

# 保健食品中非法添加药物的广谱筛查和确证

## Rapid screening and confirmation of weight-loss illegally added drugs in health foods

张帆<sup>1,2</sup> 王美玲<sup>1,3</sup> 李蓉娟<sup>4</sup>

ZHANG Fan<sup>1,2</sup> WANG Mei-ling<sup>1,3</sup> LI Rong-juan<sup>4</sup>

颜鸿飞<sup>1</sup> 张莹<sup>1</sup> 黄志强<sup>1</sup>

YAN Hong-fei<sup>1</sup> ZHANG Ying<sup>1</sup> HUANG Zhi-qiang<sup>1</sup>

(1. 湖南省检验检疫科学研究院, 湖南长沙 410004; 2. 长沙环境保护职业技术学院, 湖南长沙 410004;  
3. 中南大学, 湖南长沙 410083; 4. 东港出入境检验检疫局, 辽宁东港 118300)

(1. Hunan Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Changsha Environmental Protection College, Changsha, Hunan 410004, China; 3. Central South University, Changsha, Hunan 410083, China; 4. Donggang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Donggang, Liaoning 118300, China)

**摘要:**采用液相色谱仪—二极管阵列检测器—离子阱—飞行时间串联质谱仪(LCMS-DAD-IT-TOF)建立减肥类非法添加药物高分辨质谱数据库。样品经乙腈超声提取,提取液经 QuEChERS 吸附剂净化,以 ZORBAX Eclipse AAA 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 4.5 μm)分离,乙腈和 0.1% 乙酸为流动相梯度洗脱。筛查限为 0.10~0.75 mg/kg,平均回收率在 49.4%~88.1%;相对标准偏差为 5.0~14.8%。该方法通过紫外光谱确定非法添加药物特征吸收波长,结合滥用药物高分辨质谱数据库,通过精确质量数的检索匹配对非法添加药物实现快速筛查,并使用保留时间、同位素丰度和多级特征碎片离子进行确证。根据多级碎片离子,推导出裂解途径。具有简便、快速、高效、准确等优点。在缺乏标准品或对照品的情况下,即可得到准确可靠的结论。适用于保健食品中非法添加药物的有效快速筛查。

**关键词:**保健食品;非法添加药物;筛查;离子阱飞行时间串联质谱

**Abstract:** The high resolution mass spectrometry database of weight-loss illegally added drugs was established base on liquid chromatography-diode array detector-ion trap-time of flight tandem mass spectrometry (LC-DAD-MS-IT-TOF). The analytes in samples were extracted with

acetonitrile and the extract was purified with the mixed QuEChERS sorbents. In the chromatographic analysis, target compounds were separated on a ZORBAX Eclipse AAA column (150 mm × 4.6 mm, 4.5 μm) with the gradient elution using the mobile phases of acetonitrile and water containing 0.1% acetic acid. The results showed that the screening detection limit (SDL) of the target compounds were ranged from 0.10~0.75 mg/kg. The method validation was carried out at SDL levels, and the recoveries were 49.4%~88.1%. with the relative standard deviations(RSDs) of 5.0%~14.8%. The characteristic absorption wavelength of illegally added drugs was determined by UV spectrum. The screening of analytes was performed by precision mass matching and library searching. The retention time, isotopic abundance and multiple-stage ion mass spectral was employed to the confirmation. Moreover, the ion fragmentation patterns of these drugs can be exploited to predict the chemical formula and the fragmentation pathway. This method is simple, fast, credible and high sensitivity, which can be applied to simultaneous screening and identification of illegally added drugs in health foods.

