

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)04-0084-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.04.020



超高效液相色谱串联质谱法检测 16 种中药乳膏制剂中抗真菌药

杨 晓¹, 薛文静², 焦 洁³

(1. 山东省青岛市政务服务和公共资源交易中心, 山东 青岛 266071; 2. 山东省青岛市食品药品检验研究院·国家药品监督管理局海洋中药质量研究与评价重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 北京理工大学, 北京 100081)

摘要:目的 建立检测中药外用制剂中抗真菌药物的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 以山东省疾病预防控制中心提供的 16 种中药乳膏制剂为检测对象。色谱柱为 Agilent Poroshell SB-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(含 0.1% 甲酸水溶液), 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30℃, 进样量为 2 μL; 电喷雾离子源, 正离子、多反应监测模式, 离子源温度为 250℃, 毛细管电压为 3.5 kV, 脱溶剂气温度为 325℃。结果 灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、硝酸益康唑、硝酸咪康唑、氟康唑、联苯苄唑、氟胞嘧啶、盐酸萘替芬质量浓度分别在 1~20 ng/mL、10~200 ng/mL、0.5~10 ng/mL、0.5~10 ng/mL、0.5~10 ng/mL、1~20 ng/mL、1~20 ng/mL、5~100 ng/mL、0.5~10 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.995$, $n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5.0%; 平均加样回收率为 83.14%~102.01%, RSD 为 1.60%~3.64% ($n=9$)。16 种中药乳膏制剂均未检出上述 9 种抗真菌药物。结论 所建立的方法操作简便、可靠、结果准确, 可用于快速、有效地检测中药外用制剂中抗真菌药物的非法添加。

关键词: 非法添加; 超高效液相色谱串联质谱法; 抗真菌药物; 中药外用制剂

Detection of Antifungal Drugs in 16 Traditional Chinese Medicine Cream Preparations by UPLC-MS/MS

YANG Xiao¹, XUE Wenjing², JIAO Jie³

(1. Qingdao Exchange for Government Services and Public Resources, Qingdao, Shandong, China 266071; 2. Qingdao Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Marine Traditional Chinese Medicine, Qingdao, Shandong, China 266071; 3. Beijing Institute of Technology, Beijing, China 100081)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for detecting antifungal drugs in external preparations of traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** Sixteen types of TCM cream preparations provided by the Shandong Center for Disease Control and Prevention were used as the testing objects. The chromatographic column was an Agilent Poroshell SB-C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (containing 0.1% formic acid aqueous solution) with gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 2 μL. Electrospray ionization was adopted with positive ion, multi-reaction monitoring mode, the ion source temperature was 250℃, the capillary voltage was 3.5 kV, the desolvation gas temperature was 325℃. **Results** The linear ranges of griseofulvin, ketoconazole, clotrimazole, econazole nitrate, miconazole nitrate, fluconazole, bifonazole, flucytosine, and naftifine hydrochloride were in the range of 1-20 ng/mL, 10-200 ng/mL, 0.5-10 ng/mL, 0.5-10 ng/mL, 0.5-10 ng/mL, 1-20 ng/mL, 1-20 ng/mL, 5-100 ng/mL, 0.5-10 ng/mL, respectively ($r \geq 0.995$, $n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 5.0%. The average

第一作者: 杨晓, 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为食品、药品、化妆品等检测技术, (电子信箱) sheepig@163.com。

- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 932-933.
- [10] 李 进, 张培培, 姚尚辰, 等. 注射用哌拉西林钠他唑巴坦的聚合物杂质分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1279-1294.
- [11] 王婷婷, 肖 慧, 李 佩, 等. 国产注射用盐酸头孢吡肟质量评价[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(2): 128-133.
- [12] 邱 博, 杨浩天, 安 静. “即配即用”药物-哌拉西林钠他唑巴坦钠的配伍稳定性考察[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(8): 789-794.
- [13] 张 芸, 王亚敏. 基于 ICH Q3D(R2) 解读药品元素杂质研究的基本考虑[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(17): 1719-1724.
- [14] 张凤妹, 陈丹丹, 顾 霄, 等. 注射用头孢美唑钠中 10 种 ICH 控制元素测定方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(8): 1446-1450.
- [15] 胡 幸, 沈丹丹, 匡鑫玉, 等. 电感耦合等离子体质谱法测定咪达唑仑注射液 18 种元素杂质含量[J]. 中国药业, 2023, 32(19): 22-25.
- [16] 沈 敏, 黄逸文, 鲁 辉, 等. 天然冰片、艾片、合成冰片中残留溶剂测定及风险分析[J]. 中成药, 2023, 45(6): 1914-1920.

