

表 2 各标准不确定度分量分析一览表

Tab 2 Table of standard uncertainty

标准不确定度分量	相对标准不确定度 u	u^2	u^2 所占百分比/%	
α -BHC	$u(C_0)$	6.020×10^{-3}	3.624×10^{-5}	1.5
	$u(A_i)$	0.0380	1.444×10^{-3}	59.2
	$u(V_i)$	6.402×10^{-3}	4.099×10^{-5}	1.7
	$u(A_0)$	0.0254	6.452×10^{-4}	26.5
	$u(W_i)$	1.455×10^{-4}	2.117×10^{-8}	0
	$u(M)$	0.0165	2.722×10^{-4}	11.2
β -BHC	$u(C_0)$	6.020×10^{-3}	3.624×10^{-5}	1.4
	$u(A_i)$	0.0351	1.232×10^{-3}	46.5
	$u(V_i)$	6.402×10^{-3}	4.099×10^{-5}	1.5
	$u(A_0)$	0.0342	1.170×10^{-3}	44.1
	$u(W_i)$	1.455×10^{-4}	2.117×10^{-8}	0
	$u(M)$	0.0131	1.716×10^{-4}	6.5
γ -BHC	$u(C_0)$	6.020×10^{-3}	3.624×10^{-5}	1.4
	$u(A_i)$	0.0442	1.954×10^{-3}	76.6
	$u(V_i)$	6.402×10^{-3}	4.099×10^{-5}	1.6
	$u(A_0)$	0.0181	3.276×10^{-4}	12.8
	$u(W_i)$	1.455×10^{-4}	2.117×10^{-8}	0
	$u(M)$	0.0138	1.904×10^{-4}	7.5
δ -BHC	$u(C_0)$	6.010×10^{-3}	3.612×10^{-5}	0.4
	$u(A_i)$	0.0945	8.930×10^{-3}	97.5
	$u(V_i)$	6.402×10^{-3}	4.099×10^{-5}	0.4
	$u(A_0)$	0.0125	1.562×10^{-4}	1.7
	$u(W_i)$	1.455×10^{-4}	2.117×10^{-8}	0
	$u(M)$	0.0138	1.904×10^{-4}	7.5
五氯硝基苯	$u(C_0)$	6.034×10^{-3}	3.641×10^{-5}	0.7
	$u(A_i)$	0.0715	5.112×10^{-3}	97.0
	$u(V_i)$	6.402×10^{-3}	4.099×10^{-5}	0.8
	$u(A_0)$	0.0090	8.100×10^{-5}	1.5
	$u(W_i)$	1.455×10^{-4}	2.117×10^{-8}	0
	$u(M)$	0.0138	1.904×10^{-4}	7.5

氯硝基苯最大影响因子。通过分析各不确定度分量在检测过程中所占比重,可找出对测定有最大影响的不确定度分量。虽然检出的结果均为未检出(低于检出限),但由于中药材中有机氯农药残留量的检测为痕量检测,如果不有效地控制好检测过程中对结果起至关重要的因素,那么检测结果准确性、可靠性必定受到较大影响。因此,痕量检测更有必要对检测结果进行不确定度的评定。

REFERENCES

- [1] JJF1059-1999, Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement(测量不确定度评定与表示) [S]. Administration of Quality and Technology Supervision of People's Republic of China: 1999.
- [2] LIU S C, WANG X Y, ZHANG L, et al. Evaluation of standard value and measurement uncertainty for determination of *Panax notoginseng* total ash and acid-insoluble ash [J]. Her Med(医药导报), 2012 31(2): 195-198.
- [3] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 80.
- [4] China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Guidance for Evaluation of Uncertainty of Chemical analysis(化学分析中不确定度的评估指南) [M]. Beijing: China Metrology Publishing House. 2002.
- [5] LI Y, LUO L J, CHENG H Y, et al. GC evaluation of measurement uncertainty for the determination of vitamin E soft cream [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(4): 692-696.
- [6] JJG196-2006, Verification Regulation of Working Glass Container(常用玻璃量器检定规程) [S]. Administration of Quality and Technology Supervision of People's Republic of China. 2006 .
- [7] MIAO A D, LI X C, HE X Y, et al. Uncertainty analysis of high performance liquid chromatography in detection of tinidazole content in Tinidazole tablets [J]. Med J Beijing Mil Region(解放军医药杂志), 2012, 24(12): 28-31.