**Keywords:** Health foods; illegally added drugs; screening; liquid chromatography-ion trap-time of flight tandem mass spectrometry (LC-MS-IT-TOF)

随着中国保健食品市场的飞速发展,保健食品安全事件也不断出现,一些不法分子为了突显产品功效,常在中成药、保健食品中非法添加一些药物<sup>[1-3]</sup>,如保健酒、配制酒中违法添加西地那非(俗名“伟哥”)或近似成分;降血糖功能产品添加二甲双胍、格列苯脲等降糖药;减肥功能产品添加西布曲明等。由于此类药物为处方药,国家严禁添加在任何保健食

**基金项目:**国家质检总局科技计划项目(编号:2016IK119);“十二五”国家科技支撑计划项目(编号:2012BAK08B01)

**作者简介:**张帆,女,长沙环境保护职业技术学院副教授,博士。

**通信作者:**黄志强(1962—),男,湖南省检验检疫科学技术研究院研究员,博士。E-mail:huangzqq@126.com

**收稿日期:**2017—09—07

品中,若患者在不知情的情况下持续、大量服用这样所谓的保健食品,有可能产生难以预知的不良生理反应,呈现药物中毒症状,严重时有可能威胁到患者的生命安全。2012年3月20日,国家食品药品监督管理局发布了《保健食品中可能非法添加的物质名单(第一批)》,涉及西布曲明等六大类50余种物质,以此来监控功能性保健品中的非法添加药物。

目前国内外对保健品中非法添加化学物质的检测已有许多的研究报道,主要集中在对已知化合物进行定性和定量分析。保健食品中非法药物添加主要存在添加药物剂量不明确、配伍关系不确切、所添加药物来源不明、所含药物杂质不清晰等隐患。为筛查的目标选择带来了难度,需要建立灵敏度好、专属性好的分析方法,进一步加强对保健食品中非法添加的化学药物进行鉴别检测。分析方法有紫外分光光度法<sup>[4]</sup>、薄层色谱法<sup>[5]</sup>、高效液相色谱法<sup>[6]</sup>、高效液相一串联质谱法<sup>[7-9]</sup>等。高效液相一串联质谱法(HPLC-MS/MS)凭借其选择性好、灵敏度高、较强的抗干扰能力等优势,目前已经广泛应用于中国保健品种滥用药物的定量测定和筛查中。但该分析方法属于“目标分析方法”,具有较强的针对性,只适用于对该方法中预设的目标化合物进行分析。然而化学药品种类繁多、数量巨大,不法分子经常费尽心思寻找限量标准规定之外的其他替代化学药品以逃避法律的监管。因此无法对保健食品中非法添加物进行全面快速筛查,阻碍了保健食品安全监测和预警体系的建立。

离子阱一飞行时间串联质谱(LCMS-IT-TOF)由于既具备高分辨率和高质量数准确度,又具备多级质谱功能(最多到10级),能提供未知化合物的结构信息。通过精确质量数的检索匹配及多级特征碎片离子确证,可以快速且方便地对未知化合物实现快速筛查与鉴定<sup>[10-11]</sup>。本试验在自建药物数据库的基础上,拟采用离子阱一飞行时间串联质谱通过精确质量数的检索匹配,对保健食品中非法添加药物实现快速筛查,并使用多级特征碎片离子进行确证,根据碎片离子,推导出裂解途径。应用于某品牌减肥保健食品,从中发现并确认该保健食品中非法添加了西布曲明。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

液相色谱一二极管阵列检测器一离子阱一飞行时间串联质谱仪:LCMS-IT-TOF型,配LCMS solution V 3.6工作站,日本岛津公司;

超声波清洗器:B5510E型,美国必能信公司;

高速离心机:1-15P型,德国Sigma公司;

超纯水机:Milli-Q Advantage A10型,美国Millipore公司。

比沙可啶、茛菪碱、布美他尼、多虑平、芬氟拉明、吠塞米、氟西汀、甲氯噻嗪、氯噻嗪、氯噻酮、氢氯噻嗪、舍曲林、西布曲明、吲达帕胺:纯度>95%,美国Sigma公司;

麻黄碱、去甲麻黄碱:纯度>95%,中国药品生物制品检定所;

