

- 制品中的顺丁烯二酸与顺丁烯二酸酐总含量[J]. 色谱, 2013, 31(12):1224-1227.
- [12] Zalewska A, Pawłowski W, Tomaszewski W. Limits of detection of explosives as determined with IMS and field asymmetric IMS vapour detectors[J]. Forensic Science International, 2013, 226(1/3):168-172.
- [13] Verkouteren J R, Staymates J L. Reliability of ion mobility spectrometry for qualitative analysis of complex, multicomponent illicit drug samples[J]. Forensic Science International, 2011, 206(1/3):190-196.
- [14] Holopainen S, Nousiainen M, Sillanpää M. Determination of fuel ethers in water by membrane extraction ion mobility spectrometry [J]. Talanta, 2013, 106(1):448-453.
- [15] Gryniewicz C M, Reepmeyer J C, Kauffman J F, et al. Detection of undeclared erectile dysfunction drugs and analogues in dietary supplements by ion mobility spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 49(3):601-606.
- [16] Karpas Z, Guamán A V, Calvo D, et al. The potential of ion mobility spectrometry (IMS) for detection of 2, 4, 6-trichloroanisole (2,4,6-TCA) in wine[J]. Talanta, 2012, 93(2):200-205.

## 实验技术与方法

# 高效液相色谱法同时测定辅助改善记忆类保健食品中非法添加的17种化学药物

罗达龙, 王华

(广西梧州食品药品检验所, 广西 梧州 543002)

**摘要:**目的 建立辅助改善记忆类保健食品不同剂型中(口服液、丸剂、软胶囊)17种非法添加化学药物的高效液相色谱测定方法。方法 3种不同剂型的保健食品样品以50%甲醇水为提取溶剂进行超声提取,提取后采用C<sub>18</sub>-SPE柱净化,通过Thermo Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)分离,以100 mmol/L磷酸二氢钠水溶液和乙腈为流动相梯度洗脱,采用二极管阵列检测器定性、外标法定量。结果 在相应浓度范围内,17种化学药物线性关系良好,  $r > 0.99$ , 加标回收率为85%~120%, 检出限为10~40 μg/ml, 相对标准偏差(RSD)为0.8%~4.8%。结论 该方法操作简便、准确、快速, 能实现3种剂型中17种非法添加化学物的同时分析, 可用于辅助改善记忆类保健食品中非法添加化学药品的定性筛查和定量检测。

**关键词:** 高效液相色谱; 二极管阵列检测器; 改善记忆; 保健食品; 同时检测; 违法添加; 违禁药物

中图分类号: R155; O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)05-0546-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.014

## Simultaneous determination of 17 illegally added drugs in auxiliary memory improving health food by HPLC

LUO Da-long, WANG Hua

(Wuzhou Institutes for Food and Drug Control, Guangxi Wuzhou 543002, China)

**Abstract: Objective** To establish a method for determination of 17 illegally added drugs in memory improving health food with the formulas of oral liquid, pills, soft capsule by high performance liquid chromatography. **Methods** Samples in different dosage formulas were extracted with 50% methanol by ultrasonic and cleaned up with C<sub>18</sub> SPE cartridges, then separated on a Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1 HPLC column with a mobile phase of 100 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile for gradient elution, and quantified with external standard with photodiode array detector method. **Results** The calibration curves of the 17 chemical drugs with in appropriate concentration ranges showed a good linearity with high correlation coefficients. The average recoveries were from 85% to 120% with RSDs of 0.8%~4.8%. The detection limits of the 17 chemical drugs ranged from 10 to 40 μg/ml. **Conclusion** This method is simple, accurate and rapid. It could be used for simultaneous determination of 17 illegally added drugs in health food in the formulas of oral liquid, pills, soft capsule, and is suitable for confirming 17 illegally added drugs in memory improving health food.

