

中成药中非法添加对乙酰氨基酚的检测

★ 王晓飞 葛海生 于玲 杜华霜 (中国人民武装警察部队药品仪器检验所 北京 102613)

摘要:目的:建立中成药中非法掺入化学成分对乙酰氨基酚检测的有效方法。方法:首先采用薄层色谱法对20种市售药品进行初筛,色谱条件:硅胶GF254板,展开剂:三氯甲烷-甲醇-丙酮-氨水(9:2:1:0.05)。高效液相色谱紫外和DAD检测法对初筛结果中怀疑掺有目标组分的药品进行定性鉴别和定量分析,色谱条件:色谱柱:资生堂十八烷基硅烷键合硅胶柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(25:75);检测波长260 nm;柱温:30 °C;流速为1.0 ml·min⁻¹。结果:20种市售供试品中有一种非法添加了对乙酰氨基酚,其含量为3.52 mg/g。在0.04~0.81 μg范围内,对乙酰氨基酚的进样量与峰面积呈现良好线性($r=0.9999$),加样回收率为100.3% ($n=5$),RSD为0.9%,48 h内呈现良好稳定性($n=5$),RSD为0.92%。结论:本方法操作简便、灵敏度高、专属性强,可作为检测中成药中非法添加对乙酰氨基酚的有效方法。

关键词:中成药;对乙酰氨基酚;薄层色谱;高效液相色谱

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**B

近些年来,由于利益的驱动,中成药中非法添加化学成分的情形愈演愈烈,给社会和消费者带来严重后果。然而,中成药成分复杂,干扰因素较多^[1],实用性较差,建立中成药中非法添加化学成分的快速检验方法成为了研究热点。本文针对中成药可能添加的非法成分对乙酰氨基酚,建立了简单、快速的薄层色谱初筛方法,并用高效液相DAD和紫外检测方法对初筛结果进行定性、定量分析,试验内容介绍如下。

1 仪器与试剂

岛津LC-2010HTC 高效液相色谱仪(日本岛津公司);色谱柱(日本资生堂公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);对乙酰氨基酚对照品(中国生物制品检定所,批号:100018-200408(供含量测定用));供试品均为市售:(1)止咳化痰颗粒(北京,051104), (2)小儿咳喘灵口服液(四川,051101), (3)复方鲜竹沥液(江西,060318), (4)咳喘宁口服液(江苏,40-060215), (5)苦苣冲剂(青岛,050951);甲醇(色谱纯),水(超纯水),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC法筛选

2.1.1 对照品溶液制备 取对乙酰氨基酚对照品,加氯仿-甲醇(1:1)混合溶液制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取供试品适量,加乙醇溶液10 ml超声处理5 min,使溶解,过滤,滤液浓缩至5 ml,作为供试品溶液。

2.1.3 薄层色谱条件 硅胶GF254层析板,展开剂:三氯甲烷-甲醇-丙酮-氨水(9:2:1:0.05)对照品溶液点样量:3 μl,供试品溶液点样量:5 μl。

2.1.4 初筛结果 取2.1.1、2.1.2所述对照品与供试品溶液按2.1.3色谱条件点于薄层板上,据层析色谱图可见,编号为6的供试品在与2号对乙酰氨基酚对照品相应位置上出现相同颜色的斑点,怀疑6号样品非法添加了化学成分对乙酰氨基酚。

2.2 HPLC法定性、定量

2.2.1 色谱条件 色谱柱:资生堂十八烷基硅烷键合硅胶柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测器:(1)紫外检测器,(2)DAD检测器;柱温:30 °C;流动相:甲醇-水(25:75);检测波长260 nm;流速1.0 ml·min⁻¹。

2.2.2 溶液制备 对照品储备液的制备:取对乙酰氨基酚对照品约25 mg,置50 ml量瓶中,加乙醇至刻度,摇匀,作为储备液。

对照品溶液的制备:精密吸取“2.2.2”项下储备液2 ml置25 ml量瓶中,加0.4%氢氧化钠溶液^[2]稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

供试品溶液的制备:取6号供试品约1 g,精密

称定,置 25 ml 三角瓶中,精密加入乙醇 10 ml,精密称定,振摇,使充分溶解,再次精密称定,补足损失溶剂,滤过,精密吸取续滤液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,0.4% 氢氧化钠溶液稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

