

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.05.023

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

杜远东¹, 穆思芊¹, 丁伟¹, 赵重博²

(1. 陕西省汉中市食品药品监督检验检测中心, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)
摘要:目的 建立同时检测中药软膏剂中非法添加的9种糖皮质激素的高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。方法 色谱柱为Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm), 流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为0.3 mL/min, 柱温为40℃, 进样量为5 μL; 采用电喷雾电离, 以多重反应监测模式正离子扫描。结果 8批样品中氢化可的松、曲安奈德、氟轻松、曲安奈德醋酸酯、氟轻松醋酸酯、倍他米松戊酸酯、氯倍他索丙酸酯、倍他米松双丙酸酯、倍氯米松双丙酸酯分别在各测定质量浓度2.38~232.05 ng/mL、2.09~203.92 ng/mL、2.25~219.90 ng/mL、2.36~230.39 ng/mL、2.21~216.09 ng/mL、2.19~213.81 ng/mL、2.17~212.05 ng/mL、1.99~194.75 ng/mL、2.17~211.99 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9903$); 检测限为0.60~2.20 ng/mL, 定量限为2.19~6.63 ng/mL; 精密密度、重复性、稳定性试验结果的RSD均小于10%; 加样回收率为82.22%~110.58%, RSD为2.33%~9.87% ($n=18$)。仅1批样品中检出氯倍他索丙酸酯, 含量为8.35 μg/g; 其余样品中均未检出这9种糖皮质激素。结论 该方法灵敏度高、重复性好, 可用于同时检测中药软膏剂中非法添加糖皮质激素。
关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 中药软膏剂; 糖皮质激素; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)05-0096-04

Simultaneous Determination of Nine Glucocorticoids in Herbal Ointment by HPLC-MS/MS

DU Yuandong¹, MU Siqian¹, DING Wei¹, ZHAO Chongbo²

(1. Hanzhong Center for Food and Drug Control, Hanzhong, Shaanxi, China 723000; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous determination of nine kinds of glucocorticoids illegally added in herbal ointment. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu Shim-pack VP ODS C₁₈ column (150 mm×2.1 mm, 3 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 5 μL. Electrospray ionization (ESI) was used for positive ion scanning by multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** Among the eight batches of samples, the linear ranges of hydrocortisone, triamcinolone acetonide, fluocinolone, triamcinolone acetonide acetate, fluocinonide, betamethasone valerate, clobetasopropionate, betamethasone dipropionate and beclomethasone dipropionate were 2.38-232.05 ng/mL, 2.09-203.92 ng/mL, 2.25-219.90 ng/mL and 2.36-230.39 ng/mL, 2.21-216.09 ng/mL, 2.19-213.81 ng/mL, 2.17-212.05 ng/mL, 1.99-194.75 ng/mL, 2.17-211.99 ng/mL ($r \geq 0.9903$), respectively. The limit of detection (LOD) of nine glucocorticoids was in the range of 0.60-2.20 ng/mL and the limit of quantitation (LOQ) of nine glucocorticoids was in the range of 2.19-6.63 ng/mL. The RSDs of the precision, repeatability and stability tests were less than 10%. The average recoveries of nine glucocorticoids were in the range of 82.22%-110.58% with RSDs of 2.33%-9.87% ($n=18$). Clobetasopropionate was detected in only one batch of samples with the content of 8.35 μg/g, but the above nine glucocorticoids were not detected in other samples. **Conclusion** The method has high sensitivity and good repeatability, which can be used for the simultaneous determination of illegally added glucocorticoids in herbal ointment.

Key words: HPLC-MS/MS; herbal ointment; glucocorticoids; content determination; quality control

近年来,中成药或保健食品中检测出非法添加化学药的现象时有发生,特别是中药软膏制剂中非法添加糖皮质激素类药物的现象突出。糖皮质激素是由肾上腺皮质分泌的一类甾体类化合物,与糖、脂肪、蛋白质的代谢和生长发育密切相关,具有抗感染、抗过敏、抑制免疫反应等多种药理学作用^[1],临床主要用于治疗

肾上腺皮质功能紊乱,自身免疫性疾病如肾病型慢性肾炎、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎,变态反应性疾病如支气管哮喘、感染性疾病、休克,器官移植的排斥反应,眼科疾病^[2],尤其适用于皮肤炎症,长期使用会产生癍痕、皮炎、感染等严重副作用,危害人体健康^[3]。常用于检测中成药中非法添加化学药物的方法有物理化

