

HPLC-DAD-MS 法检测中药制剂 中非法添加成分褪黑素

伍小勇^① 傅小英^② 张晓丹^① 陈 静^① 古卓良^① 周国华^①

[摘要] 目的 建立一种检测镇静安眠类中药制剂中非法添加褪黑素成分的方法。方法 采用高效液相色谱仪(DAD 检测器)和液相色谱-质谱联用仪,比较样品与对照品的保留时间、紫外吸收光谱图和质谱图是否一致来确定样品是否添加褪黑素成分。结果 褪黑素在 2.02~101.0 mg/ml 范围内线性良好;加样回收率平均为 101.27%;精密度 RSD 为 0.1%;检测限为 4 ng/ml;同时也考察了方法的耐用性和专属性。采用本文的方法实测了 3 种市售镇静安眠类中药制剂,均检测到了褪黑素成分,其中一批样本未在说明书中表明属于非法添加。结论 该方法准确、快速、易操作,适用于镇静安眠类中药制剂中非法添加褪黑素成分的检测。

[关键词] 高效液相色谱法;液相色谱-质谱联用;非法添加;褪黑素

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2011)02-0153-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.02.018

Determination of Melatonin Illegally Adulterated into Traditional Chinese Medicines by HPLC-DAD-MS

WU Xiao-yong^①, FU Xiao-ying^②, ZHANG Xiao-dan^①, CHEN Jing^①, GU Zhuo-liang^①, ZHOU Guo-hua^①

^①Nanjing Institute for Quality Control of Medical Material and Equipment, Nanjing 210002, China;

^②Health Department of the General Logistics Department of PLA, Beijing 100842, China

[Abstract] **Objective** To establish an assay for detecting the melatonin illegally adulterated into sedative and hypnotic traditional Chinese medicines. **Methods** The consistency in the retention time of high performance liquid chromatography, DAD-UV spectra and MS spectra of elutes between samples and melatonin reference was used to find out whether melatonin was adulterated into target samples. **Results** With the detection of high performance liquid chromatography-ultraviolet 233 nm, the linear range of melatonin was 2.02-101.0 mg/ml. The average recovery was 101.27% RSD was 0.1%. The detection limit was 4 ng/ml. The durability and specificity were also investigated. Three batches of sedative and hypnotic traditional Chinese medicines from the market were detected by the assay. It was found that all the three samples contained melatonin, but one sample did not specify the addition of melatonin. **Conclusion** The method we developed here is accurate, rapid and easy-operated. It could be used to determine the melatonin illegally adulterated into sedative and hypnotic traditional Chinese medicines.

[Key words] high performance liquid chromatography; liquid chromatography/tandem mass spectrometry; illegal adulteration; melatonin

中药制剂中常见添加一些有效的化学药品,能够将中药制剂的调理作用与化学药品的速效作用有效地结合起来,有利于全面控制病情,这个过程是需要经过严格的药理与临床验证来确定的。但是某些

不法厂商为了牟取利益,未经过严格试验验证就擅自一些中药制剂中非法添加一些化学药品,患者在使用后可能产生不可预知的不良反应,严重威胁到患者的生命安全^[1-2]。目前非法添加化学物质已成为中药制剂造假的主要方式,例如在镇静安眠类中药^[3-4]中添加地西泮、艾司唑仑、氯硝西泮、褪黑素等,这属于药品监管部门严厉打击的对象。

褪黑素(melatonin),又称松果体素,是人体大脑内松果体分泌的一种激素。其分子式为 $C_{13}H_{16}N_2O_2$,相对分子质量为 232,最高紫外吸收峰在 206、233、278 nm,为脂溶性物质,对光、热均稳定。具有安眠作

基金项目:全军医学科学技术研究“十一五”计划科技攻关课题, No. 08G025

作者简介:伍小勇,主管药师。研究方向:药物分析。E-mail: wuxy5@163.com

作者单位:① 210002 江苏南京,南京军区联勤部药品仪器检验所;② 100842 北京,总后勤部卫生部

通讯作者:周国华 E-mail: ghzhou@public1.ppt.js.cn

用^[5],但服用量有一定的控制,随意长期使用,可能干扰或导致整个内分泌系统紊乱而引发其他疾病。其测定方法现有放射免疫法、酶联免疫法、红外光谱、紫外光谱、气-质联用法、液-质联用法(HPLC-MS)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测。现在应用最多的是 HPLC 法,但大多数针对单一产品,使用的流动相多为一定比例的甲醇和盐溶液^[6-8],试验后需要用大量水冲洗色谱柱。本文以镇静安眠类中药制剂为例,采用高效液相色谱仪(DAD 检测器)和液相色谱-质谱联用仪,探讨测定褪黑素的方法,并通过比较样品与对照品的保留时间、紫外吸收光谱图和质谱图是否一致来确定样品是否添加褪黑素成分,同时建立了检测非法添加褪黑素成分的质量标准^[9]。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Agilent1100,二极管阵列检测器,安捷伦公司);液相色谱-质谱联用仪(LC-MS-2020,日本岛津制作所);色谱柱(Shim-Pack VP-ODS 4.6 mm × 150 mm 5 μm(HPLC-DAD)); Shim-Pack VP-ODS 2.0 mm × 150 mm 5 μm(LC-MS)。

