

## 毛细管电泳法检测中药制剂舒骨宁中非法添加的双氯芬酸钾

刘敏<sup>1</sup>, 古卓良<sup>2</sup>, 张晓丹<sup>2</sup>, 周国华<sup>2</sup> (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 南京军区联勤部药品仪器检验所, 江苏南京 210002;)

**摘要** 目的: 采用毛细管电泳的方法检测中药制剂舒骨宁中非法添加的西药双氯芬酸钾。方法: 毛细管电泳法, 贝克曼未涂层石英毛细管柱 75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm, 以 25 mM 的磷酸氢二钠 (磷酸调节 pH 6.50  $\pm$  0.02) 为缓冲液, 0.5 psi 5 s 压力进样, 检测波长 275 nm, 柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ , 分离电压 25 kV。结果: 双氯芬酸钾的含量在 0.010 ~ 0.200 g/L 的范围内线性关系良好,  $r=0.9984$ , 平均回收率为 100.6%, RSD 为 3.01%。结论: 该方法简便、快速、可靠, 溶剂用量少, 可有效检测出中药制剂舒骨宁中非法添加的西药双氯芬酸钾。

**关键词** 毛细管电泳法; 中药; 非法添加物; 双氯芬酸钾

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)05-0359-03

## Determination of illegal ingredient diclofenacpotassium in TCM by capillary electrophoresis

LIU Min<sup>1</sup>, GU Zhuo-liang<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-dan<sup>2</sup>, ZHOU Guo-hua<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control, Nanjing Military Area, Nanjing 210002, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish a capillary electrophoresis (CE) method for determining the illegally added ingredient diclofenac potassium in TCM, Shuguning tablet. **Methods:** CE was used for the separation by using the uncoated capillary (75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm) and buffer of 25 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.50  $\pm$  0.02). The applied voltage was 25 kV at 25  $^{\circ}\text{C}$ . The sample was injected for 5 s at 0.5 psi and the detection wavelength was at 275 nm. **Results:** Linear range was from 0.010 g/L to 0.200 g/L ( $r=0.9984$ ), the average recovery was 100.6% with the RSD of 3.01%. **Conclusion:** This method is simple, rapid, reliable and accurate for quantifying the illegally added diclofenac potassium in Shuguning tablets

**KEY WORDS** capillary electrophoresis; TCM; illegal ingredient; diclofenac potassium

舒骨宁是由熟地黄、鹿衔草、骨碎补(烫)、淫羊藿、肉苁蓉、鸡血藤、莱菔子(炒)七味中药组成,具有补肾、活血、止痛的功效,用于肥大性脊椎炎、颈椎病、跟骨刺、增生性关节炎、大骨节病。但通过对市场销售的舒骨宁片进行 LCMS 检测,发现其中含有非法添加成分双氯芬酸钾。双氯芬酸钾为非甾体类抗炎镇痛药,长期大量服用容易引起消化道溃疡。由于质谱对流动相的要求比较苛刻,且检测成本高,在实际工作中难以推广。笔者建立了简便、快捷的毛细管电泳法对其进行检测,以较低的成本同样实现了中药打假的目的。

### 1 仪器和试剂

**1.1 仪器** 美国贝克曼 P/ACE<sup>TM</sup> MDQ 毛细管电泳系统,包括 32Karat 色谱工作站,自动进样器,紫外检

测器。贝克曼未涂层石英毛细管柱 75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm,日本岛津 SHIMADZU 分析电子天平,型号为 AUW120。日本岛津公司紫外-可见光光度计,型号为 UV-2450PC。上海精密仪器厂 PHS-3C 型酸度计。

