

且黄芪甲苷无紫外吸收,故采用 HPLC-ELSD 法进行检测。结果表明,该方法能较好地测定其含有量。

在测定苦参碱和氧化苦参碱含有量时,曾采用 HPLC-ELSD 法^[10]进行分析,但由于拖尾严重而放弃。在选择流动相时,考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-无水乙醇-3% 磷酸溶液(82:9:9)^[11],但分离效果均不如乙腈-甲醇-0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 7.5)。

参考文献:

[1] 王和平,韩艳艳,王建明. 苦参总碱贴片抗心律失常作用的实验研究[J]. 中医药信息, 2008, 25(5): 80-81.
[2] 周倩,钟强. 丹参酮Ⅱ_A对急性心肌梗死室性心律失常的影响[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
[3] 龚奥娣,孙敬和. 黄芪甲苷对心肌缺血心律失常大鼠模型 Ca²⁺浓度影响初步研究[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(8): 11-12.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
[5] 谈静,方芳,曾倩,等. 妇康洗剂质量标准研究[J]. 中药与临床, 2014, 5(12): 48-52.
[6] 刘华,徐向荣,唐丽. 薄层色谱法鉴别保健品中的苦参碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(19): 1715-1716.
[7] 刘浩文,刘嘉,杨妙荣,等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 659-660.
[8] 王春娥,李桃. 复方黄芪片中黄芪甲苷含量测定方法研究[J]. 国际医药卫生导报, 2005, 11(8): 78-80.
[9] 欧阳春华. 黄芪甲苷含量测定几种常见方法的比较[J]. 中国现代应用物理, 2009, 3(15): 139-140.
[10] 曹娟,孙艳清,齐永秀. HPLC-ELSD法测定复方苦参洗剂中苦参碱的含量[J]. 安徽医药, 2010, 14(2): 161-162.
[11] 杨辉,李静,农家业. HPLC法测定艾滋病口腔含漱液中苦参碱与氧化苦参碱的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(6): 1035-1036.

LC-MS 法检验减肥类产品中非法添加的氟西汀

马春艳, 封淑华*, 冯丽, 段琼, 胡伟杰
(河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立液相色谱-质谱联用(LC-MS)法测定减肥类产品中非法添加的氟西汀。方法 质谱定性分析采用 Shimadzu Shim-pack XR-ODS 色谱柱(100 mm×2.0 mm, 2.2 μm); 流动相为甲醇-0.01 mol/L 乙酸铵(含 0.1% 乙酸), 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min。液相色谱定量分析采用 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-0.8% 三乙胺溶液(磷酸调 pH 至 5.8)(5:35:60); 检测波长 226 nm; 体积流量 1.0 mL/min。结果 在 72 批样品中,有 2 批(均为平衡素)非法添加了氟西汀。结论 该方法快速、准确、灵敏度高,可用于检验非法添加的氟西汀。

关键词: 减肥类产品; 非法添加; 氟西汀; LC-MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)05-1056-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.019

Detection of fluoxetine illegally added into slimming products by LC-MS

MA Chun-yan, FENG Shu-hua*, FENG Li, DUAN Qiong, HU Wei-jie

(Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

收稿日期: 2015-12-29

基金项目: 河北省食品药品监督管理局重点科技项目(ZD2014006)

作者简介: 马春艳(1984—),女,硕士,工程师,从事保健食品和药物分析研究。Tel: (0311) 85212004-8082, E-mail: nancyma054@163.com

*通信作者: 封淑华(1864—),女,主任药师,从事药物分析研究。Tel: (0311) 89892090, E-mail: shuhua08@sina.com

ABSTRACT: AIM To establish a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for the determination of fluoxetine illegally added into slimming products. **METHODS** The qualitative analysis by mass spectrometry was performed on a Shimadzu Shim-pack XR-ODS column (100 mm × 2.0 mm, 2.2 μm) with mobile phase comprising of methanol - 0.01 mol/L ammonium acetate (containing 0.1% acetic acid) in a gradient elution manner, and flow rate of 0.3 mL/min. The quantitative analysis by liquid chromatography was conducted on an Inertsil ODS-SP C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase containing methanol- acetonitril - 0.8% triethylamine (pH value adjusted to 5.8 by phosphoric acid) (5 : 35 : 60) at a flow rate of 1.0 mL/min, and detection wavelength of 226 nm. **RESULTS** In 72 batches of samples, two batches of Pinghengsu Capsules were found illegally added into fluoxetine. **CONCLUSION** This accurate and highly sensitive method can be used for the rapid detection of illegally added fluoxetine.