混合溶液的制备:分别取对照品储备液和供试品溶液各 1 ml 混匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.3 定性试验 分别取 2.2.2 所述对照品溶液、供试品溶液和混合溶液在 HPLC 上自动进样 10 μl 分别进行紫外和 DAD 检测,记录色谱图,在选定的色谱条件下,比较保留时间,在对照品对乙酰氨基酚色谱峰对映的位置上,样品呈现相应色谱峰,混合溶液出现相应的单一色谱峰。对照品与供试品 DAD 色谱相吻合,可判定样品中含有对乙酰氨基酚。

2.2.4 线性关系考察 密称取对乙酰氨基酚对照品 25.27 mg,照“2.2.2”项下方法制备对照品溶液(40.43 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)。分别进样 1,3,5,7,9,10,11,13,15,17,19,20 μl ,记录色谱图,以峰面积(A)对进样量(C)进行回归计算,得到标准曲线方程为: $A = 102010C + 7956.4$, $r = 0.9999$ 。结果表明:对乙酰氨基酚的进样量在 0.04 ~ 0.81 μg 范围内,进样量与峰面积呈现良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10 μl ,重复进样 7 次,以对乙酰氨基酚峰面积计算, RSD 为 0.6% ($n = 7$)。

2.6 稳定性试验

将供试品溶液常温放置,分别于 0,2,8,24,48 h,精密吸取供试品溶液 10 μl 自动进样注入液相色谱仪,以对乙酰氨基酚峰面积计算, RSD 为 0.92% ($n = 5$)。结果表明,供试品溶液至少在 48 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同批样品 5 份,分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照上述相同色谱条件测定,计算,得对乙酰氨基酚平均含量的 RSD 为 1.1%。

2.8 加样回收试验

精密称取已知对乙酰氨基酚的样品适量,精密称定置 50 ml 三角瓶中,精密加入乙醇 20 ml,精密称定,振摇,使充分溶解,精密称定,补足损失溶剂,滤过,精密量取续滤液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,精密加入 0.5054 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 对照品溶液 1 ml,用 0.4% 氢氧化钠溶液稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,进样 5 μl 测定,按“2.2.1”项下色谱方法

测定含量,结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果($n = 5$)

取样量 /g	样品中对乙酰氨基酚含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.2722	0.3201	0.5054	0.8237	99.64		
1.9648	0.2768	0.5054	0.7789	99.35		
2.6264	0.3700	0.5054	0.8832	101.54	100.3	0.9
2.4198	0.3409	0.5054	0.8524	101.21		
2.2324	0.3145	0.5054	0.8209	100.20		
2.2523	0.3173	0.5054	0.8208	99.62		

2.9 样品含量测定

取本品约 1 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。对照液与供试液分别进样 10 μl ,平行 2 份,外标法计算含量为 3.52 mg/g 。

3 讨论

3.1 展开剂的确定

以三氯甲烷-甲醇-丙酮-氨水^[3]调节比例,以最佳配比:三氯甲烷-甲醇-丙酮-氨水(9:2:1:0.05)为展开剂的薄层色谱,样品色谱分离较好,方法简单、快捷、选择性较高,可以用于中药制剂中非法添加对乙酰氨基酚初筛的快速检验方法。

3.2 流动相及溶剂的确定

取供试品适量,分别用乙醇、水、流动相、先用乙醇提取,再加入 0.04% 氢氧化钠作为溶剂溶解样品,配制成对乙酰氨基酚约 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的溶液;分别用甲醇-水,乙腈-0.05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液-三乙胺^[4]、0.1% 醋酸溶液-甲醇(用二乙胺调 pH 至 3.7)^[5] 作为流动相,并对流动相进行不同配比,比较色谱图,选择分离效果好的方法:先用乙醇提取,后加入 0.04% 氢氧化钠作为溶剂,甲醇-水(25:75) 作为流动相。

本法操作简单,结果准确可靠,可以用于中药制剂中非法添加化学成分对乙酰氨基酚的快速检验方法。

参考文献

- [1] 夏顺宁,许江,李丹. 中成药中不法添加化学药检测思路的探讨[J]. 中国药事,2005,19(10):63.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版. 二部[S]. 北京:化学工业出版社,170.
- [3] 顾海成. 复方氨酚烷胺片薄层色谱鉴别方法改进[J]. 海峡药学,2006,18(4):122.
- [4] 谢楠,郭朝晖,蒋生祥. HPLC 测定感康片中对乙酰氨基酚、咖啡因和扑尔敏的含量[J]. 华西药理学杂志,2007,22(1):98.
- [5] 辛俊衡,黄林杰. HPLC 法同时测定复方氨酚烷胺片中对乙酰氨基酚和咖啡因的含量[J]. 首都医药,2005,12(11B):49.

(收稿日期:2008-10-16)