1.2 试剂 褪黑素(纯度:99.5%,浙江黄岩延年褪黑素公司,批号:090825),样品 A(规格:4 g/包,四川某产业有限公司,批号:20090901),样品 B 作为对照药品(南求褪黑素片,规格:每片含 3 mg 褪黑素,美国华纳制药,批号:20090711),样品 C(松果体素片(奥蓓斯),规格:420 mg/片,广州健鸣春生物科技,批号:09082301,未标明褪黑素含量)。所用其他试剂均为色谱纯或分析纯,水为超纯水。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 HPLC-DAD:色谱柱以十八烷基键合硅胶为填充剂,柱温:30℃,波长:233 nm,流动相:甲醇-乙腈-水(30:30:40)

1.3.2 质谱检测条件 电喷雾离子化,正负离子全扫描方式,质量采集范围 120~800;氮气,雾化气流速 1.5 L/min,干燥气流速 15 L/min;DL(脱溶剂装置)温度为 250℃,Block 温度为 200℃;极化电压:4.5 kV。

1.3.3 溶液的制备 (1)对照品溶液 取对照品 20.30 mg(纯度为 99.5%)精密称定,至 50 ml 量瓶中,加甲醇适量,超声处理 15 min 使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得 404.0 μg/ml 的贮备液。(2)样品溶液 取 1.3.3(2)项下的样品溶液,各取样品 A 约 0.8 g、样品 B 约 0.1 g 和样品 C 约 0.4 g,精密称定,分别至 50 ml 量瓶中,加甲醇适量,超声

处理 15 min 使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过。

2 结果

2.1 线性关系考察 精密量取对照品贮备液适量,依次制备浓度分别为 2.02、10.10、20.20、40.40、50.50、80.80、101.0 μg/ml 的对照品溶液。照 1.3.1 项下色谱条件各进样 10 μl,记录色谱图。以峰面积(A)为纵坐标,以褪黑素浓度(C)为横坐标,得回归方程为:

$$A = 34.94 C + 39.619, r = 0.9996$$

结果表明,在范围 2.02~101.0 μg/ml 时,线性考察结果良好。

2.2 检测限和定量限 将对照品溶液稀释成系列浓度,分别进样 10 μl,以信噪比(S/N)分别为 3 和 10 确定检测限和定量限,分别为 4、10 ng/ml,此浓度相当于每片样品中非法添加 0.2、0.5 μg 的褪黑素即可检出和定量,均远低于褪黑素的常规剂量 3 mg。

2.3 精密度试验 取浓度为 40.40 μg/ml 的对照品溶液,重复进样 6 次,峰面积积分值的 RSD 为 0.1%。

2.4 稳定性试验 将浓度为 40.40 μg/ml 的对照品溶液在室温下考察 5 d,测得 RSD 为 0.6%,其日间与日内精密度没有显著性差异,表明溶液在 5 d 内稳定。

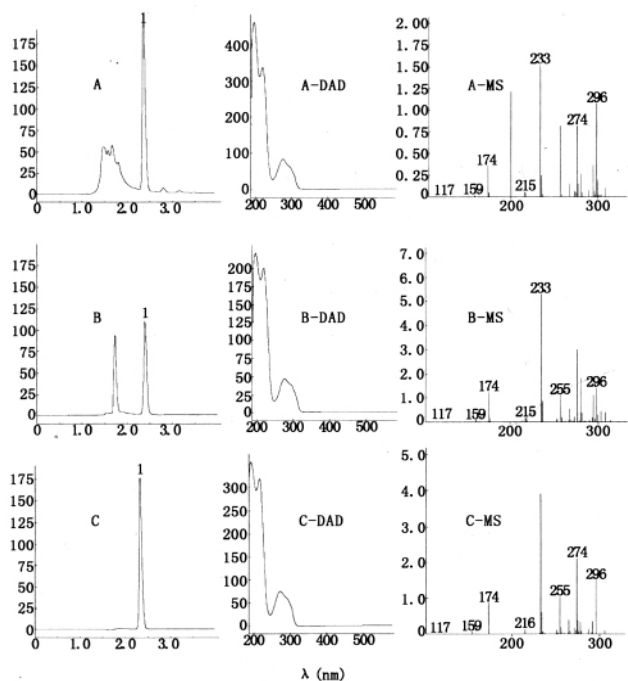
2.5 加样回收率试验 称取样品 A 约 0.3 g 共 9 份,精密称定,分别至 25 ml 量瓶,加甲醇适量,超声 20 min 使溶解;每 3 份分别加入 404.0 μg/ml 的褪黑素对照品贮备液各 1.0、1.5、2.0 ml,加甲醇稀释至刻度,即得到 3 种浓度的 9 份溶液。按样品测定项测定含量,计算回收率。计算结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=9)

