

柱前衍生高效液相色谱法测定减肥药中的芬氟拉明

翦英红 龙远德* 马言顺 黄天宝

(中国科学院成都有机化学研究所, 成都 610041)

摘 要 建立了柱前衍生反相高效液相色谱-紫外检测方法用于测定减肥药中的芬氟拉明。样品用三氯甲烷萃取, 异丙醇转溶, 再在四氢呋喃中和 60 °C 下, 用苯异氰酸酯衍生 35 min, 然后用甲醇/水 (72/28, V/V) 为流动相和 Kromasil C₁₈ 分离柱, 在 240 nm 检测衍生物。方法的线性范围在 2.52 ~ 126 mg/L ($r = 0.9994$), 检出限和定量限分别为 0.36 ng (S/N = 3) 和 1.2 ng (S/N = 10), 平均回收率为 98.4%, 相对标准偏差 (RSD) 小于 3.00%。

关键词 反相高效液相色谱法, 芬氟拉明, 柱前衍生, 苯异氰酸酯

1 引言

芬氟拉明是苯乙胺类食欲抑制剂, 其化学名称为 N-乙基- α -甲基-3-三氟甲基苯乙胺。美国食品药品监督管理局 (FDA) 称, 它会伤害人体的神经系统, 使服用者心脏瓣膜出现异常^[1]。国内也报道^[2,3]服用芬氟拉明后, 导致肾功能衰竭和精神障碍。美国 FDA 和国内有关部门都已明确规定禁止在减肥食品和药物中添加芬氟拉明。为此, 建立高灵敏度测定芬氟拉明的方法势在必行。

已见高效液相色谱法 (HPLC) 分析芬氟拉明的文献报道^[4~7], 采用紫外检测, 灵敏度不高, 最低检出限仅为 20.6 ng^[5]。本实验采用苯异氰酸酯柱前衍生和 240 nm 紫外检测方法, 不仅改善了色谱峰形, 而且提高了灵敏度, 芬氟拉明的检出限下降到 0.36 ng, 可与采用衍生-荧光检测方法的检出限 0.23 ng 相媲美^[8]。至今未见采用柱前衍生-紫外检测的 HPLC 方法分析芬氟拉明的报道。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

HPLC 系统由 Waters 6000A 输液泵、481 紫外检测器、996 二极管阵列检测器、7725 进样阀和 HW 色谱工作站组成; AS3120 振荡器; ZFQ81 旋转蒸发器。

盐酸芬氟拉明标准品 (Sigma 公司), 纯度高于 99%。无水四氢呋喃 (THF)、甲醇、苯异氰酸酯 (PIC)、CHCl₃、异丙醇和 KOH 均为分析纯。

2.2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m); 流动相: 甲醇/水 (V/V) = 72/28, 使用前经 0.45 μ m 滤膜减压过滤; 柱温: 37 °C; 检测波长: 240 nm; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 10 μ L。

2.3 实验方法

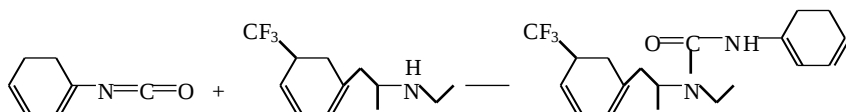
2.3.1 试剂和标准溶液的配制 按体积比 PIC:THF = 11000 的比例配制 PIC 衍生试剂, 按体积比二乙胺:THF = 11000 的比例配制二乙胺溶液, 配制后低温保存备用。

精确称取芬氟拉明标准物 4.50 mg (准确至 0.01 mg), 用无水 THF 溶解, 超声振荡 2 min 后, 用 THF 定容, 得 450 mg/L 的芬氟拉明标准溶液, 于 -4 °C 的冰箱中保存备用。

2.3.2 样品萃取 称取 1 g 左右的样品于锥形瓶中, 分别用 15、15 和 10 mL CHCl₃ 超声萃取 3 次, 合并萃取液, 过滤到 50 mL 容量瓶中, 定容后, 准确吸取 25 mL 溶液于 50 mL 烧杯中, 油浴蒸干。加入 5 mL 异丙醇, 搅拌使残渣溶解, 再滴加 2 mol/L KOH 溶液少许, 充分振荡, 采用减压法将溶液干燥, 得芬氟拉明残余物。