收稿日期: 2013-02-26

UPLC-MS/MS 测定延时类保健品中 3 种局麻药的含量

黄朝辉¹, 蔡丹丹², 陈仲益¹, 卓开华¹(1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.宁波戒毒研究中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 建立一种测定延时类保健品中 3 种局麻药含量的超高效液相-质谱联用方法。方法 采用 Waters BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)色谱柱, 流动相为含 0.1%乙酸的 0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液-乙腈(72:28), 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 质谱采用电喷雾离子源, 多反应监测模式(正离子)。结果 3 种局麻药在 20~200 μ g·L⁻¹ 内线性关系良好, r 为 0.998 8~0.999 8, 平均回收率为 98.2%~101.2%, 定量下限为 0.5 μ g·L⁻¹, 检测限为 0.1 μ g·L⁻¹。结论 该方法分析速度快, 灵敏度高, 结果准确可靠, 适用于延时类保健品中局麻药的测定, 为打击保健品非法添加提供了有力的技术手段。

关键词: 超高效液相-质谱联用; 多反应监测; 局麻药

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0099-04

作者简介: 黄朝辉, 男, 博士, 主管药师

Tel: (0574)87834153

E-mail: huang-zhao@163.com

Quantitative Determination of Three Local Anesthetics in Delay Drugs by UPLC-MS/MS

HUANG Zhaohui¹, CAI Dandan², CHEN Zhongyi¹, ZHUO Kaihua¹(1.Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China; 2.Ningbo Drug Research Center, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the quantitative determination of 3 local anesthetics in delay drugs by UPLC-MS/MS. **METHODS** Chromatography was carried on a Waters BEH C₁₈ column(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with the column temperature at 35 °C, using 0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate water solution(containing 0.1% acetic acid)-acetonitril (72 : 28) as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. Determination was performed by multiple reaction monitoring mode using electrospray ionization in positive ion mode. **RESULTS** Three chemical medicines had good linear relationships in 20–200 μg·L⁻¹(*r*=0.998 8–0.999 8), average recoveries were 98.2%–101.2%, the limits of quantitation and detection were 0.5 μg·L⁻¹ and 0.1 μg·L⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The method is rapid, sensitive and accurate, and could be an appropriate technique to detect the local anesthetics in delay drugs.

KEY WORDS: UPLC-MS/MS; multiple reaction monitoring; local anesthetics

随着物质生活水平的提高,人们开始追求更好的生活质量,保健品因此而盛行。为迎合消费者对安全的顾虑,许多保健品声称源自纯中药。然而,为达到快速起效的目的,不法生产者在保健品中添加化学药成分^[1]。非法添加的化学药成分对消费者的危害主要在于3个方面:一是随意添加导致剂量不规范;二是脱离了医生的指导,非法添加的化学药物成分不规范;三是这些化学成分中可能携带制备过程中未除去的杂质,这些杂质未能通过有效的方法加以检出、控制,也将给使用者造成直接或潜在的危害。因此,必须严格控制保健品的质量,严厉打击保健品非法添加化学物质的违法行为。

自从伟哥问世以来,市场上壮阳类保健品层出不穷。已有标准能够检测包括西地那非在内的11种磷酸二酯酶(PDE)V选择性抑制剂类化学成分^[2]。延时类保健品目前也按照壮阳类保健品标准检测,但是从使用途径和使用目的方面分析,延时类保健品添加局麻药的可能性极大,因此有必要建立局麻药检测的方法。

