

高效液相色谱法同时测定保健食品中9种 非法添加降脂类药物

孙亮, 张蓉, 邬国庆, 邸铮, 刘齐, 张华珺*

(北京市药品检验所, 北京 102206)

摘要: **目的** 建立采用高效液相色谱法同时测定调节血脂类保健食品中烟酸、普伐他汀钠、瑞舒伐他汀钙、苯扎贝特、阿托伐他汀钙、氟伐他汀钠、吉非罗齐、洛伐他汀及辛伐他汀9种非法添加药物的方法。**方法** 以甲醇为样品提取溶剂, 采用 Inertsil ODS-3 色谱柱, 以 0.02 mol/L 乙酸铵-甲醇为流动相梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 230 nm, 柱温为 30 °C, 利用保留时间定性、外标法定量, 分析 9 种非法添加药物。**结果** 本方法可以在 20 min 内定性并定量分析烟酸、普伐他汀钠、瑞舒伐他汀钙、苯扎贝特、阿托伐他汀钙、氟伐他汀钠、吉非罗齐、洛伐他汀及辛伐他汀 9 种化学药物。9 种非法添加药物在 1.0~100 µg/mL 之间线性关系良好, 相关系数均大于 0.999; 除阿托伐他汀钙在袋泡茶中回收率较低外, 平均加标回收率范围为 77.9%~102.9%, 相对标准偏差范围为 0.42%~5.8%。**结论** 该方法线性关系良好, 线性范围广, 准确度及精密度高, 可同时鉴定是否非法添加上述 9 种化学药物。

关键词: 高效液相色谱法; 调节血脂类保健食品; 非法添加药物

Simultaneous determination of 9 kinds of lipid lowering drugs illegally added in health food by high performance liquid chromatography

SUN Liang, ZHANG Rong, WU Guo-Qing, DI Zheng, LIU Qi, ZHANG Hua-Jun*

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 9 kinds of drugs (nicotinic acid, pravastatin sodium, rosuvastatin calcium, bezafibrate, atorvastatin calcium, fluvastatin sodium, gemfibrozil, lovastatin and simvastatin) illegally added in health food products for regulating blood lipid by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was extracted by methanol. A Inertsil ODS-3 chromatographic column was used with the mobile phase of 0.02 mol/L ammonium acetate-methanol for gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, and the column temperature was 30 °C. The 9 kinds of drugs were determined by the retention time, and quantified by the external standard method. **Results** The 9 kinds of drugs (nicotinic acid, pravastatin sodium, rosuvastatin calcium, bezafibrate, atorvastatin calcium, fluvastatin sodium, gemfibrozil, lovastatin and simvastatin) could be analyzed qualitatively and quantitatively within 20 min. The drugs were detected at the range between 1.0 µg/mL and 100 µg/mL with good linearities, and the correlation coefficients were all greater than 0.999. Except for atorvastatin calcium in the teabag, the average recoveries were between 77.9%

*通讯作者: 张华珺, 主管药师, 主要研究方向为保健食品及化妆品质量研究。E-mail: felicity81612@163.com

*Corresponding author: ZHANG Hua-Jun, Competent Pharmacist, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China. E-mail: felicity81612@163.com

and 102.9%, and the relative standard deviations (RSDs) were 0.42%~5.8%. **Conclusion** The method has good linear relationships, wide linear ranges, high accuracy and precision, and can be used for the simultaneous determination of above 9 kinds of drugs.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; health food products for regulating blood lipid; illegally added drugs

1 引言

高血脂引起的动脉粥样硬化是造成冠心病、高血压和心脑血管疾病的主要原因^[1]。伴随高血脂发病率的逐年上升,降血脂类中成药和保健食品等产品的市场销量不断上升^[2]。保健食品作为一种特殊食品,在其中非法添加药物的行为不仅违反了《中华人民共和国食品安全法》,而且对消费者的身体健康带来安全隐患^[3]。但由于经济利益的驱动,近年来许多不法分子为凸显保健食品的“治疗”功能,通过添加各种化学药品使其增加相应的效果进而攫取更多的经济效益。化学药品的添加多见于处方药,这些药物的使用剂量在临床上有严格的规定,使用不当会导致严重的不良反应甚至死亡^[4-8]。国家食品药品监督管理局于2010年颁布了烟酸、洛伐他汀和辛伐他汀3种辅助降血脂类保健食品违法添加药物的检测方法^[9],而降血脂类药物的种类远不止这3种。目前针对调节血脂类保健食品中非法添加的降血脂类药物的筛查方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[9]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[9-14]等,但大部分方法都只针对以上3种药物进行检测而同时检测多种非法添加药物的方法报道较少。为了全面监管保健食品中非法添加化学药品的行为,有必要开发高效、便捷且灵敏的多组分同时检测方法。本研究采用高效液相色谱法同时定性定量测定9种非法添加药物。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