第一作者:杜远东,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为食品药品检验检测,(电子信箱)1069194721@qq.com。

学鉴别法、薄层色谱法、高效液相色谱法、液质联用法、红外光谱法、拉曼光谱法等^[4-9],目前主要采用高效液相色谱法和液质联用法^[10-12]检测食品、药品、化妆品中糖皮质激素等非法添加成分。由于中药软膏剂基质复杂,已有药品中糖皮质激素的检测方法难以对其进行准确、快速筛查。本研究中建立了适用于日常监督检查中快速检测中药软膏制剂中氢化可的松、曲安奈德、氟轻松、曲安奈德醋酸酯、氟轻松醋酸酯、倍他米松戊酸酯、氯倍他索丙酸酯、倍他米松双丙酸酯、倍氯米松双丙酸酯9种糖皮质激素的高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);API 3200型三重四极杆质谱仪,配有Analyst1.6工作站,电喷雾离子源(ESI,美国AB公司);BT 261型电子分析天平(瑞士梅特勒公司,精度为十万分之一);Nexpower 1000型纯化水仪(韩国Human公司);Transferpette型可调移液器(德国Brand公司);KQ-250DE型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz);TG16-WS型离心机(湘仪离心机仪器有限公司);MX-E型涡旋仪(大龙兴创实验仪器<北京>有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);甲酸(色谱纯,成都科龙化工试剂厂);水为实验室自制一级水。氢化可的松对照品(批号为100152-201707,纯度为99.2%),曲安奈德对照品(批号为100055-201804,纯度为98.8%),曲安奈德醋酸酯对照品(批号为100125-201406,纯度为99.1%),氟轻松醋酸酯对照品(批号为100010-201108,纯度为99.6%),倍他米松戊酸酯对照品(批号为510017-201301,纯度为99.5%),氯倍他索丙酸酯对照品(批号为100302-201804,纯度为99.2%),倍他米松双丙酸酯对照品(批号为100596-201902,纯度为99.2%),倍氯米松双丙酸酯对照品(批号为100119-201805,纯度为98.8%),均购于中国食品药品检定研究院;氟轻松对照品(迈迪嘉<天津>科技有限公司,批号为ALT600756,纯度为98.1%)。中药软膏样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈柱(150 mm×2.1 mm,3 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min时5%B→55%B,

表1 中药软膏样品信息

Tab. 1 Information of herbal ointment samples

序号	样品名称	生产企业	批号
1	黄皮肤儿童抑菌乳膏	江西xxx药业有限公司	20200501
2	夫专家冬宝抑菌软膏	武汉xxx生物医药有限公司	19110041
3	宝宝肤专家抑菌软膏	武汉xxx生物医药有限公司	20040075
4	益灼康皮肤抑菌膏	河南省xxx药业有限公司	20190816
5	夫专家芦荟抑菌乳膏	武汉xxx生物医药有限公司	20050022
6	香荷止痒软膏	广东xxx制药厂有限公司	190802
7	除湿止痒软膏	四川xxx药业有限公司	201002
8	丹皮酚软膏	长春xxx制药股份有限公司	201124

2~6 min时55%B→85%B,6~7 min时85%B→5%B,7~10 min时5%B);流速:0.3 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μL。

2.1.2 质谱条件

离子源:ESI,多重反应监测,正离子扫描;离子化电压:5 500 V;温度:550℃;气帘气:30 psi;喷雾气:50 psi;辅助加热气:55 psi;碰撞气:氮气;碰撞池入口电压:10 V;碰撞池出口电压:3 V。被测组分相关质谱参数见表2。

表2 9种糖皮质激素的相关质谱参数

Tab. 2 LC-MS/MS parameters of nine glucocorticoids

序号	糖皮质激素	相对分子质量	母离子(m/z)	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)	碰撞电压(V)	去簇电压(V)
1	氢化可的松	362.46	363.2	121.0	105.1	30	40
2	曲安奈德	434.50	435.2	338.9	396.9	26	35
3	氟轻松	452.48	453.2	121.0	337.2	25	30
4	曲安奈德醋酸酯	476.53	477.2	338.9	320.8	23	30
5	氟轻松醋酸酯	494.52	495.2	120.8	337.0	26	40
6	倍他米松戊酸酯	476.57	477.3	354.9	278.8	25	30
7	氯倍他索丙酸酯	466.97	467.2	372.9	354.9	17	25
8	倍他米松双丙酸酯	504.58	505.2	318.9	278.9	22	30
9	倍氯米松双丙酸酯	521.05	521.2	503.0	319.0	20	35

注:m/z为质荷比。

Note:m/z is the mass-charge ratio.