**Key words:** High performance liquid chromatography; diode-array detector; improved memory; functional food; simultaneous determination; illegal to add; forbidden drug

目前我国已批准的保健食品的保健功能有减肥、缓解体力疲劳、辅助降血脂、辅助降血压、辅助降血糖、辅助改善记忆力等 27 种<sup>[1]</sup>,近年来,随着社会竞争压力的不断增大和老年化社会的扩大,辅助改善记忆力类保健品正步入人们的学习、工作和生活中,其具有改善记忆力、补充大脑营养等辅助保健功能。“辅助改善记忆”保健功能主要通过补充大脑正常运行所必须的物质、增加大脑细胞对氧气的利用、提供能够促进脑部新陈代谢排出的物质等途径实现<sup>[2-15]</sup>。然而不法商家为了使保健品起效快,以达到增加销售量目的,会在保健品中非法添加化学药物,但化学药物的副作用往往会严重影响人们的身体健康。

目前用于辅助改善记忆力类保健食品非法添加的筛查方法较少,同时检测多种非法添加药物的方法非常鲜见。因此,针对此类保健食品中潜在的、可能添加化学药物建立一种有效的、准确的检测方法,预防辅助改善记忆类保健食品进入市场后导致的不良事件发生,确保其安全性。本研究依据相关文献<sup>[16]</sup>,通过对 17 种促智类化学药品(多奈哌齐、石杉碱甲、依达拉奉、倍他司汀、烟酸占替诺、吡拉西坦、加兰他敏、咖啡因、茴拉西坦、氟马西尼、雌三醇、氟桂利嗪、萘普生、己烯雌酚、尼莫地平、阿米三嗪、双氯芬酸钠)建立高效液相色谱分析方法,应用于改善记忆力类保健食品中非法添加化学药物的筛查。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

辅助改善记忆力类保健食品包括 4 批液体制剂(口服液),6 批软胶囊制剂,2 批硬胶囊制剂共 3 种基质,12 批样品,来源于市场销售样品。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器,美国 Agilent)、C<sub>18</sub>-SPE 柱(60 mg/3 ml,天津博纳艾杰尔科技有限公司)、Thermo Accliaim™ Mixed-Mode WCX-1 柱(150 mm × 2.1 mm, 3 μm; 美国 Thermo)电子分析天平、超纯水器、超声波清洗器、高速离心机。

多奈哌齐(100650-200301)、石杉碱甲(100243-200401)、依达拉奉(100620-201202)、倍他司汀(100265-201203)、烟酸占替诺(100356-201002)、吡

拉西坦(100386-200702)、加兰他敏(100050-200802)、咖啡因(171215-200507)、茴拉西坦(100365-200401)、氟马西尼(100727-200601)、雌三醇(100934-200701)、氟桂利嗪(100844-200501)、萘普生(100198-201004)、己烯雌酚(100033-201308)、尼莫地平(100270-200002)、阿米三嗪(100349-200501)、双氯芬酸钠(100334-200302)标准品均购于中国食品药品检定研究院(纯度均 ≥ 98.5%),甲醇和乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。试验用水为去离子水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准溶液的制备

标准储备液:分别精密称取 17 种标准物质 20 mg,分别置于 5 ml 的容量瓶中,50% 甲醇水溶液(1:1, V:V)溶解并定容,使浓度为 4 mg/ml。

标准混合液:分别精密吸取标准溶液 0.5 ml,置于同一 10 ml 的容量瓶中,加 50% 甲醇水溶液溶解并定容,使浓度为 0.2 mg/ml,混标色谱图见图 1。

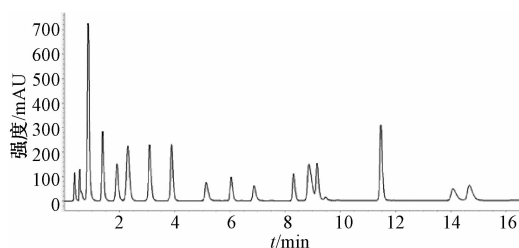


图 1 17 种化学药物混合标准溶液色谱图

Figure 1 17 kinds of chemical drug control chromatogram of mixed standard

标准工作液:取标准混合液适量加 50% 甲醇水溶液,分别配制成浓度为 40、80、100、200、400 μg/ml 标准工作液,绘制标准曲线。

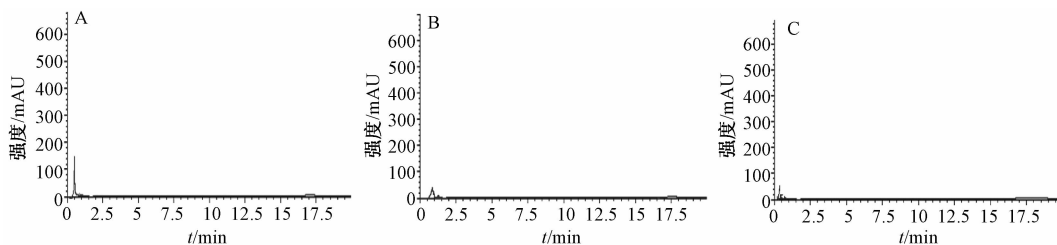
#### 1.2.2 样品前处理

液体制剂:取相当于一次口服剂量(如说明书无一次口服剂量,则取日服剂量)样品,置于 50 ml 容量瓶中,加 20 ml 50% 甲醇水溶液,超声混合 30 min,用 50% 甲醇水溶液定容至刻度,摇匀后过滤,待用。