安捷伦1100高效液相色谱仪(配备G1311A四元泵、G1322A在线脱气机、G1315B二极管阵列检测器、G1329A自动进样器及G1316A柱温箱,美国安捷伦公司);SB-25-12D型数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技有限公司)。

烟酸(批号100434-201102,纯度99.9%)、瑞舒伐他汀钙(批号101028-201202,纯度97.6%)、苯扎贝特(批号100732-200501,纯度100%)、阿托伐他汀钙(批号100590-201303,纯度95.3%)、氟伐他汀钠(批号100800-201302,纯度95.5%)、吉非罗齐(批号100284-200602,纯度99.5%)、洛伐他汀(批号

100600-201003,纯度99.4%)、辛伐他汀(批号100601-201003,纯度99.0%)均由中国食品药品检定研究院提供;普伐他汀钠(批号8-XJZ-27-1,纯度98.0%)由Toronto Research Chemical Inc提供。甲醇(色谱纯,默克股份有限公司);乙酸铵(批号L290P82,纯度98%,北京百灵威科技有限公司);水为超纯水。

样品为市售保健食品(调节血脂类软胶囊及调节血脂类袋泡茶)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.02 mol/L 乙酸铵(A)-甲醇(B); 梯度洗脱程序: 0~5 min, 60%A~20%A; 5~10 min, 20%A; 10~20 min, 20%A~10%A; 20~21 min, 10%A~60%A; 21~30 min, 60%A; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

2.2.2 标准溶液的制备

准确称取各种标准品10.0 mg, 分别置于10 mL容量瓶中, 用甲醇溶解并定容配制成1.0 mg/mL的标准储备溶液。各取单标储备液适量, 用甲醇稀释并配制所需浓度的混合对照品溶液(浓度分别为1.0、5.0、10.0、20.0、50.0和100.0 μg/mL)。

2.2.3 供试品溶液的制备

精密称取1次日常服用量的调节血脂类保健食品样品, 置于50 mL容量瓶中, 加甲醇40 mL, 超声提取15 min, 冷却至室温后, 用甲醇稀释定容, 摇匀, 上清液经0.45 μm微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液。

3 结果与分析

3.1 分析条件的优化

由于所分析的化学药物结构及理化性质差异较大, 梯度洗脱更有利于分离。曾尝试水-甲醇溶液、0.1%甲酸-甲醇溶液及0.02 mol/L 乙酸铵(含0.1%乙酸)-甲醇溶液作为流动相, 系统在进行梯度洗脱时很难得到较好峰型及分离度; 本研究确定的0.02 mol/L 乙酸铵-甲醇溶液流动相系统简单易配, 并且在梯度洗脱时峰形对称, 分离度好, 保留时间适当且检出灵敏度高。

在200~400 nm波长范围内, 通过二极管阵列检测器对混合对照品进行扫描, 提取9种成分在不同波长处的三维光谱图, 并将它们进行对比。结果表明, 230 nm波长能

使所有组分有较灵敏且近似的响应值,且干扰较小,故选择 230 nm 作为测定波长。在样品的定性分析中,将紫外全扫描谱图作为保留时间以外的另一重要定性依据,提高了目标物的定性准确性。

3.2 系统适用性实验

取混合对照品溶液进样分析,色谱图见图 1。烟酸、普伐他汀钠、瑞舒伐他汀钙、苯扎贝特、阿托伐他汀钙、氟伐他汀钠、吉非罗齐、洛伐他汀和辛伐他汀的保留时间分别为 3.07、8.66、9.05、9.66、11.47、13.97、15.42、17.43 和 18.58 min,与相邻色谱峰的分度度均大于 1.5,理论塔板数均大于 5000,表明本实验方法的分析条件符合色谱分析要求。

