

实验技术与方法

HPLC/ESHMS测定减肥保健食品中的双去甲基西布曲明

陈 稚 吴都督

(广东医学院分析中心,广东 东莞 523808)

摘要:目的 建立高效液相色谱质谱联用技术(HPLC/ESHMS)的测定方法,测定保健食品中双去甲基西布曲明。方法 色谱条件为 Johnson Spherigel C₁₈色谱柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm);流动相:流动相 A液(0.25%乙酸 + 20 mmol/L乙酸铵),流动相 B液(甲醇) = 25 + 75(体积比),流速 1 ml/min,检测波长 223 nm。质谱采用电喷雾正离子模式(ESI+),分子离子峰 m/z 252。结果 双去甲基西布曲明在 0.01 ~ 1.20 mg/ml范围内,浓度与峰面积呈良好的线性关系,最低检出限为 0.95 μg/ml ($S/N = 3$)。结论 本方法流动相简单,分析时间短且试样预处理简单,灵敏度高,借助质谱的定性能力,可大大提高方法可靠性和抗干扰能力,能准确快速地测定保健食品中的双去甲基西布曲明。

关键词:液相色谱 电喷雾质谱联用;双去甲基西布曲明;保健食品;减肥药

中图分类号: O657.72; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2010)01-0024-03

Determination of N-di-Desmethylsibutramine with HPLC/ESHMS in Slimming Health Food Products

CHEN Zhi, WU Du-du

(Analytic Center of Guangdong Medical College, Guangdong Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective A high-performance liquid chromatography electrospray/mass spectrometry (HPLC/ESHMS) method was developed to detect N-di-desmethylsibutramine in slimming health food products. **Method** The separation was completed on a RP-C₁₈ column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) with 0.25% acetic acid aqueous solution containing 20 mmol/L ammonium acetate as mobile phase. Elution run at a flow rate of 1 ml/min and UV detection was performed at 223 nm. **Results** Good linearity was shown between the peak area and the concentration of N-di-desmethylsibutramine standards, in a range of 0.01-1.20 mg/ml. **Conclusion** The correlation coefficient of the calibration curves was better than 0.9997 ($n = 6$). The limit of detection (LOD) was 0.95 μg/ml ($S/N = 3$). The method was sensitive, precise and highly reproducible.

Key words: High-Performance Liquid Chromatography Electrospray/Mass Spectrometry; N-di-Desmethylsibutramine; Health Food; Anti-Obesity Agents

西布曲明可由胃肠道迅速吸收,在肝脏主要经 P450酶系作用,几乎全部去甲基化生成去甲基西布曲明和双去甲基西布曲明两种活性代谢物。据文献报道,西布曲明的生理活性主要由双去甲基西布曲明引起^[1]。

双去甲基西布曲明尚未被 FDA 批准为处方药,但稳定性强,具有跟西布曲明同样的减肥功效^[2],且在各项检测中表现出和西布曲明不同的性质,使用它来代替西布曲明,能够逃避食品监督部门的检查,所以现在正逐渐作为西布曲明的替代物被添加

到保健食品当中以增强产品效果,达到不法牟利的目的,此种做法严重违反了严禁向保健食品内添加任何处方类药物的规定。因此,有必要建立一种测定减肥保健食品中双去甲基西布曲明的方法,以查处用代谢物代替原药以逃避食品监督部门检查的违法行为。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器 Waters 2695分离单元(美国,Waters公司),包括低压梯度泵、自动进样器、柱温箱和一个 250 μl 的定量环;Waters 2487 双波长紫外检测器(美国,Waters公司);Waters ZQ 2000 质谱检测器(英国,曼彻斯特),含有电喷雾(ESI)电离源和四级杆质量分析器;Masslynx™ 3.5 数据处理软件;

收稿日期:2009-11-12

基金项目:广东医学院青年基金资助项目(xq06027)

作者简介:陈稚女 讲师 研究方向为药物成分及液相色谱技术 E-mail: czl22@126.com

AL204电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司);JCX-250W超声波清洗机(山东济宁超声电子仪器厂);Johnson Spherigel C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连江申分离科学科技公司);0.45 μm尼龙膜(北京颇赛科技发展有限公司)。

标准品和试剂 双去甲基西布曲明标准品由中国药品生物制品检定所购得(纯度高于99%),标准品的结构式见图1。保健胶囊和保健茶均由市场购得(中国,东莞)。甲醇(色谱纯,天津四友精细化学品公司);超纯水采用AXLC1820型超纯水机(重庆阿修罗科技有限公司)。乙酸、乙酸铵(分析纯,广东汕头西陇化工厂)。所有试剂在使用前均经过超声脱气。

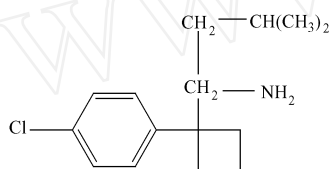


图1 双去甲基西布曲明结构式

1.2 校正曲线的配制

精密称取60 mg双去甲基西布曲明于50 ml的容量瓶中,加甲醇溶解。最后由甲醇逐渐稀释配成一系列不同浓度的工作标准溶液作校正曲线。稀释后的双去甲基西布曲明浓度为0.01、0.05、0.10、0.50、1.00和1.20 mg/ml。

