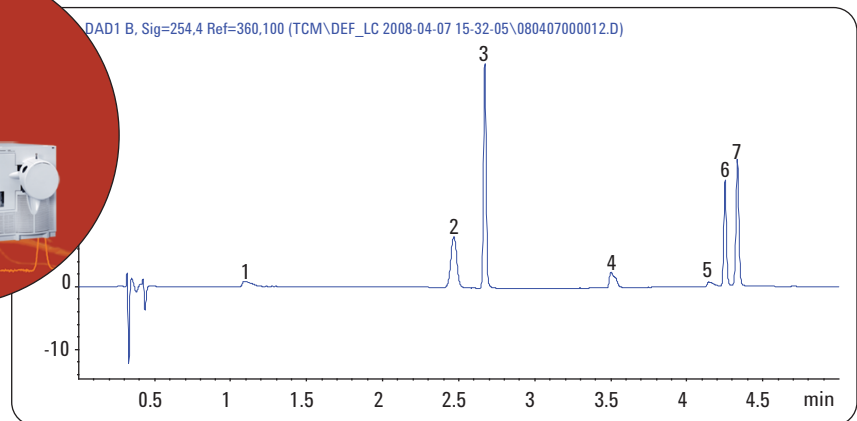
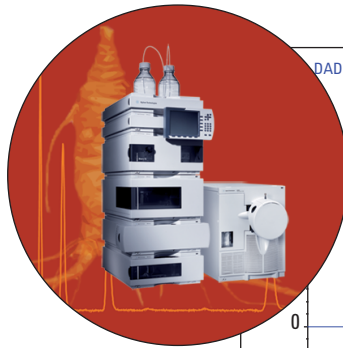


# 快速高分离度液相色谱配合紫外和四极杆质谱 检测筛查和确认中药减肥药中的掺杂物

## 应用报告

中药中的掺杂物检测



### 作者

肖尧、冉小蓉、安蓉  
安捷伦科技  
北京，中国

### 摘要

本应用报告报道了使用 LC/MS 技术进行中药中七种常见减肥药掺杂物的筛查和鉴定方法。该方法采用安捷伦快速高分离度液相色谱 (RRLC) 分离和UV检测进行色谱和光谱定性分析。单四极杆质谱法用于定性和定量鉴定，并测定加标样品的回收率。研究的七个化合物均可产生  $[M + H]^+$  离子，这七个化合物的回收率在 60.9% 至 106.3% 之间。本研究表明该方法准确、可靠，可以作为一种通用的方法进行中药减肥药和保健药中掺杂物的筛查和确认。



Agilent Technologies

## 引言

随着人民生活水平的提高，肥胖正在成为一个社会问题，减肥产品正成为最流行的一类保健品。由于减肥产品面向公众且日益流行，对这些产品的安全性应给予足够的重视。一些中药减肥药或保健品制造商非法添加一些西药制剂以提高治疗效果。过度 and 长期使用这些添加了西药的中药会对健康造成巨大的损害。因此，必须建立快速、可靠、灵敏的检测方法进行中药减肥药或保健品中掺杂物的检测。

安捷伦快速高分离度液相色谱 (RRLC) 使用亚 2  $\mu\text{m}$  填料技术，可有效地分离各个成分，在每次分析中更易于对广泛的违禁成分进行分析。由二极管阵列检测器得到的紫外 (UV) 光谱信息也有助于准确检测目标组分。除 UV 检测器外，单四极杆质谱由于其高灵敏度和更好的特异性正在成为一种快速、高效的通用检测方法。

本研究中，配备了二极管阵列检测器 (DAD) 的安捷伦 RRLC 和单四极杆质谱系统被用于六种中药减肥保健品中掺杂物的分析。

## 实验部分

### 仪器

- Agilent 1200 系列 RRLC 系统，配备二元泵 (低延迟体积配置)、脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器。
- Agilent 6130 四极质谱仪，配备 ESI 离子源。

### RRLC 方法

- 色谱柱: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 柱 (2.1 x 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) (部件号 959757-902)
- 流动相:
  - A: 水 + 0.2% 甲酸
  - B: 乙腈
- 梯度条件: 0-0.8 min, 5%B; 0.3-4 min, 5% - 65% 的 B
- 流速: 0.4 mL/min
- 进样量: 2  $\mu\text{L}$
- 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$
- 检测波长: 254 nm
- 停止时间: 5 min
- 后运行时间: 3 min

### 质谱方法

- 极性: 正
- 毛细管电压: 3000V
- 干燥气: 8 L/min
- 雾化器: 35 psi
- 干燥气温度: 350  $^{\circ}\text{C}$
- 碎裂电压 VRA

### 化学品和溶剂

- 甲醇, 乙腈 (色谱纯, Dikmapure)
- 甲酸 (色谱纯, Dikma 科技公司)
- 纯净水 (Mill-Q 系统生产的纯净水)
- 七种标准品 (参考物质), 包括盐酸苯丙醇胺、氢氯噻嗪、咖啡因、盐酸芬氟拉明、盐酸西布曲明、酚酞和便塞停, 所有这些药品均购自 NICPB (国家药品生物制品检定所)。

- 六个待测样品, DYX 减肥茶、BSY 减肥茶、GJL 减肥茶、YST 减肥茶、降脂片剂和 QM 减肥胶囊。所有这些样品均为市售产品。

### 标准溶液的配制

一定量的芬氟拉明、西布曲明、氢氯噻嗪、苯丙醇胺、咖啡因、酚酞和便塞停加入一定量的甲醇, 超声溶解, 转移至 50 mL 容量瓶, 加甲醇定容, 配制为储备液。将储备液用甲醇稀释 10 倍, 配制为紫外检测工作液 (约 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。该工作液进一步用甲醇稀释 20 倍, 配制为质谱检测工作液 (约 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。表 1 为各标准品的浓度。

浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	UV	MS
盐酸苯丙醇胺	52.5	5.25
氢氯噻嗪	18.4	0.92
咖啡因	21.2	1.06
盐酸芬氟拉明	51.0	1.02
盐酸西布曲明	19.2	0.96
酚酞	20.2	1.01
便塞停	51.0	1.02

表 1. UV 和 MS 检测中分别使用的工作液浓度

### 样品制备

**药片 (或药丸):** 将每日剂量的药品 (按照产品包装上的说明) 磨成粉末。称取其中的 1/5, 加适量 50% 的甲醇水溶液, 超声溶解 15 分钟, 转移入 10 mL 容量瓶中, 用 50% 的甲醇水溶液定容。过滤进行 HPLC 分析。滤液进一步用甲醇稀释 20 倍进行 MS 检测。

**胶囊内容物：**打开胶囊，采用上述药片的样品制备方法进行样品制备。

**胶囊壳：**胶囊壳称重，研磨成粉末。将相当于两个胶囊壳重量的粉末转移至 10 mL 容量瓶，采用上述方法进行样品制备。

### 回收率实验

将标准品添加到两个不同的阴性测试样品（片剂和胶囊内容物）中进行加标回收率考察。采用上述方法进行测定，计算 SIM 模式检测条件下的加标回收率。平行进行了空白实验（两个加标样品和两个空白）。

## 结果与讨论

### HPLC 分析

含氮原子的化合物在甲酸存在的条件下能产生较好的正离子信号。这七种样品有不同的结构和疏水性，所以采用梯度洗脱进行色谱分离。如图 1 所示，检测到的一些物质的保留和分离获得了令人满意的结果。整个分离过程在 5 分钟内完成。与其它物质的色谱峰相比，盐酸苯丙醇胺、盐酸芬氟拉明和盐酸西布曲明的色谱峰在该流动相条件下表现出一定展宽，这些是由于化合物的两性官能团导致的。

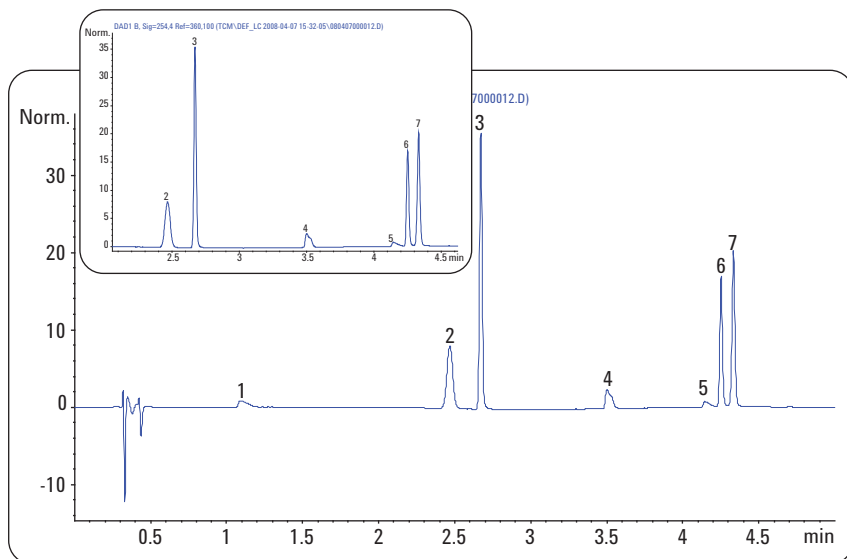


图 1.  
七种标准溶液的 RRLC 色谱图：

1. 盐酸苯丙醇胺
2. 氢氯噻嗪
3. 咖啡因
4. 盐酸芬氟拉明
5. 盐酸西布曲明
6. 酚酞
7. 便塞停

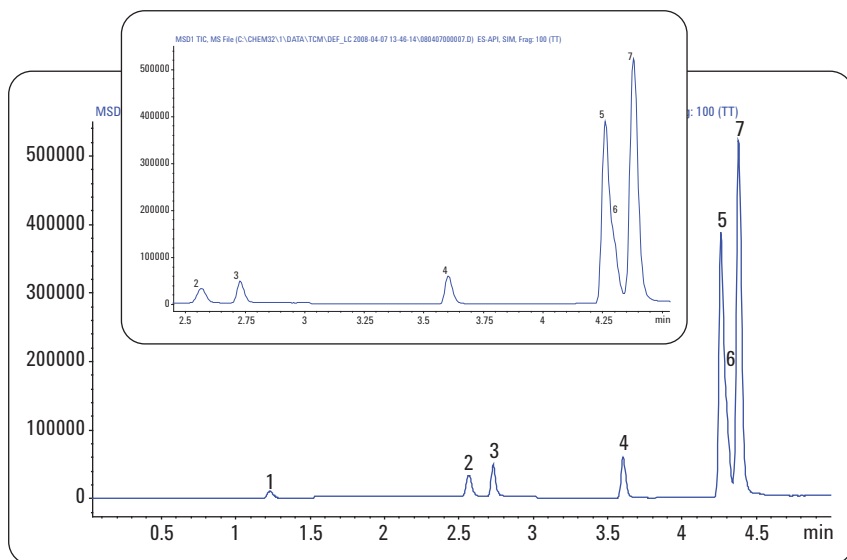


图 2.  
七种标准品的 SIM 色谱图

采用 2.1 mm 内径色谱柱和 0.4 mL/min 的流速, 不进行分析也可进行质谱分析, 并能采集到令人满意的质谱信号。因为它没有采用如高浓度的盐缓冲液等极端条件, 该分析方法并没有对柱效产生负面影响。即使进样 150 次以后, 柱效也无明显下降。