固体制剂:称取相当于一次口服剂量(如说明书无一次口服剂量,则取日服剂量),置于 100 ml 锥形瓶中,精密加入 50 ml 50% 甲醇水溶液,称量,超声提取 30 min,冷却,用 50% 甲醇水溶液补足重量,过滤,待用。

软胶囊制剂:称取相当于一次口服剂量(如说

说明书无一次口服剂量,则取日服剂量),置于 100 ml 锥形瓶中,精密加入 50 ml 50% 甲醇水溶液,称其重量,超声提取 30 min,冷却,用 50% 甲醇水溶液补足,2~4 °C 冰箱放至 1~2 h,待略有沉淀产生,将溶液转移离心管,4 000 r/min 离心 5 min,上清液过滤,待用。



注:A 为液体制剂;B 为固体制剂;C 为软胶囊制剂

图 2 3 种制剂样品的色谱图

Figure 2 Three kinds of preparations of the chromatogram of the sample

### 1.2.3 液相色谱条件

色谱柱:Thermo Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1 柱(150 mm × 2.1 mm, 3 μm);流动相 A 为水,流动相 B 为 100 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲盐, pH = 6.4, 流动相 C 为乙腈,采用梯度洗脱程序,在 85% A、10% B、5% C 下平衡 3 min,见表 1。流速 0.8 ml/min,柱温 40 °C,进样量 2 μl,检测波长 220 nm 为主要检测波长,254、280 nm 辅助定性。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	85	10	5
12	45	10	45
15	31	14	45
17	0	50	50
17.1	85	10	5
20	85	10	5

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的优化

#### 2.1.1 色谱柱的选择

选用美国 Thermo 的 3 种液相色谱柱进行比较,分别为 synchronis C<sub>18</sub>-AQ(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Hilic-10(2.1 mm × 150 mm, 3 μm) 以及 Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1(2.1 mm × 150 mm, 3 μm),由于 17 种待测物大多为碱性物质,也有少部分酸性物质,C<sub>18</sub>-AQ 色谱柱与 Hilic 柱未能实现 17 种化合物一次性分离,而离子混合型 WCX-1 色谱柱作分离,则能实现一次进样对所有物质进行分离。

#### 2.1.2 流动相的选择

由于待分析的化合物种类较多,极性差别较大,选用离子混合型 WCX 色谱柱的同时,流动相

样品净化:精密量取 3 种滤液 2 ml,以约 1 ml/min 流速通过 C<sub>18</sub>-SPE 柱(使用前分别以 3 ml 甲醇和 3 ml 水活化),用 3 ml 50% 甲醇水溶液洗脱,合并流出液与洗脱液,用 0.22 μm 有机滤膜过滤即得待测样品。3 种样品色谱图见图 2。

pH 的变化会直接影响各物质的出峰时间,本文通过 3 种溶剂的梯度变化洗脱,从而改变分析时的 pH 变化,达到 17 种物质能在 WCX 色谱柱上分离,但缓冲盐的 pH 应为 6.3~6.5,否则吡拉西坦、萘普生和咖啡难以分离。

#### 2.1.3 检测波长的选择

17 种化学药物最大吸收波长在 210~280 nm 范围内,吡拉西坦在此范围无最大吸收波长,故本文采用二极管阵列检测器,选用 220 nm 为主要检测波长,254、280 nm 辅助定性;可同时检测到 17 种化学药物,结果只需将 254、280 nm 波长响应值与 220 nm 响应值做比值对比,可实现辅助定性。

