

中成药和保健食品中非法添加西药成分检测方法的探索*

陈斌, 胡昭君, 余岳林, 张少敏, 林峰

(上海市闸北食品药品检验所, 上海 200435)

摘要 目的: 建立应用薄层色谱法、高效液相色谱法和红外光谱法检测常见中成药和保健食品中非法添加的西药。方法: 运用薄层色谱法快速初筛, 高效液相色谱-二极管阵列初步鉴定, 红外光谱法定性鉴定的色谱光谱综合运用技术。结果: 建立的方法能够鉴别出添加的格列苯脲、格列齐特、盐酸芬氟拉明、酚酞、盐酸二甲双胍、盐酸西布曲明和枸橼酸西地那非等西药成分。结论: 本方法准确可靠, 简便易行, 易于推广。

关键词: 中成药; 保健食品; 薄层色谱; 高效液相色谱-二极管阵列; 红外分光光度法; 格列苯脲; 格列齐特; 盐酸芬氟拉明; 酚酞; 盐酸二甲双胍; 盐酸西布曲明; 枸橼酸西地那非

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1677-04

Use of spectrometry and chromatography for the identification of added illegally medicine in Chinese traditional medicine and herbal dietary supplement*

CHEN Bin, HU Zhao-jun, YU Yue-lin, ZHANG Shao-ming, LIN Feng

(Zhabei Institute for Food and Drug Control Shanghai 200435 China)

Abstract Objective To develop a method for identification of added illegally medicine in Chinese traditional medicine and herbal dietary supplement using spectrometry and chromatography. **Method** TLC, HPLC-DAD and IR were adopted. **Results** Glibenclamide, gliclazide, fenfluramine hydrochloride, phenolphthalein, metformin hydrochloride, sibutramine hydrochloride, sildenafil citrate could be identified by this method. **Conclusion** The method is precise, reliable, simple, rapid and can be used universally.

Key words Chinese traditional medicine, herbal dietary supplement, glibenclamide, gliclazide, fenfluramine hydrochloride, phenolphthalein, metformin hydrochloride, sibutramine hydrochloride, sildenafil citrate

中成药和保健食品中非法添加西药成分的行为不仅危及广大群众身体健康,而且严重影响了中药和保健食品声誉,也阻碍了中医药和保健品事业的发展。加强对中成药和保健食品监管是食品药品监管部门的神圣职责,我们根据区域食品药品检验所的自身特点,充分利用现有检测仪器设备,对目前市场上常见的非法添加西药成分的检验方法进行探索,以求寻找出一套能够适合基层食品药品检验所的快速检测方法,为打击在中成药和保健食品中非法添加西药成分的违法行为提供强有力的技术支撑。

文献中有关中成药和保健食品中非法添加西药

的检测方法虽已有报道^[1~8],但中成药和保健食品中非法添加降糖药、壮阳药和减肥药的系统检测方法报道较少,本文建立了系统检测中成药和保健食品中非法添加西药的方法,即运用薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱-二极管阵列法(HPLC-DAD)、红外分光光度法(IR)等色谱光谱技术确立了中成药和保健食品中掺入格列苯脲、格列齐特、盐酸芬氟拉明、酚酞、盐酸二甲双胍、盐酸西布曲明和枸橼酸西地那非等基本检测方法,可供基层食品药品检验所检查非法添加上述西药时使用。检验为阳性的样品经质谱与核磁共振方法验证,结果完全一致。

* 2007年上海市食品药品监督管理局系统立项研究课题;获2007年度上海市食品药品监督管理局系统检验技术交流会二等奖;获2008年第三届普析通用杯《药物分析杂志》优秀论文三等奖

第一作者 Tel: (021) 66836106 E-mail: chenbin_zh@sn-da.gov.cn

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪、Nicolet 380 傅立叶变换红外光谱仪(波长范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 扫描次数 32 次)。