2.3.3 衍生反应 衍生化反应方程式如下所示:

2003-05-28 收稿; 2003-12-09 接受



用少量的 THF 溶解芬氟拉明残余物质后,加入 60 μL 的 PIC 衍生试剂,于 40 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中反应 20 ~ 60 min,再往反应液中加入 80 μL 二乙胺溶液,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中反应以消耗过量的 PIC。所得反应液用 0.45 μm 的滤膜过滤,移入 5 mL 容量瓶中,甲醇定容待分析。

在芬氟拉明标准溶液中加入一定量的 PIC 衍生试剂,按上述同样方法衍生、定容和过滤后待用。

3 结果与讨论

3.1 衍生溶剂的确定

芬氟拉明在四氯化碳、环己烷、乙酸乙酯中不完全溶解,在乙腈和 THF 中能溶解,在 THF 中的衍生效果优于在乙腈中的衍生效果。

3.2 衍生反应的温度、时间和摩尔比的优化

在上述色谱条件下,考察了在 THF 溶剂中,反应温度和时间对芬氟拉明衍生物产率的影响。图 1 表明,衍生物产率随温度增加而增加,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,衍生效果最佳。图 2 表明,反应进行 30 min 后,衍生物产率趋于稳定。采用同样的方法,在 11 ~ 110 的范围内考查了芬氟拉明与 PIC 的反应摩尔比对衍生物产率的影响,发现摩尔比在 13 以后,衍生产物的量不再增加。本实验确定的衍生条件是:温度 60 $^{\circ}\text{C}$,时间 35 min,芬氟拉明与 PIC 的反应摩尔比 13。

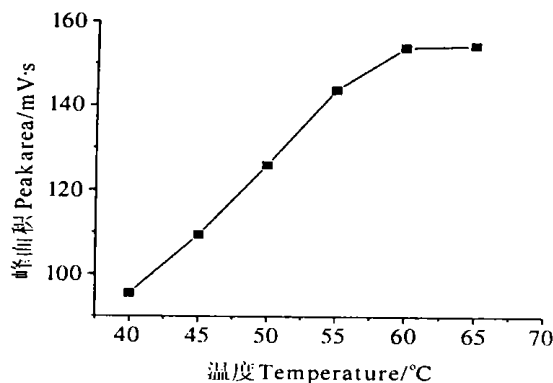


图 1 温度对衍生率的影响

Fig. 1 Effect of temperature on derivatization yield

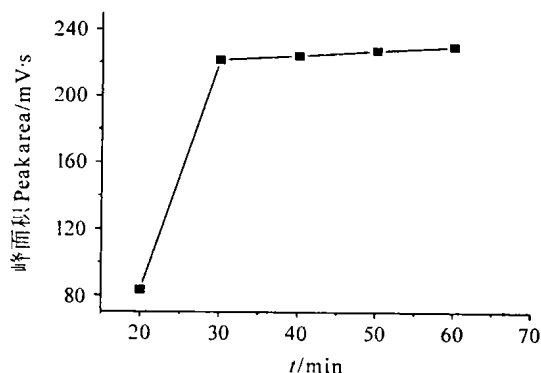


图 2 反应时间对衍生率的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on derivatization yield

3.3 最大吸收波长的确定

采用 Waters 996 二极管阵列检测器在 200 ~ 400 nm 之间进行衍生物的光谱全扫描,紫外吸收谱图的最大吸收波长 240 nm 确定为检测波长。

3.4 色谱图

按 2.2 的色谱条件,得芬氟拉明标准和样品的色谱分离谱图(图 3),表明衍生试剂和未知物不干扰芬氟拉明衍生产物的色谱分离。

3.5 线性回归方程和检出限

配制 2.52、6.30、12.60、25.20、63.00 和 126.00 mg/L 的芬氟拉明标准溶液,按 2.3.3 节方法衍生后进行色谱分离,以相应标准溶液的色谱峰面积 (Y) 对浓度 (X) 作线性回归。表明在 2.52 ~ 126.00 mg/L 的范围内,呈现良好的线性关系: $Y = 37703 + 11890 X$, $r = 0.9994$ 。方法的检出限为 0.36 ng ($S/N = 3$),最低检出浓度为 36 $\mu\text{g/L}$,定量限为 1.2 ng ($S/N = 10$)。

