

亚 3 μm 填料核壳色谱柱结合 HPLC-DAD 法快速测定 降压类中成药及保健食品中添加的 34 种化学药物

倪赞, 张崇生*, 谢循策

(温州市食品药品检验检测院, 温州 325008)

摘要 目的: 采用亚 3 μm 填料核壳色谱柱建立快速检测降压类中成药及保健食品中非法添加的 34 种化学药物的 HPLC-DAD 方法。方法: 样品以甲醇为溶剂超声提取, 采用 Shiseido Capcell Core C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm) 分离, 以甲醇-0.02 mol $\cdot$ L⁻¹ 乙酸铵 (用甲酸调节 pH=3.0 $\pm$ 0.1) 为流动相梯度洗脱, 流速 0.7 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 215、230 nm, 二极管阵列扫描光谱进一步确证。结果: 34 种化学降压药在相应浓度范围内呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.998, 检测下限为 0.1~10.5 ng $\cdot$ mL⁻¹, 3 个浓度水平回收率 ($n=6$) 在 82.7%~118.9% 之间, RSD 为 0.50%~4.1%。收集的 94 批样品中有 16 批呈非法添加阳性, 其中卡维地洛为首次报道检出, 5 批阳性样品存在不同降压机制化学药的组合添加。结论: 本方法可用于降压类中成药及保健食品中非法添加化学药的高通量筛查和定量检测。

关键词: 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器; 降压类中成药及保健食品; 非法添加; 亚 3 μm 填料; 核壳色谱柱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 05-0895-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.05.18

Rapid determination of 34 chemicals drugs in anti-hypertensive Chinese patent medicines and healthy foods by HPLC-DAD coupled with sub-3 μm particle fused-core column

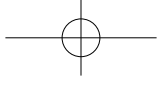
NI Zan, ZHANG Chong-sheng*, XIE Xun-ce

(Wenzhou Institute for Food and Drug Control, Wenzhou 325008, China)

Abstract **Objective:** To develop a method for rapid determination of 34 chemical drugs which were illegally added into anti-hypertensive Chinese patent medicines and health foods by HPLC-DAD coupled with sub-3 μm particle fused-core column. **Methods:** After ultrasonic extraction by methanol, the sample was separated on a Shiseido Capcell Core C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm) column with gradient elution. The mobile phase consisted of methanol and 0.02 mol $\cdot$ L⁻¹ ammonium acetate solution (using formic acid to adjust pH=3.0 $\pm$ 0.1) at a flow rate

* 通信作者 Tel: (0577) 88536561; E-mail: 1018763742@qq.com

第一作者 Tel: (0577) 88509531; E-mail: ni_zan@163.com



of $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The column temperature was set at 40°C and the wavelengths were set at 215 nm and 230 nm. The peaks were simultaneously confirmed by the spectrum range from diode array detection (DAD). **Results:** A good resolution of 34 chemical drugs was obtained. The correlation coefficients for 34 chemical drugs were above 0.998 in linearity range. And the limits of detection ranged from $0.1\text{--}10.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The recoveries were 82.7%–118.9%, with the relative standard deviations of 0.5%–4.1% at three spiked levels. Illegally adulteration of chemical drugs was found in 16 from 94 tested samples. Carvedilol was detected for the first time. Chemical drugs with different anti-hypotensive mechanisms were synergistically adulterated in 5 batches of positive samples. **Conclusion:** The method is suitable for confirmation of 34 illegally added chemical drugs in anti-hypertensive Chinese patent medicines and healthy foods.

Keywords: HPLC; diode array detector; anti-hypertensive Chinese patent medicines and health foods; illegally added; sub- $3 \mu\text{m}$ particle; fused-core column

高血压是一种以动脉血压增高为临床表征的高发性心血管疾病,是引起慢性肾病、冠心病和脑中风等疾病的最危险因素。常见的化学降压药按作用机制可分为^[1]:①利尿剂,如呋达帕胺等;② β 受体阻滞剂,如洛尔类;③ α 受体阻滞剂,如唑嗪类;④血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB),如沙坦类;⑤血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI),如普利类;⑥钙拮抗药 (CCB),如地平类。这些化学降压药见效快,但长期服用会产生肝肾损害等副作用,因此,患者往往青睐于毒副作用小的中成药和保健食品,不法分子利用这种心理,在其中非法添加化学药,宣称降压快速而牟取暴利,却造成患者重复过量使用化学降压药,使血压发生骤降或剧烈波动,易导致肾损伤和诱发中风等^[2]。

目前,中成药及保健食品中添加问题比较突出^[3],而针对降压类中成药及保健食品中非法添加药物检测的国家标准《药品检验补充方法和检验项目批准件》仅涉及硝苯地平等 13 种成分(批件号 2009032 和 2014008),且分离方法零散,效率低下。文献报道方法主要有 TLC 法^[4]、HPLC 法^[5-6]、GC-MS 法^[7]、LC-MS/MS 法^[8-9],其中 LC-MS/MS 是多数文献报道的高通量分析方法,但由于仪器昂贵、维护成本高,方法普及受限^[10]。近年来,随着色谱技术的发展,Kirkland 等^[11-12]将 $0.5 \mu\text{m}$ 厚的多孔硅壳熔融到 $1.7 \mu\text{m}$ 实心硅核上,制备出核壳型 (fused-core) 亚 $3 \mu\text{m}$ 填料颗粒,具有极小的传质阻抗和轴向扩散,允许使用更短的色谱柱和较高的流速,以达到快速、高分辨率的分离^[13],产生的反压仅仅为 UPLC 亚 $2 \mu\text{m}$ 填料色谱柱的一半,使得在常规低压液相色