样品量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
513.8	404.0	919.0	100.30		
514.0	404.0	919.8	100.45		
513.6	404.0	921.3	100.92		
512.5	606.0	1126.0	101.24		
512.7	606.0	1122.8	100.68	101.27	0.9
513.2	606.0	1122.5	100.54		
514.2	808.0	1342.3	102.49		
513.4	808.0	1344.7	102.88		
516.8	808.0	1340.6	101.96		

2.6 样品中褪黑素的测定 按 1.3.1 项下色谱条

件试验,在与褪黑素对照品色谱峰中相同的保留时间处,样品 A、B 和 C 均检出色谱峰, DAD 图谱显示此色谱峰的紫外吸收图谱与对照品褪黑素完全一致,见图 1。在 206、233、278 nm 处均有最大吸收峰。因此可初步确定样品 A 中非法添加了褪黑素成分(样品 B 为对照样品,说明书中标明含褪黑素;样品 C 标明为松果体提取物)。按 2.1 项下回归方程,测定 3 样品分别含褪黑素为 6.2 mg/包、3.2、2.7 mg/片,或 1.71、10.75、6.26 mg/g ($n=3$)。



A: 样品 A; B: 样品 B; C: 对照品; I: 褪黑素

MS 图谱中, A、B、C 中的 $[M+H]^+$ 相对分子质量均为 233.20;

同位素比 ($M: M+1: M+2$): A 为 100:16.28:1.62,

B 为 100:16.10:1.45, C 为 100:15.42:1.45

图 1 样品与褪黑素对照品的 HPLC 色谱图及其 DAD 紫外吸收图谱和 MS 图谱

3 讨论

3.1 中药中非法添加的褪黑素成分确定 试验中除了应用保留时间和 DAD 紫外吸收光谱初步确定非法添加物为褪黑素外,为了进一步对该非法添加物进行确证,将样品和褪黑素对照品按 1.3.1 项下色谱条件和 1.3.2 项下质谱条件,分别进样 1 μ l,进行正负离子全扫描,测定其质谱(见图 1)。图 1 显示,样品和褪黑素对照品的相对分子质量相同,同位素比也相近。因此,运用 HPLC-DAD-MS 三者联用可基本确定该非法添加物为褪黑素。

3.2 方法的专属性和耐用性考察 试验中样品和

对照品的保留时间、紫外吸收光谱图和质谱图中相对分子质量和同位素比一致性可确定本方法的专属性符合要求。为了考察方法的耐用性,试验中采用了 3 个不同厂家的色谱柱(Shim-Pack VP-ODS 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm 5 μ m), Agilent 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm 5 μ m) 和 Alltima 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm 5 μ m)) 均能符合系统性试验,并在样品中检测出非法添加物褪黑素。

3.3 提取溶剂的选择 本研究分别试验了甲醇、乙醇、甲醇-乙腈-水(30:30:40) 3 种溶剂,对样品进行提取。结果表明,乙醇提取时样品图色谱峰不对称,有其它物质夹在其中;甲醇提取时样品图色谱峰对称,测定结果高;甲醇-乙腈-水(30:30:40) 提取时色谱峰中杂峰较甲醇提取物较多。由于褪黑素为脂溶性物质,易溶于甲醇,因此选用甲醇作为提取溶剂。

综上所述,运用 HPLC-DAD-MS 三者联用并通过比较样品与对照品的保留时间、紫外吸收光谱图和一级质谱图的一致性,无需对非法添加物分析二级质谱来进行结构确证,即可确定样品中非法添加物褪黑素成分。该方法准确、快速、易操作,适用于镇静安眠类中药制剂中非法添加褪黑素成分的检测。

【参考文献】

- [1] 董永成,杜士明,陈永顺,等.中成药及保健品非法添加化学成分的类型、危害及对策[J].时珍国医国药,2006,17(8):1601-1603
- [2] 张纯良,张国浩.对“梅花 K”假药案的反思[J].中国药事,2004,18(1):56
- [3] 刘畅,夏晶,胡青,等.LC/MS(n)法对中成药中非法添加 9 种镇静催眠类化学药品检测方法的研究[J].解放军药学报,2009,25(3):254-256
- [4] 祝波,赵宗阁,王尊文,等.LC-MS/MS 法分析保健品及中成药中添加的 15 种镇静催眠剂[J].药物分析杂志,2010,30(4):745-751
- [5] 彭清涛,胡文祥,陈陪让,等.眠尔康胶囊对小鼠睡眠的影响[J].解放军药学报,2003,19(2):100-102
- [6] 袁成,于燕莉,张卫星,等.高效液相色谱法用于褪黑素香口胶的含量测定[J].中国生化药物杂志,2005,26(4):232-234
- [7] 王金英,江川,李书柯,等.褪黑素测定方法及玉米、水稻种子中褪黑素含量的分析研究[J].中国农学通报,2009,25(17):20-24
- [8] 张相年,向军,赵树进.褪黑素原料和片剂的高效液相色谱分析[J].广东药学,2002,12(6):31-32
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[S].北京:中国医药科技出版社,2010.附录 194

(收稿日期:2010-09-14;修回日期:2010-11-19)

(本文编辑 梁爱君)