### 样品分析

- 在 DYG、YST、BSY 和 GJL 减肥茶和降脂片中检测到了咖啡因。
- 在 QM 减肥胶囊中检测到了盐酸西布曲明 (如产品包装所示)。

图 6 和图 9 的色谱图表明, 阳性样品中采用紫外和质谱均可检测到目标化合物。DAD 紫外光谱可为目标化合物的存在提供有用信息。因此, RRLC-UV 可用作目标化合物快速筛查的工具。然而, 对于组成成分复杂的样品, 采用单一的分离方法不容易将所有成分完全分离。采集到的 DAD 光谱由于不完全分离而发生了叠加。这时就需要采用质谱或其它方法对某些成分进行进一步确认。

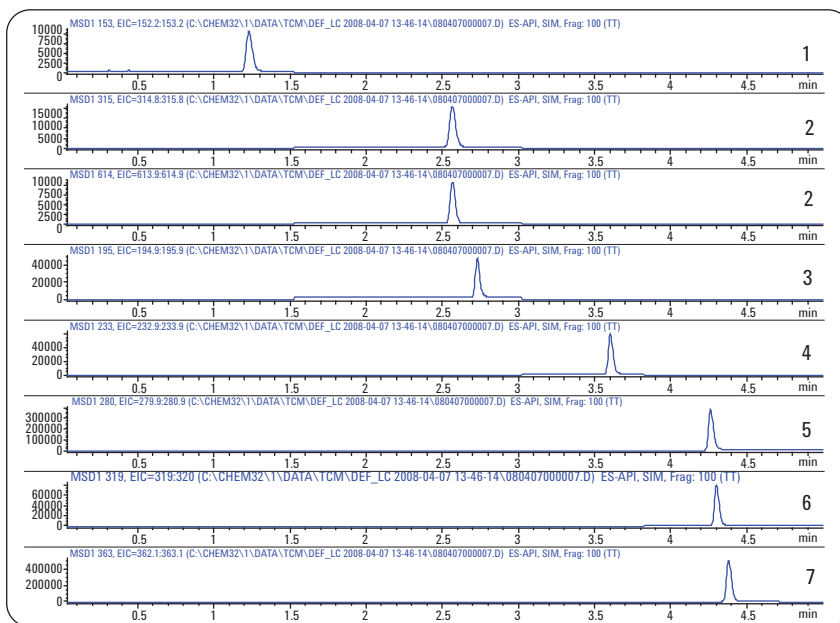


图 3. 七种标准品的 EIC 色谱图  
 1. 盐酸苯丙醇胺  
 2. 氢氯噻嗪  
 3. 咖啡因  
 4. 盐酸芬氟拉明  
 5. 盐酸西布曲明  
 6. 酚酞  
 7. 便塞停

化合物	苯丙醇胺	氢氯噻嗪	咖啡因	芬氟拉明	西布曲明	酚酞	便塞停
[分子量]	151.21	297.74	194.19	231.2	279.87	318.32	361.39
[M+H] <sup>+</sup>	152.5	315.1/614.2	196.2	233.2	280.2	319.3	362.4

表 2. 七种标准品质谱检测的准分子离子峰 (加氢峰)

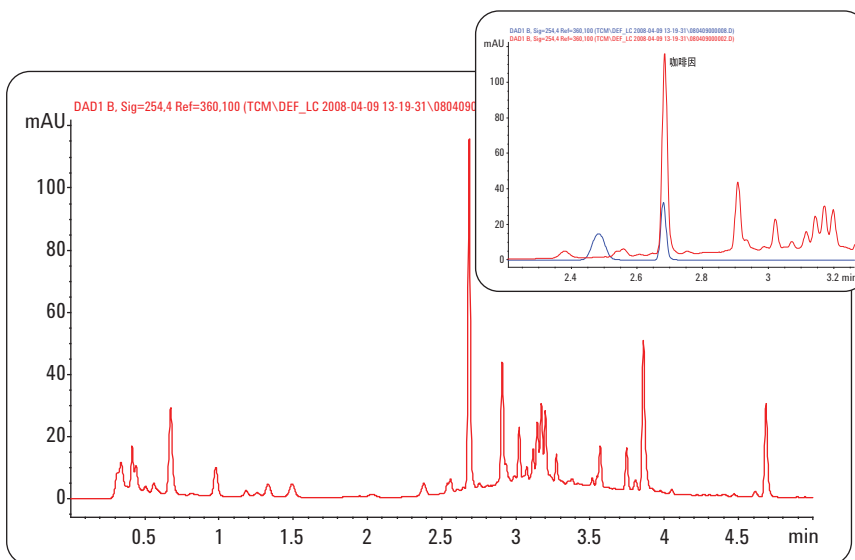


图 4. DYG 减肥茶的 RRLC-UV 色谱图与混合标准品色谱图 (右上) 的比较

在 DYX 减肥茶 (0.6 mg/g, 图 4)、BSY 减肥茶 (0.37 mg/g, 图 7)、GJL 减肥茶 (0.74 mg/g, 图 10)、YST 减肥茶 (0.94 mg/g, 图 13)、降脂片 (1 mg/g, 图 16) 中均检测到了咖啡因, 含量均低于每日允许剂量。