谱仪上就能够实现 UPLC 快速分离^[14]。本实验选择上述六大类 34 种常用化学降压药为目标物,采用亚 $3 \mu\text{m}$ 填料核壳色谱柱,建立高通量的二极管阵列高效液相色谱快速分析方法,大大缩短检测时间,为新形势下药品和保健食品的质量监管提供了强有力的技术保障。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪 (SPD-M20A 二极管阵列检测器和 LCSolution 工作站);密理博 Milli-Q Integral 5 超纯水器;赛多利斯 PB-21 酸度计;梅特勒 XS205DU 十万分之一分析天平;宁波新芝 SB-5200D 超声波清洗器。

对照品卡托普利(批号 100318-201103)、酒石酸美托洛尔(批号 100084-201403)、盐酸地巴唑(批号 100420-201002)、盐酸艾司洛尔(批号 100749-200501)、盐酸塞利洛尔(批号 100807-200501)、盐酸阿呋唑嗪(批号 100728-200501)、富马酸比索洛尔(批号 100711-201602)、盐酸哌唑嗪(批号 100164-201204)、盐酸普萘洛尔(批号 100783-201202)、盐酸特拉唑嗪(批号 100375-201103)、呋达帕胺(批号 100257-201605)、咪达普利(批号 100748-200401)、盐酸贝凡洛尔(批号 101033-200901)、盐酸地尔硫草(批号 100161-201404)、盐酸维拉帕米(批号 100223-200102)、盐酸尼卡地平(批号 100586-201102)、雷米普利(批号 101378-201501)、利血平(批号 100041-201213)、盐酸贝尼地平(批号 101049-201001)、苯磺酸氨氯地平(批号 100374-201605)、硝苯地平(批号 100338-201404)、奥美沙坦酯(批号 100864-201503)、氯沙坦钾(批号 100597-201102)、厄贝

沙坦(批号 100607-201603)、盐酸贝那普利(批号 100768-201403)、螺内酯(批号 100193-201203)、盐酸喹那普利(批号 100568-201302)、缬沙坦(批号 100651-201604)、尼莫地平(批号 100270-201403)、非洛地平(批号 100717-201403)、西尼地平(批号 100993-200701)、拉西地平(批号 100741-200802)和坎地沙坦酯(批号 100685-201602)均购自中国食品药品检定研究院,卡维地洛(批号 LRAA9063)购自 Sigma-Alorich 公司。94 批样品主要来源为 2015 年~2017 年国家保健食品安全风险监测抽样和市县食药监局联合公安部门打四非专项行动抽样,部分通过互联网以及微商购买。甲醇(Merck 公司)、甲酸(Tedia 公司)为色谱纯,其

余试剂均为国产分析纯,水由密理博公司超纯水器制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shiseido Capcell Core C₁₈(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm);流动相:A 为 0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调节 pH=3.0±0.1),B 为甲醇,梯度洗脱(0~9 min, 70%A; 9~20 min, 70%A→52%A; 20~25 min, 52%A; 25~32 min, 52%A→22%A; 32~45 min, 22%A→10%A),流速:0.7 mL·min⁻¹;检测波长:215 nm 和 230 nm;柱温:40℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,34 种化学降压药分离良好,典型色谱图见图 1。