**1.2 药品和试剂** 乙腈为色谱纯,磷酸氢二钠(广东汕头西陇化工厂,分析纯,批号 0702012),磷酸(南京化学试剂一厂,分析纯,批号 960809),水为纯净水。吉林某药业股份有限公司生产抗骨增生片(商品名为舒骨宁),批号 20060101。双氯芬酸钾原料药(江苏省药检所提供,含量为 99.19%)作为对照品。通化卫京药业股份有限公司生产的抗骨增生片(经质谱检测未添加西药成分的合格产品),批号为 050504。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 贝克曼未涂层石英毛细管柱 75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm,以 25 mM 的磷酸氢二钠 (磷酸调节

pH 6.50 ± 0.02) 为缓冲液, 0.5 psi 5 s 压力进样, 检测波长为 275 nm, 检测时间 10 min, 分离电压 25 kV; 外标法。

**2.2 供试品溶液与对照品溶液的制备** 精密称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.119 6 g, 溶于 125 mL 水中,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  调节 pH 值为 6.50 ± 0.02, 备用。精密称取双氯芬酸钾原料药 2.070 mg, 置 10 mL 量瓶中, 以上述缓冲液定容备用。取抗骨增生片, 去糖衣, 碾成细粉, 精密称取 60 mg, 置 10 mL 量瓶中, 以上述缓冲液定容, 超声提取 10 min, 摇匀滤过取续滤液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系** 取上述对照品溶液, 以缓冲液稀释至 0.010 0, 0.020 0, 0.050 0, 0.100 0, 0.150 0, 0.200 0 g/L, 分别以 0.5 psi 5 s 压力进样, 以浓度  $C$  对峰面积  $A$  进行线性回归, 求得回归方程,  $A = 36.898C + 2.402$ , 相关系数为  $r = 0.9989$ , 表明双氯芬酸钾在 0.010 0 ~ 0.200 0 g/L 范围内线性关系较好。

**2.3.2 样品稳定性考察** 取同一样品制得的样品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 记录色谱图, 测得峰面积的响应值  $RSD = 2.49\%$ , 出峰时间  $RSD = 2.27\%$ , 表明样品溶液在 8 h 内稳定。

**2.3.3 进样精密度** 在上述色谱条件下, 重复进对照品 6 次, 测得峰面积响应值  $RSD = 2.44\%$ , 出峰时间  $RSD = 1.27\%$ , 表明系统精密度良好。

**2.3.4 重复性** 同一批样品, 平行精密称取 6 次, 每份约 60 mg, 按样品溶液项下制备, 然后分别进样, 记录色谱图, 测得峰面积, 代入线性方程中计算双氯芬酸钾含量,  $RSD$  为 3.69%, 表明该方法重复性较好。

**2.3.5 方法回收率** 精密称取已知含量的样品粉末 9 份 (样品含双氯芬酸钾 0.1078 g/L), 三份一组, 每份 60 mg, 精密称定, 分别添加 1 mL 低、中、高 3 个浓度的双氯芬酸钾原料药, 按“2.5 项下操作”后, 制成加样回收率供试液。结果表明方法的回收率为 100.6%,  $RSD$  为 3.01%。

## 3 样品测定

取吉林某药业股份有限公司生产的舒骨宁片, 按照“2.3 项下操作”, 制备待测样品, 以“2.2 项下所述色谱条件”平行进样 3 次, 测得峰面积, 取平均值, 用外标法计算样品中双氯芬酸钾的含量, 结果表明, 该批次的舒骨宁片中非法掺入了双氯芬酸钾, 测算出每克成药 (不含糖衣) 含双氯芬酸钾约 17.97 mg。对照品及供试品色谱图见图 1。

