

## 论著

## 高效液相色谱法检测保健食品中的违禁药物

蔡增轩 李 刚 任一平

(浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310009)

**摘 要:**目的 建立高效液相色谱法同时测定保健食品中的3大类共10种违禁添加药物的方法。方法 样品经色谱分离后采用二极管阵列(PDA)检测器检测,以紫外特征吸收谱图作为定性的依据。结果 苯乙双胍、芬氟拉明、格列齐特、格列甲嗪、西力士、格列苯脲、西地那非、格列美脲、伐地那非、盐酸西布曲明的最低检出限分别为8.26、38.34、13.37、22.44、6.90、16.08、25.32、40.43、40.94、11.95 ng/ml;线性关系在0.5~50 µg/ml浓度范围,相关系数( $r$ )均大于0.999 8,样品加标回收率大于85%,RSD小于5.20%。结论 该方法样品处理简便,结果准确可靠,重复性好,灵敏度高。

**关键词:**色谱法,高压液相;营养保健品;物质滥用检测

## Determination of Illegal Medicines in Health Foods by High Performance Liquid Chromatography

CAI Zeng-xuan, LI Gang, REN Yi-ping

(Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Zhejiang Hangzhou 310009, China)

**Abstract: Objective** A simple method employing photodiode array (PDA) detector for determination was established for the analysis of illegal medicines in health foods. **Method** The chromatographic separation was performed on reverse Atlantis C<sub>18</sub> column with a mobile phase of 10 mmol/L ammonium acetate-ammonium acetate-methanol. **Results** The linear range was from 0.5 to 50.0 µg/ml,  $r=0.999\ 8$ . The average recovery was above 85%,  $RSD < 5.20\%$  ( $n=6$ ). **Conclusion** The analytical method in the present study was well validated and good results were obtained with respect to precision, repeatability and spiked recovery.

**Key word:** Chromatography, High Pressure Liquid; Dietary Supplements; Substance Abuse Detection

西地那非是美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗男性功能障碍的口服药<sup>[1]</sup>,西力士是第二代磷酸二酯酶(PDE-5)选择性抑制剂,药效更快、更持久,已在欧洲批准上市,伐地那非为选择性5-磷酸二酯酶(PDE-5)抑制剂,是继西地那非、他地那非之后第3个男性性功能障碍用药,药效较西地那非和他地那非有所改良。但如过量服用会引起头痛、消化不良,颜色分辨下降等不良反应<sup>[2]</sup>,对于心血管患者,有可能导致突然死亡。

格列齐特、格列甲嗪、格列美脲、格列苯脲是一类广泛用于治疗2型糖尿病的药物,主要通过加速胰岛素从胰腺细胞分泌、阻止ATP敏感性K通道,从而达到降血糖的作用。苯乙双胍因为是用于治疗2型糖尿病的药物,但不刺激胰岛素分泌,主要通过抑制葡萄糖在肠内的吸收,促进组织对葡萄糖的摄取,增加葡萄糖的利用,对糖尿病人有降血糖的作用,对正常人的血糖无影响<sup>[3]</sup>。

盐酸西布曲明为新型减肥药,芬氟拉明为苯丙胺类食欲抑制药,2种药品均被禁止用于减肥产品<sup>[4]</sup>。

上述药物均为处方药,需要在医生指导下服用,因此,我国明令禁止在保健食品中添加上述药品。

但保健食品市场管理混乱,一些不法厂家唯利是图,常将这类违禁药物掺入保健食品内,以达到其宣传的治疗作用,严重威胁到服用者的健康。为加强市场管理,维护消费者的利益,必须建立一套有效的检测保健食品中违禁药品的定性定量方法。

