

HPLC 检测中药中非法添加化学降压药物

陈惠玲¹, 封令霞² (1.厦门市药品检验所, 福建 厦门 361012; 2.厦门大学药学院, 福建 厦门 361000)

摘要: 目的 为打击中药制剂中非法添加化学降压药物现象, 建立了 HPLC 定性检测中药制剂中可能非法添加的 15 种化学降压药物。方法 采用 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 梯度洗脱; 流动相 A 为 0.02 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液, 流动相 B 为甲醇-乙腈(2:1), 检测波长为 230 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃。结果 15 种化学降压药物有很好的分离度、线性及检测灵敏度。检测限为 0.01~13 ng, 连续 5 针进样色谱图中各组分保留时间的 RSD 均<0.1%。结论 本方法简便灵敏, 重复性好, 可作为降压类药物的鉴别方法。

关键词: 化学降压药物; 中药制剂; 非法添加; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)13-1346-03

Detection of Antihypertensive Agents Illegally Added in Traditional Chinese Medicine by HPLC

CHEN Huiling¹, FENG Lingxia² (1.Xiamen Institute for Drug Control, Xiamen 361012, China; 2.School of Pharmaceutical Sciences of Xiamen University, Xiamen 361000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To hit the phenomenon that antihypertensive agents illegally adulterated in traditional Chinese medicine(TCM) preparations, an HPLC method was established for detection of these fifteen kinds of antihypertensive agents.

METHODS The chromatography was performed using an Agilent Extend-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) and gradient elution with the mobile phase consisting of 0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution and methanol-acetonitrile (2:1) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 230 nm. The column temperature was set at 30 ℃. **RESULTS** Under the condition, there was a good resolution among the fifteen kinds of antihypertensive agents and the detectability was 0.01 ng to 13 ng. Repeated 5 injections yielded relative standard deviation less than 0.1% regarding the retention time of each component.

CONCLUSION This method is simple and sensitive with good reproduction quality for identifying antihypertensive agents.

KEY WORDS: antihypertensive agents; traditional Chinese medicine; illegally additives; HPLC

近年来, 在纯中药制剂和保健药品中非法添加化学药物的案件很多, 降压类中药制剂中添加西药的现象尤为突出, 给人们的健康带来严重威胁。本试验对中药制剂中是否非法添加化学降压药作初步筛查, 选择了15种降压药物包含西药中的各类型降压药, 采用梯度洗脱的方法对15种化学降压药物进行分离, 结果显示该方法简便、灵敏、重复性好, 可作为降压类药物的鉴别方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配有液相四元泵、自动控温的自动进样器及紫外可变波长检测器; Mettler AE200 电子天平; TGL 16G 台式高速离心机; SB5200 型超声波发生器。

1.2 降压药对照品

氢氯噻嗪片(1, 批号: 20050903, 规格: 25 mg, 山西临汾云鹏药业有限公司)、酒石酸美托洛尔片

(2, 批号: 0708031, 规格: 25 mg, 阿斯利康制药有限公司)、曲克芦丁片[3, 批号: 20070714, 规格: 60 mg, 开封制药(集团)有限公司]、盐酸特拉唑嗪片(4, 批号: 50292VA, 规格: 2 mg, 英国雅培制药有限公司)、富马酸比索洛尔片(5, 批号: 0711053, 规格: 5 mg, 北京华素制药股份有限公司)、盐酸普萘洛尔片[6, 批号: 07115091, 规格: 10 mg, 中诺药业(石家庄)有限公司]、吲达帕胺片(7, 批号: 0707054, 规格: 2.5 mg, 天津力生制药股份有限公司)、氯沙坦钾片(8, 批号: 07440, 规格: 50 mg, 杭州默沙东制药有限公司)、厄贝沙坦片(9, 批号: 07121851, 规格: 150 mg, 江苏恒瑞医药股份有限公司)、硝苯地平片(10, 批号: 060502, 规格: 10 mg, 山西太原药业有限公司)、替米沙坦片(11, 批号: 703359, 规格: 80 mg, 勃林格殷格翰)、盐酸地尔硫革片(12, 批号: 070504, 规格: 30 mg, 浙江亚太药业股份有限公司)、尼群

作者简介: 陈惠玲, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0592)5619842

E-mail: imfeeling1@sina.com.cn

地平片(**13**, 批号: 060602, 规格: 10 mg, 大同市卫华药业有限责任公司)、尼莫地平片(**14**, 批号: 060407, 规格: 20 mg, 陕西省秦光制药厂)、非洛地平缓释片(**15**, 批号: 0801055, 规格: 5 mg, 阿斯利康制药有限公司), 15 种对照药品均为市场购买, 并按标示含量 100%折算使用。