(收稿日期: 2024-01-05; 修回日期: 2024-11-28)

recovery rates were in the range of 83.14% to 102.01% with *RSDs* in the range of 1.60% to 3.64% ($n = 9$). None of the above nine antifungal drug was detected in the 16 TCM cream preparations. **Conclusion** The established method is easy, reliable and accurate, which can be used for the rapid and effective detection of illegal addition of antifungal drugs in TCM external preparations.

Key words: illegal addition; UPLC - MS / MS; antifungal drug; external preparations of traditional Chinese medicine

浅表型真菌感染(如手癣、足癣、体癣、股癣等)主要表现为于皮肤、黏膜、皮下组织,多由居住环境较差、气候潮湿等造成。临床常用的抗真菌药物主要有非多烯类、三唑类、磺胺类等。近年来,中药外用制剂因其效果好、副作用少,临床应用广泛。但部分不法厂家或小作坊在中药外用制剂中非法添加抗真菌药物,以达到增强疗效的目的。由于其添加的抗真菌类化学成分种类和含量未知,患者若长期大量使用,会对人体的生理代谢产生毒副作用,甚至引起肝肾损伤^[1-3]。本研究中以 16 种中药外用制剂为研究对象,采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC - MS / MS)法检测其中 9 种抗真菌药物,为监管部门打击制假违法行为提供有效的技术支撑。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1260 Prime II 型液相色谱 - Agilent 6470 型质谱仪(美国 Agilent 公司); AX224ZH 型电子分析天平(美国 Ohaus 公司,精度为 0.1 mg); ME2002TE 型电子天平(德国 Mettler Toledo 公司,精度为 0.1 mg); 3 - 15 型离心机(德国 Sigma 公司); MS3 型涡旋混匀器(德国 IKA 公司); KQ - 250DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

中药乳膏制剂,共 16 种,均由山东省疾病预防控制中心提供;对照品灰黄霉素(批号为 130426 - 9101,含量 100%),酮康唑(批号为 100294 - 202105,含量 99.7%),克霉唑(批号为 100037 - 2020085,含量 99.5%),硝酸益康唑(批号为 100214 - 202005,含量 99.7%),硝酸咪康唑(批号为 100213 - 201406,含量 100%),氟康唑(批号为 100314 - 201906,含量 99.8%),联苯苄唑(批号为 100314 - 201906,含量 99.8%),氟胞嘧啶(批号为 100315 - 202103,含量 100.0%),盐酸萘替芬(批号为 100823 - 200501,含量 100%),均购自中国食品药品检定研究院;凡士林(武邑炎威医疗科技有限公司,批号为 20180702);乙腈、甲酸、*N* - 丙基乙二胺均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell SB - C₁₈ 柱(100 mm ×

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Program of gradient elution

时间(min)	A(%)	B(%)	时间(min)	A(%)	B(%)
0	95	5	9	10	90
1	95	5	9.5	0	100
3	55	45	10	95	5
4	40	60	13	95	5

2.1 mm, 2.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A) - 乙腈(含 0.1% 甲酸水溶液, B), 梯度洗脱(洗脱程序见表 1); 流速: 0.3 mL / min; 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。

2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 正离子、多反应监测模式, 离子源温度为 250 °C, 毛细管电压为 3.5 kV, 脱溶剂气温度为 325 °C, 各组分质谱参数见表 2(其中,* 为定量离子), 离子流图见图 1。