十八烷基键合硅胶吸附剂(C<sub>18</sub>):40~60 mm,北京艾杰尔有限公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,德国Merck公司;

其余试剂均为分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 标准溶液配制 分别称取10.0 mg上述标准品,置于10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容配制成1.0 mg/mL的标准储备液,转入棕色样品瓶中,于-20℃下冷冻保存。试验中用甲醇稀释上述标准储备液,配制不同浓度的混合标准工作溶液,于4℃下保存。

1.2.2 样品制备 胶囊样品,倾出内容物连同胶囊壳一起捣碎,混匀。

1.2.3 样品前处理 称取1.00 g试样(精确至0.001 g)置于25 mL离心管中,加入15 mL乙腈,超声提取20 min,冷却至室温,将样品全部转移至25 mL容量瓶中,用10 mL乙腈分多次清洗离心管,合并清洗液至容量瓶中,并用乙腈定容至刻度,摇匀后,静置5 min。取2 mL上清液到另一洁净的离心管中,加入10 mg C<sub>18</sub>粉末,充分涡旋后,以18 000 r/min离心3 min,取0.5 mL上清液,用流动相稀释至1.0 mL,过0.22 μm有机微孔滤膜后,上机供测试。

1.2.4 色谱条件 色谱柱:安捷伦ZORBAX Eclipse AAA柱(4.5 mm×150 mm,5 μm);流动相A为0.1%乙酸水溶液,流动相B为乙腈;梯度洗脱程序:0~8 min,5% B~20% B;8~26 min,20% B~50% B;26~33 min,50% B~100% B;100% B保持7 min,40.0~40.1 min,100% B~5% B;40.1~45.0 min,5% B。柱温为30℃,进样体积为10 μL,检测波长230 nm。

1.2.5 质谱条件 离子源:ESI,正负离子同时扫描;扫描范围:MS<sup>1</sup> m/z 150~1 000,MS<sup>2</sup> m/z 50~500,MS<sup>3</sup> m/z 50~500;加热模块温度:200℃;CDL温度:200℃;雾化气流速:1.5 L/min;干燥气流速:10 L/min;离子源电压:正离子模式+4.5 kV,负离子模式-3.5 kV;检测器电压:1.7 kV;质量数校准方法:自动调谐优化电压,外标法校准质量数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理条件优化

目前文献<sup>[7,9]</sup>报道的保健食品中减肥类药物的提取方法,主要使用甲醇、乙腈、甲醇一水、甲醇一0.1%甲酸、甲醇一10 mmol/L醋酸铵等有机溶剂进行超声萃取。本研究是对多种违禁药物进行筛查,所涉及的化合物种类较多,化学结构不同,性质相差较大,需要一种普适强的提取方法。分别比较了甲醇、乙腈、1%乙酸甲醇、1%乙酸乙腈和甲醇一水(1+1,体积比)等溶剂的提取效果。试验结果显示,用甲醇或甲醇一水提取,由于溶剂极性大,提取的杂质较多,基质干扰严重。在提取溶剂中加入乙酸,对提取效果无明显改善,反而部分含氨基化合物的回收率下降。乙腈属于通用型试剂,用乙腈提取能兼顾大多数化合物的提取效率,且基质干扰相对较少,适用于多组分筛选。C<sub>18</sub>吸附剂能有效去除样品中的油脂和其他非极性干扰物,使基质抑制得到改善,故选用C<sub>18</sub>吸附剂进行净化。

### 2.2 质谱条件和色谱条件的优化

由于筛查的化合物种类较多,电离性质不同,除了主要在正离子模式下有响应的化合物以外,还有少部分化合物在

负离子模式下电离。本方法充分利用离子阱—飞行时间串联质谱快速正负极转换功能,能够对样品同时进行正负离子模式扫描,从而实现一次进样却能得到所有化合物的质谱信息,极大地节省了分析时间。

