

HPLC-MS 同时测定保健食品中的 7 种违禁药物

邓育平¹, 丁芳林^{1*}, 周婷婷² (1. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南长沙 410127; 2. 湖南中储粮质量检测中心, 湖南长沙 410600)

摘要 [目的]建立了降血压保健食品中 7 种违禁添加成分的高效液相色谱-电喷雾质谱联用(HPLC-ESI/MS)测定方法。[方法]采用 Spherigel C₁₈ 反相色谱法,以 0.02 mol/L 甲酸铵缓冲盐(pH=3.2)-乙腈-甲醇为流动相,梯度洗脱,质谱定性定量测定保健食品中的 7 种违禁药物。[结果]在该条件下,以华法林钠为内标,ESI⁻模式下的最低检出限为 0.01~0.05 mg/L,回收率为 80.89%~109.05%。[结论]该方法样品处理简单,结果准确,重现性好,灵敏度高且适应范围广,可用于降血压类药物及保健食品中违禁成分的检测。

关键词 高效液相色谱-电喷雾质谱法;违禁成分;降血压保健食品

中图分类号 S132 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)17-07688-04

Simultaneous Detection of 7 Illegal Synthetic Drugs in Dietary Supplements by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

DENG Yu-ping et al (Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127)

Abstract [Objective] A method was developed for qualitative and quantitative detection of 7 illegal synthetic drugs in antihypertensive dietary supplements by high performance liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry (HPLC · -ESI/MS). [Method] The quality and quantity of the mass spectrum were detected via applying Spherigel C₁₈ reverse phase colour spectrum method and taking 0.02 mol / L ammonium formate buffered solution (pH = 3.2) -acetonitrile-methanol as mobile phase to elute away graded. [Result] The lowest detection limit under ESI⁻ model was in the range of 0.01 - 0.05 mg/L and the recovery rate was 80.89% - 109.05% by using warfarin sodium as the internal standard. [Conclusion] This method was simple, accurate, reproducible, sensitive in treating the sample, so it can be widely used in the detection of illegal synthetic drugs in antihypertensive medicals and the dietary supplements.

Key words High performance liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry; Illegal synthetic drugs; Antihypertensive dietary supplements

高血压病是一种由遗传多基因和环境多危险因素交互作用而形成的全身性疾病,不仅患病率高,且可引起严重的心、脑、肾并发症,严重地威胁着人类的身体健康。因此,降血压药的研制和降血压保健食品的开发越来越受到人们的重视。噻嗪类利尿剂氢氯噻嗪和氯噻酮以其作用缓和、作用时间长和不良反应较少的优点而最为常用^[1]。吲哒帕胺、缬沙坦、尼群地平、非洛地平等各类降压药物常与利尿剂辅助使用,但如果长期服用利尿剂可出现低血钠、低血钾、低血镁、增高尿酸、减低糖耐量、增高血清胆固醇和甘油三酯等,通过不同的途径损害肾脏^[2]。目前,在降血压保健食品的安全性检测方面有一些报道^[3-4],但很少在保健食品中检出阳性,且检测的目标物普遍较少。笔者以华法林钠为内标物,建立了高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-ESI/MS)测定降血压保健食品中的氢氯噻嗪、氯噻酮、呋塞米、吲哒帕胺、缬沙坦、尼群地平、非洛地平等的方法,利用质谱定性定量。该方法定性定量准确、灵敏度高、重现性好、抗干扰力强且适应范围广。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试样品为市场购得的降血压胶囊状(样品 1)和降血压颗粒状保健食品(样品 2)。主要仪器:Waters Alliance 2695-ZQ 2000 液相色谱-质谱联用仪,由 Waters 2695 分离单元、ZQ 2000 质谱检测仪器、Water 2487 双波长紫外检测器组成,美国 Waters 公司;KQ 3200 B 型超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;Mettler Toledo 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

主要试剂:氢氯噻嗪、氯噻酮、呋塞米、吲哒帕胺、缬沙坦、

尼群地平、非洛地平、华法林钠标准品(结构见图 1),均购自于中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯,湖南化工研究院精细化工研究所;试验用水,Millipore 超纯水仪制备;甲酸(纯度为 85%),分析纯,上海实验试剂有限公司;甲酸铵,分析纯,上海新华化工厂;冰醋酸,分析纯,天津恒兴试剂。