常规配备紫外检测器的高效色谱检测由于只能提供相对保留时间和被检物质官能团信息,难以独立确证检测结果。以质谱作为检测器的液-质联用检测系统在提供相对保留时间的基础上,还能检测化合物结构信息,如分子量、特征碎片等,其结果更可靠^[3]。

本实验建立了超高效液相-质谱联用(UPLC-MS)多反应监测(MRM)法检测延时类保健品中3种局麻药的方法,样品处理简单,检测快速,灵敏度高,可为药品监管部门打击非法添加提供有

效的技术手段。

1 仪器与试剂

Waters Alliance-Quattro Micro 液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司),色谱柱为 Waters BEH C₁₈ 键合硅胶柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); SB-5200DTN 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); R 200 D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

盐酸丁卡因对照品(批号:100456-200301,纯度:100%)、盐酸利多卡因对照品(批号:100341-200702,纯度:93.4%)和苯磺酸罗哌卡因对照品(批号:100548-200401,纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;延时类保健品2批(保健品A和保健品B)和壮阳类保健品1批(保健品C)均为市售品。乙腈(默克公司,色谱纯);乙酸铵(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

取对照品盐酸丁卡因、盐酸利多卡因、苯磺酸罗哌卡因11.30, 12.92, 11.77 mg,精密称定,分别置50 mL量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀;各精密量取1.0 mL,同置50 mL量瓶中,加50%乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL各含约4 μg的储备液。

2.2 供试品溶液制备

取保健品A 1片,保健品B 3次喷射量,各置50 mL量瓶中,加乙腈40 mL,超声提取15 min,放冷至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液用50%乙腈溶液逐级稀5 000倍,得供试品溶液。

取保健品 A 作为阳性样品, 保健品 C 作为阴性样品, 同法制备分别得到阳性样品和阴性样品溶液。

2.3 色谱-质谱条件及系统适用性试验

2.3.1 色谱条件 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 含 0.1%乙酸的 0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液-乙腈(72:28)洗脱; 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样量: 5 μL。

2.3.2 质谱条件 模式为电喷雾离子化(ESI)方式, 多反应监测(MRM), 检测离子为正离子。干燥气流量为 500 L·h⁻¹, 雾化气流量为 50 L·h⁻¹, 氩气流量: 0.1 mL·min⁻¹; 取样锥孔电压及碰撞能量见表 1。混合对照品溶液的总离子流图见图 1。

表 1 3 种局麻药的质谱参数

Tab 1 Three local anesthetics MS parameters

化合物	分子离子	定量离子	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
丁卡因	265	176	20	10
利多卡因	235	86	15	12
苯磺酸罗哌卡因	275	126	20	18

2.4 方法专属性考察

取阳性样品和阴性样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱质谱条件测定, 阳性样品检出丁卡因, 阴性样品对检测无干扰。色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察和定量下限的确证

精密量取混合对照品储备液适量, 用 50%乙腈溶液逐级稀释得到对照品系列溶液, 依法测定。以对照品溶液浓度为横坐标, 各化合物定量离子峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程。丁卡因、利多卡因、罗哌卡因的线性方程分别为 $Y=132.9X+324.1$, $Y=105.8X+90.3$, $Y=190.6X+98.6$, r 分别为 0.998 8, 0.999 8, 0.999 8, 在 20~200 μg·L⁻¹ 内线性关系良好, 信噪比为 10 时定量下限为 0.5 μg·L⁻¹($n=6$, RSD 分别为 4.52%, 5.01% 和 5.12%), 信噪比为 3 时检测限为 0.1 μg·L⁻¹($n=6$, RSD 分别为 5.32%, 5.61% 和 6.12%)。

2.6 精密度试验

分别精密吸取贮备液配制低、中、高(20, 100, 200 μg·L⁻¹)3 个浓度的溶液, 按“2.3”项下的色谱质谱条件, 分别在同 1 d 内重复进样 3 次, 连续进样 3 d, 计算日内及日间精密度。结果见表 2。