3.3 线性关系、定量限与检出限

分别取配制好的混合对照品溶液,按“2.2.1”中所述的实验条件进样分析。以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,得各化学药物的线性回归方程和相关系数,按照信噪比(signal-noise ratio, S/N)等于 10 计算定量限(limit of quantification, LOQ),按照 $S/N=3$ 计算检出限(limit of detection, LOD)。结果表明,9 种非法添加药物浓度在 1.0~100 $\mu\text{g/mL}$ 之间的线性关系良好,计算得到的线性回归方程相关系数均大于 0.999,方法灵敏度较高。9 种化学药物的回归方程、相关系数、线性范围、仪器定量限及检出限见表 1。

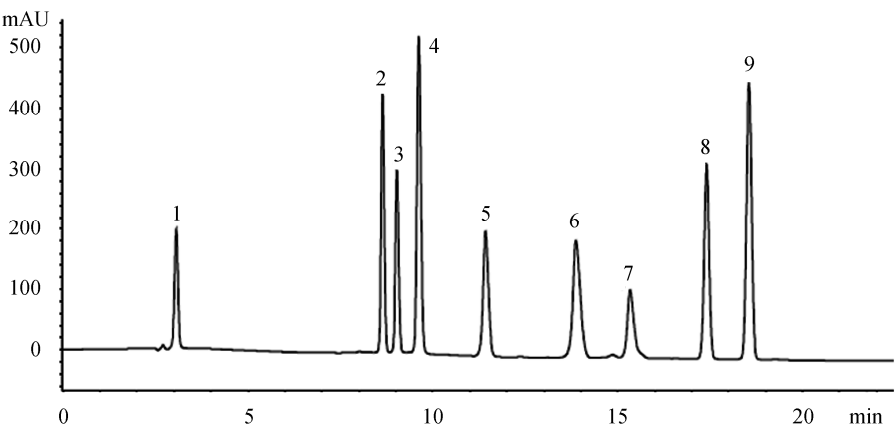


图 1 混合对照品的高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of mixed reference

1.烟酸(nicotinic acid), 2.普伐他汀钠(pravastatin sodium), 3.瑞舒伐他汀钙(rosuvastatin calcium), 4.苯扎贝特(bezafibrate), 5.阿托伐他汀钙(atorvastatin calcium), 6.氟伐他汀钠(fluvastatin sodiu), 7.吉非罗齐(gemfibrazil), 8.洛伐他汀(lovastatin), 9.辛伐他汀(simvastatin)

表 1 9 种化学药物的回归方程、相关系数、线性范围、定量限及检出限
Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LOQs and LODs of the 9 kinds of drugs

成分	回归方程	相关系数(r^2)	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	LOQ($\mu\text{g/mL}$)	LOD($\mu\text{g/mL}$)
烟酸(nicotinic acid)	$Y=12.445X+3.4857$	0.9998	1.0~100	0.45	0.130
普伐他汀钠(pravastatin sodium)	$Y=25.2243X+6.2387$	0.9998	1.0~100	0.22	0.065
瑞舒伐他汀钙(rosuvastatin calcium)	$Y=18.179X+3.6867$	0.9999	1.0~100	0.30	0.090
苯扎贝特(bezafibrate)	$Y=38.645X+34.971$	0.9998	1.0~100	0.15	0.046
阿托伐他汀钙(atorvastatin calcium)	$Y=21.897X-3.3620$	0.9999	1.0~100	0.50	0.150
氟伐他汀钠(fluvastatin sodiu)	$Y=27.834X-7.1343$	0.9999	1.0~100	0.51	0.150
吉非罗齐(gemfibrazil)	$Y=14.509X+21.132$	0.9996	1.0~100	0.56	0.170
洛伐他汀(lovastatin)	$Y=30.878X+0.093442$	0.9999	1.0~100	0.30	0.089
辛伐他汀(simvastatin)	$Y=46.068X+7.9714$	0.9998	1.0~100	0.21	0.062