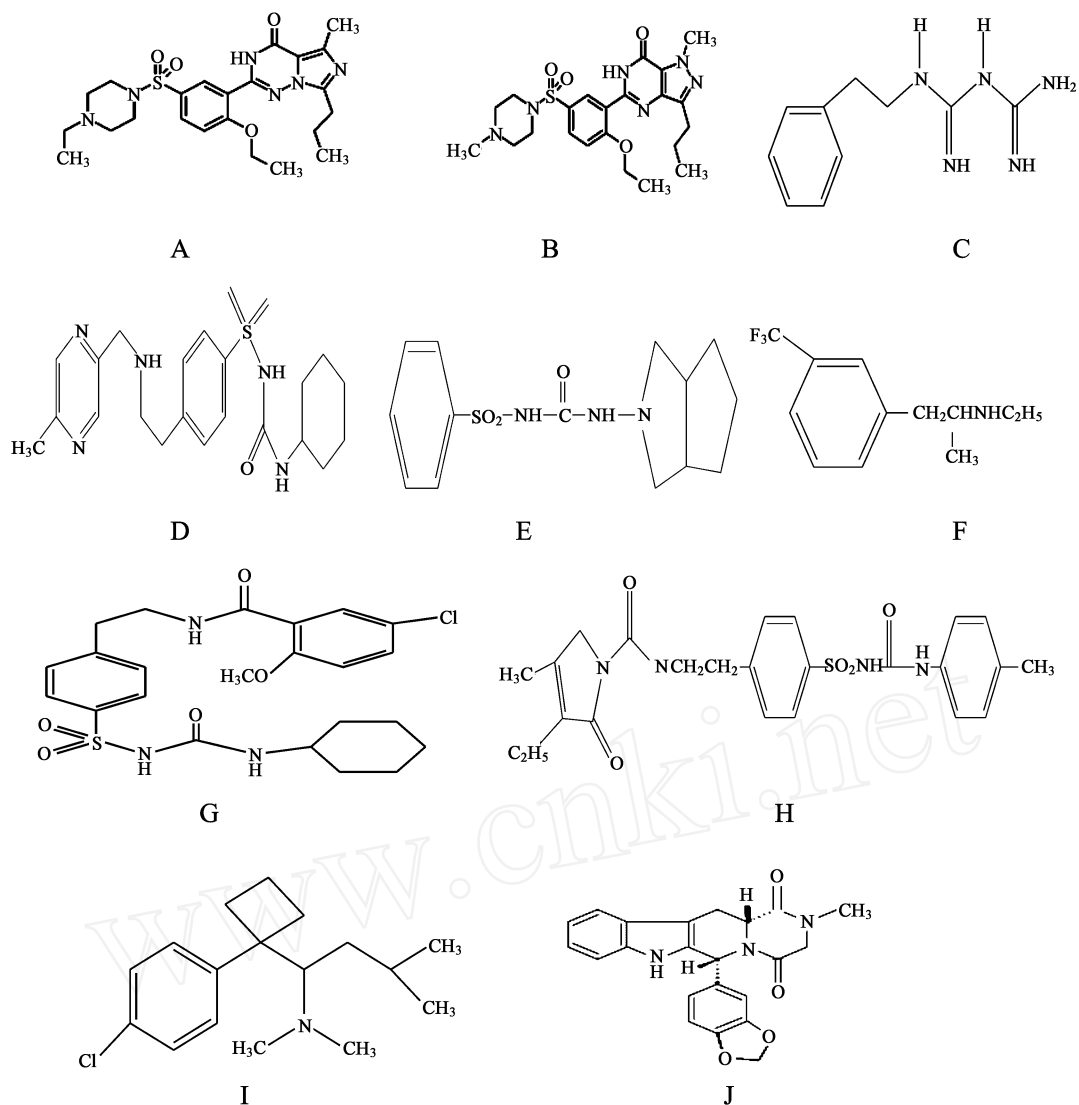
## 1 材料与方法

1.1 试剂 西地那非标准品、西力士标准品、伐地那非标准品、格列齐特标准品、格列甲嗪标准品(SIGMA公司);格列美脲标准品(SIGMA公司);格列苯脲标准品(Dr. Ehrenstorfer公司);苯乙双胍标准品(SIGMA公司);盐酸西布曲明标准品(浙江省药品检定所提供);芬氟拉明标准品(Dr. Ehrenstorfer公司)。有机溶剂均为色谱纯。超纯水由Millipore纯水系统(美国Millipore公司)制备。

储备液的配制 称取西地那非、西力士、伐地那非、格列齐特、格列甲嗪、格列美脲、格列苯脲、苯乙双胍、盐酸西布曲明、芬氟拉明标准品各10 mg,用10 ml甲醇水(体积比1+1)溶解,(格列甲嗪、格列美脲加0.003 mol/L氢氧化钠3~4滴帮助溶解)制成1 mg/ml储备液,保存在4℃冰箱中。

工作溶液的配制 用50%甲醇水溶液将储备液依次稀释成10.0、1.0、0.1 µg/ml的工作溶液。

作者简介:蔡增轩 男 博士



A 伐地那非, B 西地那非, C 苯乙双胍, D 格列甲嗪, E 格列齐特, F 芬氟拉明, G 格列苯脲, H 格列美脲, I 西布曲明, J 西力士。

图 1 保健食品中 10 种违禁药物的化学结构

1.2 仪器 Alliance 2695 高效液相色谱仪、2996 PDA 检测器、Empower 2.0 软件、Milli-Q 去离子水制备系统(美国 Millipore 公司), WH-866 涡流混合器、Anke KA-1000 离心机。