格列苯脲(批号 10135-0103)、格列齐特(批号 0269-9701)、盐酸芬氟拉明(批号 10073-0002)、酚酞(批号 0091-9601)均由中国药品生物制品检定所提供, 盐酸二甲双胍(批号 200510284, 深圳市中联制药有限公司)、盐酸西布曲明(批号 88060028, 太极集团涪陵制药厂)、西地那非(批号 98068-QCS-07, 辉瑞制药有限公司); 金豹胶囊(批号 051109, 060505)、皇族八宝(批号 20060702)、鹿鞭回春胶囊(批号 070102)、参花清渴茶(批号 070303, 070503)、轻身减肥片(批号 060802)和降脂减肥胶囊(批号 060702)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取盐酸二甲双胍、格列苯脲、格列齐特、枸橼酸西地那非、西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞加甲醇分别制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液配制 取样品 5 片(或粒)研细, 检测盐酸二甲双胍、盐酸西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞的样品用甲醇 10 mL 超声提取 15 min, 检测格列苯脲、格列齐特的样品用氯仿 10 mL 超声提取 15 min, 检测枸橼酸西地那非的样品用[甲醇-水-氨水(75:25:1)] 10 mL 提取 15 min 后再用提取溶液稀释至刻度, 过滤, 滤液作为供试品溶液。

2.3 薄层色谱法快速筛选 检测盐酸二甲双胍, 以氯仿-甲醇-水(16:10:5)为展开剂, 以 10% 亚硝基铁氰化钠溶液-铁氰化钾试液-10% 氢氧化钠溶液显色; 检测格列苯脲、格列齐特, 以氯仿-环己烷-乙醇-冰醋酸(8:13:1:1)为展开剂, 在 254 nm 下观察; 检测枸橼酸西地那非, 以乙醇-正己烷-氨水(70:30:1)为展开剂, 在 254 nm 下观察; 检测盐酸西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞, 以甲苯-乙酸乙酯-异丙醇-浓氨(12:6:3:0.5)为展开剂, 在 254 nm 下观察。

2.4 高效液相色谱-二极管阵列法确认 色谱条件: 检测盐酸二甲双胍, 以甲醇-离子对试剂(庚烷磺酸钠 0.5056 g 加三乙胺 1.4 mL, 加水至 1000 mL, 用磷酸调节 pH 至 3.5 ± 0.05) (30:70) 为流动相, 色谱柱为 C_{18} 柱(以下的色谱柱均为 C_{18}); 检测格列苯脲、格列齐特, 以甲醇-0.1% 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 至 3.0 ± 0.05) (70:30) 为流动相; 检测枸橼酸西地那非, 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸三

乙胺(取 7 mL 三乙胺用水稀释至 1000 mL, 用磷酸调 pH 至 3.0 ± 0.1) - 甲醇-乙腈(58:25:17) 为流动相。所检样品中金豹胶囊(批号 051109)中检出枸橼酸西地那非, 轻身减肥片中检出盐酸西布曲明, 其液相色谱图和二极管阵列紫外光谱图见 1 和图 2。

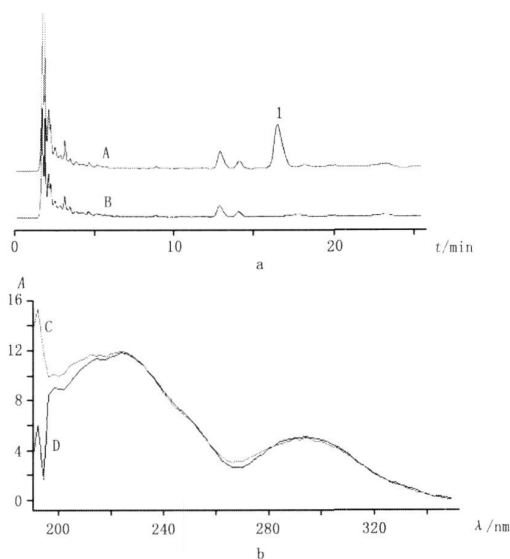


图1 金豹胶囊的高效液相色谱图(a)和二极管阵列紫外光谱图(b)
Fig 1 HPLC chromatography (a) and UV spectra (b) of Jingbao capsules

A. 批号 051109 样品 (Lot No. 051109) B. 批号 060505 样品 (Lot No. 060505) C. 西地那非对照品 (sildenafil reference substance) D. 批号 051109 (Lot No. 051109)

1. 西地那非 (sildenafil)

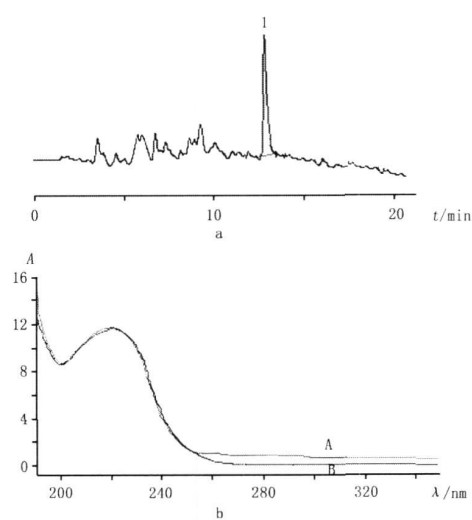


图2 轻身减肥片的高效液相色谱图(a)和二极管阵列紫外光谱图(b)