1.2 标准溶液的配制 分别称取氢氯噻嗪、氯噻酮、呋塞米、缬沙坦、吲哒帕胺、尼群地平及非洛地平标准品适量,用 50% 甲醇水溶液溶解,超声 30 min 后稀释到 10 ml,得到氢氯噻嗪(300 mg/L)、氯噻酮(268 mg/L)、呋塞米(272 mg/L)、缬沙坦(198 mg/L)、吲哒帕胺(168 mg/L)、尼群地平(218 mg/L)和非洛地平(234 mg/L)标准溶液。

准确称取 0.050 0 g 华法林钠,用 50% 甲醇水溶液溶解,超声 30 min 后稀释到 50 ml,过 0.22 μm 有机膜,得到 1 000 mg/L 标准溶液,备用。

1.3 样品处理 准确称取胶囊状降血压保健食品(先除去糖衣)0.500 0 g,置于 50 ml 容量瓶中,加入 50% 甲醇水溶液溶解,超声 30 min,定容,过 0.22 μm 有机膜,备用。

准确称取颗粒状降血压保健食品 0.500 0 g,置于 50 ml 容量瓶中,加入 50% 甲醇水溶液溶解,超声 30 min,定容,过 0.22 μm 有机膜,备用。

1.4 试验条件 液相色谱条件:色谱柱为江申 Spherigel C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm);流动相:A 相为甲醇,B 相为乙腈,C 相为 0.02 mol/L 甲酸铵-甲酸缓冲盐(pH=3.2);流速 1.0 ml/min,梯度洗脱程序见表 1;进样量为 10 μl。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),扫描范围为 m/z 150~500;ESI⁻模式,毛细管电压为 4.0 kV,锥孔电压为 -30 V;萃取电压为 4 V;射频电压为 0.5 V;源温度为 108 ℃;脱溶剂温度为 300 ℃;脱溶剂气为 300 L/h;锥孔反吹气为 10 L/h。

作者简介 邓育平(1964-),男,湖南双峰人,实验师,从事化学实验与管理研究。*通讯作者,教授,硕士,从事食品(生物)化学教学及天然产物的提取与分析研究。

收稿日期 2013-05-17

表 1 梯度洗脱程序

时间//min	流动相		
	A//%	B//%	C//%
0	5.2	20.8	74.0
3.0	7.8	31.2	61.0
9.0	13.4	53.6	33.0
17.0	18.0	72.0	10.0
18.0	5.2	20.8	74.0
23.0	5.2	20.8	74.0