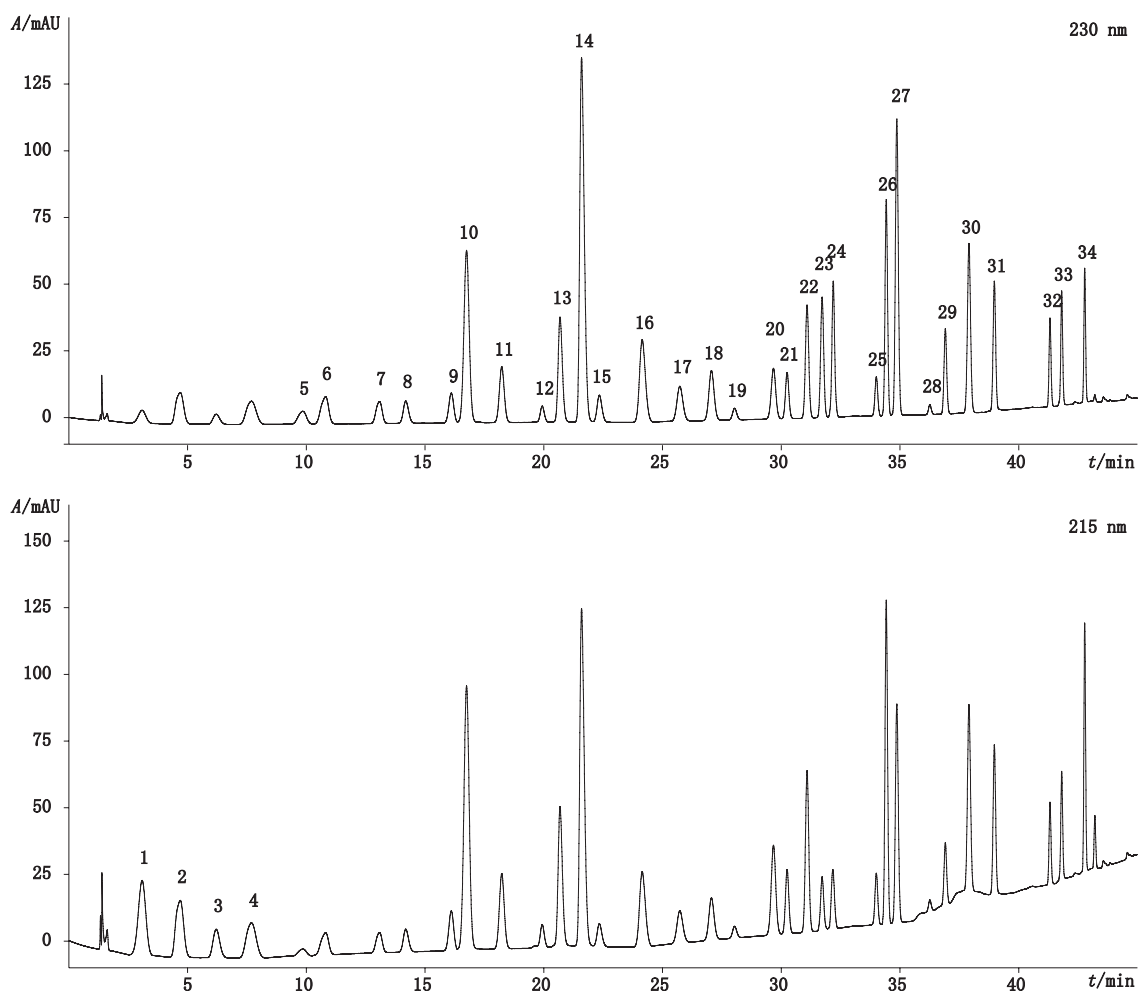


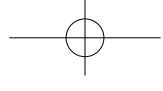
图 1 34 种化学降压药混合对照品 HPLC 色谱图(峰号同表 1)

Fig. 1 HPLC chromatograms of 34 mixed reference substances of chemical hypotensors (peak numbers are the same as those in Tab.1)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 精密称取对照品硝苯地平、奥

美沙坦酯、盐酸塞利洛尔、盐酸普萘洛尔、咪达普利、盐酸贝凡洛尔、盐酸维拉帕米、雷米普利、盐酸贝尼地



平、氯沙坦钾、螺内酯各约 50 mg, 分别置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得质量浓度约为 $2\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品溶液; 称取对照品盐酸阿伐唑嗪、盐酸特拉唑嗪、吲达帕胺、盐酸地尔硫草、盐酸尼卡地平、利血平、坎地沙坦酯各约 25 mg, 分别置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得质量浓度约为 $1\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品溶液; 称取对照品盐酸哌唑嗪、卡维地洛、苯磺酸氨氯地平、厄贝沙坦、缬沙坦、拉西地平、尼莫地平、非洛地平、西尼地平各约 25 mg, 分别置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得质量浓度约为 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单一对照品溶液。取上述单一成分对照品溶液各 2 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得混合对照品储备液(1); 称取卡托普利、酒石酸美托洛尔、盐酸艾司洛尔、盐酸贝那普利、盐酸唑那普利的对照品各约 20 mg, 富马酸比索洛尔对照品约 10 mg 和盐酸地巴唑对照品约 5 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用混合对照品储备液(1)溶解并定容至刻度, 即得混合对照品储备液(2)。各单一成分对照品溶液和混合对照品储备液均 2~4 °C 避光冷藏备用。

2.2.2 供试品溶液 取样品(颗粒剂或片剂需研细, 混匀; 硬胶囊需取内容物混匀, 囊壳剪碎备用; 软胶囊需挤出内容物混匀, 囊壳剪碎备用), 准确称取或者量取一定量(口服液精密量取 10 mL; 硬胶囊和软胶囊称取 1 次服用剂量的内容物, 加 1 次服用剂量的囊壳; 其他制剂称取 1 次服用剂量), 置 50 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇适量超声提取(功率 200 W, 频率 40 kHz) 20 min, 冷却至室温, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 取续滤液待测。如果检测后判定为非法添加的阳性样品, 其浓度超出线性范围, 则在此基础上继续稀释。

2.3 标准曲线和线性范围

精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备液(2)适量, 用甲醇依次定量稀释 50、25、10、5、2.5 和 1 倍, 制成系列浓度的混合对照品溶液 $S_1\sim S_6$ (按浓度由低到高顺序编号), 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以峰面积值 Y 对质量浓度 $X(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ 进行线性回归, 各化合物的线性范围、回归方程和相关系数见表 1。结果表明 34 种化学药在各自质量浓度范围内与峰面积均呈良好线性关系, r 均大于 0.998。

2.4 检测下限和定量下限试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备液(2)适

量, 用甲醇定量稀释, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以 3 倍信噪比计算检测下限(LOD), 以 10 倍信噪比计算定量下限(LOQ), 结果见表 1。

2.5 进样精密度试验

取“2.3”项下 S_4 混合对照品溶液 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 连续测定 6 次, 计算上述 34 种化学降压药的峰面积 RSD, 结果在 0.2%~2.5% (表 1), 表明方法的进样精密度良好。

2.6 加样回收率与重复性试验

选择阳性检出率较高的胶囊制剂作为回收率试验基质, 精密称取胶囊内容物 0.2 g, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入 S_4 混合对照品溶液 1 mL, 作为低浓度回收率组; 精密加入 S_6 混合对照品溶液 1 mL, 作为中浓度回收率组; 精密加入 S_6 混合对照品溶液 5 mL, 作为高浓度回收率组。每个浓度水平配制 6 份, 按“2.2.2”项下方法进行样品处理后进样测定, 加样回收率和重复性 RSD ($n=6$) 结果见表 2。从表 2 可见, 34 种化学降压药低中高浓度的平均回收率均在 82.7%~118.9%, 结果较为满意, 低中高浓度峰面积 RSD 控制在 0.5%~4.1%, 表明方法重复性较好。