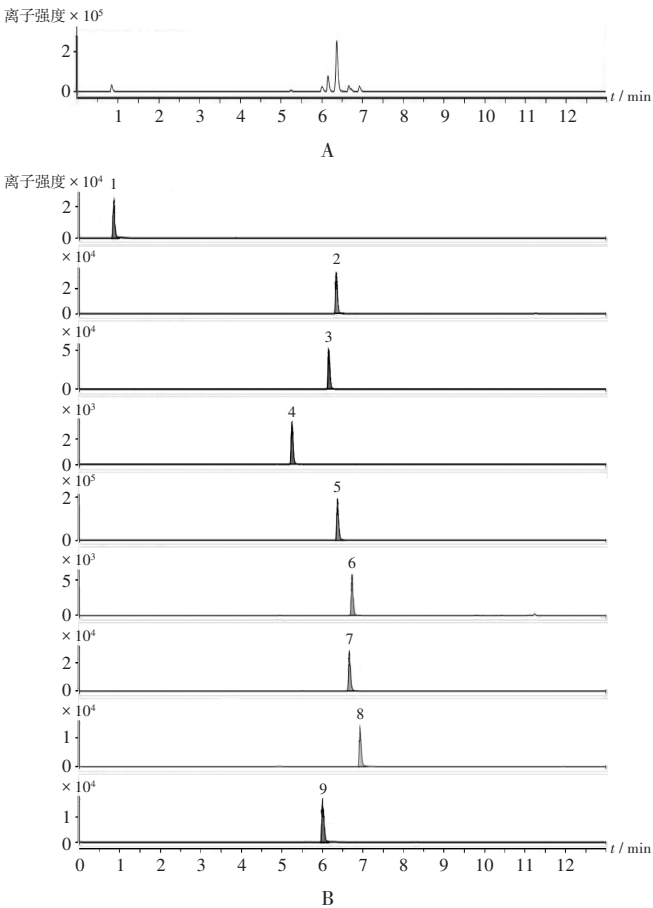
2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 分别取 9 种对照品 50 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解, 定容, 摇匀, 即得质量浓度均为 1 mg / mL 的对照品贮备液; 各取适量,

表 2 各组分质谱参数

Tab. 2 Mass spectrometry parameters of each component

组分名称	母离子(<i>m/z</i>)	碎裂电压(V)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量(eV)
灰黄霉素	353.1	130	165.0*	20
			215.0	20
酮康唑	531.1	190	489.2*	30
			254.9	40
克霉唑	277.0	140	165.1*	25
			199.0	32
硝酸益康唑	381.0	150	125.0*	34
			192.9	23
硝酸咪康唑	416.9	160	158.9*	40
			161.0	40
氟康唑	307.1	120	238.0*	20
			220.0	20
联苯苄唑	311.1	90	243.0*	20
			165.0	40
氟胞嘧啶	130.0	80	113.0*	18
			85.0	20
盐酸萘替芬	288.0	110	117.0*	15
			141.0	25



1. 氟胞嘧啶 2. 克霉唑 3. 盐酸萘替芬 4. 氟康唑 5. 联苯苄唑
6. 灰黄霉素 7. 硝酸益康唑 8. 硝酸咪康唑 9. 酮康唑
A. 总离子流图 B. 定量离子流图

1. Flucytosine 2. Clotrimazole 3. Naftifine hydrochloride 4. Fluconazole
5. Bifonazole 6. Griseofulvin 7. Econazole nitrate 8. Miconazole
nitrate 9. Ketoconazole
A. Total ion chromatograms B. Quantitative ion chromatograms

Fig. 1 Ion chromatograms

用乙腈制成含酮康唑 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氟胞嘧啶 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑各 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬、克霉唑各 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液; 取适量, 加入凡士林, 按供试品溶液配制方法制成酮康唑质量浓度为 10, 25, 50, 100, 150, 200 ng/mL , 氟胞嘧啶质量浓度为 5, 12.5, 25, 50, 75, 100 ng/mL , 氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑质量浓度均为 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 ng/mL , 硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬、克霉唑质量浓度均为 0.5, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 ng/mL 的系列混合对照品溶液。

供试品溶液: 取样品 0.5 g, 精密称定, 置 15 mL 离心管中, 加 1% 甲酸乙腈 8.0 mL, 涡旋振荡 1 min, 加 *N*-丙基乙二胺 50 mg, 超声 (功率 200 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 9 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 置 10 mL 容量