2 结果与分析

2.1 分离条件的优化 分别在 ESI 正、负离子模式下考察 7

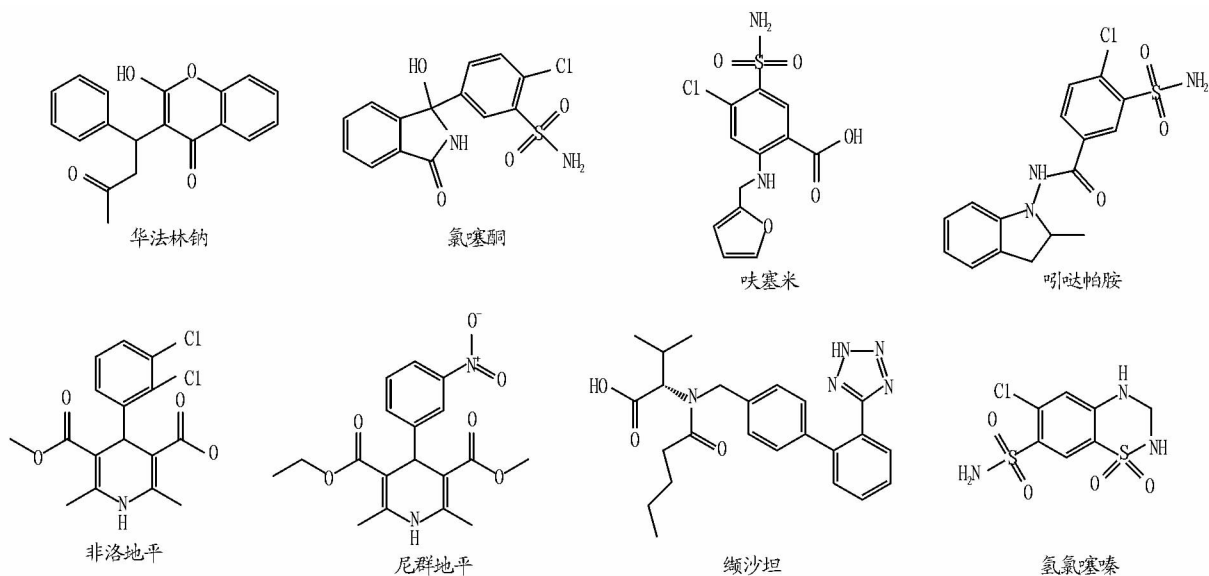


图 1 目标物和内标的结构

2.2 HPLC-ESI/MS 分析 在优化的色谱和质谱条件下, 各目标物都有很好地分离(图 2)。

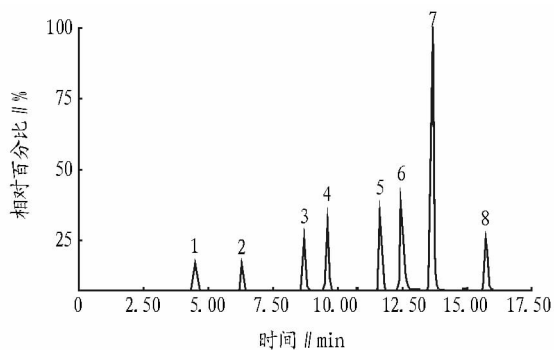
图 3 是 7 种违禁药物标准品和内标的分子离子质谱图。从图 3 可见, 在 ESI⁻ 模式下, 7 种主要成分都形成准分子离子 [M-H]⁻, 氢氯噻嗪 (m/z 296)、氯噻酮 (m/z 337)、呋塞米 (m/z 329)、吡哌帕胺 (m/z 364)、缬沙坦 (m/z 434)、尼群地平 (m/z 359)、非洛地平 (m/z 382)。

2.3 方法的线性范围和检出限 精确移取适量的混合标准溶液, 稀释到一定浓度, 以华法林钠为内标。以目标物的质谱峰面积与华法林钠的质谱峰面积比为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得到线性方程, 目标物的线性范围为 0.2 ~ 13.6 mg/L。以信噪比 (S/N) 为 3 时的检出浓度作为检出限 (LOD)。7 种目标物的线性范围、线性方程、相关系数 (r^2),

种成分的质谱响应。在 ESI 模式下, 7 种成分在负离子模式下的响应均优于正离子模式下的响应。根据考察结果, 确定以负离子模式来分析 7 种成分。

考察了不同毛细管电压的影响; 在 ESI⁻ 模式下, 毛细管电压为 4.0 kV 时的响应最好。考察了不同锥孔电压 (-10、-15、-20、-25、-30、-35、-40、-45、-50、-60、-70 V) 的影响。在 ESI⁻ 模式下, 氢氯噻嗪、氯噻酮、呋塞米、缬沙坦、吡哌帕胺、尼群地平、非洛地平的最好锥孔电压分别为 -45、-30、-30、-30、-35、-30、-35 V, 该试验最终选择 -30 V 作为 ESI⁻ 模式下的锥孔电压。

检出限 (LOD) ($S/N=3$) 见表 2。



注: 1. 氢氯噻嗪; 2. 氯噻酮; 3. 呋塞米; 4. 吡哌帕胺; 5. 缬沙坦; 6. 尼群地平; 7. 非洛地平。

图 2 目标物在负离子模式下的选择离子色谱

表 2 7 种目标物的线性范围、线性方程、相关系数、检出限 (LOD) ($S/N=3$)

目标物	线性范围// $\mu\text{g/ml}$	线性方程	相关系数 (r^2)	检出限// $\mu\text{g/ml}$
氢氯噻嗪	0.15 ~ 15.00	$y = 0.023 2x + 0.009 4$	0.999 9	0.03
氯噻酮	0.27 ~ 13.40	$y = 0.016 3x + 0.000 7$	0.999 5	0.05
呋塞米	0.14 ~ 5.44	$y = 0.027 0x - 0.003 4$	0.999 2	0.04
吡哌帕胺	0.08 ~ 8.40	$y = 0.055 8x + 0.023 2$	0.999 1	0.017
缬沙坦	0.20 ~ 9.92	$y = 0.072 1x - 0.003 6$	0.999 7	0.013
尼群地平	0.04 ~ 4.36	$y = 0.221 4x + 0.170 6$	0.999 2	0.01
非洛地平	0.12 ~ 11.70	$y = 0.041 5x + 0.023 4$	0.999 2	0.023