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取氢化可的松、曲安奈德、氟轻松、曲安奈德醋酸酯、氟轻松醋酸酯、倍他米松戊酸酯、氯倍他索丙酸酯、倍他米松双丙酸酯、倍氯米松双丙酸酯对照品各10 mg,精密称定,分别置25 mL棕色容量瓶中,加乙腈溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为400 μg/mL的对照品贮备液;分别精密量取各对照品贮备液适量,加乙腈稀释成质量浓度为50 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液:取混合均匀的样品0.2 g,精密称定,置10 mL具塞比色管中,加入饱和氯化钠溶液1 mL,涡

旋30 s,再加入乙腈2 mL,涡旋30 s,加入乙腈近刻度,超声提取30 min,冷却至室温,加入乙腈定容,摇匀,以4 000 r/min的转速离心10 min,取上清液,0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

基质标准曲线溶液:取上述混合对照品溶液,逐级稀释成质量浓度为20.0,10.0,4.0,2.0,0.5,0.2 μg/mL的系列标准溶液。将不含9种待测激素组分且基质组成与供试品相近的样品作为空白样品,取6份,各0.2 g,精密称定,分别置10 mL比色管中。分别加入上述系列标准溶液0.1 mL^[13-14],按供试品溶液制备方法制成氢化可的松、曲安奈德、氟轻松、曲安奈德醋酸酯、氟轻松醋酸酯、倍他米松戊酸酯、氯倍他索丙酸酯、倍他米松双丙酸酯、倍氯米松双丙酸酯质量浓度分别为2,5,20,40,100,200 ng/mL系列基质标准曲线溶液。

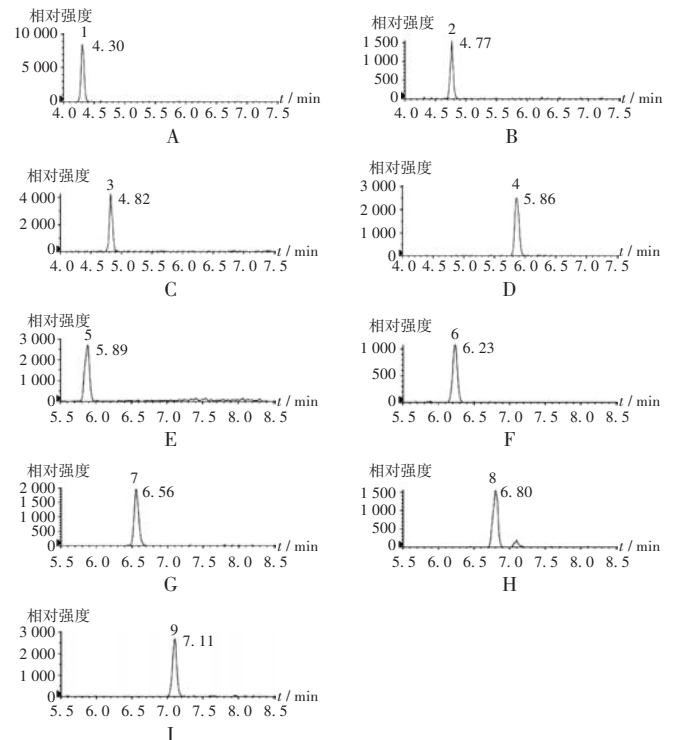
阴性样品溶液:取不含9种待测激素组分的样品,按供试品溶液制备方法制备溶液,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下混合对照品溶液和阴性样品溶液各适量,按2.1项下色谱与质谱条件进样分析,记录多重反应监测色谱图。结果阴性样品溶液色谱中在对照品溶液色谱出峰时间处无相应吸收峰,提示其他成分对其测定无干扰。详见图1。