2.7 稳定性试验

取“2.3”项下 S_4 混合对照品溶液 10 μL , 分别在配制后避光冷藏放置 0、4、8、12、16、20、24 h, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算, 34 种化学降压药峰面积的 RSD 在 0.40%~3.3% ($n=6$) 之间, 表明 34 种化学降压药溶液至少在 24 h 内稳定。

2.8 样品测定

94 批降压类中成药及保健食品照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 通过比较样品与对照品的保留时间以及扫描光谱, 判定样品中是否含有非法添加的药物。结果有 16 批样品检出卡托普利等 11 种成分, 阳性率为 17.0%, 检出含量见表 3。其中卡维地洛为首次报道检出; 吲达帕胺、硝苯地平、氨氯地平、卡托普利和利血平是非法添加最多的 5 种化学药, 且存在混合添加情况。16 批阳性样品中, 有 5 批存在不同降压机制化学药的联合添加, 如以钙拮抗药 + 血管紧张素转换酶抑制剂和利尿剂 + β 受体阻滞剂等形式, 尚未发现同一作用机制化学降压药的混合添加。通过混合添加追求快速降压效果的非法添加行为, 给患者带来极其严重的安全风险。

表 1 34 种化学降压药的线性方程、线性范围、相关系数、检测下限、定量下限和精密度

Tab. 1 The linear equations, linear ranges, correlation coefficients, LOD, LOQ and precisions for 34 kinds of chemical hypotensors

序号 (No.)	化学降压药 (chemical hypotensors)	线性范围 (linear range) / (ng · mL ⁻¹)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	LOD/ (ng · mL ⁻¹)	LOQ/ (ng · mL ⁻¹)	RSD/ %
1	卡托普利 (captopril)	3.80~189.73	$Y=21\ 477X-2\ 536$	0.999 9	0.29	0.87	0.7
2	酒石酸美托洛尔 (metoprolol)	2.46~127.36	$Y=25\ 700X+1\ 455$	0.999 7	0.18	0.56	2.5
3	盐酸地巴唑 (bendazol)	3.22~155.50	$Y=79\ 167X-9\ 568$	0.999 2	0.07	0.20	1.5
4	盐酸艾司洛尔 (esmolol)	2.36~117.91	$Y=25\ 953X-915$	0.999 6	0.26	0.79	1.1
5	盐酸塞利洛尔 (celiprolol)	4.64~229.22	$Y=68\ 271X-12\ 799$	0.9987	0.38	1.13	0.2
6	盐酸阿呋唑嗪 (alfuzosin)	2.39~119.26	$Y=59\ 451X-5\ 653$	0.999 8	0.35	1.04	1.0
7	富马酸比索洛尔 (bisoprolol)	3.3~165.2	$Y=29\ 427X-2\ 132$	0.999 9	0.53	1.60	1.9
8	盐酸哌唑嗪 (prazosin)	1.07~50.17	$Y=517\ 820X-4\ 080$	0.999 4	0.03	0.10	1.9
9	盐酸普萘洛尔 (propranolol)	4.20~419.16	$Y=12\ 389X+36\ 069$	0.998 3	0.71	2.14	0.8
10	盐酸特拉唑嗪 (terazosin)	2.37~117.75	$Y=58\ 139X-5\ 983$	0.999 1	0.37	1.12	0.4
11	吲达帕胺 (indapamide)	0.96~104.18	$Y=30\ 568X-4\ 151$	0.999 5	0.11	0.34	1.4
12	咪达普利 (imidapril)	0.78~76.95	$Y=3\ 760X-1\ 108$	0.999 3	0.08	0.23	1.5
13	盐酸贝凡洛尔 (bevantolol)	3.85~385.1	$Y=26\ 026X-5\ 379$	0.999 7	0.39	1.17	2.3
14	盐酸地尔硫草 (diltiazem)	1.59~158.79	$Y=50\ 319X-1\ 376$	0.998 5	0.18	0.54	2.2
15	卡维地洛 (carvedilol)	0.65~65.45	$Y=97\ 712X+469$	0.998 9	0.09	0.26	1.0
16	盐酸维拉帕米 (verapamil)	2.95~298.73	$Y=35\ 206X-407$	0.999 1	0.27	0.82	1.8
17	盐酸尼卡地平 (nicardipine)	2.05~211.10	$Y=41\ 913X-2\ 833$	0.999 6	0.28	0.83	1.6
18	雷米普利 (ramipril)	1.07~106.16	$Y=14\ 584X-1\ 205$	0.999 9	0.08	0.25	2.2
19	利血平 (reserpine)	1.33~131.57	$Y=5\ 542X-660$	0.999 1	0.18	0.53	0.9
20	盐酸贝尼地平 (benidipine)	3.41~341.49	$Y=41\ 953X-9\ 822$	0.999 7	0.41	1.24	2.1
21	苯磺酸氨氯地平 (amlodipine)	1.35~139.62	$Y=217\ 652X-8\ 111$	0.998 7	0.10	0.27	2.3
22	硝苯地平 (nifedipine)	12.36~617.72	$Y=6\ 288X-6\ 687$	0.999 4	3.50	10.5	0.2
23	奥美沙坦酯 (olmesartan)	5.93~585.84	$Y=36\ 908X-66\ 854$	0.999 2	0.92	2.77	2.0
24	氯沙坦钾 (losartan)	3.27~320.05	$Y=57\ 596X-16\ 051$	0.998 3	0.82	2.61	2.2
25	厄贝沙坦 (irbesartan)	1.58~157.32	$Y=56\ 896X-2\ 674$	0.999 6	0.21	0.64	0.9
26	盐酸贝那普利 (benazepril)	4.72~468.03	$Y=1\ 943X-11\ 718$	0.999 7	1.29	3.87	0.3
27	螺内酯 (spironolactone)	3.58~359.75	$Y=38\ 228X-11\ 530$	0.998 5	0.64	1.91	0.8
28	盐酸喹那普利 (quinapril)	5.53~552.79	$Y=4\ 761X-35\ 277$	0.999 6	0.9	2.7	1.4
29	缬沙坦 (valsartan)	1.92~189.11	$Y=43\ 058X-1\ 214$	0.999 8	0.20	0.61	0.5
30	尼莫地平 (nimodipine)	1.60~159.47	$Y=57\ 977X-770$	0.999 3	0.15	0.44	0.4
31	非洛地平 (felodipine)	1.72~169.38	$Y=44\ 940X+2\ 960$	0.999 5	0.17	0.52	1.3
32	西尼地平 (cinnidipine)	1.46~150.58	$Y=62\ 791X-263$	0.999 1	0.10	0.31	2.1
33	拉西地平 (lacidipine)	1.19~118.96	$Y=48\ 232X-5\ 615$	0.999 6	0.18	0.53	1.1
34	坎地沙坦酯 (candesartan cilexetil)	2.57~624.91	$Y=46\ 989X-2\ 886$	0.999 7	0.25	0.74	0.5