QM 减肥胶囊中检测到的盐酸西布曲明为每颗胶囊含盐酸西布曲明 10.86 mg, 产品包装上标示为每颗胶囊 10 mg。

## 结论

结果表明单四极杆质谱法是一种可用于中药减肥药和保健品中掺杂物筛查和鉴定的简单且易于使用的检测工具。

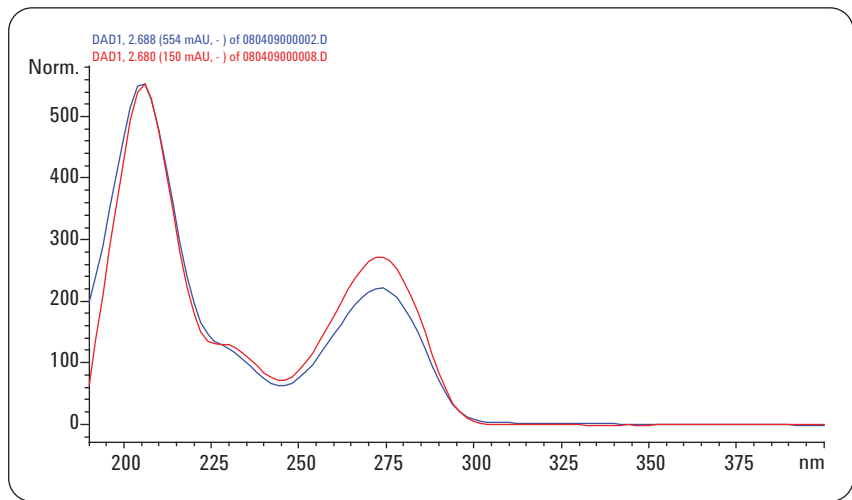


图 5. 咖啡因标准品与 DYX 减肥茶中咖啡因谱的比较

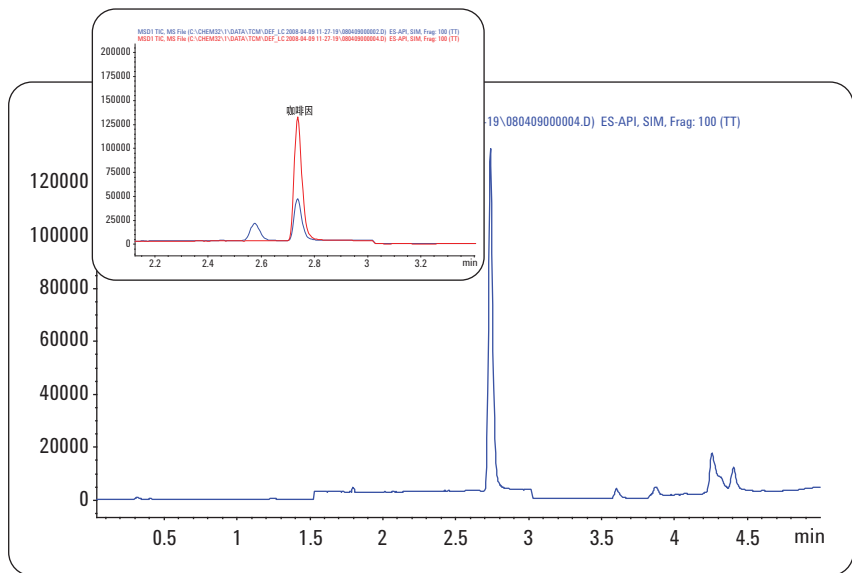


图 6. DYX 减肥茶与混合标准品溶液 (左上角) SIM 模式检测得到的 RRLC-MS 色谱图的比较

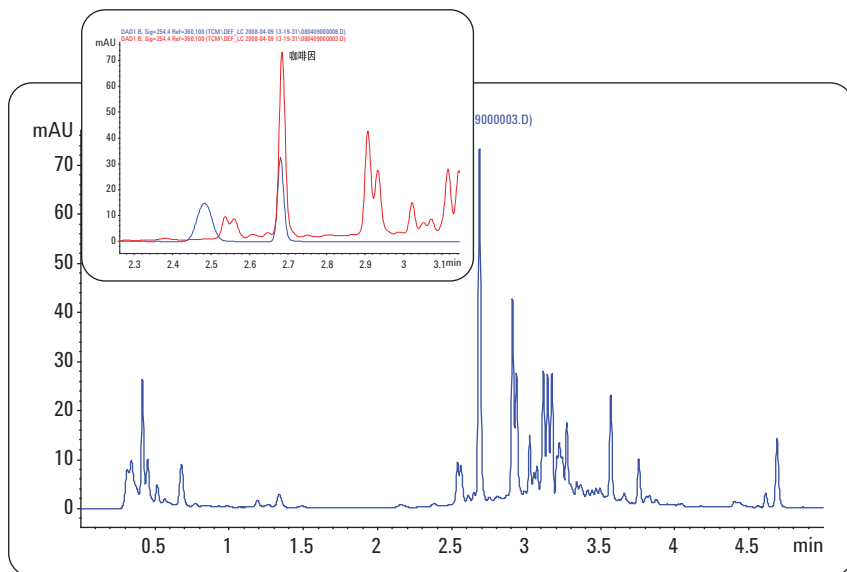


图 7.  
BSY 减肥茶与混合标准品溶液（右上角）的 RRLC-UV 色谱图的比较