1.3 方法 HPLC 条件色谱柱: Waters Atlantis ODS<sub>18</sub> 柱(2.1 mm × 150 mm, 5.0 μm); 柱温: 30; 试样温度: 室温。进样体积: 10 μl。流速: 0.2 ml/min。梯度条件见表 1。

表 1 色谱分离梯度洗脱条件

时间(min)	10 mmol/L 乙酸铵水溶液(%)	10 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液(%)	梯度变化曲线
0.0	60	40	
3.0	50	50	6
13.0	50	50	1
14.0	40	60	6
29.0	40	60	1
30.0	0	100	6
39.0	0	100	1
39.5	60	40	6

准确称取样品 1.0 g, 加 10 ml 甲醇水溶液(1 + 1 体积分数)溶解(降糖类药品需加 0.5 ml 3 mol/L NaOH), 超声震荡 10 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液后, 残渣再用甲醇水重复提取 1 次。合并提取液。再用 50% 甲醇水稀释 10 倍, 过 0.22 μm 滤膜, 待用。

## 2 结果和讨论

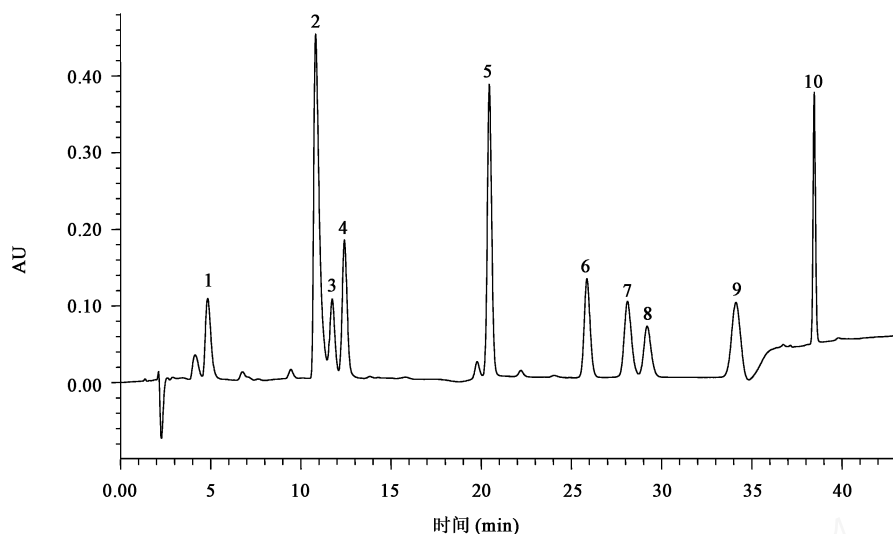
2.1 流动相的选择 本研究采用 10 mmol/L 乙酸铵水溶液和 10 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液。使用梯度洗脱的方法适用范围广。

2.2 色谱柱的选择 取各标准品, 配制成混合溶液, 分别使用以下色谱柱进样分析。各柱规格参数: 柱 1: Cosmosil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm、粒径 5 μm); 柱 2: Atlantis C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm、粒径 5 μm); 柱 3: Sunfire C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm、粒径 5 μm); 柱 4:

Atlantis C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm ×150 mm、粒径 5 μm)。

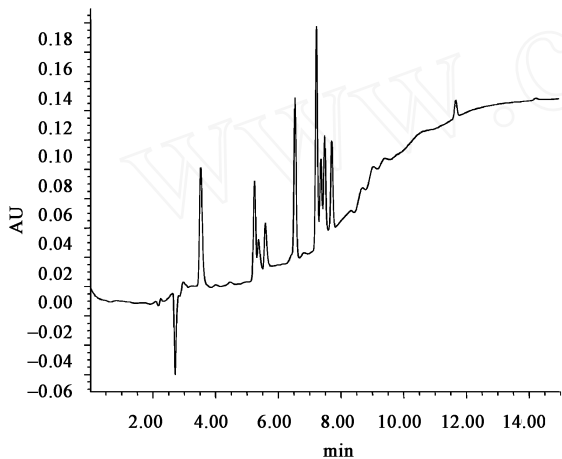
实验结果表明,在相同的标准溶液和流动相条件下,不同的柱子经过优化梯度洗脱条件后,都存在