1.3 样品处理

固体样品处理 固体样品若为胶囊,取其粉末内容物;若为片剂,则取一定量的样品碾碎、混匀,称量0.05~0.1 g,加入100 ml甲醇,超声提取30 min,静置沉淀后上清液用0.45 μm尼龙膜过滤,滤液直接进HPLC/ESI-MS系统分析,进样量5 μl。

液体样品处理 液体样品直接用0.45 μm尼龙膜过滤,滤液进HPLC/ESI-MS系统分析,进样量5 μl。

1.4 实验条件

HPLC条件 色谱柱 Johnson Spherigel C₁₈柱;流动相 A液(0.25%乙酸+20 mmol/L乙酸铵);流动相 B液(甲醇)=25+75(体积比);进样前,柱子用流动相平衡10 min,流速为1.0 ml/min。由DAD流出的溶液经过三通阀分流,只有0.2 ml/min进入到MS电离源;柱温:25;进样体积为5 μl。

MS条件 用电喷雾离子化正离子采集模式(ESI+),目标离子:双去甲基西布曲明分子离子峰 m/z 252,选择离子进行定量。毛细管电压为3 kV,锥孔电压为40 V,萃取电压为5 V,聚焦电压为0.5 V,源温度为110,脱溶剂气温度为230,脱溶剂气流速为250 L/h,锥孔反吹气流速为50 L/h。

2 结果

2.1 线性范围和检测限

将1.2中所配制的一系列双去甲基西布曲明标准工作溶液中的6种浓度各平行分析3次。以峰面积的平均值为纵坐标、相应浓度为横坐标作图,得到校正曲线 $y = 79\,494.35x + 244$,相关系数 $r = 0.9997$,色谱图见图2-B。将标准溶液逐渐稀释,求得被分析物的检测下限,检出限为 $0.95\ \mu\text{g/ml}$ ($S/N = 3$),样品最低检测限为 $3.48\ \mu\text{g/ml}$ ($S/N = 3$)。

2.2 回收率和精密度试验

在保健胶囊和保健茶中添加标准品溶液,均做5份平行测定,平行测定3次,结果见表1。

表1 双去甲基西布曲明回收率和精密度 ($n=5$)

样品	添加量 (mg/ml)	测定量 (mg/ml)	回收率 (%)	相对标准 偏差 (%)
1	0.10	0.09812	98.12	3.11
2	0.10	0.09660	96.60	4.67

2.3 方法抗干扰能力

减肥保健食品中含有多种化合物,成分非常复杂,以空白样品色谱图(图2-A)与加入标准品后的样品色谱图(图2-C)相比较,空白样品在双去甲基西布曲明的出峰时间处没有明显的信号,这说明在本实验条件下,原料成分未对检测目标物造成干扰。