表 2 34 种化学降压药平均回收率及重复性 ($n=6$)

Tab. 2 Average recoveries and repeatability ($n=6$) for 34 kinds of chemical hypotensors

序号 (No.)	低浓度 (low concentration)		中浓度 (medium concentration)		高浓度 (high concentration)	
	平均值 (mean) / %	RSD / %	平均值 (mean) / %	RSD / %	平均值 (mean) / %	RSD / %
1	101.2	2.2	100.4	0.50	98.2	1.7
2	99.7	2.5	105.2	2.5	100.8	2.2
3	105.9	2.9	113.8	2.8	110.9	1.5
4	99.2	2.1	96.7	2.4	104.7	1.2
5	97.5	1.7	96.9	2.9	94.3	2.1
6	99.5	1.9	99.6	0.80	89.9	1.8
7	106.1	1.2	112.5	1.8	104.1	2.4
8	95.1	2.7	103.1	1.1	106.4	2.0
9	111.7	3.3	99.1	1.9	113.5	2.5
10	90.7	1.9	103.1	2.9	104.9	1.3
11	97.8	2.4	99.9	1.5	101.2	1.7
12	106.6	2.6	96.8	1.8	90.4	2.4
13	104.1	1.8	102.6	1.2	91.5	1.1
14	108.1	0.90	106.3	2.0	100.8	2.5
15	82.7	2.3	103.0	2.4	97.6	3.6
16	100.1	2.1	112.7	3.5	113.3	3.8
17	110.9	2.5	107.8	1.3	104.6	2.0
18	98.6	2.0	114.1	0.70	97.5	3.2
19	102.1	2.3	114.5	1.7	87.2	2.8
20	105.7	1.5	115.2	2.1	110.3	2.7
21	108.6	2.9	102.6	2.5	94.2	2.1
22	95.2	1.3	109.7	0.60	115.1	3.2
23	99.5	2.4	102.4	3.4	94.5	3.0
24	110.8	0.9	109.5	3.1	104.3	2.1
25	99.6	0.7	96.7	3.8	104.8	1.9
26	108.7	3.3	103.4	3.1	111.1	1.2
27	112.1	4.0	105.3	0.90	115.6	2.0
28	95.3	2.2	91.9	3.7	103.0	1.1
29	104.6	1.1	108.4	3.2	103.1	2.1
30	106.1	4.0	114.9	4.1	105.3	2.5
31	107.1	1.3	111.0	1.9	98.7	0.60
32	91.8	2.7	107.0	3.7	102.6	1.2
33	98.1	1.0	89.2	4.0	102.5	2.9
34	118.9	1.8	117.1	3.1	104.8	3.5

表 3 阳性样品中非法添加成分种类及其含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

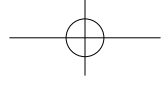
Tab. 3 Types and contents of detected components in positive samples

样品编号 (sample number)	检出成分 (detected components)	含量 (contents) / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
18、63、85	卡托普利 (captopril)	12.1~67.5
4、63、80	吲达帕胺 (indapamide)	5.2~27.3
80	富马酸比索洛尔 (bisoprolol)	63.4
47	卡维地洛 (carvedilol)	42.2
32、42	利血平 (reserpine)	20.3~44.1
36、66、71	苯磺酸氨氯地平 (amlodipine)	3.7~14.9
18、42、50	硝苯地平 (nifedipine)	7.2~36.7
13	盐酸贝那普利 (benazepril)	33.6
81	氯沙坦钾 (losartan)	48.5
11、27	尼莫地平 (nimodipine)	14.9~87.6
66	厄贝沙坦 (irbesartan)	22.3