出峰顺序、保留时间和峰形改变的情况。由于标准品中极性化合物较多,采用 Atlantis 柱的分离效果明显优于其他柱子,见图 2、图 3。

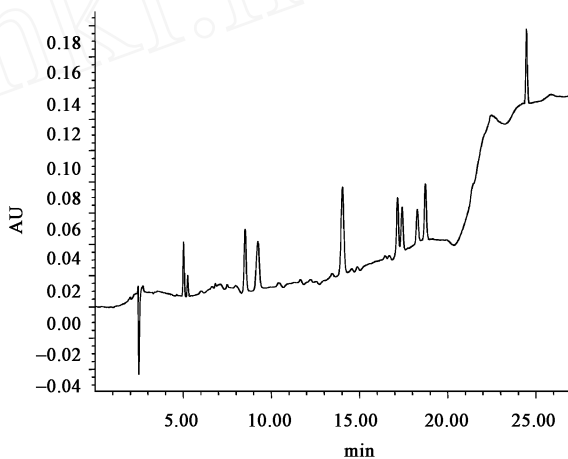


1 苯乙双胍, 2 芬氟拉明, 3 格列齐特, 4 格列甲嗪, 5 西力士, 6 格列苯脲, 7 西地那非, 8 格列美脲, 9 伐地那非, 10 盐酸西布曲明。

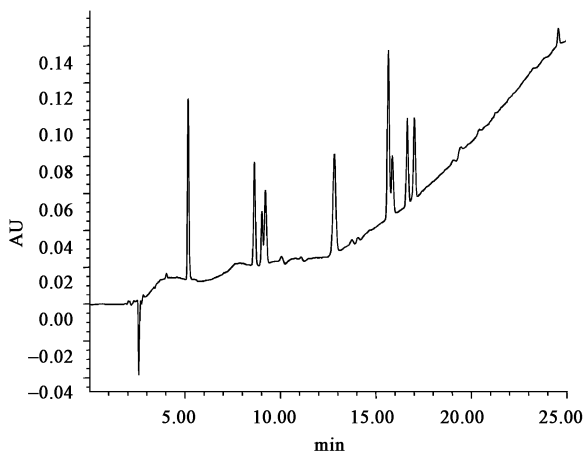
图 2 保健食品中 10 种添加违禁药品的色谱分离图(检测波长 210nm)



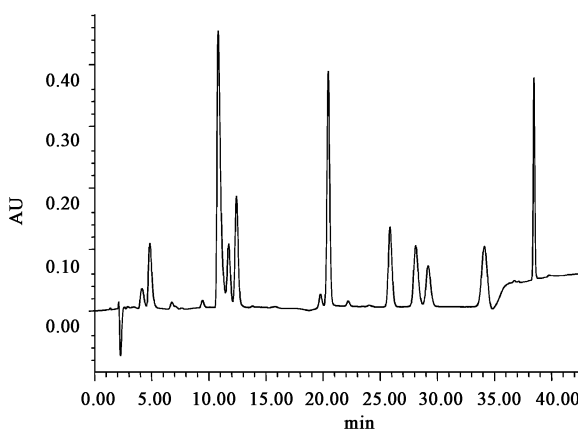
柱 1 Cosmosil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm 粒径 5 μm)



柱 2 Atlantis C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm 粒径 5 μm)



柱 3 Sunfire C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm 粒径 5 μm)