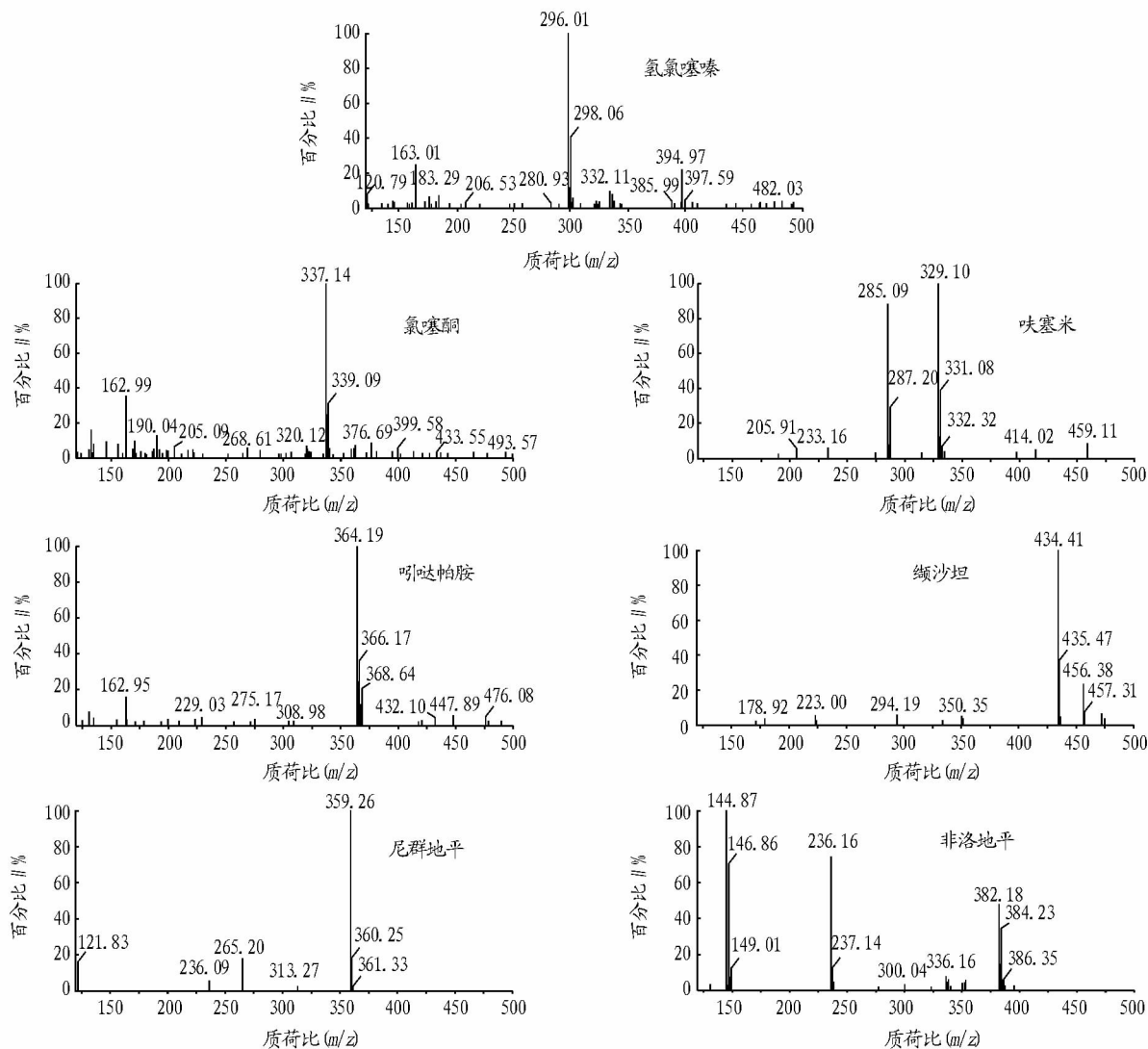


图3 7种违禁药物标准品和内标物的分子离子质谱

2.4 精密度和回收率

2.4.1 精密度。在优化的色谱-质谱条件下进行方法的精密密度试验。在同一天内配制低浓度混合标准样品,加入0.5 ml 内标溶液,用50%甲醇水溶液稀释到5 ml,平行进样5次分析,计算目标物与内标物质谱峰面积比值的相对标准偏差(*RSD*)。试验得出,氢氯噻嗪、氯噻酮、呋塞米、吲哚帕胺、缬沙坦、尼群地平、非洛地平的*RSD*分别为3.1%、4.8%、2.9%、2.1%、1.4%、2.0%、1.7%。