KEY WORDS: slimming products; illegally added; fluoxetine; LC-MS

近年来,一些不法分子为了牟取经济利益,在中成药和保健食品中非法添加各类化学药物^[1-3],减肥类中成药、保健食品中非法添加的情况尤为严重,对服用者安全造成严重隐患,甚至危及生命^[4-5]。然而,国家减肥类药物非法添加补充方法中只载了8种药物^[6-8],而在实际监测中发现,违法添加的手段和种类^[9-11]不断更新变化,相关检验方法滞后,造成行政监督“无法可依”的现实问题。为此,我院系统、全面地研究中成药、保健食品(包括食品但以保健食品形式宣传、销售)中非法添加减肥类药物的检测方法,广泛收集临床上副作用明显、具有减肥效果的药物^[12-20],建立液质联用(LC-MS)检测方法,形成较全面的减肥药数据库,达到同时快速筛查和监测的目的。按我院初步建立的减肥数据库,已在监督抽检中检测到减肥类中成药及保健食品中添加了精神类药物—食欲抑制剂氟西汀。

氟西汀又名百忧解(fluoxetine,商品名Prozac),是一种口服抗抑郁药,主要是抑制中枢神经对5-羟色胺的再吸收,用于治疗抑郁症^[21]、强迫症及暴食症,但服用者在未知情况下过量服用,会危害身体健康。因此,迫切需要建立一种快速、简便、准确的定性定量方法。

本实验以氟西汀为研究对象,采用质谱(MS)精确定性和液相色谱(LC)准确定量相结合的方法,建立了减肥类中成药及保健食品中非法添加氟西汀的检验方法,可扩大国家食品药品监督管理局补充检验方法的检测范围。

1 仪器与试剂

戴安U3000高效液相色谱仪;AB TripleTOF® 5600⁺液质联用仪;Milli-Q超纯水器;KH-800 KDE超声波清洗器。甲醇为色谱纯(德国Merck

公司);乙酸为色谱纯(美国Fisher公司);乙酸铵为色谱纯(美国Sigma公司);其他试剂均为分析纯;水为超纯水(自制)。盐酸氟西汀(规格50 mg,含有量100.0%)购自中国食品药品检定研究院,批号100513-200401。样品均为市售中成药或保健食品。

2 检测条件

2.1 LC-MS 色谱条件 Shimadzu Shim-pack XR-ODS 色谱柱(100 mm × 2.0 mm, 2.2 μm);流动相为0.01 mol/L 乙酸铵溶液(A)-甲醇(B)(含0.1%乙酸),梯度洗脱(0~1 min, 20% B; 1~6 min, 20%~80% B; 6~8 min, 80% B);柱温30℃;体积流量0.3 mL/min;进样体积5 μL。

2.2 MS 条件 Turbo V™离子源;电喷雾电离(ESI)探针,正离子扫描;信息触发采集模式(IDA);GS1、GS2(379 kPa);CUR Gas(207 kPa);离子源温度550℃;电喷雾电压5 500 V;去簇电压80 V;碰撞能量24 V;TOF-MS一级质谱全扫描范围 m/z 100~1 000;TOF-MS/MS二级质谱全扫描范围 m/z 40~1 000。

2.3 LC 条件 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相甲醇-乙腈-0.8%三乙胺溶液(磷酸调pH至5.8)(5:35:60);柱温30℃;体积流量1.0 mL/min;进样量5 μL;检测波长226 nm。

3 方法与结果

3.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸氟西汀对照品适量,甲醇振摇溶解,制成质量浓度为2.0 mg/mL的对照品贮备液。精密量取1 mL,置于10 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(质量浓度为0.2 mg/mL)。

3.2 供试品溶液的制备 若供试品为液体,精密

量取本品1次服用量;若供试品为固体制剂,取本品研细后,精密称取细粉适量(约相当于1次服用量),置于50 mL量瓶中,加甲醇适量,超声15 min,放冷至室温,甲醇稀释至刻度,摇匀,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。视样品质量浓度情况,对其进行一定程度的稀释。

3.3 空白溶液的制备 称取茶类和胶囊类空白样品,按“3.2”项下方法处理,即得。

3.4 氟西汀的MS分析 氟西汀对照品的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为310,产生的二级碎片主要为 m/z 44、148,质谱图见图1,发现与美国Lilly研究实验室文献[22]中的标准化合物质谱图一致,裂解途径见图2。