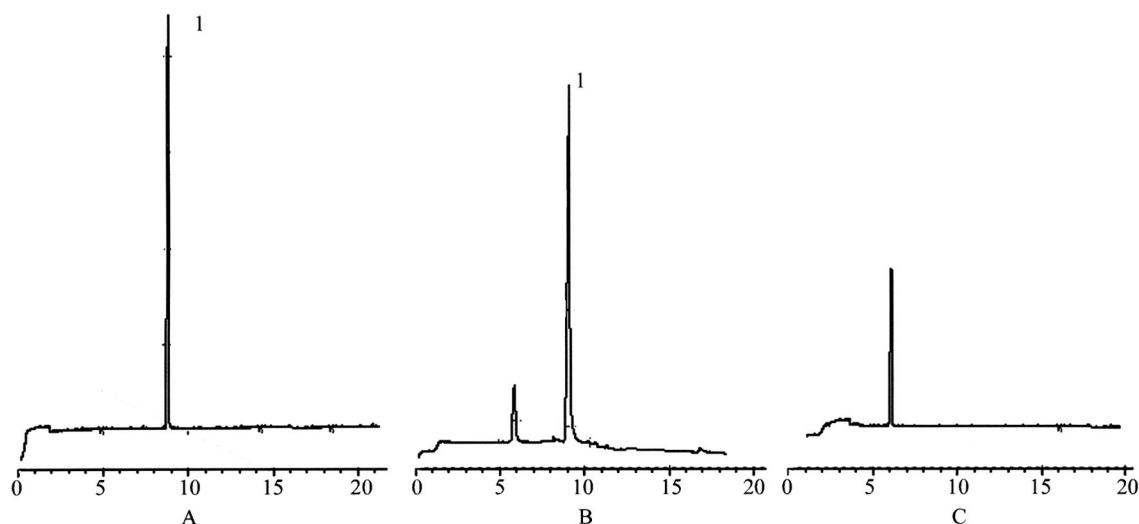


图 1 双氯芬酸钾及其制剂的毛细管电泳分离图谱

A 双氯芬酸钾原料药; B 吉林某药业公司舒骨宁片 (非法添加产品); C 舒骨宁片 (合格产品); 峰 1 双氯芬酸钾

## 4 讨论

**4.1 测定波长的选择** 以缓冲液为空白对照, 对照品稀释至 2.07 mg/L, 在紫外 - 可见光光度仪上扫描<sup>[1]</sup>, 发现对照品在 275 nm 处有最大吸收, 故选择 275 nm 为检测波长。

**4.2 分析方法的选择** 中国药典 2005 版二部中给出了双氯芬酸钠的含量测定方法为指示剂法<sup>[2]</sup>, 该法样品用量大, 含量测定结果容易受中药成分干扰, 不适用于少量添加的双氯芬酸成分的检测; 当不能确定中药制剂中是否添加了西药成分以及添加了何

种西药成分时,质谱法是一种终端确证方法,江苏省药检所建立了舒骨宁片中非法添加双氯芬酸钾的质谱检测方法,但作为日常工作中的常规打假手段,质谱检测方法仪器昂贵,成本较高,需要专门的技术人员,不利于在基层推广使用,并且,质谱法极高的灵敏度对于检测必须添加到一定浓度才能发挥药效的西药也是一种浪费;高效液相色谱法分析时间略长,且溶剂用量较大<sup>[3]</sup>。笔者建立的 CE 检测方法快速、简便、溶剂用量少、检测限符合检测要求,可作为快速打假的一种手段。

**4.3 缓冲体系的选择** 确定该方法的缓冲体系前,考察过非水体系<sup>[4,5]</sup>、偏酸体系、中性体系和偏碱体系,试验结果表明,pH(6.50±0.02)时,出峰时间短,分离度和峰形符合含量测定的要求。溶剂的酸碱度是如何影响双氯芬酸钾的色谱行为还有待进一步的试验确证。

**4.4 定量计算** 毛细管电泳法中,毛细管内缓冲液

极其微小的变化也会引起出峰时间的漂移和峰面积较大的变化,因此,采用 CE方法法定性定量时,每进样5次,须以0.1M的NaOH和缓冲液冲洗柱子,以保证出峰时间和峰面积的重现性。

#### 参考文献:

- [1] 刘荣,冯端浩,邓夕军,等.紫外分光光度法测定双氯芬酸钠凝胶剂的含量[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(6):481.
- [2] 中国药典 2005版[S].第二部.2005:60.
- [3] 李家春,吴沉,彭国平,反相离子对色谱法测定复方双氯芬酸钠注射液的含量[J].医药导报,2006,25(10):1064.
- [4] 杨静,刘文英,张奕华,非水毛细管电泳法测定双氯芬酸衍生物ZLR-8的含量[J].中国药科大学学报,2005,36(4):326.
- [5] 尹茶.非水毛细管电泳法及其应用[J].国外医学药学分册,1997,24(4):202.