3 讨论

3.1 色谱柱选择

34 种化学降压药极性差异较大,采用常规的 $5 \mu\text{m}$ 硅胶颗粒填料的色谱柱难以在短时间内对多种成分进行快速分离。在相同的流动相体系下,试验分别采用 Shiseido Capcell Core C_{18} ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 2.7 \mu\text{m}$) 和 Agilent Zorbax SB C_{18} ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5.0 \mu\text{m}$) 色谱柱对 34 种化学降压药的混合对照品溶液进行分析 (见图 1 和图 2)。由图可知,选用分析性能优秀的 Agilent Zorbax SB C_{18} 作为常规 $5 \mu\text{m}$ 填料色谱柱的代表,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,通过调整流动相,大部分成分在 160 min 内可以得到分离,但盐酸地尔硫草和卡维地洛,奥美沙坦酯和氯沙坦钾,厄贝沙坦、盐酸贝那普利和螺



内酯色谱峰重叠严重,无法基线分离;亚 3 μm 填料核壳色谱柱 Shiseido Capcell Core C_{18} 在流速 0.7 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,可在 45 min 内将 34 种化学降压

药完全分离,分离度大于 1.8,相比 Agilent Zorbax SB C_{18} 色谱柱,节省约 72% 的分析时间和约 80% 的溶剂。

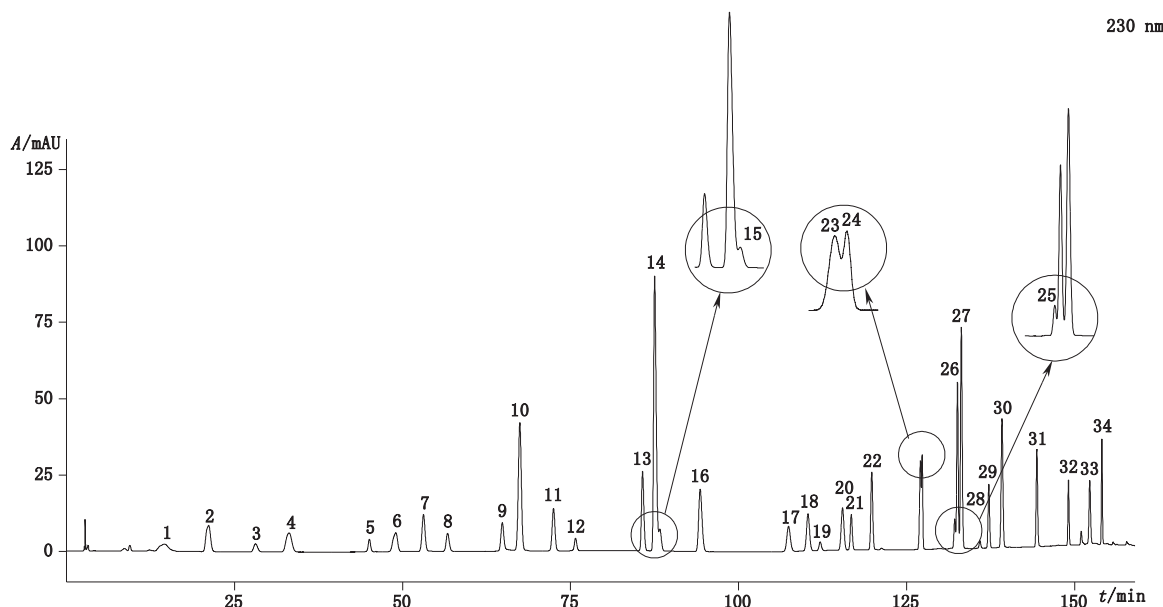


图 2 34 种化学降压药混合对照品在常规 5 μm 填料色谱柱上的色谱图(峰号同表 1)

Fig. 2 HPLC chromatograms of 34 mixed reference substances of chemical hypotensors on conventional 5 μm particles column (peak numbers are the same as those in table 1)

本试验采用的亚 3 μm 填料核壳色谱柱,其 Fused-core 独特核壳结构,显著改善了色谱峰形及分离度,实现对 34 种化学降压药的高分辨率快速分离,具有近似 UPLC 上使用的亚 2 μm 色谱柱的超高柱效,分析时的反压仅 21.5 MPa,远低于亚 2 μm 色谱柱的 40 MPa 反压,使我们在常规低压液相色谱仪上也能实现对复杂混合物的快速分离。此外,亚 3 μm 填料核壳色谱柱所用 2 μm 入口筛板孔径要远大于亚 2 μm 色谱柱(0.5 μm),避免筛板孔径过小发生堵塞^[15],增加色谱柱耐用性。

3.2 波长选择

扫描光谱响应值主要由物质性质和浓度共同决定。扫描光谱经归一化[0,1]处理消除浓度因素后,可以更加直观地反映不同物质区别,图 3 是 34 种降压类化学药经归一化处理后的扫描光谱图。

从图 3 可知,大部分降压类化学药在 200~215 nm 波长附近有最强吸收,但是大部分溶剂和含羧酸根 C=O 成分在此处具有普遍的强吸收,基质干扰大。地平类(苯磺酸氨氯地平、非洛地平、拉西地平、尼莫地平、西尼地平、硝苯地平、盐酸尼卡地平 and 盐酸贝尼地平)在 230 nm 和 350 nm 波长处有较强吸