瓶, 加 1% 甲酸乙腈定容, 混匀; 取 1.0 mL, 置 10 mL 容量瓶, 初始流动相 (95%A - 5%B) 定容, 混匀, 移至离心管中, 9 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 经微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 精密量取 2.2 项下系列混合对照品溶液适量, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度 (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。

表 3 线性关系考察结果 ($n = 6$)

Tab. 3 Results of the linear relation test ($n = 6$)

待测组分	线性方程	线性范围 (ng/mL)	r
灰黄霉素	$Y_1 = 900.9X_1 + 70.7$	1 ~ 20	0.999
酮康唑	$Y_2 = 311.3X_2 + 1\,685.4$	10 ~ 200	0.996
克霉唑	$Y_3 = 10\,939.1X_3 + 47.8$	0.5 ~ 10	0.999
硝酸益康唑	$Y_4 = 9\,750.5X_4 - 202.3$	0.5 ~ 10	0.999
硝酸咪康唑	$Y_5 = 4\,971.4X_5 + 411.6$	0.5 ~ 10	0.999
氟康唑	$Y_6 = 641.6X_6 - 140.7$	1 ~ 20	0.997
联苯苄唑	$Y_7 = 32\,805.9X_7 - 331.5$	1 ~ 20	0.999
氟胞嘧啶	$Y_8 = 805.9X_8 - 2.1$	5 ~ 100	0.999
盐酸萘替芬	$Y_9 = 17\,763.2X_9 + 3\,546.3$	0.5 ~ 10	0.995

精密度试验: 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 2 μL , 按 2.1 项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果酮康唑、氟胞嘧啶、氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑、硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬、克霉唑峰面积的 *RSD* 分别为 1.44%, 3.71%, 0.62%, 1.20%, 2.81%, 3.54%, 1.86%, 2.84%, 1.77% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取未检出 9 种抗真菌药物的样品适量, 精密称定, 加入混合对照品溶液适量, 按 2.2 项下方法制成含酮康唑 50 ng/mL , 氟胞嘧啶 25 ng/mL , 氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑 5 ng/mL , 硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬、克霉唑 2.5 ng/mL 的供试品溶液。取适量, 分别于室温放置 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 时按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果的 *RSD* 分别为 1.12%, 1.73%, 0.76%, 1.52%, 1.34%, 0.62%, 1.31%, 1.83%, 2.16% ($n = 6$), 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取稳定性试验项下供试品溶液适量, 平行 6 份, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果酮康唑、氟胞嘧啶、氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑、硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬、克霉唑含量的 *RSD* 分别为 1.31%, 3.73%, 2.31%, 1.90%, 2.22%, 2.43%, 1.71%, 2.86%, 1.72% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取抗真菌药物添加水平已知的样品9份,加入混合对照品溶液适量,平行6份,按2.2项下方法制备供试品溶液(含酮康唑40,10,5 mg/kg,氟胞嘧啶20,5,2.5 mg/kg,氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑4,1,0.5 mg/kg,硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬、克霉唑为2,0.5,0.25 mg/kg),按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果平均加样回收率分别为100.71%,91.48%,98.79%,97.99%,92.71%,87.28%,83.14%,93.47%,102.01%,RSD分别为2.89%,2.86%,2.22%,1.60%,3.49%,2.75%,1.90%,3.64%,1.72%($n=6$)。

2.4 样品检测

取9种样品适量,平行3份,按2.2项下制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算抗真菌药物含量。结果均未检出9种抗真菌药物成分。

3 讨论

3.1 提取方法选择

抗真菌化学成分多溶于甲醇、乙腈,但由于基质为膏剂,成分复杂,在酸性条件下回收较好。预试验中分别选取0.1%甲酸乙腈、1%甲酸乙腈、2%甲酸乙腈进行提取^[4-6],结果显示,1%甲酸乙腈的提取效果较好。但单纯溶剂提取,固体类样品提取效率较低,基质干扰严重,故采用QuEChERS法^[7]考察MgSO₄、C₁₈和N-丙基乙二胺等吸附剂的除杂除水情况。结果显示,C₁₈对待测物有吸附,易造成目标化合物损失;MgSO₄对回收率无影响,但峰形较差,故采用N-丙基乙二胺进行前处理。同时考察了不同的提取时间(超声20,30,40 min)对提取效率的影响,结果超声30 min时提取效率最佳。