3.4 准确度和精密度实验

在经测定不含有 9 种化学药物的空白样品: A 品牌(批号: ABJ501085A)软胶囊及 B 品牌(批号: Z3A006)袋泡茶中进行添加回收和精密度实验。在空白样品中添加高、中、低 3 个水平的标准对照品溶液(添加量分别为 1.6、0.4 及 0.08 mg/g), 按本方法进行实验, 平行测定 6 次, 以评价该方法的准确度及精密度。测定结果见表 2。结果表明, 除阿托伐他汀钙在袋泡茶中回收率较低外, 所得到的平均加标回收率范围为 77.9%~102.9%, 相对

标准偏差(relative standard deviation, RSD)范围为 0.42%~5.8%, 说明本研究建立的方法能满足实际样品分析要求。

针对阿托伐他汀钙在袋泡茶中的回收率较低的问题, 经查阅文献^[15], 发现阿托伐他汀钙对温度、湿度、酸和氧化等因素较为敏感, 其包装时需密封, 防止氧化性物质、酸碱性和水分等接触样品, 因此推断其在袋泡茶中的回收率低可能是稳定性差所造成的, 阿托伐他汀钙在不同基质中的回收率情况有待进一步研究。

表 2 空白样品中 9 种化学药物的添加回收率及精密度(n=6)
Table 2 Recoveries and precisions of 9 kinds of drugs spiked in a blank matrix (n=6)

成分	添加量(mg/g)	软胶囊		袋泡茶	
		回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
烟酸 (nicotinic acid)	1.60	98.4	1.20	101.5	1.70
	0.40	100.9	0.93	93.0	3.10
	0.08	84.6	3.20	94.8	3.50
普伐他汀钠(pravastatin sodium)	1.60	98.4	1.80	96.8	0.67
	0.40	98.6	0.79	95.8	1.10
	0.08	89.8	0.42	87.7	1.20
瑞舒伐他汀钙(rosuvastatin calcium)	1.60	101.7	1.80	99.9	0.72
	0.40	102.2	0.77	99.9	0.93
	0.08	96.8	0.96	92.9	1.30
苯扎贝特(bezafibrate)	1.60	97.2	1.80	95.3	0.55
	0.40	95.9	1.10	94.3	0.49
	0.08	77.9	4.20	80.9	1.90
阿托伐他汀钙(atorvastatin calcium)	1.60	97.9	1.80	40.6	9.30
	0.40	94.4	0.77	33.7	2.60
	0.08	89.5	0.97	32.1	7.70
氟伐他汀钠(fluvastatin sodiu)	1.60	95.6	1.90	101.6	0.97
	0.40	95.4	0.74	102.9	0.58
	0.08	86.6	1.30	96.2	0.93
吉非罗齐(gemfibrazil)	1.60	99.7	1.40	94.1	3.60
	0.40	101.2	1.10	98.4	5.80
	0.08	96.7	2.20	94.1	4.20
洛伐他汀(lovastatin)	1.60	95.5	1.80	96.2	0.92
	0.40	95.7	0.81	98.3	0.66
	0.08	93.3	0.53	95.8	1.10
辛伐他汀(simvastatin)	1.60	93.3	1.90	96.5	0.87
	0.40	93.5	2.40	96.1	1.10
	0.08	83.9	1.10	88.5	4.30

3.5 样品的检测结果

应用本方法对市售 10 种调节血脂类保健食品进行分析测定, 通过对比样品与标准品的保留时间及色谱峰的紫外吸收全扫描光谱图进行准确定性, 通过标准曲线法定量, 所测定的保健食品中均未检出以上 9 种药物。

4 结 论

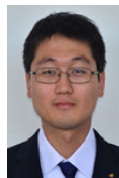
本研究建立了用高效液相色谱法同时测定调节血脂类保健食品中 9 种非法添加药物的方法, 该方法线性关系良好、线性范围广、准确度及精密度高, 可用于保健食品的日常检验工作, 阿托伐他汀钙在不同基质中的回收率情况有待进一步研究。