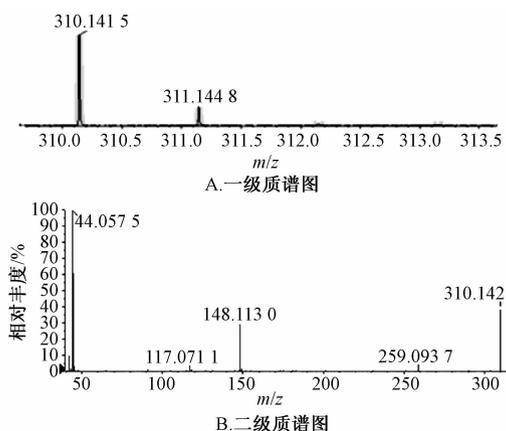


图1 氟西汀质谱图

Fig. 1 MS spectra of fluoxetine

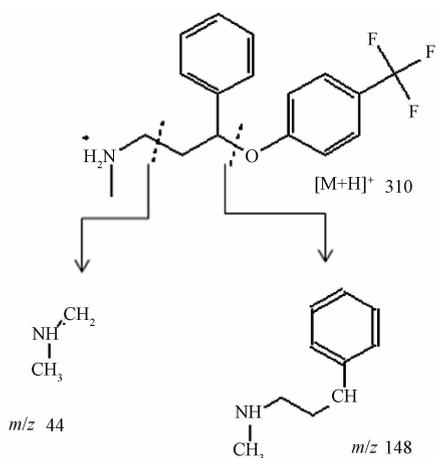


图2 氟西汀裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathway of fluoxetine

3.5 样品色谱分析 供试品与对照品进行比较,发现两者的色谱峰保留时间、紫外吸收光谱图一致,见图3和图4。

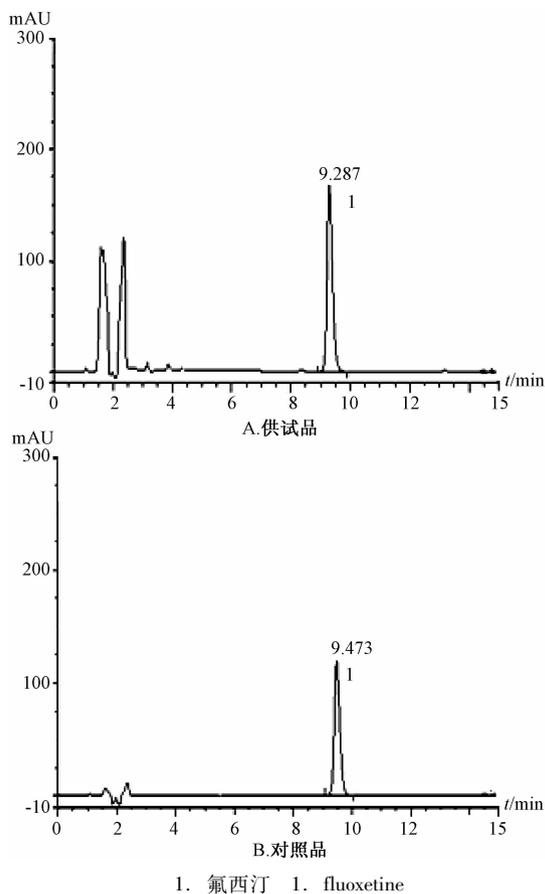


图3 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms

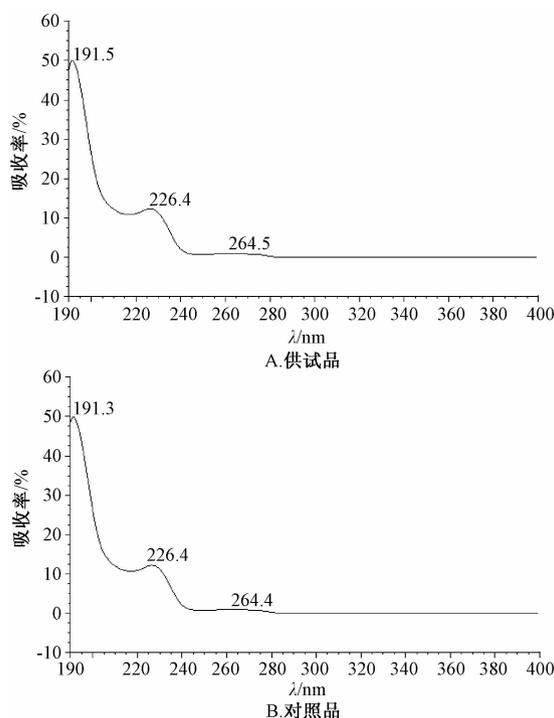
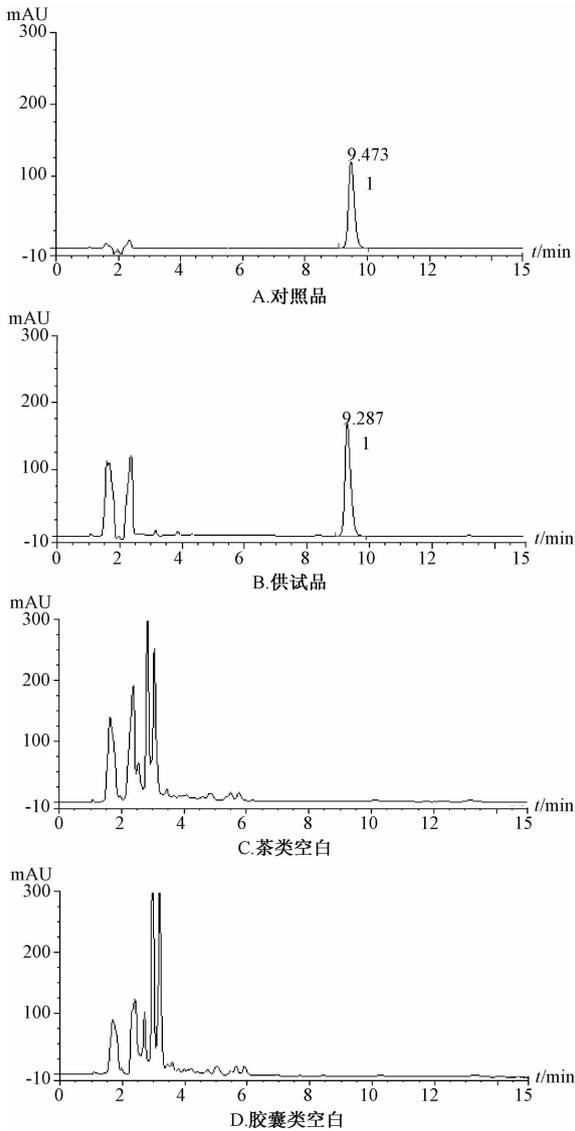


图4 紫外吸收光谱图

Fig. 4 UV absorption spectra

3.6 专属性 分别取对照品、供试品和空白样品溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 发现氟西汀与其他杂质峰分离度良好, 空白样品无干扰。见图 5。



1. 氟西汀 1. fluoxetine

图 5 专属性试验结果

Fig. 5 Results of specificity tests