### 2.2 标准储备溶液的稳定性

标准混合液分别在 0、1、8、12、24 h 进针,考察溶液的稳定性。结果表明,标准液在 8 h 内使用有效的是吡拉西坦,12 h 内有效的有加兰他敏、倍他司汀、己烯雌酚、阿米三嗪、多奈哌齐、氟桂利嗪,24 h 以内有效的有萘普生、咖啡因、依达拉奉、双氯芬酸钠、茴拉西坦、氟马西尼、烟酸占替诺、雌三醇、石杉碱甲、尼莫地平。

### 2.3 方法的灵敏度

取标准工作液按 1.2.3 色谱条件进样分析绘制标准曲线,以峰面积  $y$  对标准品的浓度  $x$  (mg/L) 进行回归分析,按照  $S/N = 3$  计算检出限(LOD)、 $S/N = 10$  计算检出限(LOQ),线性范围在 40~400 μg/ml,灵敏度试验结果见表 2。

### 2.4 方法的准确度

在经测定不含有 17 种化学药物的 3 种基质的空白样品中进行加标回收率试验,平行测定 6 次,计算重复测定的相对标准偏差(RSD),得到的平均加标回收率范围为 85%~120%,见表 3。

表 2 灵敏度试验结果

Table 2 Results of sensitivity test

化学药物名称	线性方程	相关系数	检出限 /( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	定量限 /( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
吡拉西坦	$y = 1049.97677x + 2.52761$	0.999 1	40	120
褪黑素	$y = 20000.65163x + 151.73544$	0.998 4	10	40
咖啡因	$y = 7582.52427x + 12.15567$	0.999 9	10	40
依达拉奉	$y = 5151.56337x + 4.28066$	0.999 9	10	40
双氯芬酸钠	$y = 9144.10051x + 19.39842$	0.999 8	10	40
茴拉西坦	$y = 9215.43903x - 84.87136$	0.997 6	10	40
氟马西尼	$y = 7788.34568x - 4.30193$	0.999 9	10	40
烟酸占替诺	$y = 3288.04638x + 3.62498$	0.999 9	40	120
雌三醇	$y = 3244.93486x - 2.44406$	0.999 9	10	40
石杉碱甲	$y = 2529.28479x - 0.179557$	0.999 9	40	120
尼莫地平	$y = 3577.39905x + 3.76603$	0.999 9	10	40
加兰他敏	$y = 8288.72654x - 16.64477$	0.999 9	10	40
倍他司汀	$y = 5619.48427x - 1.37363$	0.999 9	10	40
己烯雌酚	$y = 1385.25614x - 17.37834$	0.995 2	40	120
阿米三嗪	$y = 10622.96584x + 7.10449$	0.999 9	10	40
多奈哌齐	$y = 3391.50621x - 1.87267$	0.999 9	40	120
氟桂利嗪	$y = 4315.58061x - 9.38678$	0.999 3	40	120

表 3 准确度试验结果 ( $n = 6, \%$ )

Table 3 Precision of the method

化学药物名称	液体制剂		固体制剂		软胶囊制剂	
	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率
吡拉西坦	3.9	95 ~ 105	4.1	96 ~ 101	4.8	95 ~ 110
褪黑素	1.0	92 ~ 103	0.9	94 ~ 100	1.2	90 ~ 110
咖啡因	1.1	90 ~ 105	1.3	92 ~ 98	1.3	95 ~ 105
依达拉奉	1.6	96 ~ 101	1.5	97 ~ 108	1.3	95 ~ 105
双氯芬酸钠	1.3	94 ~ 107	1.4	95 ~ 100	1.3	95 ~ 110
茴拉西坦	1.1	95 ~ 110	1.6	92 ~ 107	1.2	90 ~ 110
氟马西尼	1.4	97 ~ 103	1.1	99 ~ 101	1.3	99 ~ 102
烟酸占替诺	1.7	98 ~ 103	1.2	104 ~ 110	1.4	100 ~ 105
雌三醇	1.5	94 ~ 105	0.8	96 ~ 104	1.3	98 ~ 102
石杉碱甲	1.8	100 ~ 102	1.1	95 ~ 99	1.5	99 ~ 102
尼莫地平	1.0	99 ~ 103	1.2	97 ~ 101	1.3	98 ~ 102
加兰他敏	1.9	96 ~ 103	2.0	95 ~ 104	2.3	99 ~ 101
倍他司汀	3.7	96 ~ 104	3.1	96 ~ 101	4.1	99 ~ 102
己烯雌酚	3.3	89 ~ 95	3.4	85 ~ 99	3.6	85 ~ 105
阿米三嗪	1.0	88 ~ 94	1.5	96 ~ 104	1.3	98 ~ 102
多奈哌齐	1.0	90 ~ 101	1.5	91 ~ 101	1.3	95 ~ 102
氟桂利嗪	1.4	100 ~ 105	1.4	98 ~ 105	1.2	100 ~ 120