3.6 加标回收率和精密度

平行称取 3 份样品,加入芬氟拉明标准溶液,再按 2.3.2 样品萃取和 2.3.3 衍生反应步骤操作,然后测定芬氟拉明,计算回收率。实验结果见表 1,加标回收率在 95.7 % ~ 101.0 % 之间,其平均值为 98.4 %,RSD 小于 3.00 %。在 3 天内,对 3 个样品进行了连续检测,其日间 RSD 分别为 3.63 %、4.75 % 和 5.04 %。

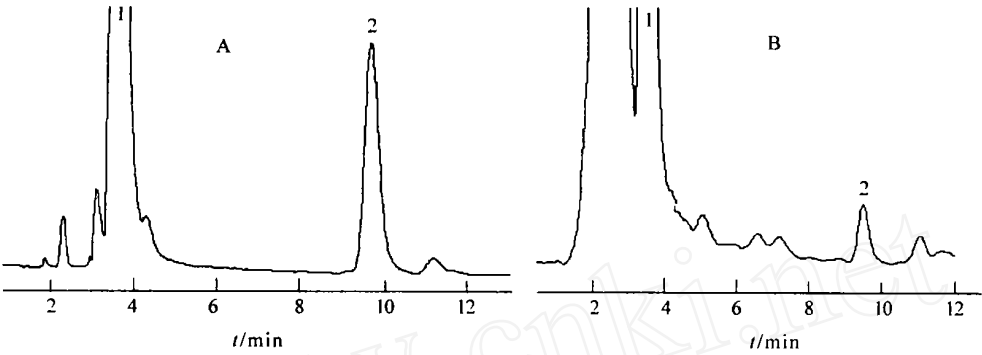


图 3 芬氟拉明标准(A)和样品(B)的色谱图

Fig. 3 The Chromatograms of fenfluramine (A) and sample (B)

峰(peak):1. PIC 衍生试剂(phenylisocyanate (PIC) derivative reagent); 2. 芬氟拉明衍生物(fenfluramine derivative)。

表 1 回收率及精密度 (n = 3)

Table 1 Recoveries and precision (n = 3)

样品 Sample	样品量 Weight (g)	测定值 Found (μg)	加入值 Added(μg)	测定值 Total Found (μg)	回收率 Recovery(%)	相对标准偏差 RSD(%)
1	0.84	14.77	34.25	47.87	97.7	0.40
1	0.97	17.38	150.00	168.98	101.0	2.98
2	0.63	21.17	13.70	34.74	99.1	0.69
2	0.59	19.96	68.50	85.54	95.7	1.91

3.7 样品分析

表 2 列出 4 种减肥药中芬氟拉明的含量数据。

表 2 样品分析结果

Table 2 Analytical results of the samples

样品 Sample	测出值 Found (μg / g)	相对标准偏差 RSD % (n = 3)	样品 Sample	测出值 Found (μg / g)	相对标准偏差 RSD % (n = 3)
1	17.67	0.38	3	43.61	1.78
2	36.00	2.15	4	未检出 Undetected	

References

1 Zhang Jingzhong(张镜衷). *Nutrition and Food Sanitation*(营养与食品卫生),**1998**, 3:15
2 Ye Ying(叶 颖),Liu Donghua(刘栋华). *Xizhang Science and Technology*(西藏科技),**1999**, 2: 28
3 Miu Hongjian(缪鸿键). *J. Clin. Psychol. Med.*(临床精神医学杂志), **2001**, 11(4): 214
4 Tan Xiaoqiu(谭小秋),Gao Yanhong(高燕红). *Chinese J. Prev. Med.*(中华预防医学杂志),**2001**, 35(2):124 ~ 125
5 Liu Weimin(钮伟民),Dai Jun(戴 军),Cheng Shangwei(陈尚卫),Dai Weijie(戴维杰). *Chinese J. Health Laboratory Technology*(中国卫生检验杂志), **2002**, 12(6): 681 ~ 682
6 Qian Xiaoping(钱小平),Sun Liyuan(孙丽媛). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱),**1998**, 16(6):548 ~ 549
7 Cheng Zhongdai(陈宗岱),Ling Zhongmin(凌宗岷). *West Chinese J. Pharmaceutical Study.*(华西药学杂志),**1994**, 9(4): 60 ~ 62
8 Clausing P, Rushing L G, Newport G D, Bowyer J F. *J. Chromatogr. B*, **1997**, 692: 419 ~ 426