3.2 色谱条件和质谱条件的选择

预试验中考察了不同比例(80:20,85:15,90:10,95:5,V/V)的乙酸水溶液-乙腈、乙酸水溶液-甲醇、甲酸水溶液-甲醇、甲酸水溶液-乙腈等流动相进行梯度洗脱,结果发现0.1%甲酸水溶液-乙腈(含0.1%甲酸水溶液)分离度最好。C₈和C₁₈柱在上述流动相梯度洗脱下,色谱峰在8 min内均出峰完全,峰形良好,因此选择更常用的C₁₈柱^[8-11]。质谱条件,经调谐,正离子监测模式明显优于负离子,故选择;预试验中考察了不同的毛细管电压(2.5,3.0,3.5 kV),结果3.5 kV灵敏度较高^[12-15]。

3.3 方法评价

我国研究多以片剂、胶囊、丸剂、散剂等常用剂型和药典品种为主,而对其他品种和外用制剂的研究相

对较少。由于气候等原因,皮肤病发病率持续升高,为确保市售中药外用制剂的安全有效、均一稳定,需制定严格的质量标准。本研究中的方法操作简便、可靠、结果准确,可有效检测中药乳膏制剂中抗真菌药物的非法添加,为提升化妆品、消毒产品、中药外用制剂安全性提供参考。

参考文献

- [1] 王璐璐,刘慧,戴亮. 2013~2015年南京地区常用抗真菌药利用分析[J]. 中国药师,2017,20(2):317-320.
- [2] 苏冠民,辛成龙,姜大峰,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定消毒产品中违禁抗真菌药物[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(12):902-905.
- [3] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范[M]. 北京:中国标准出版社,2015:193-197.
- [4] 赵丽红,路亚静,李忠华. 高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定消字号乳膏中8种抗真菌药物[J]. 质量安全与检验检测,2021,31(3):15-17.
- [5] 邵明媛,王浩,史海良,等. 基于QuEChERS提取的液相色谱-串联质谱法测定化妆品中11种抗真菌药物残留[J]. 分析试验室,2016(4):430-434.
- [6] 张素洁,孙贺伟,郭君君,等. 液相色谱-串联质谱法同时测定血清中5个三唑类抗真菌药物浓度及其治疗药物监测应用[J]. 药物分析杂志,2017,37(6):1038-1045.
- [7] 张凯,秦宇,卞华,等. QUECRES-超高效液相色谱-串联质谱法检测羊肉中8种抗真菌药[J]. 色谱,2018,36(10):999-1004.
- [8] 赵佳丽,欧贝丽,周燕. 超高效液相色谱-质谱联用快速同时检测止痒类中药制剂中添加11种化学药物成分[J]. 中国现代应用学,2016,33(12):1558-1562.
- [9] 高峰丽,赵玉平,杨夏. 高效液相色谱法测定2%酮康唑搽剂中酮康唑含量[J]. 中国药业,2013,22(6):63-64.
- [10] 卢奕,张雁,李东. 高效液相色谱法检测中药制剂中非法添加的抗真菌药物[J]. 中国药业,2013,22(13):7-9.
- [11] 张龙贵,王建芬,魏丹丹,等. 化妆品中违禁药物分析方法的研究概述[J]. 中国药师,2012,15(4):567-571.
- [12] 言慧洁,潘源虎. HPLC-MS/MS法同时检测抗风湿中药制剂中非法添加9种糖皮质激素的方法建立[J]. 中国合理用药探索,2018,15(10):68-72.
- [13] 张亚锋,李卓,董靖,等. 高效液相色谱法测定消肿止痛类中成药中16种非法添加糖皮质激素及消炎镇痛类化学成分[J]. 中南药学,2019,17(10):1676-1680.
- [14] 张艳萍,张敏,周宗洲,等. UPLC-MS/MS法同时测定中药软膏中非法添加的28种抗真菌类和糖皮质激素类化学成分[J]. 轻工科技,2021,37(2):39-41.
- [15] 许江红,张若良,余静,等. 超高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定中草药制剂中非法添加的糖皮质激素和抗真菌药物[J]. 药品评价,2021,18(21):1311-1316.

(收稿日期:2024-01-12;修回日期:2024-12-28)