3.7 线性关系考察 精密量取对照品储备溶液适量, 分别稀释成 0.004、0.02、0.04、0.08、0.2、0.4、0.8 mg/mL 对照品溶液, 注入 HPLC 色谱仪, 以质量浓度 (mg/mL) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归分析, 得回归方程 $Y = 130.41X - 0.0314$ ($r = 0.9999$), 表明氟西汀在 0.004 ~ 0.800 mg/mL 范围内线性关系良好。

3.8 精密度试验 精密吸取盐酸氟西汀对照品溶液 (0.200 mg/mL) 5 μL, 重复进样 6 次, 测得其

峰面积 RSD 为 0.4%, 表明仪器精密度良好。

3.9 检出限及定量限 精密称取空白样品适量, 加入不同体积对照品溶液, 按“3.2”项下方法处理, 在“2.3”项条件下测定。结果, 按信噪比 S/N 为 3, 检出限为 0.27 mg/g; 按信噪比 S/N 为 10, 定量限为 1.33 mg/g。

3.10 稳定性试验 取对照品和样品溶液, 分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 分析, 测得峰面积 RSD 分别为 0.4% 和 0.3%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.11 回收率 分别取减肥茶类和胶囊剂类阴性样品各 9 份, 精密加入 3 个质量浓度的盐酸氟西汀对照品溶液, 在“2.3”项条件下测定。结果, 减肥茶类样品平均回收率为 96.9%, RSD 为 0.9%; 胶囊剂类样品平均回收率为 101.0%, RSD 为 1.9%, 表明该方法准确性良好。

3.12 耐用性试验 取上述对照品、供试品、空白溶液适量, 分别在 3 根色谱柱上进行测定, 型号和规格见表 1。结果, 3 根色谱柱上氟西汀与其他峰分离度均良好, 保留时间适中, 空白样品在氟西汀位置处无干扰。