Fig 2 HPLC chromatography (a) and UV spectra (b) of Qingshen Jianfei tablets

A. 盐酸西布曲明对照品 (sibutramine hydrochloride reference substance) B. 轻身减肥片 (Qingshen Jianfei tablets)

1. 盐酸西布曲明 (sibutramine hydrochloride)

2.4 红外分光光度法进一步确认 疑似添加西药成分的分离方法用低压柱色谱和高效液相色谱方法进行分离纯化,收集的馏分经水浴蒸干后进行红外分光光度法分析。分离盐酸二甲双胍柱层析以氯仿-甲醇(7:3)为洗脱剂,高效液相色谱分离以甲醇-水(30:70)为流动相;分离格列苯脲、格列齐特柱层析条件为用石油醚-氯仿梯度洗脱,高效液相色谱分离以甲醇-水(70:30)为流动相;分离枸橼酸西地那非的柱层析以氯仿-甲醇(2:8)为洗脱剂,高效液相色谱分离以甲醇-水(40:60)为流动相;分离西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞的柱层析条件为氯仿-甲醇梯度洗脱,高效液相色谱分离以甲醇-水(60:40)为流动相。所检测的样品中检出某些中成药和保健品含有枸橼酸西地那非和盐酸西布曲明,红外光谱图见图3。

2.5 样品检验结果 用以上方法对8个样品批次进行了非法添加西药成分的鉴别,结果见表4。其中3个样品为阳性。

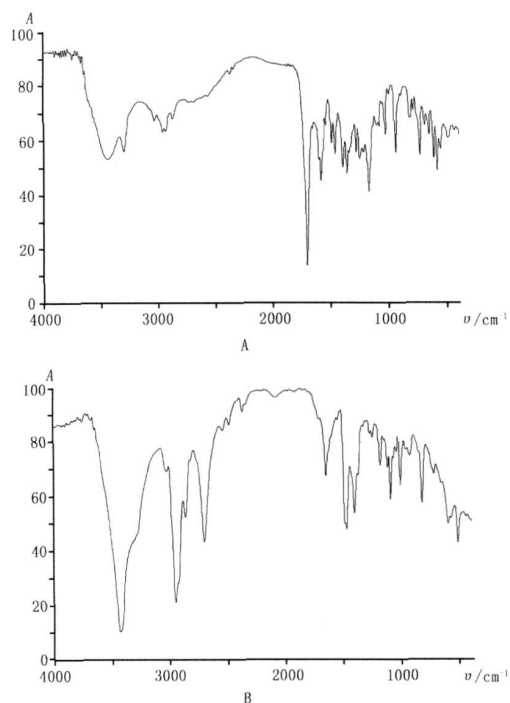


图3 金豹胶囊中枸橼酸西地那非(A)和轻身减肥片中西布曲明(B)的红外光谱图

Fig 3 R spectra of sildenafil citrate in Jinbao capsules(A) and sibutramine hydrochloride in Qingshen Jianfei tablets(B)

表1 样品检验结果

Tab 1 Result of test

样品 (sample)	批号 (Lot No.)	西药成分 (medicine)	结果 (result)
金豹胶囊 (Jinbao capsules)	051109	枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate)	+
金豹胶囊 (Jinbao capsules)	060505	枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate)	+
皇族八宝 (Huangzu Babao)	20060702	枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate)	-
鹿鞭回春胶囊 (Lubian Huichun capsules)	070102	枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate)	-
参花清渴茶 (Shenhua Qingke Cha)	070303	盐酸二甲双胍、格列苯脲、格列齐特 (metformin, gliclazide, glibenclamide)	-
参花清渴茶 (Shenhua Qingke Cha)	070503	盐酸二甲双胍、格列苯脲、格列齐特 (metformin, gliclazide, glibenclamide)	-
轻身减肥片 (Qingshen Jianfei tablets)	060802	盐酸西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞 (sibutramine, fenfluramine, phenolphthalein)	西布曲明+ (metformin)+
降脂减肥胶囊 (Jiangzhi Jianfei capsules)	060702	盐酸西布曲明、盐酸芬氟拉明、酚酞 (sibutramine, fenfluramine, phenolphthalein)	-