2.4.2 回收率。分别将低、中、高3个浓度水平的混合标准溶液1 ml 加入到0.5 ml 的内标溶液,用50% 甲醇水溶液稀释定容到5 ml,过膜,每个添加水平平行测定5份样品。试验得出,7种目标物在3种添加水平下的回收率为80.89%~109.05%,*RSD* < 7.01% (表3)。由于7种目标物的性质相差比较大,在ESI⁻模式下的响应度灵敏性不同,回收率有点差异,但是都合乎试验测定要求。

2.5 样品分析

2.5.1 稳定性试验。分别在配制样品溶液后的0、2、4、6、8、10、12 h 各取样5 μg,分析检测考察溶液的稳定性。氢氯噻

表3 样品中添加的目标物的回收率 (n=6)

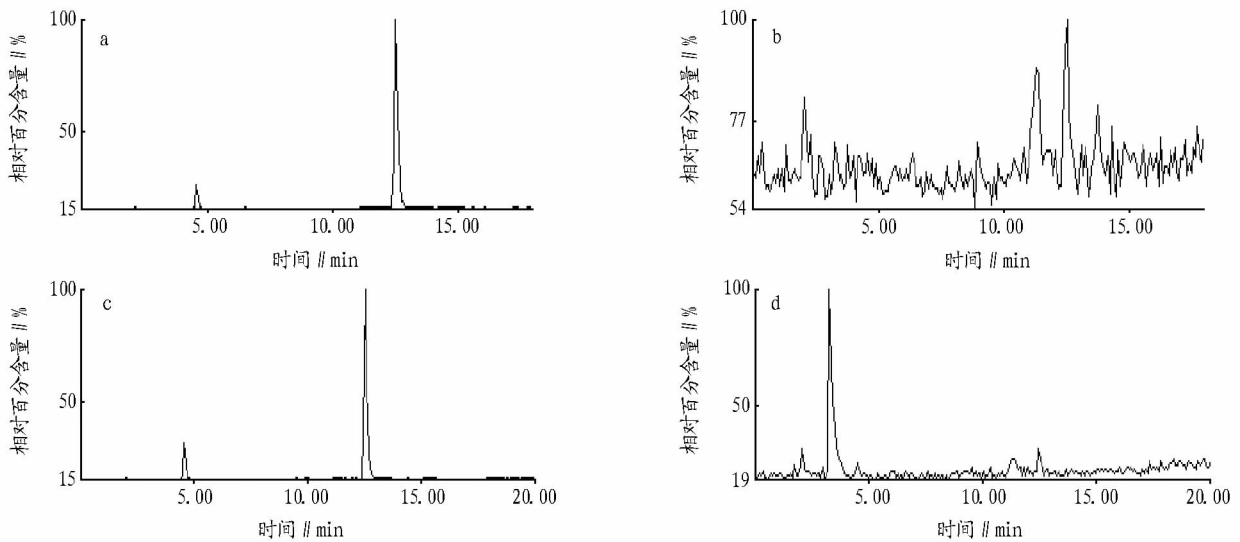
目标物	添加量//μg	测得量//μg	回收率//%	<i>RSD</i> //%
氢氯噻嗪	36.00	29.12	80.89	4.51
	75.00	65.32	87.09	2.96
	150.0	126.5	84.30	2.34
氯噻酮	32.20	26.55	82.46	5.58
	67.00	59.46	88.74	2.48
	134.0	132.0	98.47	7.01
呋塞米	32.64	35.59	109.1	3.20
	68.00	60.13	88.43	2.15
	136.0	124.6	91.60	2.64
吲哚帕胺	20.20	20.00	99.03	6.44
	42.00	37.09	88.31	2.99
	84.00	75.34	89.69	3.61
缬沙坦	23.81	20.36	85.51	2.66
	49.60	44.83	90.38	4.52
	99.20	86.37	87.07	5.35
尼群地平	26.16	22.81	87.19	3.41
	54.50	49.65	91.10	2.68
	109.00	113.29	103.94	2.15
非洛地平	28.08	25.32	90.17	4.16
	58.50	50.84	86.91	2.37
	117.00	98.49	84.18	1.55