多种非法添加药物极性差异比较大,有极性、中等极性或弱极性化合物。考察了常用甲醇—水、乙腈—水混合溶剂体系作为流动相对目标化合物的色谱行为和离子化程度的影响。结果表明,当使用乙腈—水体系作为流动相时,大部分待测化合物的响应值比用甲醇—水作流动相时高。试验还进一步比较了流动相中加入 0.1% 乙酸、0.1% 甲酸、5 mmol/L 甲酸铵、5 mmol/L 乙酸铵等挥发性试剂对灵敏度的影响。正离子模式下流动相中加入酸,可显著提高离子化效率和灵敏度。负离子模式下,流动相中加入酸性溶液,会抑制分析物的去质子化。因此当加入 0.1% 甲酸溶液后,目标化合物响应明显减弱,有些几乎不出峰,如氢氯噻嗪。采用 5 mmol/L 乙酸铵—乙腈作流动相时,个别化合物峰型较宽,拖尾严重。综合考虑,本试验采用 0.1% 乙酸—乙腈作为

流动相进行梯度洗脱,使所有化合物都尽可能出峰,扩大筛查范围,并且具有较高的灵敏度和较好的分离度。

### 2.3 高分辨质谱谱库的建立

参照法规、指令、相关文献、新闻报道等,尽可能查到保健食品中所有减肥类非法添加物的名单,并将这些化合物名称、分子式、精确分子量输入到 Excel 文档,将 Excel 文档导入 MetaID 软件作为一级高分辨质谱筛查谱库。利用现有标准物质,建立多级碎片离子及保留时间信息数据库,用于进一步定性确证。包含中英文名称、CAS 号、分子量、分子式、结构式、加合模式、电离模式、一级质谱图、二级等多级质谱图等信息,导入 ACD LABS 12.0 MS Manager 软件用于谱库检索。通过谱库检索,未知化合物质谱图中主要碎片离子峰的  $m/z$  与标准谱图对比,最后得到的结果用各级谱图匹配度(MSsimilarity)来衡量相似性,匹配度的程度可作为确证参考。该数据库同时是开放的体系,可不断增加化合物种类,还可自行对非法添加药物的多级质谱库进行扩展。16 种常见减肥药物的多级质谱库信息见表 1。

表 1 16 种化合物的分子式、保留时间、精确质量数、主要碎片离子以及胶囊样品中筛查限、平均回收率和精密度

Table 1 List of target illegal adulterants with corresponding molecular formula, retention time, polarity, diagnostic precursor ions, sequential multistage fragment ions ( $MS^2$  and  $MS^3$ )<sup>a</sup>, accurate mass data, screening detection limit(SDL), average recovery (at SDL) and precisions (RSD)