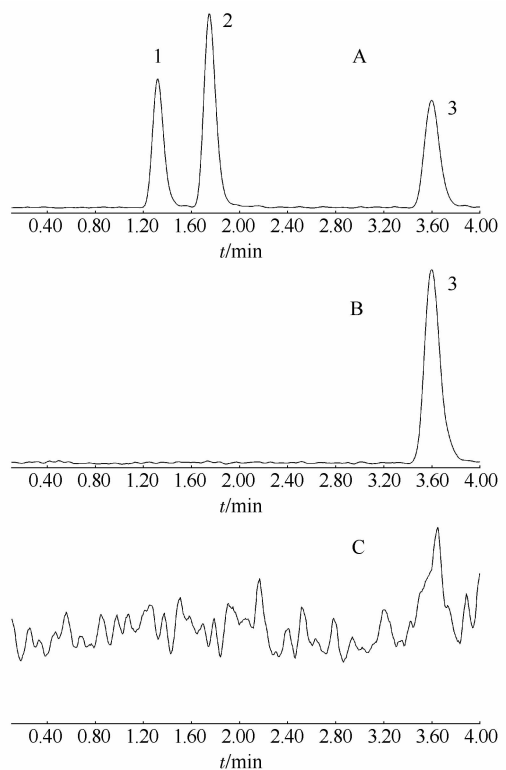


图 1 总离子流图

A-混合对照品; B-阳性样品; C-阴性样品; 1-利多卡因; 2-罗哌卡因; 3-丁卡因

Fig 1 Total ion chromatograms

A-reference substances; B-positive sample; C-negative sample; 1-lidocaine; 2-ropivacaine; 3-dicaine

表 2 精密度试验结果($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of precision test($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

化合物	浓度/ μg·L ⁻¹	日内精密度/ μg·L ⁻¹	RSD/ %	日间精密度/ μg·L ⁻¹	RSD/ %
丁卡因	20.60	20.52±0.03	2.35	20.56±0.04	2.46
	103.00	102.97±0.04	1.42	103.01±0.06	1.25
	206.00	206.07±0.06	1.30	205.98±0.04	1.31
利多卡因	25.84	25.88±0.07	2.20	25.76±0.05	2.32
	129.20	129.31±0.11	1.28	129.21±0.16	1.23
	258.40	258.35±0.10	1.31	258.40±0.24	1.28
罗哌卡因	23.54	23.50±0.17	2.14	23.49±0.17	2.34
	117.70	117.69±0.25	1.25	117.71±0.20	1.42
	235.40	235.26±0.18	1.16	235.36±0.28	1.15

2.7 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液(浓度为 40 μg·mL⁻¹) 5 μL, 按“2.3”项下色谱质谱条件, 连续进样 5 次, 测定各化合物定量离子峰面积, 计算 RSD($n=5$) 分别为 1.8%, 2.6%, 2.0%, 表明方法的精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密量取混合对照品溶液(浓度为 40 μg·mL⁻¹) 5 μL, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样,

测定各化合物定量离子峰面积, 计算 RSD($n=6$) 分别为 2.1%, 1.9%, 2.3%。表明对照溶液在室温放置 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验

取不含 3 种局麻药的样品一次服用量, 共取 9 份, 分别置 50 mL 量瓶中, 分为 3 批, 每批 3 份, 各分别加入对照品 8, 10, 12 mg, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取 5 μ L, 依法测定。3 种局麻药 3 个水平的回收率见表 3。

表 3 3 种局麻药的平均回收率($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

化合物	平均回收率/%		
	水平 I	水平 II	水平 III
丁卡因	98.2 \pm 3.5	99.3 \pm 2.5	100.5 \pm 1.5
利多卡因	99.2 \pm 2.5	98.5 \pm 3.1	99.8 \pm 1.9
罗哌卡因	101.2 \pm 2.0	100.2 \pm 1.5	99.9 \pm 1.6