收稿日期:2009-03-25

(上接第 333页)

可转化为5-氟尿嘧啶核苷,以伪代谢产物形式掺入RNA中干扰蛋白质的合成。硫酸长春新碱是作用于M期的药物,与纺锤丝微管蛋白结合,从而影响微管装配和纺锤丝的形成。丝裂霉素C是周期非特异型药物,可使细胞的DNA解聚,同时阻碍DNA的复制,从而抑制肿瘤细胞分裂。文献报道中并未阐述选择阳性对照药物是以药物的抑制效果为依据还是以药物的作用机制为依据。本研究选取了3种常用的阳性对照药物,比较了其对于人肝癌细胞系HepG2的抑制情况,以抑制效果为衡量指标,认为硫酸长春新碱是该细胞系体外药物筛选时较适宜的阳性对照药物。

本研究中对3种常用的抗癌药物抑制情况进行比较,只是针对于人肝癌细胞系HepG2的,由于体外细胞系类别很多,不同种类不同来源的细胞间存在一定差异,所以并不适用于其它种类和来源的细胞系;而且,本文只是研究药物对于体外培养的细胞株的抑制情况,并非针对临床抗肿瘤药物用药指导。

#### 参考文献:

- [1] 陈富强,李煜,李瑶,等.人肝癌细胞系HepG2生物学特性分析[J].内蒙古大学学报(自然科学版),2007,38(3):306.
- [2] Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Zempleni J. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation

initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells [J]. J Nutr Biochem, 2006, 17: 23.

- [3] Gao FJ, Cui SX, Chen MH, et al. Des-gamma-carboxy p10-thrombin increases the expression of angiogenic factors in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Life Sci, 2008, 83: 815.
- [4] Wang ZY, Burke PA. Effects of Hepatocyte Nuclear Factor-4 on the Regulation of the Hepatic Acute Phase Response [J]. J Mol Biol, 2007, 371: 323.
- [5] 徐庆,陈全斌,义祥辉,等.荔枝核提取物对HepG2细胞系HBsAg与HBeAg表达的影响[J].中国医院药学杂志,2004,24(7):393.
- [6] Jia F, Zhang YZ, Liu CM. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication in HepG2. 2.15 cells by RNA interference based on retrovirus delivery [J]. J Biotechnol, 2007, 128: 32.
- [7] 王敏,贾正平,马骏,等.瑞香狼毒总黄酮提取物的抗肿瘤作用[J].中国中药杂志,2005,30(8):603.
- [8] 唐玲,葛迎春,刘平,等.油茶籽提取物对体外培养不同肿瘤细胞增殖的抑制作用[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(10):141.
- [9] 赵灿国,董伟华,孔天翰.蝎毒及其分离组分对4种肿瘤细胞生长的抑制作用[J].广州医学院学报,2006,34(1):26.
- [10] 王曼,孙兴怀.曲尼司特对培养兔晶状体上皮细胞的作用[J].眼科研究,2004,22(5):485.
- [11] 张春红,张连学,李向高,等.人参二萜脂肪酸抗肿瘤活性的初步研究[J].中药材,2006,29(11):1200.
- [12] 李亚娟,周洪澜,葛岩,等.槲寄生碱对人腺样囊性癌细胞的抑制作用[J].吉林大学学报(医学版),2008,34(4):601.

收稿日期:2009-02-25