嗪测定结果得到样品1的*RSD*为1.5%,样品2的*RSD*为1.2%。结果表明,供试样品溶液在12 h 内基本稳定。

2.5.2 样品的色谱-质谱分析。分别对2种待测样品进行

检测,检出结果均为阴性。分别对 2 样品加入华法林钠,并且对样品 1 稀释 4 倍,样品 2 稀释 5 倍后在 ESI⁻ 模式下进行色谱-质谱分析,其碎片离子与华法林钠和氢氯噻嗪标准品

的色谱以及质谱图像一致。样品 1 和 2 以及其加内标样品的谱图如图 4。



注:a. 样品 1 ;b. 样品 1 稀释 4 倍;c. 样品 2;d. 样品 2 稀释 5 倍。

图 4 阴性样品及其加标样品的选择离子图和总离子流

3 结论

试验建立了同时测定降血压保健食品中的 7 种违禁添加成分的 HPLC-ESI/MS 方法。在满足高度分离条件下,通过优化梯度洗脱程序和质谱条件,有效提高了分析效率和准确度。样品前处理简单,分析过程操作简单,回收率符合试验要求。该试验的灵敏度、重现性、稳定性、选择性等方面都有较好的呈现,可以用于市场降血压保健食品中目标物的检测。

参考文献

- [1] 王萍,李立群,徐雷,等. 氢氯噻嗪治疗高血压 63 例[J]. 菏泽医学专科学校学报,2009,21(4):32-33.
- [2] 刘舒扬,薛津,靳朝东. HPLC 法测定复方马来酸依那普利和氢氯噻嗪的含量[J]. 分析实验室,2009(12):319-321.
- [3] 陈玉璞. HPLC 法测定复方卡托普利片中氢氯噻嗪的含量[J]. 西北药学杂志,2010(2):14-15.
- [4] 朱永林,贡玉清,邵德佳,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物尿液中 8 种利尿剂残留量[J]. 中国兽药杂志,2008(9):6-12.

(上接第 7687 页)

2.6.2 包装纸箱失重标准。对包装纸箱试验数据进行整理得出,在平均湿度 60.70% 储存条件下,第 1 周平均失重 0.000 0 kg,第 2 周平均失重 0.020 0 kg,第 3 周平均失重

0.010 0 kg,第四周平均失重 0.010 0 kg。

试验数据表明,在平均湿度 60.70% 的储存条件下,包装纸箱失重较小,环境湿度每降低 1%,包装纸箱平均失重 0.001 6 kg。

表 8 各试验等级烟叶失重标准统计

试验等级	平均湿度//%	第 1 周平均失重//kg	第 2 周平均失重//kg	第 3 周平均失重//kg	第 4 周平均失重//kg	湿度每降低 1% 平均失重//kg
湖南中部	56.60	0.38	0.56	0.30	0.67	0.049 3
安徽中下部	56.60	0.37	0.44	0.90	1.26	0.020 1
四川中部	65.33	0.52	0.80	0.45	1.15	0.018 1
四川下部	45.83	0.55	0.80	1.20	1.20	0.088 4
湖南中部	34.80	0.72	0.71	1.24	1.24	0.084 0
安徽上部	59.06	0.20	0.30	0.26	0.24	0.018 6

3 结论

通过对试验数据分析,得出如下几点结论:储存期无内衬袋片烟烟箱重量随环境湿度变化而变化,包装纸箱重量也随环境湿度变化而变化。同一等级烟叶在不同储存环境条件下,失重标准有所不同;在同一环境条件下,不同等级烟叶之间失重标准也有差异。片烟储存期间,包装纸箱失重标准

相对片烟较小。

参考文献

- [1] 邓明军,尹永强. 烟叶存储变化规律及其影响因素[EB/OL]. (2007-08-21) http://www.tobaccochina.com/tobaccoleaf/tutorial/purchasing/20078/2007820115919_266834.shtml.
- [2] 蔡国良,谭珠妹,宋纪真,等. 烟叶储存保管方法? YC/T0006-1992[S/OL]. (1992-06-01) <http://www.docin.com/p-364885572.html>.