

液质联用检查中药制剂及保健食品中减肥类药物*

车宝泉, 张喆, 黄晓君, 郭洪祝, 王志斌

(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要 目的: 建立准确、灵敏的 HPLC-MS/MS 方法鉴别中药制剂及保健品中非法添加的 10 种减肥药物。方法: 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱, 梯度洗脱: 流动相 A 为含 0.1% 醋酸的 20 mmol L⁻¹ 醋酸铵溶液, 流动相 B 为甲醇, 流速为 1 mL·min⁻¹。选择正负离子全扫描方式检测临床常用的 10 种减肥药, 利用质谱解析软件研究了上述化合物的质谱裂解规律, 通过比较样品峰与对照品峰的一级质谱、二级质谱质荷比, 确定样品中是否掺杂了化学药物。结果: 各色谱峰间分离度良好, 质谱分辨率符合要求, 最小检出量为 2 ng 至 100 ng。结论: 该方法简便、快捷, 灵敏度、准确性均可满足定性检查的要求。

关键词: HPLC-MS/MS; 减肥药; 酚酞; 盐酸氟西汀; 盐酸西布曲明; 奥利司他

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0633-03

HPLC-MS/MS identification of antiobesity in traditional Chinese medicine and health foods*

CHE Bao-quan, ZHANG Zhe, HUANG Xiao-jun, GUO Hong-zhu, WANG Zhi-bing

(Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035 China)

Abstract Objective To develop an HPLC-electrospray ion trap mass spectrometry for the identification of ten antiobesity illegally adulterated in traditional Chinese medicine (TCM) and health foods. **Method** The separation was conducted on a Ultimate XB-C₁₈ Column by gradient elution with methanol and 20 mmol L⁻¹ ammonium acetate as the mobile phase, the flow rate is 1 mL·min⁻¹. The mass spectrometer was operated in positive ion or negative mode and in three scan modes including full scan MS, selected ion monitoring and full scan MS². The fragmentation pattern of these drugs was summarized, the obtained pseudomolecular ions, fragment ions were used to identify whether these drugs were present in the medicines. **Results** Resolution of these ten drugs were good. The limits of detection were 2-100 ng. **Conclusions** The method is sensitive, specific, accurate and very applicable to Chinese medicine and health food.

Key words HPLC-MS/MS; antiobesity; phenolphthalein; fluoxetine; sibutramine; orlistat

目前我国用于减肥的中药和保健食品面临的主要问题是添加违禁药物。某些制药商在中药制剂和保健食品中非法掺杂化学合成减肥药, 普通患者在不知情下服用化学药物, 给人体造成了很大伤害, 严重的甚至造成死亡。

现行国家方法对一些药物的鉴别存在空白。也有其他报道采用液相色谱-质谱或气相色谱-质谱方法鉴别减肥药^[1,2], 但也存在检查药物较少的问题。为解决上述问题, 本文研究建立了液相色谱-质谱测定方法, 可鉴别 10 种化学减肥药物, 结合建立的质谱数据库, 基本可以覆盖市场上销售的减肥

药物。本文报道的方法简便, 监控范围广, 准确率、灵敏度高, 可为“打假”工作提供可靠的技术保障。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Thermo 公司 Finnigan LCQ Advantage 液相色谱-离子阱质谱联用仪, 配有 ESI 源; 美国 Thermo 公司 Surveyor 高效液相色谱仪, 配有液相泵、自动进样器及二极管阵列检测器。

1.2 对照品 咖啡因、呋塞米、盐酸安非他酮、盐酸芬氟拉明、酚酞、布美他尼、盐酸氟西汀、盐酸舍曲林、西布曲明、奥利司他对照品均购自中国药品生物

* 北京市“2006 药品安全及服务平台”(No. D02060260000703) 资助

第一作者 Tel: (010) 66124424 E-mail: chebaoquan@126.com

制品检定所, 纯度均为 100%。

1.3 试剂 甲醇为色谱纯, 醋酸铵为分析纯, 水为纯化水。

1.4 样品 均为北京市药品食品监督管理局市场监督抽查样品。其中肥姐减肥胶囊批号为 2006092901, 标示主要成分为枳实、山楂、芦荟等。

2 仪器条件

2.1 液相色谱条件 色谱柱: U timate s XB- C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 A: 含 0.1% 醋酸的 20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱 (0~13 min, B 相为 20% → 42%; 13~20 min, B 相为 42%; 20~23 min, B 相由 42% → 64%; 23~33 min, B 相为 64%; 33~33.1 min, B 相为 64% → 95%; 33.1~40 min, B 相为 95%; 40~40.1 min, B 相回到初始比例 20%); 检测波长为 230 nm, 流速为 1 mL·min⁻¹ (分流比为 4:1), 进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 源电压 4.5 kV, 毛细管温度: 270 °C, 毛细管电压 20 kV, 鞘气流速 5 L·min⁻¹, 正负离子检测, 扫描方式采用全扫描一级质谱、全扫描二级质谱 (MS/MS), 相对碰撞能量 40%, 质量数范围 100~1000。