化合物	分子式	准分子离子			保留时间/min	二级碎片离子		筛查检出限/ ( $mg \cdot kg^{-1}$ )	平均回收率 ( $n=6$ )/%	相对标准偏差 ( $n=6$ )/%
		离子模式	精确质量数( $m/z$ )	质量误差 ( $10^{-6}$ )		测定值 ( $m/z$ )	测定值 ( $m/z$ )			
去甲麻黄碱 norephedrine	$C_9H_{13}NO$	$[M+H]^+$	152.107 0	-2.60	6.82	134.095 4	117.067 8	0.15	83.8	6.1
麻黄碱 ephedrine	$C_{10}H_{15}NO$	$[M+H]^+$	166.122 6	-4.70	7.96	148.111 7	117.069 9	0.25	85.5	8.8
氯噻嗪 chlorothiazide	$C_7H_6N_3O_4S_2Cl$	$[M-H]^-$	293.941 5	1.70	8.91	213.963 7	178.996 1	0.10	53.1	8.2
氢氯噻嗪 hydrochlorothiazide (6)	$C_7H_8N_3O_4S_2Cl$	$[M-H]^-$	295.957 2	0.00	9.79	268.948 6	204.988 2	0.15	79.7	10.8
氯噻酮 chlorthalidone	$C_{14}H_{11}N_2O_4S_2Cl$	$[M-H]^-$	337.005 5	-1.80	16.10	318.995 3	283.020 6	0.25	64.2	8.4
芬氟拉明 fenfluramine	$C_{12}H_{16}NF_3$	$[M+H]^+$	232.130 8	-5.50	17.60	187.073 5	159.041 8	0.20	76.0	6.4
多虑平 doxepin	$C_{19}H_{21}NO$	$[M+H]^+$	280.169 6	-3.40	20.47	235.111 7	107.049 1	0.25	49.4	9.6
甲氯噻嗪 methyclothiazide	$C_9H_{11}N_3O_4S_2Cl_2$	$[M-H]^-$	357.949 5	1.90	20.55	321.973 1	258.012 1	0.25	80.7	8.8
呋塞米 furosemide	$C_{12}H_{11}N_2O_5S_2Cl$	$[M-H]^-$	329.000 4	-0.91	22.23	285.012 0	204.987 9	0.10	75.7	6.0
西布曲明 sibutramine	$C_{17}H_{26}NCl$	$[M+H]^+$	280.182 7	-3.90	23.67	139.031 1	103.054 6	0.12	67.2	8.7
吲达帕胺 indapamide	$C_{16}H_{16}N_3O_3S_2Cl$	$[M+H]^+$	366.067 4	-0.55	24.55	132.080 8	117.058 1	0.25	83.1	11.8
氟西汀 fluoxetine	$C_{17}H_{18}NOF_3$	$[M+H]^+$	310.141 3	-0.32	24.68	148.112 7	—	0.50	85.0	5.0
舍曲林 sertraline	$C_{17}H_{17}NCl_2$	$[M+H]^+$	306.081 1	-2.30	25.43	275.040 6	158.977 9	0.75	62.2	14.8
苄氟噻嗪 bendroflumethiazide	$C_{15}H_{14}N_3O_4F_3S_2$	$[M-H]^-$	420.030 5	3.30	27.17	289.045 0	205.081 0	0.15	88.1	7.3
布美他尼 bumetanide	$C_{17}H_{20}N_2O_5S$	$[M-H]^-$	363.102 0	0.67	29.39	319.112 9	262.041 3	0.25	80.2	9.0
比沙可啶 bisacodyl	$C_{22}H_{19}NO_4$	$[M+H]^+$	362.138 7	-4.10	31.12	226.085 1	184.075 1	0.15	83.5	5.4

2.4 筛查流程图

保健食品中非法添加药物种类繁多,除了添加常用的治疗药物,还常添加治疗药物的结构类似物、临床上本不用作治疗或已被淘汰的药物以及尚未获得批准的新型药物或先导化合物。因此保健食品中非法添加药物的筛查即包括已知化合物名称,并有相应的标准品的目标化合物筛查;又包括已知化合物名称,但无相对照品,或既不知化合物名称,又无对照品的非目标化合物筛查。筛查分析面临两个难点:① 化合物结构复杂,相对分子质量范围广;② 非目标化合物的分析中无相应的标准品,无法进行比对研究。本研究建立了如图1所示的筛查策略。步骤①适用于目标化合物筛查,步骤②和③适用于非目标化合物筛查。通过紫外光谱确定非法添加药物特征吸收波长,结合滥用药物高分辨质谱数据库,通过精确质量数的检索匹配对非法添加药物实现快速筛查,并使用保留时间、同位素丰度和多级特征碎片离子进行确证。