线性关系考察、定量限与检测限确定:取2.2项下系列基质标准曲线溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积积分值,以各组分质量浓度(X ,ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表3。取2.2项下系列基质标准曲线溶液,逐级稀释,按2.1项下色谱与质谱条件进样分析,当信噪比(S/N)为10:1时,得各化合物的定量限;当 S/N 为3:1时,得各化合物的检测限。结果见表3。

精密度试验:取2.2项下系列基质标准曲线溶液,



1. 氢化可的松 2. 曲安奈德 3. 氟轻松 4. 曲安奈德醋酸酯
5. 氟轻松醋酸酯 6. 倍他米松戊酸酯 7. 氯倍他索丙酸酯
8. 倍他米松双丙酸酯 9. 倍氯米松双丙酸酯

A - I. 混合对照品溶液

图1 9种糖皮质激素定量离子对的多重反应监测色谱图

1. Hydrocortisone 2. Triamcinolone acetonide 3. Fluocinolone
4. Triamcinolone acetonide acetate 5. Fluocinonide 6. Betamethasone valerate
7. Clobetasopropionate 8. Betamethasone dipropionate
9. Beclomethasone dipropionate

A - I. Mixed reference solution

Fig. 1 MRM chromatograms of quantitative ion pairs of nine glucocorticoids

按2.1项下色谱与质谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果氢化可的松、曲安奈德、氟轻松、曲安奈德醋

表3 9种糖皮质激素的线性关系考察结果、检测限与定量限、加样回收试验结果

Tab. 3 Results of the linear relation test, LOD, LOQ and the recovery test of nine glucocorticoids

糖皮质激素	线性回归方程	相关系数 (r)	线性范围 (ng/mL)	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)	低浓度水平		中浓度水平		高浓度水平	
						$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
氢化可的松	$Y = 288.0X + 643$	0.997 2	2.38~232.05	0.60	2.38	83.79	4.78	105.07	4.84	93.09	2.70
曲安奈德	$Y = 84.3X + 159$	0.990 3	2.09~203.92	1.40	4.18	101.63	8.50	107.47	2.33	96.19	4.76
氟轻松	$Y = 159.0X + 370$	0.994 7	2.25~219.90	1.40	4.50	85.70	8.41	110.58	8.50	87.78	3.66
曲安奈德醋酸酯	$Y = 200.0X + 1\ 130$	0.992 7	2.36~230.39	0.60	2.36	102.47	7.77	108.12	6.26	89.94	4.44
氟轻松醋酸酯	$Y = 224.0X + 561$	0.991 5	2.21~216.09	2.20	6.63	96.44	9.87	105.94	5.67	84.92	2.63
倍他米松戊酸酯	$Y = 112.0X + 122$	0.991 9	2.19~213.81	0.60	2.19	89.67	8.41	107.95	8.84	98.35	7.29
氯倍他索丙酸酯	$Y = 158.0X + 181$	0.996 3	2.17~212.05	1.40	4.34	92.49	8.91	107.90	9.23	94.23	5.74
倍他米松双丙酸酯	$Y = 194.0X + 274$	0.996 9	1.99~194.75	2.00	6.00	82.22	7.80	104.77	5.32	99.24	7.19
倍氯米松双丙酸酯	$Y = 166.0X + 562$	0.994 8	2.17~211.99	2.20	6.57	83.65	7.71	108.39	4.72	88.61	8.93

酸酯、氟轻松醋酸酯、倍他米松戊酸酯、氯倍他索丙酸酯、倍他米松双丙酸酯、倍氯米松双丙酸酯峰面积的RSD分别为3.13%, 4.47%, 4.07%, 3.56%, 4.24%, 3.96%, 3.05%, 3.66%, 3.61% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验:取2.2项下阴性样品溶液6份,分别精密加入等量2.2项下对照品贮备液,使各激素含量均为0.2 mg/g,按2.2项下方法制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,记录6份供试品溶液中9种激素含量。结果各激素含量的RSD均小于10% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验^[15]:取重复性试验项下的供试品溶液1份,置室温下避光保存,分别于0, 2, 4, 6, 8, 12 h时按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积。结果各激素峰面积的RSD均小于8% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