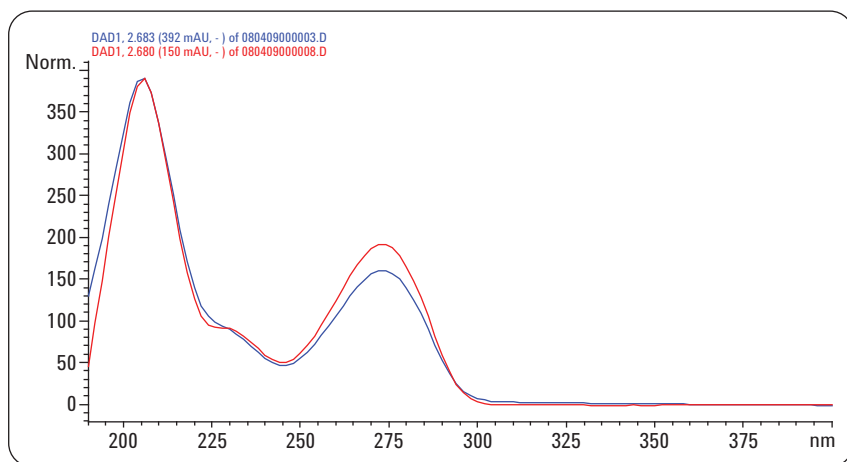


图 8.  
咖啡因标准品与 BSY 减肥茶中咖啡因谱的比较

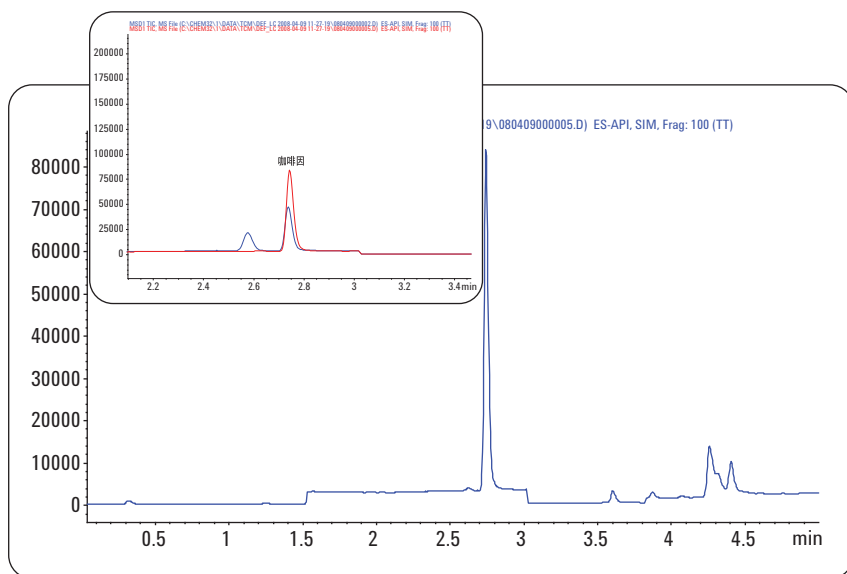


图 9.  
BSY 减肥茶与混合标准品溶液（左上角）SIM 模式检测得到的 RRLC-MS 色谱图的比较

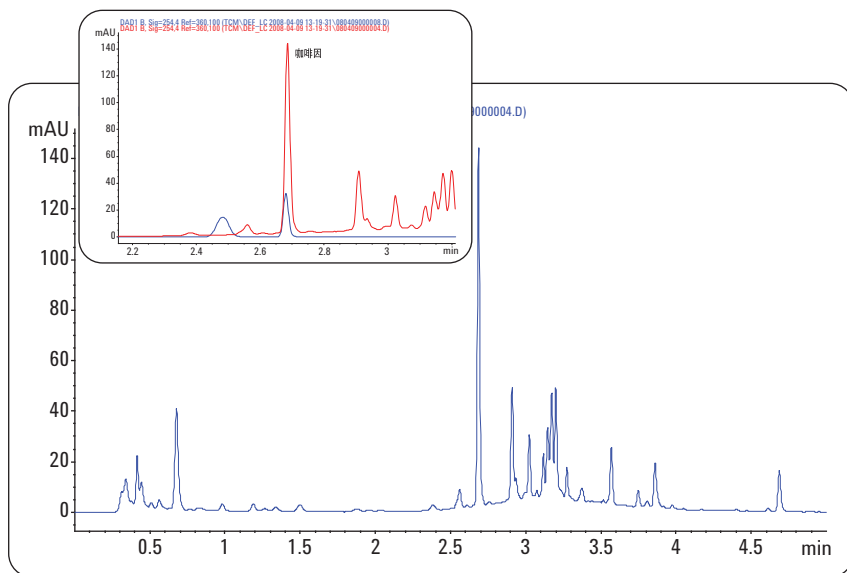


图 10.  
GJL 减肥茶与混合标准品溶液（右上角）的 RRLC-UV 色谱图的比较

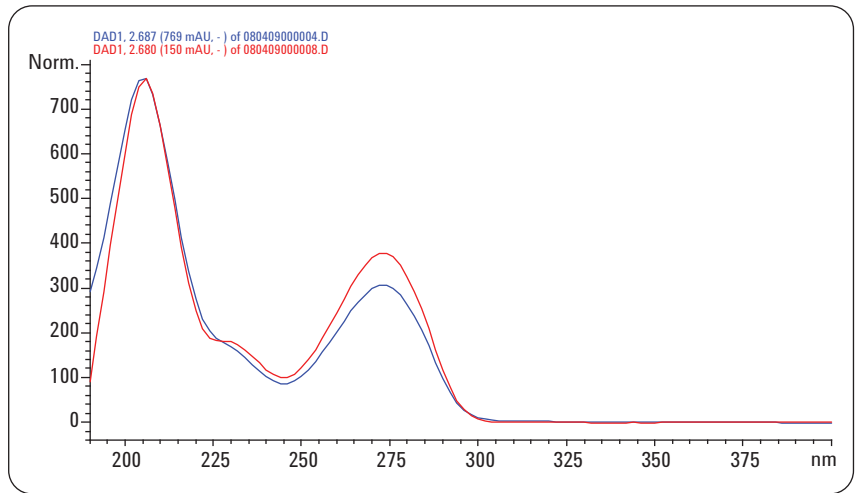


图 11.  
咖啡因标准品与 GJL 减肥茶中咖啡因谱的比较

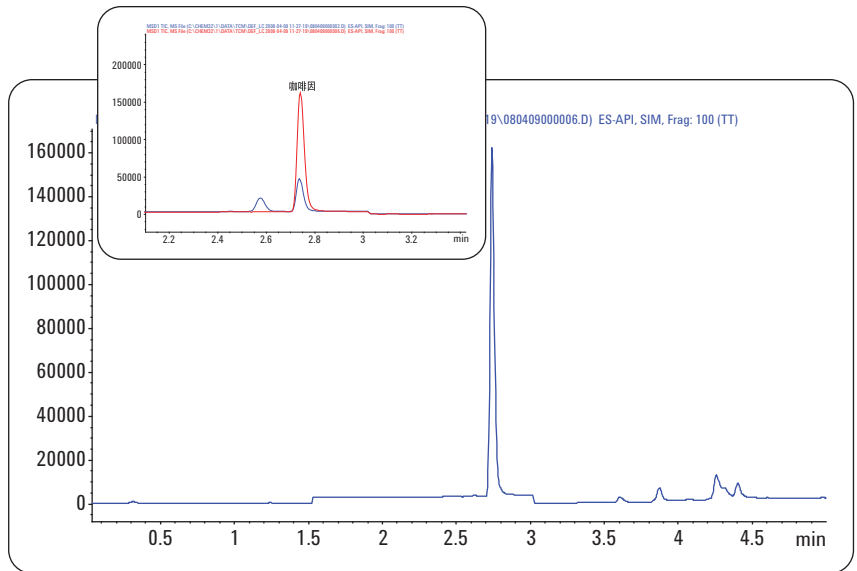


图 12.  