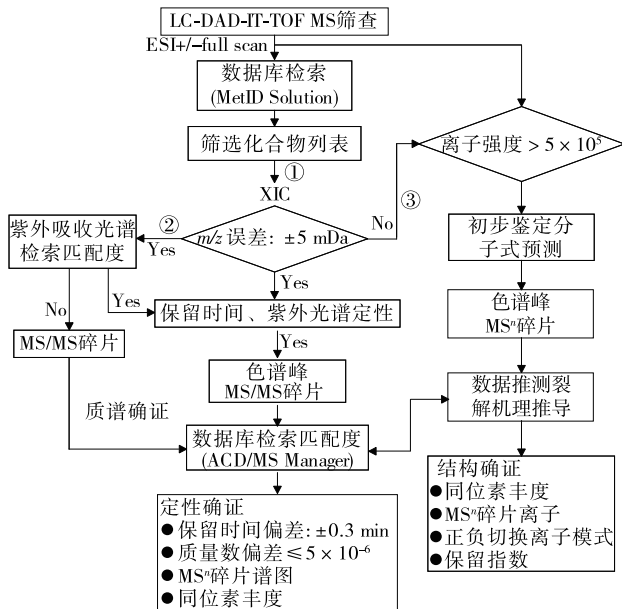


图1 筛查流程图

Figure 1 Screening procedure for illegally added drugs using LC-DAD-IT-TOF-MS

2.5 实际样品筛查

应用该方法对实际样品进行筛查,图2为市售某减肥胶囊样品溶液正模式下的离子流图。在23.5 min有一个很强的色谱峰,对应的分子离子峰为  $m/z$  280.181 3、二级碎片离子为  $m/z$  235.124 8;  $m/z$  179.062 9、 $m/z$  153.046 1、 $m/z$  139.031 4、 $m/z$  125.015 9,三级碎片离子为  $m/z$  103.054 3,见图2。根据分子离子峰的精确质量数,采用分子式预测软件预测其对应的分子式,得到4个候选的化合物,其中一种化合物分子式为  $C_{17}H_{26}NCl$ 。

同时由 MetID solution 筛查软件按精确质量数进行自动快速定性筛查,筛查结果为西布曲明。为进一步确证该化合物的存在,将所得的多级高分辨质谱碎片离子,在自建的药物高分辨质谱数据库中搜索,得到其二级碎片离子与西布曲明的匹配度达到99.4%,见图3、4,且保留时间与西布曲明

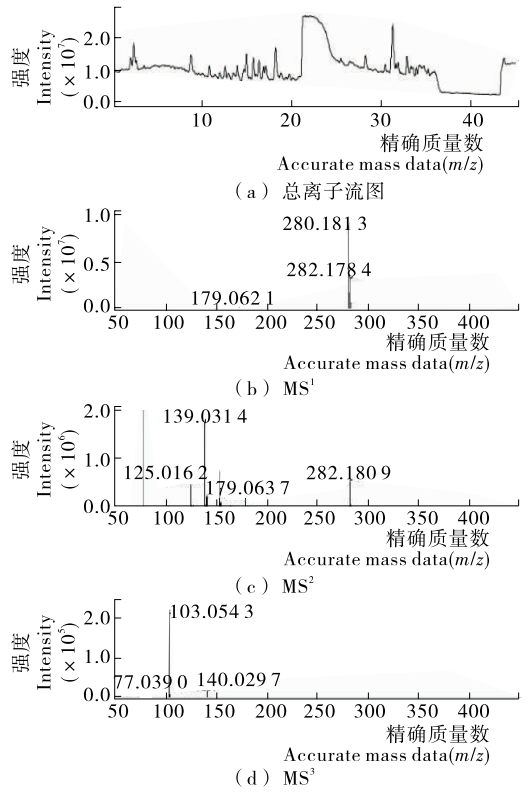


图2 阳性样品的总离子流图和多级质谱图

Figure 2 Full-scan accurate mass chromatograms and MSn spectra of a positive sample