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液 精密称取对照品咖啡因、盐酸安非他酮、盐酸氟西汀各 20 mg, 呋塞米、布美他尼、奥利司他各 10 mg, 盐酸芬氟拉明、西布曲明各 50 mg, 酚酞 15 mg, 盐酸舍曲林 30 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.2 供试品溶液 取 1 次服用量的样品细粉 (固体制剂) 或液体制剂, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 40 mL, 固体制剂超声 15 min, 液体制剂振摇 2 min, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

4 方法与结果

4.1 10 种化学药物的质谱特性 精密量取“3.1”项下对照品溶液各 5 μL, 按“2.1”及“2.2”项下条件进样分析, 各化合物准分子离子及对准分子离子进行二级全扫描分析所得碎片离子见表 1。质谱总离子流图见图 1-A 和图 1-B。

4.2 专属性试验 中药制剂和保健品剂型比较多, 成分比较复杂, 为考察辅料及中药制剂其他成分对上述 10 种减肥药定性检查的干扰情况, 选择了 4 种常用剂型的样品包括片剂、胶囊、茶和口服液, 按“3.2”项下配制供试品溶液 1 份, 比较色谱及质谱

表 1 10 种化合物准分子离子及主要碎片离子质荷比

Tab 1 Pseudomolecular ions and their ions at full scan MS/MS for 10 substances

化学名 (name)	m/z	
	准分子离子 (pseudomolecular ions)	碎片离子 (fragment ions)
咖啡因 (caffeine)	195	138(M - C ₂ H ₄ N ₂)
安非他酮 (amfebutamone)	240	184(M - C ₄ H ₉ + 2H)
芬氟拉明 (fenfluramine)	232	187(M - C ₂ H ₆ N), 159(M - C ₄ H ₁₀ N)
酚酞 (phenolphthalein)	[M + H] + 319	225(M - C ₆ H ₅ O)
布美他尼 (bumetanide)	365	284(M - H ₂ NO ₂ S) 240(M - H ₂ NO ₂ S - CO ₂)
氟西汀 (fluoxetine)	310	148(M - C ₇ H ₄ F ₃ O)
舍曲林 (sertraline)	306	275(M - CH ₄ N)
西布曲明 (sibutramine)	280	153(M - C ₆ H ₄ Cl - CH ₃), 139(M - C ₆ H ₄ Cl - C ₂ H ₅)
奥利司他 (orlistat)	496	337(M - C ₇ H ₁₂ NO ₃), 319(M - C ₇ H ₁₂ NO ₃ - H ₂ O)
呋塞米 (furosemide)	[M - H] - 329	285(M - COOH)

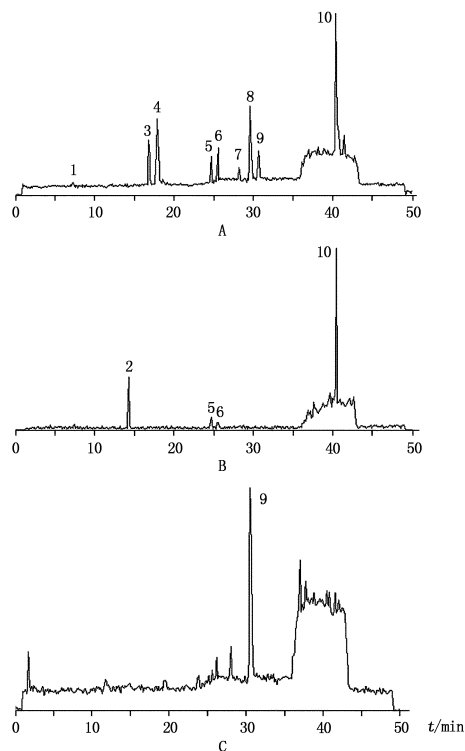


图 1 10 种对照品正离子 (A)、对照品负离子 (B)、肥姐减肥胶囊 (C) 总离子流图

Fig 1 Chromatograms of TIC of 10 reference substances - positive ion (A), reference substances - negative ion (B), Feijie antiobesity capsules (C)