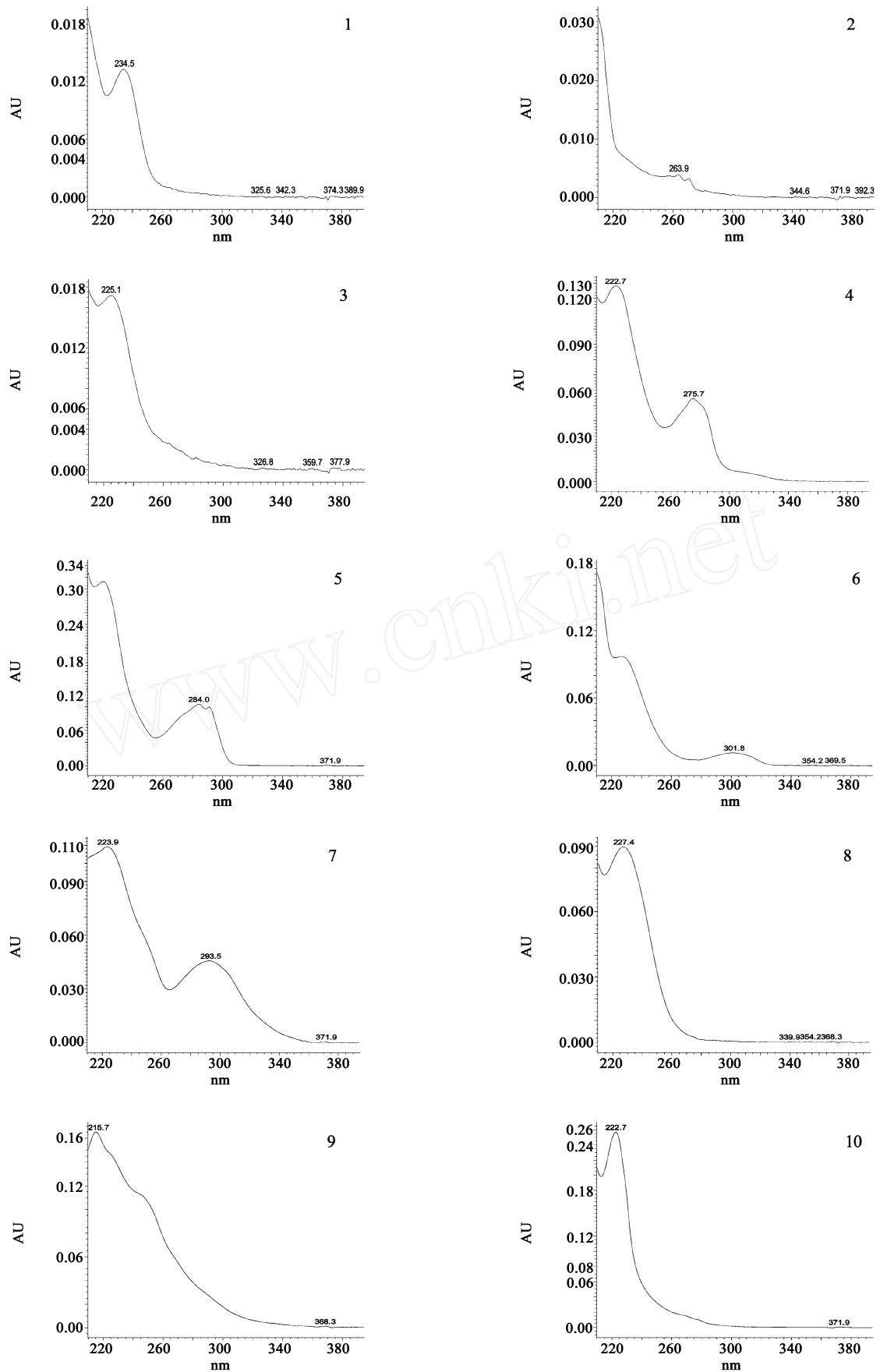


柱 4 Atlantis C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm × 150 mm 粒径 5 μm)

图 3 不同色谱柱的分离色谱图

2.3 PDA 定性分析 每个物质都有其特定的紫外特征吸收谱图和最佳吸收波长, PDA 的紫外特征吸

收谱图和保留时间能对样品进行初步定性。图 4 为各标准品的紫外特征吸收谱图。



1 苯乙双胍, 2 芬氟拉明, 3 格列齐特, 4 格列甲嗪, 5 西力士, 6 格列苯脲, 7 西地那非, 8 格列美脲, 9 伐地那非, 10 盐酸西布曲明。

图 4 各种药品的紫外扫描图

## 2.4 方法学验证

2.4.1 校正曲线的制作 将苯乙双胍、芬氟拉明、格列齐特、格列甲嗪、西力士、格列苯脲、西地那非、格列美脲、伐地那非、盐酸西布曲明标准溶液配成混合溶液,浓度分别为10、50、20、20、10、10、20、20、20、30  $\mu\text{g/ml}$ 。再取混合溶液500、200、100、50  $\mu\text{l}$ 定容至1 000  $\mu\text{l}$ 。以试样峰面积为纵坐标,试样浓度为横坐标,制成曲线。结果见表2。