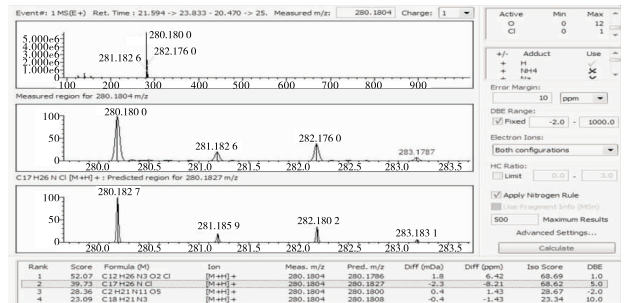


图3 一级质谱的精确质量数检索初筛

Figure 3 Screening of the compound by library matching of mass accuracy

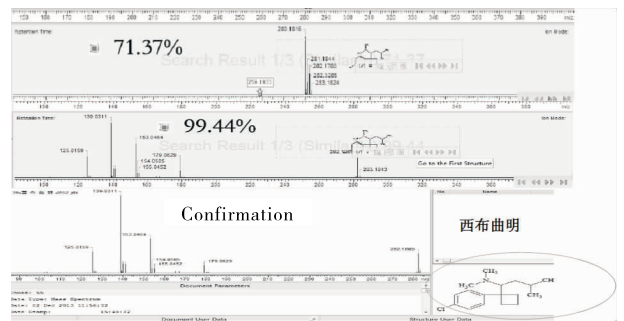


图4 多级质谱的谱库检索结果确证

Figure 4 Confirmation of the compound via library matching by using ACD/MS Manager based on retention precision and MSn spectrum similarity

标准物质的保留时间一致。因而确认该减肥胶囊中含有西布曲明。根据特征子离子碎片信息推断出该化合物的多级裂解规律见图 5,在正电荷中心  $N^+$  的吸引下,与正电荷中心连接的胺基  $N-C$  键断裂,丢失  $C_2H_7N$ ,形成  $m/z$  为 235.124 8 的中间体,该中间体有 3 种结构形式:四元环形式以及稳定性更好的五元环和开环结构形式,经分子预测软件

可知  $m/z$  179.062 9、 $m/z$ 153.046 6、 $m/z$  139.030 9 和  $m/z$  125.015 9,这些碎片离子是由开环结构的中间体分别丢失  $C_4H_8$ 、 $C_6H_{10}$ 、 $C_7H_{12}$  和  $C_8H_{14}$  得到, $m/z$  为 139.030 9 的二级碎片离子进一步裂解,丢失  $HCl$  得到  $m/z$  为 103.054 3 的碎片离子。这与文献[12]报道的西布曲明完全相符,因此进一步确证了保留时间为 23.5 min 的化合物为西布曲明。