2.10 耐用性试验

试验中比较了 3 种不同类型的色谱柱: Waters BEH C₁₈(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m)、Waters HSS C₁₈(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m)、Agilent ZORBAX C₁₈(50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 结果供试品溶液在这 3 种色谱柱上均能得到很好的结果。柱温分别为 35 $^{\circ}$ C 和 45 $^{\circ}$ C 时, 供试品溶液均能得到很好的效果。

2.11 样品测定

取供试品一次服用量, 置 50 mL 量瓶中, 按“2.2”项下方法制得供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 5 μ L, 注入液相色谱仪, 测各化合物定量离子峰面积, 计算样品中局麻药浓度, 进一步换算为每次服用量中的含量。

结果 2 批样品检测出非法添加了丁卡因, 含量为每次使用量 40 mg 和 20 mg。

3 讨论

利用多反应监测模式检测时, 一般情况下会选择 2 个稳定的碎片离子, 分别用于定性和定量分析。本实验检测的 3 种局麻药均属于酰胺类结构, 在 ESI⁺模式下容易发生 α 裂解, 所需碰撞能量低, 每个化合物各自只得到一个特征碎片离子^[4]。但由于裂解方式稳定, 很适合用于定量检测分析, 3 种待测成分的线性都很好。

本实验建立了液-质联用(LC-MS)多反应监测(MRM)法检测延时类保健品中 3 种局麻药含量的方法。试验结果表明, 样品中杂质对 3 种成分无干扰, 并且样品前处理程序简单, 结果准确, 专属性好。本方法为打击延时类保健品中非法添加局麻药提供了技术支持。

REFERENCES

- [1] ZHANG J Z, HUANG W, HUANG H X, et al. Investigation of the quality of health foods in a southern city of China in 2009 [J]. China Contemp Med(当代医学), 2012, 18(32): 158-160.
- [2] State Food and Drug Administration Medical Inspection and Additional Testing Methods and Project Approval Documents 2009030(国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2009030) [S]. 2009.
- [3] LI Y Y, SHANGGU Y Y. UPLC-MS/MS analysis of the metabolites of pinocembrin in human liver microsome [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 159-163.
- [4] YANG Y, ZHANG W, YE L. Simultaneous determination of prilocaine and lidocaine in transdermal receiving fluid using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2009, 27(1): 74-77.

收稿日期: 2013-06-05

《中国生化药物杂志》征稿启事

《中国生化药物杂志》于 1976 年创刊; 一直秉承“基础与临床结合、普及与提高并重”的原则, 报道有关生化药物基础与临床研究的最新进展, 并以“促进我国生化药物医学的健康发展及深化国际学术合作与交流”为己任。

《中国生化药物杂志》为中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊, 同时被《美国化学文摘》、《中国生物学文摘》、《中国药学文摘》等重要检索系统收录; 是中国科技论文与引文数据库、中国期刊全文数据库、中国科技期刊数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国科学引文数据库、中文生物医学期刊文献数据库、中国生物学文摘数据库的来源期刊。其主管单位是无锡日报报业集团, 主办单位是无锡锡报期刊传媒有限公司; 由《中国生化药物杂志》编辑部和北京数字影视传媒有限公司出版发行。国际标准刊号: ISSN 1005-1678, 国内统一刊号: CN 32-1355/R。面向海内外公开发刊, 具有较高的学术地位和权威性, 邮发代号 28-233。

读者对象为生化和生物技术药物领域的科技工作者、临床相关医生、医学院校的相关专业师生等。热忱欢迎从事药理学、药理学、临床药理学、生物化学、医学免疫学、分子生物学、医学微生物学、细胞生物学、临床医学、生物医药技术等基础及相关临床医学专家、学者投稿。

编辑部地址: 北京市朝阳区芍药居 38 号楼 3 层 8302 室(100029)

联系电话: 010-84281432; 010-84280076-8711/8713/8718/8720; 传真: 010-84662099; 投稿邮箱: cbcpharm@cyberzone.cn