表2 线性范围、回归方程和相关系数

名称	线性范围( $\mu\text{g/ml}$ )	回归方程	$R^2$
苯乙双胍	0.5~10.0	$y = 2.04e5 x + 9.2e4$	0.9999
芬氟拉明	2.5~50.0	$y = 9.22e4 x - 2.21e4$	0.9999
格列齐特	1.0~20.0	$y = 1.04e5 x + 2.31e4$	0.9999
格列甲嗪	1.0~20.0	$y = 1.63e5 x + 2.06e2$	0.9998
西力士	0.5~10.0	$y = 6e5 x + 6.64e4$	0.9998
格列苯脲	0.5~10.0	$y = 3.33e5 x + 4.91e3$	0.9998
西地那非	1.0~20.0	$y = 9.96e5 x - 4.23e3$	0.9999
格列美脲	1.0~20.0	$y = 1.18e5 x + 3.83e2$	0.9999
伐地那非	1.0~20.0	$y = 2.01e5 x + 5e4$	0.9999
盐酸西布曲明	1.5~30.0	$y = 6.44e4 x + 2.66e4$	0.9994

2.4.2 检出限 当信噪比为3的浓度为最低检出限时,当信噪比为10的浓度为最低定量限时,苯乙双胍、芬氟拉明、格列齐特、格列甲嗪、西力士、格列苯脲、西地那非、格列美脲、伐地那非、盐酸西布曲明最低检出限分别为8.26、38.34、13.37、22.44、6.93、16.08、25.32、40.43、40.94、11.95  $\text{ng/ml}$ 。最低定量限分别为27.53、127.80、44.57、74.80、23.10、53.60、84.40、134.77、136.53、39.83  $\text{ng/ml}$ 。

2.4.3 回收率 取空白样品3份,每份0.50 g,加入各组标样,按1.3进行试样处理。进样10  $\mu\text{l}$ 。结果如表3。

2.4.4 精密度 取空白的样品,按1.3要求进行试样处理。进样10  $\mu\text{l}$ 。苯乙双胍、芬氟拉明、格列齐特、格列甲嗪、西力士、格列苯脲、西地那非、格列美脲、伐地那非、盐酸西布曲明的精密度试验( $n=6$ )  $RSD\%$ 分别为5.01、4.30、2.80、0.78、0.69、0.93、

表3 10种违禁药品的回收率

组分名称	加入量( $\mu\text{g/ml}$ )	测得量( $\mu\text{g/ml}$ )	回收率(%)
苯乙双胍	2.0	1.77	88.5
芬氟拉明	0.4	0.37	92.5
格列齐特	2.0	1.89	94.5
格列甲嗪	2.0	1.84	92.0
西力士	10.0	8.93	89.3
格列苯脲	1.0	0.97	97.0
西地那非	10.0	8.87	88.7
格列美脲	1.0	0.96	95.6
伐地那非	1.0	0.94	94.0
盐酸西布曲明	4.0	3.69	92.3

0.51、0.23、3.03、5.20。

2.4.5 实际样品的测定 对市售某种抗疲劳保健食品进行检测,在210 nm的检测波长下,20.479 min出现色谱峰,和标准对照为西力士成分。

## 参考文献

- [1] 李润锴,薄涛,刘虎威,等.毛细管电泳法测定性保健食品中的西地那非[J].色谱,2002,20:335-337.
- [2] McCulley T J, Luu J K, Marmor M F, et al. Effects of sildenafil citrate (Viagra) on choroidal congestion [J]. Ophthalmologica, 2002, 216: 455-458.
- [3] 徐叔云.现代实用临床药理学[M]北京:人民卫生出版社,1996: 816-835.
- [4] 陈新谦,金有豫,主编.新编药理学[M].第13版.北京:人民卫生出版社,1992:477-478.
- [5] 钱小平,赵远很,孙丽媛.高效液相色谱法测定盐酸芬氟拉明及其在片剂中含量[J].色谱,1998,16(6):548-549.
- [6] 陈宗岱,凌宗岷,潘延汉.高效液相色谱法测定爱娇美中盐酸芬氟拉明的含量[J].华西医学杂志,1994,9(1):60-62.
- [7] 谭小秋,高艳红.高效液相色谱法测定减肥食品中的盐酸芬氟拉明的含量[J].中华预防医学杂志,2001,35(2):124-125.
- [8] 缪玉山,历伟兰,倪桃,等.HPLC测定枸橼酸西地那非片中西地那非及其有关物质的含量[J].中国药科大学学报,2001,32: 273-275.
- [9] 丛培红,孙延清.高效液相色谱法测定盐酸苯乙双胍片的含量[J].山东医药工业,2003,22(4):14-15.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15; O657.72; TS218 文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2007)01-0036-05