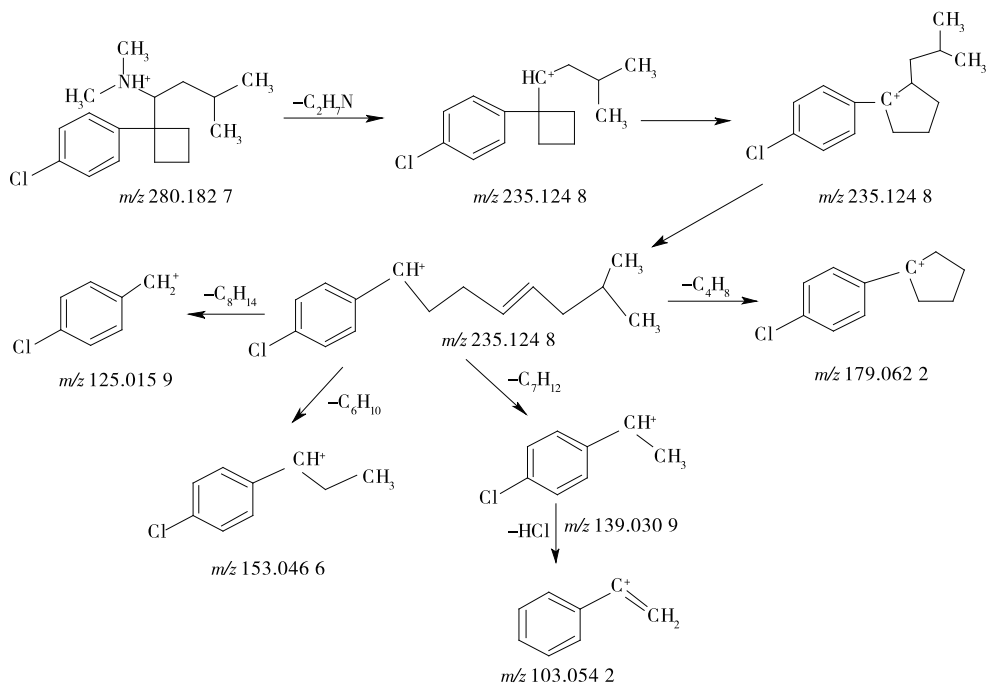


图 5 西布曲明的裂解途径

Figure 5 The proposed fragmentation pathways for Sibutramine

### 3 结论

本试验采用液相色谱-二极管阵列检测器-离子阱-飞行时间串联质谱对保健食品中的非法添加药物进行了筛查与确认。通过谱库检索、分子式预测、以及多级碎片离子质谱图鉴定,可对已知以及非目标化合物进行检测,并根据碎片离子信息,推断其裂解规律。该方法简单、快速,为“非目标”检测分析、筛查范围广、在不使用标准品或对照品的情况下即可得到准确可靠的结论。适用于食品、药品中减肥类非法添加物以及其他非法添加物的快速筛查与鉴定。

#### 参考文献

- [1] 沈志武,唐宏兵,李群,等. 高效液相色谱法测定保健食品中他达拉非、西地那非、伐地那非违禁药物含量[J]. 理化检验: 化学分册, 2008, 44(6): 540-542.
- [2] 刘吉金,李军. 减肥食品或保健品中非法添加盐酸西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞的快速检测方法研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(6): 793-794.
- [3] 张喆,高青,余倩,等. 中药制剂及保健品中违禁添加 9 种化学降糖药 HPLC-MS/MS 定性检测[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(1): 38-43.
- [4] 张平,黄赵刚,程钢,等. 降糖宁胶囊中掺有西药降糖成分的检测[J]. 安徽医药, 2006, 10(3): 48.

- [5] 宋家玉,周景洋,丰硕,等. 薄层色谱法检测降糖中药制品中的格列本脲[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1 339-1 3401.
- [6] 杨蕾,谢华,黄瑛,等. HPLC 法测定格列美脲胶囊中格列美脲的含量[J]. 中国药品标准, 2002, 3(6): 59.
- [7] 李丹,文红梅,崔福春,等. LC-MS/MS 法快速测定中成药、保健食品中非法添加的 36 种化学成分[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1 527-1 532.
- [8] 林艳萍,司端运,刘昌孝. 液质联用分析中药降糖制剂中掺入的西药成分[J]. 天津大学学报, 2008, 41(6): 720-724.
- [9] 杨钊,陈安珍,吴爱英,等. UPLC-MS/MS 测定降糖类中成药及保健品中 11 种化学药[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2 127-2 130.
- [10] 王美玲,曾乐,颜鸿飞,等. 高效液相色谱-离子阱飞行时间串联质谱法快速筛查保健食品中非法添加的磷酸二酯酶-5 抑制剂及其类似物[J]. 分析测试学报, 2014, 33(3): 239-247.
- [11] 张帆,颜鸿飞,戴洁云,等. 食品多组分添加剂及非法添加物的 HPLC-HRMS 广谱筛查[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 42-48, 62.
- [12] SONG Fen-hong, MONROE Douglas, EL-DEMERDSH Aref, et al. Screening for multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 88: 136-143.