GJL 减肥茶与混合标准品溶液 (左上角) SIM 模式检测得到的 RRLC-MS 色谱图的比较



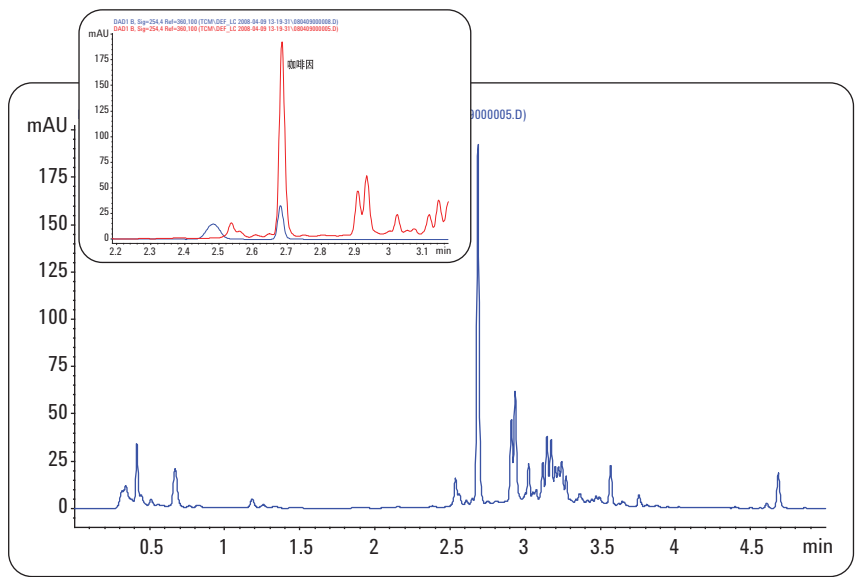


图 13.  
YST 减肥茶与混合标准品溶液（右上角）的 RRLC-UV 色谱图的比较

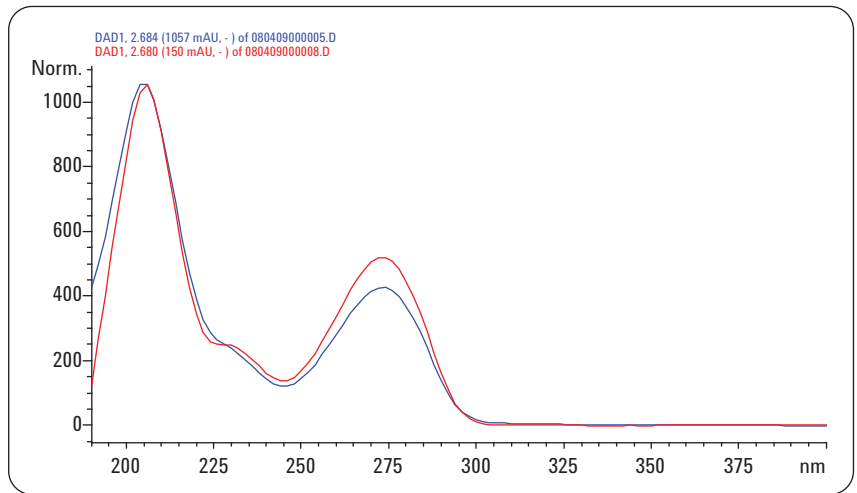


图 14.  
咖啡因标准品与 YST 减肥茶中的咖啡因谱的比较

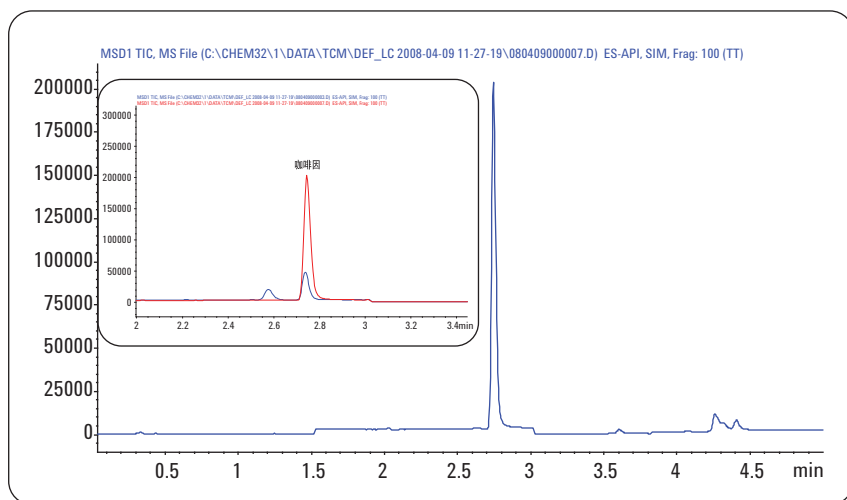


图 15. YST 减肥茶与混合标准品溶液（左上角）SIM 模式检测得到的 RRLC-MS 色谱图的比较

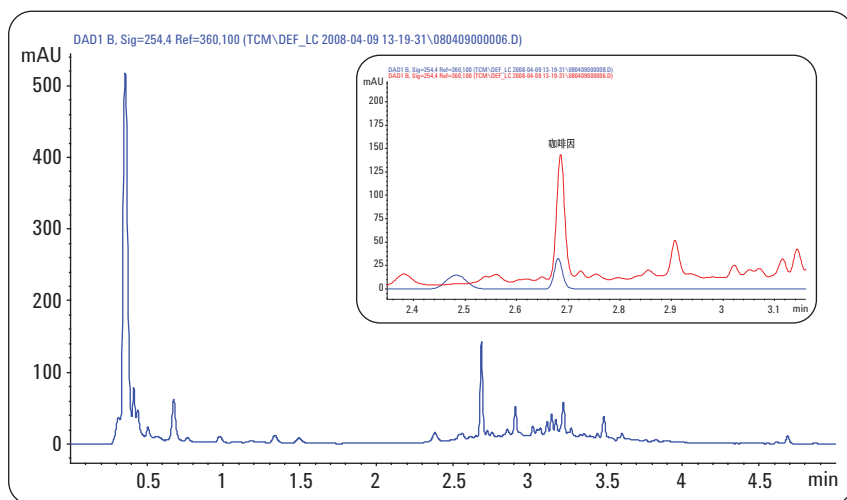


图 16. 降脂片与混合标准品溶液（右上角）的 RRLC-UV 色谱图的比较