## 2.5 净化条件的优化

辅助改善记忆类保健食品基质比较复杂,需要进行适当的净化。固相萃取技术是目前应用较多的净化手段。本文比较了  $C_{18}$ -SPE 柱、硅胶 SPE 柱、HLB-SPE 柱作比较。结果表明,3 种基质利用  $C_{18}$ -SPE 柱净化除了能拦截大部分杂质外,还能对 17 种化学药物洗脱完全且有较好的回收率;而硅胶 SPE 柱,虽然完全洗脱 17 种化学药物,但不能对杂质进行除杂;HLB-SPE 柱虽然能拦截杂质,但也对 17 种化学药物拦截,影响对样品的回收率。故本文选择  $C_{18}$ -SPE 柱对样品进行净化。

## 2.6 不同品牌高效液相色谱仪的评价

本试验除了选用安捷伦高效液相仪外,还选用了 Thermo 的 UltiMate<sup>®</sup> 3000 高效液相仪,两台仪器对同一份对照与样品的测试,均无明显差异,故本方法对仪器无特殊要求。

## 2.7 实际样品的测定

在本试验中,共取口服液 4 批、软胶囊 6 批,以及硬胶囊 2 批,17 种促智类化学药物均未检出。

## 3 小结

本文建立了使用同一种色谱条件同时测定辅助改善记忆类保健食品中可能添加的 17 种化学药物含量的高效液相方法,在 20 min 内完成了对各化合物的分析测定,在保证分离度的情况下,实现了快速有效的高通量分析,可为监测辅助改善记忆类保健食品非法添加药物提供技术支撑。

## 参考文献

- [1] 王静文,曹进,王钢力,等.保健食品中非法添加药物检测技术研究进展[J].药物分析杂志,2014,34(1):1-11.
- [2] 徐学君,徐德琴,汪骏.多奈哌齐的药理作用及其临床应用研究进展[J].安徽医药,2009,13(4):352-354.
- [3] 徐红冰,王晓平,刘皋林.石杉碱甲的药理研究和临床应用[J].世界临床药物,2014,35(1):60-63.
- [4] 刘凤琴.依达拉奉药理作用和临床应用的研究进展[J].北方药学,2013,10(7):32-33.
- [5] 汪保孝.倍他司汀联合针刺治疗颈性眩晕 46 例[J].中国中医药科技,2012(5):477-478.
- [6] 丁岩,郑培良.烟酸占替诺治疗心脑血管病的药理学基础[J].中国临床药理学杂志,2006,22(3):232.
- [7] 周红宇,郑国统.吡拉西坦促记忆作用原理的研究进展[J].中国药理学通报,1996,12(2):123-125.
- [8] 王聪,石心红,屠锡德,等.加兰他敏治疗阿尔茨海默症的研究进展[J].药学与临床研究,2008,16(1):45-49.
- [9] 李海霞,陈榕,周丹,等.咖啡因的合成及其药理作用的研究进展[J].华西药学杂志,2011,26(2):182-187.
- [10] 高海燕.石杉碱甲联合茴拉西坦治疗多发性脑梗死痴呆疗效观察[J].航空航天医学杂志,2013,24(5):596-597.
- [11] 杨劲松,赵施竹.氟马西尼在药物中毒所致昏迷患者中的应用[J].中国社区医学,2008,14(1):67-68.
- [12] 何威,清木勘治.雌三醇对胚胎小鼠脑发育的影响[J].神经解剖学杂志,1999,15(2):137-140.
- [13] 鲁文琴,尹航.盐酸氟桂利嗪胶囊的临床研究与药理作用[J].中国现代药物应用,2012,6(19):130-131.
- [14] 潘洁.浅谈褪黑素的临床应用[J].海峡药学,2005,17(2):105-106.
- [15] 赵正梅,陈晓蓉.己烯雌酚对体外培养中神经元的保护作用[J].神经解剖学杂志,2007,23(1):69-72.
- [16] 朱慧果.辅助改善记忆力类保健食品中违禁添加药物检测方法研究[D].湖南:湖南师范大学,2012.