ng	LQD /ng	Precision /%	Linear equation	<i>r</i>	Range /ng·mL <sup>-1</sup>	Average recovery (RSD/%)
Terbutaline sulfate	5.8	19	0.36	$y = 3.3 \times 10^4 x + 51.83$	0.999 0	6.75–67.5	97.9% (1.67)
Sulfamethoxazole	6.0	20	0.29	$y = 5.2 \times 10^4 x + 14.78$	1.000 0	6.70–67.0	98.1% (0.24)
Clenbuterol hydrochloride	6.6	29	0.38	$y = 4.5 \times 10^4 x - 0.75$	1.000 0	4.94–49.4	98.4% (0.37)
Dioxopromethazine hydrochloride	2.6	8.8	0.29	$y = 1.4 \times 10^5 x - 11.59$	1.000 0	6.75–67.5	97.9% (0.41)
Benproperine phosphate	3.8	13	0.37	$y = 9.7 \times 10^4 x - 20.87$	1.000 0	4.28–42.8	98.1% (0.49)
Ambroxol hydrochloride	7.1	38	0.49	$y = 3.9 \times 10^4 x - 3.08$	1.000 0	4.96–49.6	95.3% (0.36)
Chlorphenamine maleate	12	47	0.75	$y = 4.4 \times 10^5 x - 49.22$	0.999 9	5.20–52.0	99.4% (1.6)
Diphenhydramine hydrochloride	8.2	33	0.43	$y = 4.6 \times 10^4 x - 22.95$	1.000 0	6.20–62.0	99.6% (0.58)
Pentoxifyverine citrate	49	220	1.38	$y = 8.6 \times 10^4 x - 4.54$	1.000 0	12.8–128	97.6% (0.71)
Ketotifen fumarate	44	170	1.17	$y = 1.6 \times 10^4 x - 23.24$	0.999 9	8.10–81.0	98.6% (1.15)
Prednisone acetate	16	91	1.18	$y = 3.8 \times 10^4 x - 37.71$	0.999 8	4.81–48.1	98.3% (1.02)
Diazepam	3.0	10	0.51	$y = 1.6 \times 10^5 x + 23.42$	1.000 0	3.92–39.2	99.1% (0.36)

**1.2 检测限、定量限、精密度、线性与范围、回收率及耐用性** 本法的检测限、定量限、精密度、线性与范围及回收率结果见表 2。结果表明该方法精密度及耐用性良好,在一定范围内具有较好的线性关系。

## 2 样品测定

对市场流通的 9 批样品进行检测,结果显示,5 批样品中存在非法添加的化学药品。3 批样品中检出盐酸二氧丙嗪,其含量以每日口服剂量计分别为 44.8、53.6、76.6 mg; 其中 1 批同时非法添加了盐酸二氧丙嗪与马来酸氯苯那敏,马来酸氯苯那敏的含量以每日口服剂量计为 57.6 mg。1 批检出盐酸氨溴索,其含量以每日口服剂量计为 218.4 mg。1 批检出醋酸泼尼松,其含量以每日口服剂量计为 117.6 mg。

## 讨论

现行的《药品检验补充检验方法和检验项目批准件》(批准件编号 2009031) 中包含 8 种化学药品的检验方法,但该方法不能同时检出此 8 种药品。本文根据文献报道,将可能存在的非法添加的化学药品增至 12 种,并优化色谱条件,实现一次性检测 12 种药品。

由于 12 种化学药品的最大吸收波长分布在 215~240 nm 之间,采用 225 nm 作为检测波长。采用正、负离子扫描模式对 12 种化学成分进行质谱检测时,发现负离子模式下,绝大部分成分响应较低,因此,采用正离子扫描模式。

本文采用的色谱条件,可以高效检出共 12 种化学成分,并采用保留时间、光谱、准分子离子峰及碎片离子峰共 4 个指标用以定性,可以降低检验结果的假阳性,本方法除枸橼酸喷托维林和富马酸酮替芬的检测限大于 40 ng 外,其余 10 种化学成分的检测限均低于 20 ng,各药品的检测限均显著低于其每

日最低剂量。本方法准确度好、灵敏度高、专属性强且简便快捷,对于止咳平喘类中药制剂及保健品的非法添加检测具有较强的应用价值。

## References

- [1] Li Z. Asthma, mainly resulted from air pollution, has become one of the most common diseases in the world [EB/OL]. 2014-05-04 [2017-02-10]. [http://news.china.com.cn/world/2014-05/04/content\\_32278782.htm](http://news.china.com.cn/world/2014-05/04/content_32278782.htm).
- [2] World Health Organization. Asthma [EB/OL]. 2013-11 [2017-02-10]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/zh/>.
- [3] Wang TS, Tong Y, Zheng J, et al. Detection of 29 adulterations in lipid-regulating, antihypertensive, antitussive and antiasthmatic herbal remedies by TLC [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2010, 45: 857–861.
- [4] Xu YW, Li B, Zheng J. Identification of four chemical substances added into traditional Chinese medicine for relieving cough and asthma illegally by TLC [J]. *Drug Stand China (中国药品标准)*, 2011, 12: 58–60.
- [5] Chen XH, Qin J, Su J, et al. Determination of 8 kinds of chemical medicines illegally added in traditional Chinese medicines for relieving cough and asthma by UPLC-Q-TOF [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formula (中国实验方剂学杂志)*, 2015, 21: 64–67.
- [6] Wang ZY, Li D, Wen HM, et al. Screening for 18 mixed illegally cough-relieving chemical composition in health food by LC-MS/MS [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2012, 30: 172–175.
- [7] Song XZ, Li L, Zhang ZQ. HPLC-MS/MS studies on separation and identification of antitussive in Chinese medicine [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2010, 30: 1822–1828.
- [8] Lin N, Chen XY, Song B, et al. Determination of ambroxol

- and clenbuterol in human plasma by LC-MS/MS method [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, 42: 308–313.
- [9] Liu KJ, Li MF. Assay and content uniformity of dioxopromethazine hydrochloride in compound paracetamol and zinc gluconate tablets by HPLC [J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2006, 7: 33–35.
- [10] Wang YH, Li B, Chen Z. Simultaneous determination of seven antimicrobial agents in adulterated herbal medicines for relieving cough and asthma by HPLC-DAD [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2014, 49: 683–687.
- [11] Zhang CY, Li ZG, Xu JL. Study on determination of prednisone acetate and dexamethasone acetate in traditional Chinese medicinal preparation for antitussive and antiasthmatics by UPLC-MS/PDA [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2009, 44: 226–228.
- [12] Huang YY, Tu JH, Xu HX, et al. Rapid determination of anti-inflammatory and analgesic chemicals illegally added into Chinese patent medicine and health foods by UPLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 246–254.
- [13] Huang L, Lai WH, Yang N, et al. Identification of chemicals added illegally into Chinese patent medicine of cold cure [J]. *Med Pharm J Chin PLA* (解放军医药杂志), 2013, 25: 74–75.
- [14] Li XQ, Tan M, Jiang CJ, et al. Rapid screening of 24 chemicals added illegally in anti-rheumatic herb preparations and health foods by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2014, 36: 1891–1894.