1.3 试剂

醋酸铵为分析纯试剂, 水为纯化水, 甲醇、乙腈(美国 Tedia)为色谱纯。

1.4 样品

珍菊降压片(批号: GC2076, 规格: 每片重 0.25 g, 含盐酸可乐定 0.03 mg、氢氯噻嗪 5 mg、芦丁 20 mg)为市场购买。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A: 0.02 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液, 流动相 B: 甲醇-乙腈(2:1); 梯度洗脱, 检测波长为 230 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 进样量为 2 μL, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab1 Condition of gradient elution

时间/min	A(0.02 mol·L ⁻¹ 醋酸铵溶液)/%	B(乙腈)/%	C(甲醇)/%
0	80	6	14
20	40	20	40
30	30	24	46
35	25	25	50
40	20	26	54
40.01	80	6	14
50	80	6	14

2.2 对照溶液的制备

取“1.2”项下的 15 种对照药品, 研磨成粉末状, 分别精密称取适量(约相当于各对照化合物 10 mg), 置同一具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 超声 10 min, 静置, 高速离心, 取上清液, 即得对照溶液, 备用。

2.3 样品溶液的制备

取珍菊降压片一片, 研成细粉, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 超声 15 min, 静置, 高速离心, 取上清液, 即得。

2.4 15 种化学降压药物色谱特性

将“2.2”项下对照溶液注入高效液相色谱仪

进行分析。在“2.1”项下的液相色谱条件下, 15 种化合物得到很好的分离, 色谱图见图 1。

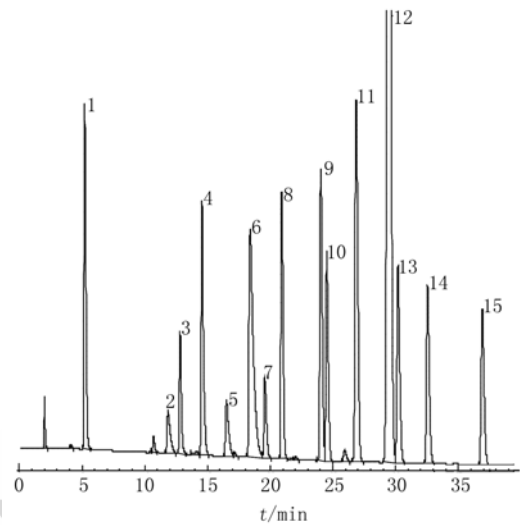


图 1 15 种对照药品的高效液相色谱图

1-氢氯噻嗪; 2-酒石酸美托洛尔; 3-曲克芦丁; 4-盐酸特拉唑嗪; 5-富马酸比索洛尔; 6-盐酸普萘洛尔; 7-吲达帕胺; 8-氯沙坦钾; 9-厄贝沙坦; 10-硝苯地平; 11-替米沙坦; 12-盐酸地尔硫卓; 13-尼群地平; 14-尼莫地平; 15-非洛地平

Fig 1 HPLC chromatogram of 15 reference substances

1-hydrochlorothiazide; 2-metoprolol tartrate; 3-troloxerutin; 4-terazosin hydrochloride; 5-bisoprolol fumarate; 6-propranolol hydrochloride; 7-indapamide; 8-losartan potassium; 9-irbesartan; 10-nifedipine; 11-telmisartan; 12-diltiazem hydrochloride; 13-nitrendipine; 14-nimodipine; 15-felodipine

2.5 线性关系考察

取“2.2”项下对照溶液适量, 稀释 10 倍, 按“2.1”项下的色谱条件进样分析, 进样体积依次为 2, 4, 6, 8 和 10 μL。将 15 种降压药的进样量对峰面积进行线性回归, 结果见表 2。15 种药物的线性均良好。

2.6 色谱峰保留时间的精密度

在该色谱条件下, 取“2.5”项下对照溶液的稀释液, 重复进样 5 次, 各色谱峰保留时间的 RSD 均在 0.01%~0.1%之间, 表明该流动相系统非常稳定。以曲克芦丁保留时间为 1, 计算其余各峰的相对保留时间, 以便于检测。结果见表 2。

2.7 检测限

精密量取“2.2”项下对照溶液适量, 加甲醇逐级稀释至不同浓度, 按“2.1”项下色谱条件测定, 高效液相色谱图中, 各物质色谱峰的信噪比(S/N)在 10 时, 上述 15 种药物的检测限均在 0.01~13 ng 之间, 表明该方法具有很好的灵敏度。