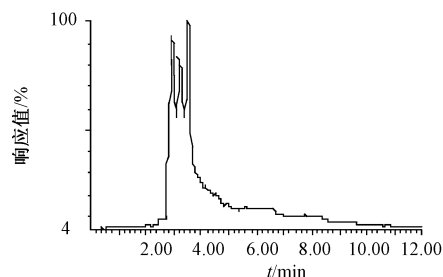


图2-A 空白样品色谱图

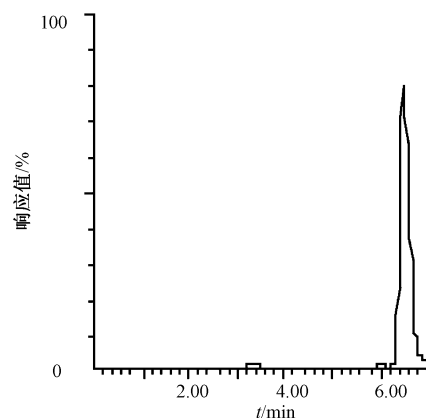


图2-B 标准品色谱图

2.4 试样测定

本试验运用以上HPLC/ESI-MS方法测定了8种减肥保健胶囊以及5种保健茶,13个样品中检测

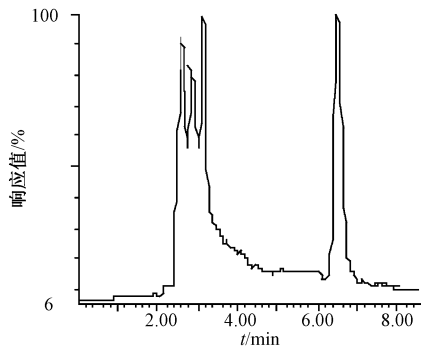


图 2-C 添加标准品后的试样色谱图

出某保健茶中添加了双去甲基西布曲明,见色谱图 3和质谱图 4,含量为 1.56 mg/g ($RSD = 2.1\%$, $n = 3$)。

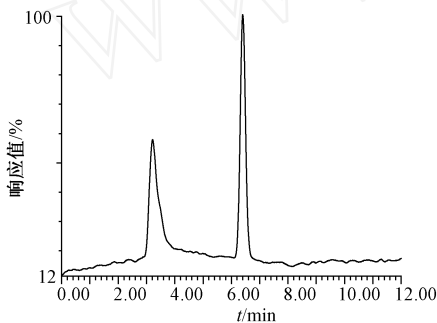


图 3 试样色谱图

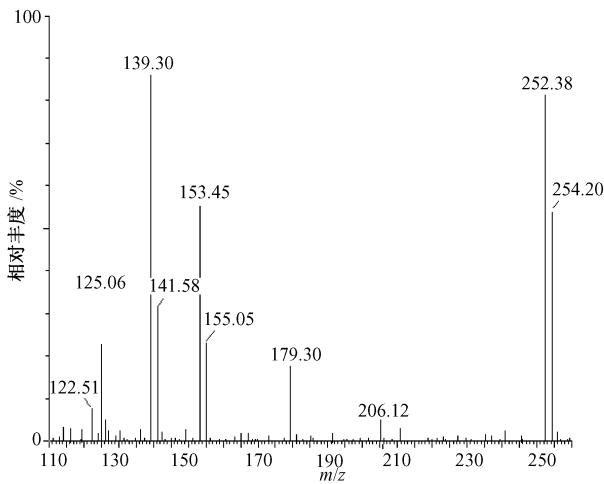


图 4 检测试样质谱图

用了乙酸,当在流动相中加入 0.25%的乙酸以后,双去甲基西布曲明的峰形比较对称,且对质谱仪器不造成危害。

为了取得双去甲基西布曲明的分子离子峰 $[M + H]^+$ 最大响应值,通过流动注射分析 100 ng/ml 的双去甲基西布曲明的标准溶液,对质谱离子化模式进行了选择,对毛细管电压和锥孔电压进行了优化。目标物采用正离子模式比负离子模式时的灵敏度要高 2~3 个数量级。双去甲基西布曲明准分子离子峰 ($[M + H]^+$) 的 m/z 为 252,它的分子离子峰的峰面积随着毛细管电压的升高而逐渐增大。当毛细管电压为 3 kV 时达到一个平台,再增加毛细管电压会导致分子离子峰的峰面积下降,因此本实验的最佳毛细管电压设置为 3 kV。

在扫描模式下,分别在锥孔电压为 20、30、40、50、60、70 V 时,比较双去甲基西布曲明分子离子峰响应值,选择最合适的锥孔电压。在较低的锥孔电压下,双去甲基西布曲明分子离子峰的响应较好;当锥孔电压增加时,碎片离子随之增加,分子离子峰的响应变差。实验结果显示在 40 V 的锥孔电压下,双去甲基西布曲明有较好的分子离子峰。这可能由于双去甲基西布曲明是极性较强的化合物,而且分子比较小,所以很容易被离子化,在高电压下容易裂解。标准品的质谱图见图 5。

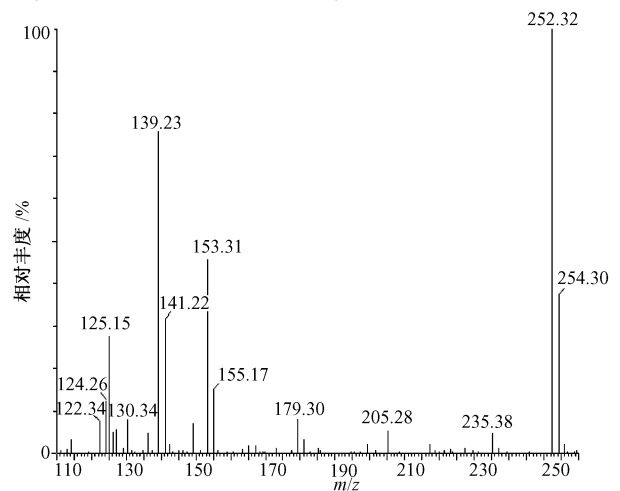


图 5 双去甲基西布曲明标准品质谱图

3 讨论

双去甲基西布曲明不溶于有机溶剂,故选用极性较强的甲醇作为提取溶剂,液相色谱图显示甲醇溶解的样品能得到对称性好、峰宽较窄的色谱峰。

在不加改性剂的条件下,双去甲基西布曲明的峰形不对称,拖尾严重。用盐类改性剂可以改善峰形,但不挥发性的盐类会造成质谱离子源的严重污染。在本文的方法中没有添加盐类改性,而是使

参考文献

- [1] CHEN Jun, LU Wei, ZHANG Qizhi, et al. Determination of the active metabolite of sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Chromatography B, 2003, 785 (2): 197-203.
- [2] 左晓春, 笄宏远. 新一代减肥药——西布曲明 [J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 16 (2): 155-157.