Determination of Fenfluramine in Slimming Drug by High Performance Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization

Jian Yinghong, Long Yuande*, Ma Yanshun, Huang Tianbao

(Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract A reversed-phase high performance liquid chromatographic method is described for the determination of fenfluramine in slimming drug using precolumn derivatization and ultraviolet detection. The sample was extracted with chloroform and the extract was derivatized in tetrahydrofuran with phenylisocyanate at 60 °C for 35 min. The derivative obtained was determined by using methanol-water (72/28, V/V) as mobile phase and detection at 240 nm on a Kromasil C₁₈ column. The curve of peak area with concentration for the fenfluramine derivative is good linear in the range from 2.52 to 126 mg/L with correlation coefficient being 0.9994. The limit of detection and the limit of quantification are 0.36 ng (S/N = 3) and 1.2 ng (S/N = 10), respectively. The average recovery of the method is 98.4%, and the relative standard deviation (RSD) is less than 3.0%.

Keywords Reversed-phase high performance liquid chromatography, fenfluramine, precolumn derivatization, phenylisocyanate

(Received 28 May 2003; accepted 9 December 2003)

2004 年中国金属学会分析测试大型学术年会及展览会征文通知

为加强学术交流,提高冶金分析测试水平,中国金属学会分析测试分会拟于2004年10月在北京举办“中国金属学会分析测试大型学术年会及展览会”,此次大型学术年会涵盖面广,涉及冶金分析、力学测试、无损检测等专业领域。所征集论文将印刷成精美的论文集,会议期间评选出的化学类优秀论文将推荐在《冶金分析》上发表。现将有关征文事宜通知如下:

一、征文范围

(1) 冶金分析专业:光谱分析、化学分析、气体分析、状态分析等分析技术在冶金领域中的发展动态、冶金材料(包括钢铁、合金、铁合金、矿石、原辅材料及新型冶金炉料等)的分析测试新方法及新技术的研究报告、化学前处理方法、取制样方法及经验、电化学分析应用研究、有机试剂合成及应用、化学物相分析在其他学科领域(如地质找矿、产品剖析、矿物材料的化学表面改性、特种成分组合的新材料开发等)应用拓展的研究成果与经验、在线分析技术与计算机数据处理及传输技术的应用研究、特殊标准物质的研制与研究探索、实验室的建设及管理经验,等等;

(2) 力学测试专业:力学测试技术的现状及发展趋势;常规及特殊力学性能综述、力学性能在工程中的应用、断裂韧度测试的新方法及设备、断裂韧度测试标准执行中存在的问题、不同材料断裂力学性能的表征及评价、低周疲劳测试技术、不同强度级别材料疲劳寿命的表征、不同参数描述的裂纹扩展速率、高频疲劳冷热疲劳、不同的材料n值的变化规律、常规力学性能测试仪器设备的研制成果、常规力学标准样品的研制及应用等、力学性能试验数据处理,等等;

(3) 无损检测专业:金属材料无损检测技术发展动态综述、引进国外各类钢材无损检测仪器及成套设备的应用及消化经验介绍、开展无损检测具体应用方面的技术交流、应用NDT技术进行金属材料物理性能测试的技术交流、进一步提高钢材无损检测可靠性的技术及管理经验与体会,等等。

二、征文要求

1) 论文要求观点明确,数据准确、完整,文字精炼,条理清楚,层次清晰,结构严谨。综述一般不超过八千字,研究报告不超过四千字,并提供中英文摘要及关键词。

2) 论文需提供计算机打印稿,并以3.5寸磁盘或电子邮件方式提供电子版,论文插图一律拷入磁盘。所使用软件应为WORD 97以上版本,请注明软件版本及文件名称。

3) 征稿截止日期:2004年6月30日

4) 欢迎国内外仪器生产厂(商)家在论文集上刊登广告并到会介绍产品。

5) 有关学术年会相关信息请查询“中国分析网”www.analysis.org.cn

通信地址:北京市海淀区学院南路76号,钢铁研究总院分析测试研究所(邮编100081)

联系人:田俊菊 电话/传真:010-62182398; E-mail: yjfx@analysis.org.cn