收(图 3-A);洛尔类(富马酸比索洛尔、盐酸贝凡洛尔、盐酸普萘洛尔、盐酸塞利洛尔)在 230 nm 和 270 nm 波长处吸收较强(图 3-B);普利类(雷米普利、咪达普利、盐酸贝那普利和盐酸喹那普利)在 230 nm 存在较强吸收(图 3-C);沙坦类(奥美沙坦酯、厄贝沙坦、坎地沙坦酯、氯沙坦钾和缬沙坦)在 230 nm 和 250 nm 波长吸收较强(图 3-D);唑嗪类(盐酸阿呋唑嗪、盐酸哌唑嗪和盐酸特拉唑嗪)在 250 nm 和 340 nm 波长吸收较强(图 3-E);杂类(卡维地洛、利血平、螺内酯、盐酸地尔硫草、盐酸维拉帕米和吲达帕胺)扫描光谱相对复杂多样,但是在 230 nm 波长处具有比 230~350 nm 波长处强的吸收(图 3-F)。根据上述各成分的紫外光谱吸收特征,除卡托普利、盐酸地巴唑、酒石酸美托洛尔和盐酸艾司洛尔选择 215 nm 波长外,其余 30 种降压药选择 230 nm 作为检测波长外,分析简化,灵敏度也能满足实验需求。

3.3 流动相选择

本文对流动相进行了优化。由于待分析的化合物种类较多,极性差别较大,梯度洗脱更有利于分离。有机相比拟了甲醇和乙腈,相同梯度条件下使用甲醇

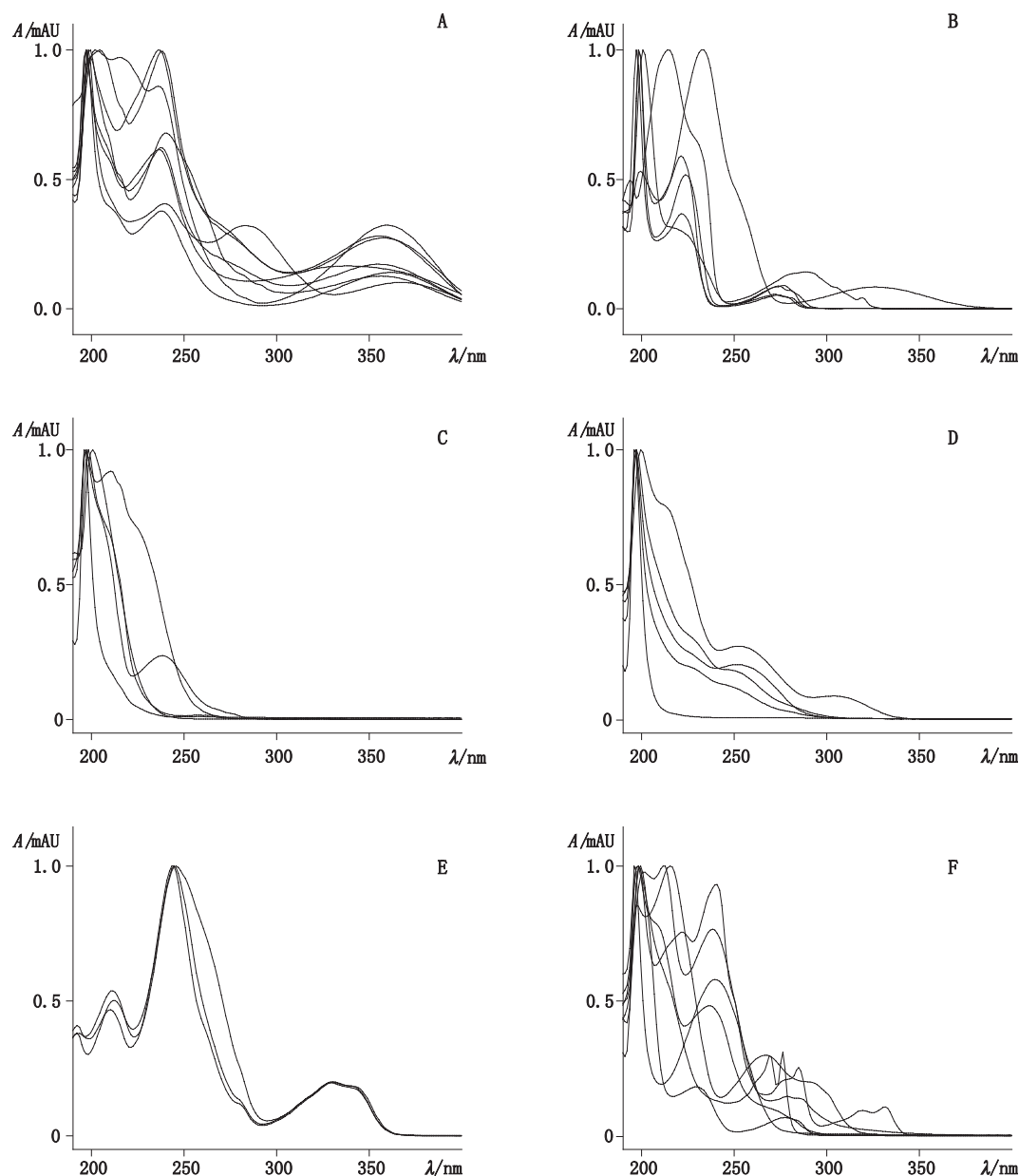


图3 地平类(A)、洛尔类(B)、普利类(C)、沙坦类(D)、唑嗪类(E)和其他类(F)扫描光谱图

Fig. 3 Spectrums of the dipine (A), lol (B), pril (C), sartan (D), zosin (E) and else (F)