表 2 15 种降压药的相对保留时间和线性

Tab 2 Respective retention time and linearity of fifteen antihypertensive agents

降压药名称	保留时间/min	相对保留时间	回归方程	r	线性范围/ μg
氢氯噻嗪	5.208	0.41	$Y=3\ 616.6X+63.902$	0.999 2	0.105 3~0.526 6
酒石酸美托洛尔	11.850	0.92	$Y=647.47X+13.158$	0.997 5	0.116 2~0.581 2
曲克芦丁	12.812	1.00	$Y=1\ 029X+42.374$	0.988 4	0.125 0~0.625 1
盐酸特拉唑嗪	14.560	1.14	$Y=3\ 327.2X+17.663$	0.999 9	0.097 3~0.486 3
富马酸比索洛尔	16.513	1.29	$Y=1\ 003.9X+8.118\ 7$	0.999 9	0.099 9~0.499 4
盐酸普萘洛尔	18.400	1.44	$Y=5\ 235.3X+20.919$	0.999 9	0.110 3~0.551 3
吲达帕胺	19.583	1.53	$Y=2\ 623.5X+8.925\ 6$	0.999 9	0.041 3~0.206 7
氯沙坦钾	20.914	1.63	$Y=2\ 874.5X+34.719$	0.999 9	0.123 8~0.619 0
厄贝沙坦	24.032	1.88	$Y=3\ 875.2X+32.572$	0.999 9	0.111 6~0.557 8
硝苯地平	24.505	1.91	$Y=2\ 826.7X+25.313$	0.999 9	0.101 4~0.506 8
替米沙坦	26.842	2.10	$Y=4\ 608\ X+52.028$	0.999 9	0.133 7~0.668 3
盐酸地尔硫革	29.455	2.30	$Y=2\ 665.3X+249.32$	0.999 9	1.026 7~5.133 4
尼群地平	30.183	2.36	$Y=3\ 186.7X+36.176$	0.999 9	0.101 1~0.505 3
尼莫地平	32.541	2.54	$Y=2\ 912.5X+25.711$	0.999 9	0.100 8~0.503 8
非洛地平	36.902	2.88	$Y=2\ 681.3X+23.716$	0.999 9	0.100 8~0.504 2

2.8 样品中化学降压药物的检查

取“2.3”项下所制备的珍菊降压片的样品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，其色谱图见图 2。样品图谱中出现与氢氯噻嗪对照样品色谱峰保留时间相同的色谱峰(见图 2 中的峰 1)，表明此样品中的氢氯噻嗪可被检出。

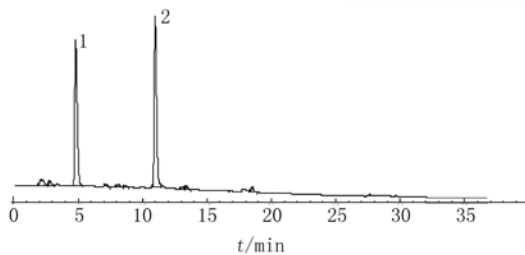


图 2 珍菊降压片的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of Zhenju Jiangya tablets

3 讨论

3.1 分离条件的选择

3.1.1 流动相的选择 参考文献[1]中的方法，采用梯度洗脱程序，并用乙腈、甲醇与缓冲盐作流动相。此系统可将 15 种降压药同时分离，此外阿替洛尔、卡托普利、依那普利和氨氯地平也可被分离，但由于阿替洛尔、卡托普利、依那普利的保留时间均较短，易被中药制剂的辅料及杂质所干扰，选择性不高，故未将其列入系统；氨氯地平应用此色谱条件检测时，不够灵敏，故也不将其列入。

3.1.2 色谱柱的选择 应用上述梯度洗脱方法进

行 15 种组分的分离时，采用不同的色谱柱出现了不同的结果。采用 Agilent TC-C₁₈ 柱进行分析时，HPLC 图谱中仅观察到 14 个特征峰，替米沙坦的特征峰消失，且厄贝沙坦与硝苯地平分离效果不好，酒石酸美托洛尔的检测灵敏度降低；采用 Agilent Extend-C₁₈ 柱时，15 种组分分离良好，重复进样的各组分保留时间的精密度良好。上述现象说明色谱柱的选择对实验结果影响很大，本实验选择 Agilent Extend-C₁₈ 柱分离效果较好。

3.2 对照药品及样品处理

综合 15 种组分离理化性质的分析，各组分溶解性质有一定差异，但基本能溶于甲醇，因此本实验最终选择用甲醇作为配制对照药品及样品溶液的溶剂。本实验所选择的 15 种组分中有些化合物不稳定，如硝苯地平、尼群地平、尼莫地平、盐酸普萘洛尔等遇光易变质，因此在溶液的制备及存储过程应尽量避光及缩短操作时间。

3.3 其他

本实验拟建立非法添加药物检测的初筛实验的方法，如需进一步确定添加成分，可做进一步的质谱分析。

参考文献

- [1] GAO Q, ZHANG Z, JU B Q, et al. Identification of antihypertensive by HPLC-MS/MS and its database development [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2007, 42(21): 1665-1667.

收稿日期: 2010-07-05