表 1 色谱柱型号和规格

Tab. 1 Types and sizes of columns

型号	规格
Agilent Zorbax SB-C ₁₈	4.6 mm × 150 mm, 5 μm
Thermo Acclaim 120 C ₁₈	4.6 mm × 250 mm, 5 μm
Inertsil ODS-SP C ₁₈	4.6 mm × 150 mm, 5 μm

4 样品测定

4.1 样品的 MS 定性筛查 在“2.2”项条件下, 采用 TOF-MS 信息相关采集模式, 取对照品溶液 (1 μg/mL) 和样品溶液 5 μL, 注入 LC-MS 联用仪, MS 定性初步筛选出 72 批监督抽检的样品 (其中减肥胶囊剂 41 批, 茶剂 25 批, 片剂 4 批, 丸剂 1 批, 颗粒剂 1 批)。通过比较各样品与对照品的液相色谱保留时间、质谱的全扫描一级图和二级图, 发现有 2 批样品与对照品溶液一致, 故确定其呈阳性, 即非法添加了氟西汀。检出结果见表 2, 质谱图见图 6。

表 2 氟西汀检出结果

Tab. 2 Results of fluoxetine detection

剂型	检验批次/批	检出批次/批	检出率/%
胶囊剂	41	2	4.9
茶剂	25	0	0
片剂	4	0	0
丸剂	1	0	0
颗粒剂	1	0	0

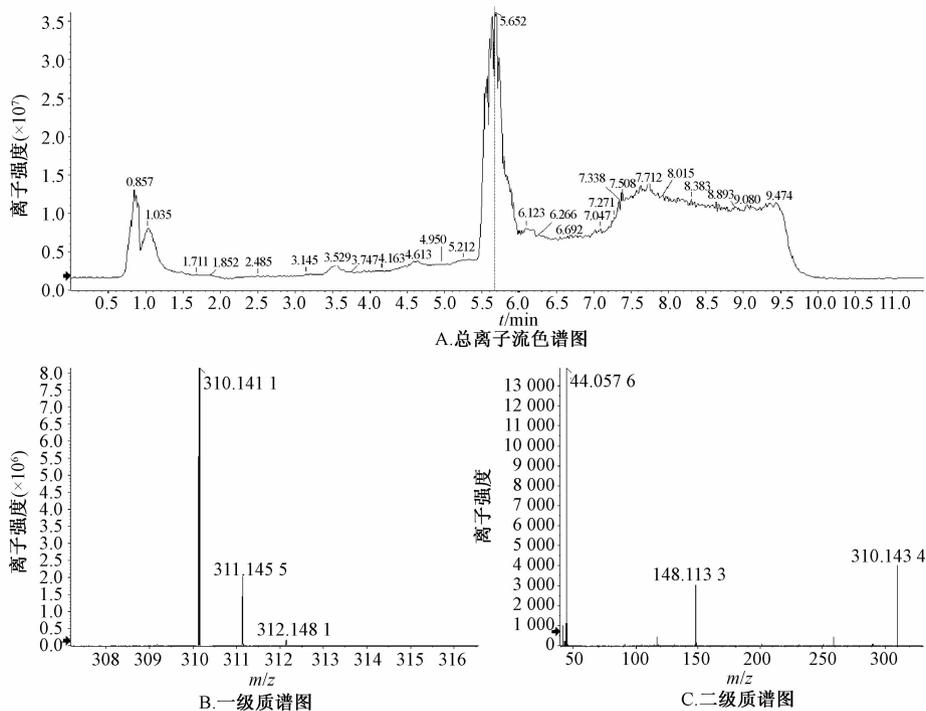


图6 样品质谱图

Fig. 6 MS spectra of samples

4.2 样品的LC测定 对MS定性初筛呈阳性的2批样品进行定量测定,在“2.3”项条件下,采用标准曲线法计算其含有量。结果,2批样品中氟西汀的含有量分别为66.7 mg/g(平衡素,无批号)和63.3 mg/g(平衡素,批号SAZ0606A),相当于每粒含氟西汀20.0 mg和19.0 mg,与西药服用量相当。