作有机相,目标化合物能获得更好的分离效果,乙腈-水相系统唑嗪类出现拖尾峰,分离效果较差;水相比较了0.1%甲酸、0.1%磷酸、0.1 mol·L⁻¹磷酸二氢钾和0.02 mol·L⁻¹乙酸铵(用甲酸调节pH),采用0.1%甲酸和0.02 mol·L⁻¹乙酸铵(用甲酸调节pH)分析效果较好,但0.1%甲酸体系卡托普利色谱峰形较差,而0.02 mol·L⁻¹乙酸铵(用甲酸调节pH)体系卡托普利色谱峰响应得到显著改善。研究还发现,流动相的pH对化合物分离影响较大,考察了0.02 mol·L⁻¹乙酸铵(甲酸调节pH为2.0~5.0)对

34种降压药物的分析效果,结果显示,pH=3.0±0.1时各成分能实现较好的分离,故本文采用0.02 mol·L⁻¹乙酸铵(用甲酸调节pH=3.0±0.1)-甲醇梯度洗脱流动相体系,同时乙酸铵属于挥发性缓冲盐,便于后续研究实现液相色谱到液相色谱-质谱方法的转变。

3.4 小结

本文利用亚3 μm 填料核壳色谱柱,在常规低压液相色谱仪上实现降压类中成药及保健食品中化学降压药的高通量快速筛选,检测效率高,成本低,适用

范围广,灵敏度高,为基层食药监部门快速发现和有效打击此类非法添加行为提供技术支撑。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药物学[M]. 第17版. 北京:人民卫生出版社,2011
CHEN XQ, JIN YY, TANG G. The New Materia Medica[M]. 17th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011
- [2] 董永成,杜士明,陈永顺,等. 中成药及保健品非法添加化学成分的类型、危害及对策[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1601
DONG YC, DU SM, CHEN YS, *et al.* Types and harm of illegally added chemicals in traditional Chinese medicine and health food as well as countermeasure against the phenomenon[J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2006, 17(8): 1601
- [3] 徐硕,金鹏飞,徐巧玲,等. 中药及保健品中非法添加化学药物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(16): 1843
XU S, JING PF, XU QL, *et al.* Advances in the chemical substances illegally adulterated in traditional Chinese medicines and health foods[J]. Chin J New Drugs, 2015, 24(16): 1843
- [4] 王铁松,全禹,郑洁,等. 薄层色谱法快速筛查降脂、降压、止咳平喘类中药制剂中的29种添加化学药物[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(11): 857
WANG TS, TONG Y, ZHENG J, *et al.* Detection of 29 adulterations in lipid-regulating, antihypertensive, antitussive and antiasthmatic herbal remedies by TLC[J]. Chin Pharm J, 2010, 45(11): 857
- [5] 陈惠玲,封令霞. HPLC检测中药中非法添加化学降压药物[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(5): 1346
CHEN HL, FENG LX. Detection of antihypertensive agents illegally added in traditional Chinese medicine by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2011, 28(5): 1346
- [6] 胡青,张甦,王柯,等. 中药及保健食品中违禁添加7种降压类化学药物的HPLC-DAD法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(8): 601
HU Q, ZHANG S, WANG K, *et al.* Determination of seven anti-hypertension chemical drugs added illegally into traditional Chinese medicines and health food by HPLC-DAD[J]. Chin J Pharm, 2010, 41(8): 601
- [7] 李涛,朱小红,林芳. GC-MS联用方法检测降压类中成药及保健食品中非法添加的化学药物[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2212
LI T, ZHU XH, LIN F. GC-MS determination of chemical drugs added illegally in Chinese patent medicine and health food[J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(11): 2212
- [8] 欧贝丽,张红伟,徐宏祥. UPLC-MS/MS法测定中成药及保健品中添加的36种化学药物[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2141
OU BL, ZHANG HW, XU HX. UPLC-MS/MS determination of 36 chemicals added into traditional Chinese medicines and health care products[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(12): 2141
- [9] 王铮帅,舒展,朱洁,等. 中成药和保健食品中18种非法添加降压药物的HPLC-QTOF/MS定性检测[J]. 中国药师, 2016, 19(6): 1084
WANG ZS, SHU Z, ZHU J, *et al.* Detection of 18 antihypertensive agents illegally added in traditional Chinese medicines and healthy care products by HPLC-QTOF/MS[J]. China Pharm, 2016, 19(6): 1084
- [10] BORGES EM, ROSTAGNO M, MEIRELES MA. Sub 2 μm fully porous and partially porous (core-shell) stationary phases for reversed phase liquid chromatography[J]. RSC Adv, 2014, 4(44): 22875
- [11] KIRKLAND JJ, TRUSZKOWSKI FA, RICKER RD. A typical silica-based column packings for high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2002, 965(1-2): 25
- [12] GRITTI F, GUIOCHON G. Unusual behavior of the height equivalent to a theoretical plate of a new poroshell stationary phase at high temperatures[J]. J Chromatogr A, 2007, 1169(1): 125
- [13] GONZALEZ RV, OLIVES AI, MARTIN MA. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography[J]. Trac-Trend Anal Chem, 2015, 64: 17
- [14] KIRKLAND JJ, SCHUSTER SA, JOHNSON WL, *et al.* Fused-core particle technology in high performance liquid chromatography: an overview[J]. J Pharm Anal, 2013, 3(5): 303
- [15] MCCALLEY DV. Instrumental considerations for the effective operation of short, highly efficient fused-core columns. Investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(27): 4561

(本文于2017年12月26日收到)