1. 咖啡因 (caffeine) 2. 呋塞米 (furosemide) 3. 安非他酮 (amfebutamone) 4. 芬氟拉明 (fenfluramine) 5. 酚酞 (phenolphthalein) 6. 布美他尼 (bumetanide) 7. 氟西汀 (fluoxetine) 8. 舍曲林 (sertraline) 9. 西布曲明 (sibutramine) 10. 奥利司他 (orlistat)

图(图略),个别液相色谱图中可见与上述 10种对照品保留时间一致的色谱峰,但是无一级质谱和二级质谱质荷比与上述 10种减肥药相同的碎片离子峰,由于本方法采用后者为定性依据,因此可判断常规辅料以及各制剂中所含的中药成分不干扰 10种减肥药的检测。

4.3 精密度试验 精密量取“3.1”项下对照品溶液,连续进样 5次,紫外检测器 HPLC 图谱中保留时间的 RSD 均在 1% 之内,显示方法精密度良好。

4.4 灵敏度试验 取“3.1”项下对照品溶液适量,加甲醇逐步稀释,按“2.1”及“2.2”项下条件测定,上述药物的待测量在 2~100 ng 之间时,一级质谱总离子流图中色谱峰的信噪比(S/N)在 3 左右。

4.5 样品测定 用此方法检验了 25 批次样品,剂型包括胶囊、片、茶、口服液,其中 5 批样品检出西布曲明、1 批中检出芬氟拉明、1 批中检出酚酞。样品的典型图谱见图 1-C,样品中西布曲明分子离子及碎片质量数与表 1 中的理论值相同。

5 讨论

5.1 流动相的选择 方法所鉴别的 10 种药物化学性质相差较大,要达到良好分离比较困难。经试验流动相比比例为乙腈-缓冲液(0.02 mol·L⁻¹醋酸铵,0.1% 三氟醋酸)(60:40)时,有几个成分峰形不好,拖尾严重,分离度达不到要求,且奥利司他不出峰;调整流动相为甲醇-缓冲液(0.02 mol·L⁻¹乙酸铵,0.1% 醋酸)(60:40)后,峰形有较大改善,仍然无法完全分离,奥利司他不出峰。经试验,流动相比比例为甲醇-缓冲液(80:20)时,奥利司他约 50 min 才出峰,因此用等度洗脱的方法很难在奥利司

他出峰的基础上保证其他 9 个成分的分离。经过反复实验确定了所述的梯度洗脱方法。应用该方法基线平稳,各成分能完全分离,而且奥利司他峰之前的溶剂峰没有干扰。

5.2 供试品溶液制备 本文中检测的化学减肥药基本都能溶于甲醇,某些需要超声助溶,而水溶性差别较大,因此选择甲醇作为溶剂。此外中药制剂由于处方中多数含有浸膏,比较粘稠,如果用水相或含水的流动相溶解,过滤困难。试验证明采用甲醇为溶剂提取过滤的溶液,所含化学添加物溶解完全,其他成分和辅料干扰小,而且方便快捷。

5.3 检测 呋塞米易于失去一个氢形成带负电荷的[M-H]⁻离子峰,其他 9 种成分均易于加氢形成带正电荷的[M+H]⁺离子峰,因此选用正负离子检测方式进行试验。奥利司他结构为饱和脂肪烃,在 200~400 nm 紫外光谱范围内无紫外吸收,液相色谱图中无法检测,因此采用质谱总离子流图检测。

参考文献

- 1 YAN Hong(颜红), LIXiao-yu(李晓瑜), PENG Fu-quan(彭富全). Simultaneous determination of four kinds of chemical drugs in slimming foods by HPLC-Mass spectrometry (HPLC-MS 同时检测减肥类保健食品中常见 4 种化学药物). *J Mod Food Pharm* (现代食品与药品杂志), 2006, 16(5): 9
- 2 FENG Jia-li(冯家力), PAN Zhen-qiu(潘振球), CAO Hua-juan(曹华娟), et al. Determination of fenfluramine, diethylpropion and mazindol in slimming foods by gas chromatography-mass spectrometry (减肥食品中违禁药物芬氟拉明、安非拉酮、马吲哚的气相色谱-质谱检测). *Chin J Chromatogr* (色谱), 2004, 22(3): 228
(本文于 2008 年 8 月 6 日收到)