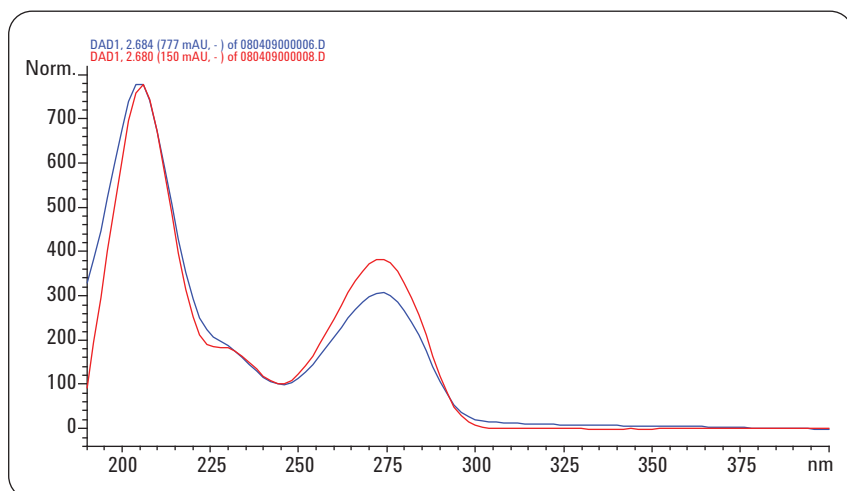


图 17. 咖啡因标准品与降脂片中的咖啡因谱的比较

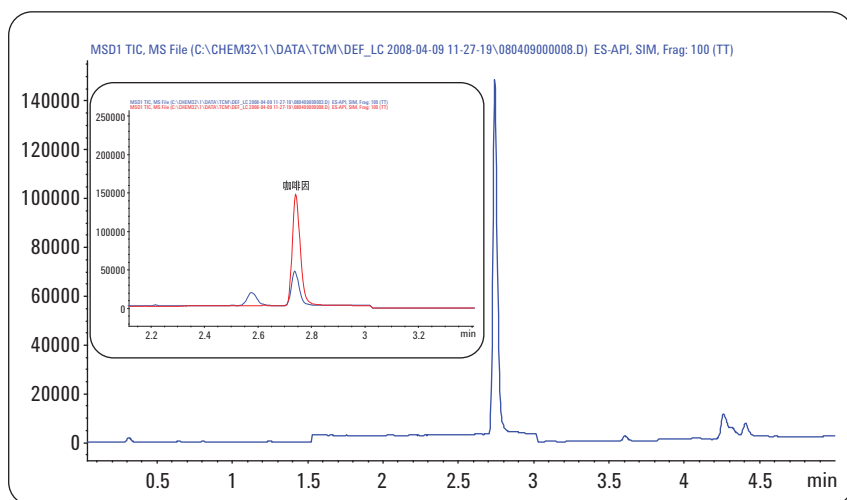


图 18.  
降脂片与混合标准品溶液（左上角）SIM 模式检测得到的 RRLC-MS 色谱图的比较

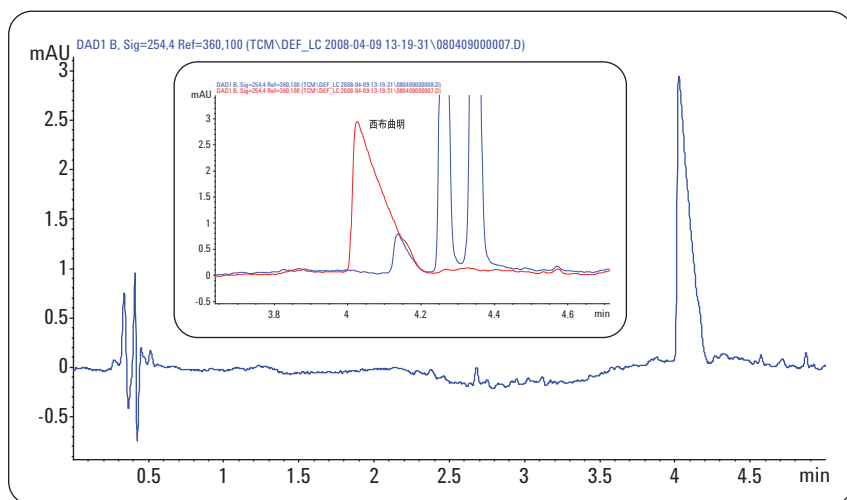


图 19.  
QM 减肥胶囊与混合标准品溶液（右上角）的 RRLC-UV 色谱图的比较

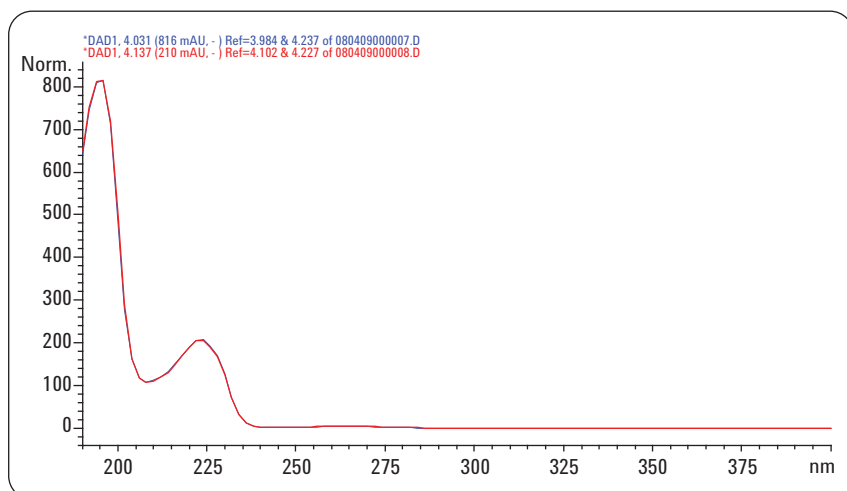


图 20.  
西布曲明标准品与 QM 减肥胶囊中的西布曲明的咖啡因谱的比较

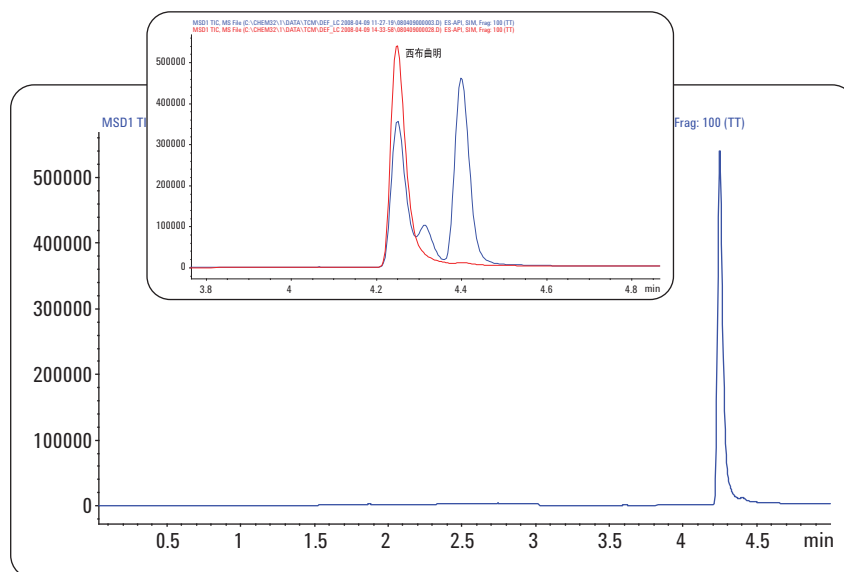


图 21.  
QM 减肥胶囊与混合标准品溶液（左上角）SIM 模式检测得到的 RRLC-MS 色谱图的比较

样品名/回收率 (%)	盐酸苯丙醇胺	氢氯噻嗪	咖啡因	盐酸芬氟拉明	盐酸西布曲明	酚酞	便塞停
BSY							
减肥茶	60.9	71.2	96.5	96.3	106.3	90.4	79.9
降脂片	75.5	78.8	96.5	90.0	99.6	90.4	88.1

表 3.  
两个样本的加标回收率（六次平行实验）

[www.agilent.com/chem/tcm](http://www.agilent.com/chem/tcm)

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2009  
2009 年 10 月 1 日，中国印刷  
出版号 5989-9220CHCN