3 讨论

3.1 高效液相色谱-质谱-质谱方法确认 将检出含枸橼酸西地那非的保健品和含盐酸西布曲明的保健品,分别进行高效液相色谱-质谱-质谱分析,结果同样被检出枸橼酸西地那非和盐酸西布曲明。枸橼酸西地那非的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为475,其二级质谱的碎片为283,311,377,结果与其分子结构相吻合,结果见图2。西布曲明的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为280,其二级质谱的碎片为125,139,153,165,179,179,结果与其分子结构相吻合。

3.2 核磁共振方法确认 将用高效液相色谱纯化

制备得的西地那非进行 ^1H NMR核磁共振氢谱分析,0.940~0.967(t ,3H,丙基上- CH_3),1.649(m ,2H,丙基上- CH_2 -),2.554~2.592(t ,2H,丙基上- CH_2 -),4.115(s ,3H,吡唑环连接的 CH_3),6.074(s ,2H,吡唑环相连- NH_2),6.355(s ,2H,酰胺上的- CONH_2),这些数据完全与西地那非的结构相吻合,因此判定该化合物的分子结构为西地那非。

3.3 难点和创新点 本研究综合了目前各种标准和文献资料^[1~13],系统地建立了运用薄层色谱快速筛选、高效液相色谱-二极管阵列的保留时间与紫外光谱的综合定性确认以及红外光谱的化学结构确

认的整套方法, 其中的难点在于运用红外光谱法确定时对样品中被测成分和最小检测量的要求较高, 需要一套有效的提取分离的方法。为此, 本文建立的柱层析和高效液相色谱分离技术, 分离出的西药纯度和含量均达到红外光谱法的要求。检出的结果经高效液相色谱 – 质谱 – 质谱确定, 以及核磁共振仪氢谱分析的进一步确定, 结果完全一致, 表明本文所建立的方法行之有效。

参考文献

- 1 Reepmeyer JC, Woodruff JT. Use of liquid chromatography – mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafilil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement *J Pharm Biomed Anal*. 2007, 44(4): 887
- 2 Gatz SR, Flurer CL, Wolk KA. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase- 5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC – ESI – MS and LC – UV. *J Pharm Biomed Anal*. 2004, 36(3): 525
- 3 ZENG Mao-fa (曾茂法), ZHANG Xue-bin (张学斌). Identification of four components of diabetes medicine added illegally to health products by HPLC (高效液相色谱法同时鉴定保健品中非法添加的四种降糖药成分). *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2006, 6(23): 506
- 4 YAO Yu (姚羽), LIHui-yi (李慧义), ZHANG Qi-ming (张启明), *et al*. Determination of illegal mixture in traditional Chinese medicine preparations of phenobarbital by HPLC – DAD (检测安神类中成药中非法添加化学药品的方法研究). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2007, 42(3): 224
- 5 WANG Tie-jie (王铁杰), QU Ying-heng (邱颖娣), LIYu-lan (李玉兰), *et al*. Detection of phenformin and gliclazide illegally mixed into traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations by LC – QMS (液相色谱 – 串联四极杆质谱联用法测定中药降糖制剂中非法掺入苯乙双胍和格列齐特的研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(12): 1453
- 6 XU Yuan-jin (徐远金), XU Gui-ping (许桂苹). Determination of sibutramine, indapamide, bumetanide and chlorothiazide in mass-reducing tonic by micellar electrokinetic capillary chromatography (胶束电动毛细管色谱法测定减肥保健品中的西布曲明、吲达帕胺、丁脲胺和氯噻嗪). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(12): 1456
- 7 SUN Yu-ming (孙玉明), SUN Ling-ling (孙苓苓), ZHONG Da-fang (钟大放). Detection of glyburide in traditional Chinese medicine by liquid chromatography – mass spectrometry method (液相色谱 – 质谱联用法检测某些中药制剂中的格列本脲). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(3): 326
- 8 LIU Ji-jin (刘吉金), LI Jun (李军). Study on the method for examination of sibutramine hydrochloride, fenfluramine hydrochloride and phenolphthalein in the products of weight reducing food and health care products (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). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(6): 793

(本文于 2008 年 8 月 6 日收到)