参考文献

- [1] 韩建军, 宁娜. 降血脂药物的研究进展[J]. 药学研究, 2015, 34(1): 29–32.
Han JJ, Ning N. Research progress on hypolipidemic drugs [J]. J Pharm Res, 2015, 34(1): 29–32.
- [2] 白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
Bai H. Method for the detection of efficacy components of health food [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2011.
- [3] 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.
Wang JW, Huang XL, Cao J, et al. Simultaneous determination of 25 illegally added drugs in diet health foods by ultra-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(2): 151–156.
- [4] 宁霄, 张伟清, 王钢力, 等. 保健食品中非法添加药物的检测现状及筛查策略研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1876–1882.
Ning X, Zhang WQ, Wang GL, et al. Detection status and screening strategy of illegally added drugs in healthy food [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1876–1882.
- [5] 王静文, 曹进, 王刚力, 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.
Wang JW, Cao J, Wang GL, et al. Research progress on determination technologies for illegally added drugs in health food [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(1): 1–11.
- [6] 张小龙, 王昆, 吴先富, 等. 中药及保健食品中非法添加状况分析[J]. 中国药师, 2014, 17(10): 1749–1753.
Zhang XL, Wang K, Wu XF, et al. Analysis on chemical substances illegally added in TCM and health products [J]. China Pharm, 2014, 17(10): 1749–1753.
- [7] 郭志鑫, 董培智, 申国华, 等. 保健食品非法添加化学药品的特点及监管建议[J]. 中国药事, 2013, 27(11): 1132–1134.
Guo ZX, Dong PZ, Shen GH, et al. Characteristics of illegal addition of chemicals to health food and recommendations for supervision [J]. Chin Pharm Aff, 2013, 27(11): 1132–1134.
- [8] 孙晶, 张中湖, 王维剑. 降脂减肥等七类中成药非法添加西药情况研究[J]. 药学研究, 2013, 32(3): 174–176.
Sun J, Zhang ZH, Wang WJ. Study on illegal addition of western medicine to 7 kinds of Chinese formulated products [J]. J Pharm Res, 2013, 32(3): 174–176.
- [9] 国家食品药品监督管理局 114 号文件[S].
NO.114 document of China food and drug administration [S].
- [10] 鲁涓. 液质联用技术在检测中成药及保健食品非法添加中的应用[J]. 海峡药学, 2015, 27(8): 80–82.
Lu J. Application of LC-MS in detection of illegal adding in Chinese patent medicine and health food [J]. Strait Pharm J, 2015, 27(8): 80–82.
- [11] 张喆, 高青, 车宝泉, 等. 中药和保健食品中非法添加降脂类药物的检测方法研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 25(12): 2069–2072.
Zhang Z, Gao Q, Che BQ, et al. Study on the detection method of lipid-lowering drugs illegally added in traditional Chinese medicine and health food [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 25(12): 2069–2072.
- [12] 姜树银, 郭常川, 石峰, 等. Q-Orbitrap 高分辨质谱用于降血脂类中成药和保健食品中非法添加物的快速筛查、鉴定和定量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1447–1452.
Jiang SY, Guo CC, Shi F, et al. Application of Q-Orbitrap high resolution mass spectrometry to the detection of illegal adulterated antihyperlipidemics in herbal medicines and dietary supplements [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(8): 1447–1452.
- [13] 郝刚, 顾炳仁. UPLC-MS/MS 检测降血脂类保健食品中违法添加物[J]. 中国执业药师, 2014, 11(7): 20–23, 56.
Hao G, Gu BR. Rapid identification of illegal additives in lipid lowering health foods by UPLC-MS/MS [J]. China Licensed Pharm, 2014, 11(7): 20–23, 56.
- [14] 胡青, 崔益冷, 张甦, 等. 降血脂和降血糖类中药及保健食品中违禁添加 17 种化学药物的液相色谱-离子阱质谱定性检测[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(2): 124–127.
Hu Q, Cui YL, Zhang S, et al. Detection 17 chemical drugs illegally added in traditional Chinese medicine for reducing blood fat and lowering blood sugar and health food by LC-MSⁿ trap[J]. Chin J Pharm, 2009, 40(2): 124–127.
- [15] 沈加永. 阿托伐他汀钙片剂制剂及质量控制[D]. 开封: 河南大学, 2013.
Shen JY. Atorvastatin calcium preparation and quality standards [D]. Kaifeng: Henan University, 2013.

(责任编辑: 刘丹)

作者简介



孙亮, 博士, 主管药师, 主要研究方向为保健食品质量检验。
E-mail: chemliang@126.com

张华琚, 主管药师, 主要研究方向为保健食品及化妆品质量研究。
E-mail: felicity81612@163.com