加样回收试验^[15]:取2.2项下混合对照品溶液,用乙腈稀释10倍,得质量浓度为5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液;取阴性样品0.2 g,精密称定,共18份,按低、中、高浓度水平分别加入上述混合对照品溶液10, 80, 400 μL ,平行3份。按供试品溶液制备方法制备加标供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算含量和加样回收率。结果见表3。

2.4 样品含量测定

取8批样品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱与质谱条件进样测定,采用外标法计算样品中各组分的含量。结果仅1批样品检出氯倍他索丙酸酯,含量为8.35 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法优化

曾考察涡旋振摇和超声提取方法,以及不同提取时间(10, 20, 30, 40 min),结果超声提取的回收率高于涡旋振摇提取,且超声提取30 min的回收率趋于稳定。曾考察离心过滤和固相萃取2种方法用于溶液净化,结果离心过滤的回收率高于固相萃取,且简便易行。

3.2 色谱条件优化

考察了 C_{18} 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μm)和 C_{18} 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μm)对测定结果的影响,结果3 μm 粒径 C_{18} 柱的分离度和峰形均优于5 μm 粒径 C_{18} 柱。流动相的有机相考察了乙腈和甲醇,乙腈的分离效果和洗脱能力均优于甲醇,水相考察了水、0.1%甲酸水溶液和0.1%乙酸水溶液,0.1%甲酸水溶液的色谱峰强度高于水和0.1%乙酸水溶液。采用梯度洗脱

有助于化合物的快速洗脱,减少色谱峰的拖尾现象,且在流动相中加入少量乙酸有利于化合物的离子化,可提高灵敏度。

3.3 方法评价

建立的LC-MS/MS法灵敏度高、专属性强、重复性好,可用于同时检测中成药软膏剂中非法添加的糖皮质激素类化学成分。

参考文献

- [1] 谢 凯,黄碧瑜,劳海燕. 糖皮质激素药理特性及其药物制剂的探讨[J]. 深圳中西医结合杂志,2018,28(12):191-192.
- [2] 李祥山. 分析糖皮质激素药理特性及其药物制剂的研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(95):198.
- [3] 张堂德,邓 俐,王瑞华. 外用糖皮质激素的副作用及防治[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2012,19(4):263-266.
- [4] 宁素云,卢方正,郭兴杰. 中成药中非法掺入对乙酰氨基酚的检测方法研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1171-1172.
- [5] 于亚男,胡立立,安 宇. 丹参中非法添加9种黄色合成色素薄层色谱鉴别[J]. 亚太传统医药,2017,13(15):15-17.
- [6] 童 杨,孙 蓓,罗欣杰,等. 高效液相色谱法检测中成药中非法添加的布洛芬[J]. 化工技术与开发,2020,49(4):48-50.
- [7] 刘 静,姜 鑫,曲绪楷,等. 高效液相色谱-质谱联用法快速检测中成药和保健食品中非法添加的12种减肥类药物[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(8):2518-2523.
- [8] 张昊天,孙 超,宋志铭. 近红外聚类分析法快速检验中成药及保健品中的非法添加4种降糖类物质[J]. 黑龙江医药,2017,30(2):237-241.
- [9] 董晶晶,郝 翔. 激光拉曼光谱法测定中药三七花中非法添加的化学降压药[J]. 中国药师,2017,20(2):391-393.
- [10] 雷玉萍,殷 帅,吴公平. 中成药和保健食品中非法添加肾上腺皮质激素类药物的检测方法研究[J]. 中医药导报,2009,15(5):81-83.
- [11] 潘 军. HPLC法筛查中药软膏制剂中非法添加的17种糖皮质激素[J]. 中成药,2014,36(11):2323-2326.
- [12] 徐 硕,金鹏飞,何笑荣,等. 检测抗风湿类中成药和保健品非法添加化学药物的研究进展[J]. 西北药学杂志,2018,33(1):133-136.
- [13] 傅小红,李 芳,姜 伟. QuEChERS结合LC-MS/MS法用于消字号乳膏产品中糖皮质激素的研究测定[J]. 广东化工,2019,46(15):77-79.
- [14] 黎 隽,裴小龙,张 丽,等. 降糖类中成药和保健食品中13种非法添加成分检测方法改进[J]. 中国药业,2019,28(15):26-29.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.

(收稿日期:2021-04-04;修回日期:2021-08-20)