5 讨论

当保健食品中违禁添加化学成分时,为达到一定的治疗效果,添加量通常为药用剂量,故在检测过程中发现离子流图中出现明显的色谱峰,并且不在国家补充检验方法收录的非法添加化学物质中时,需要对其进行仔细研究,确定是否为新型添加化学物质。本实验中检出的非法添加化学药品氟西汀为国家食品药品监督管理局“打非”过程中采用本院建立的质谱数据库筛查时所发现,表明在减肥类中成药及保健食品中添加该成分是一种新动向,需引起相关机构的高度重视。

本实验基于LC-MS联用技术所提供的高灵敏度、高选择性、高精确质量的质谱数据,可迅速完成对样品的高精度一级、二级扫描,并得到精确质量数和碎片离子信息,从而对未知非法添加药物进行快速、全面的分析。同时,与对照品和文献

[9]进行比较,发现高分辨质谱在打击非法添加药物的工作中将发挥更为重要的作用。

参考文献:

- [1] 李杨杰, 欧国灯, 李泳雪, 等. HPLC-MS-MS法测定降压类中成药和保健食品中非法添加氨氯地平 and 乐卡地平的研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 956-960.
- [2] 中国华, 董培智, 裴社强, 等. HPLC-MS-MS法测定降糖类中成药中非法添加物格列波脲[J]. 中成药, 2014, 36(6): 1213-1217.
- [3] 黎雪清, 谭 渺, 蒋创杰, 等. HPLC法快速筛查抗风湿类中成药和保健食品中24种非法添加化学成分[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1891-1894.
- [4] 杨景勋. 减肥药的安全性 with 合理使用[J]. 药物不良反应杂志, 2003, 5(2): 91-94.
- [5] 吴丹辰, 程春燕, 荆志成. 食欲抑制剂和药物诱导的肺动脉高压[J]. 医药专论, 2013, 34(5): 266-270.
- [6] 国家食品药品监督管理局. 液质联用(HPLC/MS/MS)分析鉴定西布曲明的添加检验方法[S]. 2006.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局食药监办许[2010]114号(附件2)[S]. 2010.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 减肥类中成药或保健食品中酚酞、西布曲明及两种衍生物的检测方法[S]. 2012.
- [9] 张晓丹, 傅小英, 陈 静, 等. HPLC-DAD数据库快速筛查减肥类中药制剂及保健食品中的10种非法添加化学物质[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(2): 195-201.

- [10] 谢 敏. 高效液相色谱法测定减肥类保健品中非法添加剂[J]. 广州化工, 2015, 43(4): 150-152.
- [11] 黎银波, 孟庆玉, 钟庆元, 等. UPLC-MS/MS 法快速检测减肥类保健食品中 7 种违法添加的药物[J]. 中南药学, 2012, 10(10): 752-756.
- [12] 车宝泉, 黄晓君, 张 喆, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定血液中的 15 种减肥药物[J]. 色谱, 2011, 29(8): 718-722.
- [13] 肖 松, 朱小兰, 陈 波, 等. 减肥保健食品中奥利司他的 HPLC-UV-ESI-MS 的测定[J]. 卫生研究, 2006, 35(3): 355-356.
- [14] 罗金文, 张升萍, 朱海霖, 等. 液相色谱-质谱联用法鉴定中药制剂中掺入的减肥药[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 791-794.
- [15] 赖天兵, 胡小红, 刘晓革. 减肥类保健食品违禁添加药物现状及特点[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(4): 336-337.
- [16] 李 丹, 文红梅, 崔福春, 等. LC-MS/MS 法快速筛选保健食品中非法添加的 11 种减肥化学成分[J]. 中国药事, 2009, 23(4): 335-338.
- [17] 朱 健, 裘一婧, 沈国芳, 等. UPLC-MS/MS 法快速检测减肥类保健食品中 13 种非法添加化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(4): 509-515.
- [18] 王静文, 黄湘鹭, 曹 进, 等. 超高效液相色谱法同时测定减肥类保健食品中非法添加的 25 种药物[J]. 色谱, 2014, 32(2): 151-156.
- [19] 马 微, 马 强, 付 丽, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥保健食品中非法添加的药物利莫那班和奥利司他[J]. 色谱, 2010, 28(1): 43-48.
- [20] 马 微, 彭 涛, 朱明达, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥保健食品中 11 种食欲抑制剂[J]. 分析化学, 2009, 37(11): 1583-1589.
- [21] 刘福文, 李建阳, 卢福元. 莫沙必利联合氟西汀治疗功能性消化不良临床观察[J]. 人民军医, 2010, 53(1): 35.
- [22] Klaus F. Analytical profiles of drug substances [M]. New York: Academic Press, 1990, 19: 193-219.