

液质联用色谱法同时测定降糖类中成药中 9种非法添加的化学成分

孟丽¹, 陈伟², 欧阳八四^{2*}

(1. 盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224006;

2. 苏州市中医医院, 苏州市吴门医派研究院, 江苏 苏州 215009)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法同时测定降糖类中成药中9种非法添加的化学成分。方法:采用C₁₈色谱柱,以甲醇-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵溶液梯度洗脱,检测波长235 nm,柱温35 ℃,同时进行全波长扫描(190~400 nm),并对可疑成分进行质谱确认。结果:9种对照品在各自浓度范围内,呈现良好的线性关系($r \geq 0.9999$),精密度、稳定性、检出限、定量限、回收率均符合规范,并检出降糖宁中非法添加了格列本脲。结论:该方法简便快速准确,适用于上述降糖类化学成分的检测。

[关键词] 中成药; 非法添加; 降糖类化学成分; 高效液相色谱-质谱联用

[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0066-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190066

Simultaneous Determination of 9 Illegally Added Anti-diabetic Chemical Components in Chinese Patent Medicines by HPLC-MS

MENG Li¹, CHEN Wei², OUYANG Ba-si^{2*}

(1. Yancheng Institute of Health Sciences, Yancheng 224006, China;

2. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215009, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of 9 illegally added anti-diabetic chemical components in Chinese patent medicines. **Method:** The compounds were separated on C₁₈ column, with methanol-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution as the mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 235 nm and the column temperature was 35 ℃, with the flow rate of 1.0 mol·L⁻¹. Full wavelength scanning was from 190 nm to 400 nm. Suspicious ingredients were confirmed by mass spectrometry. **Result:** All 9 components had good linear relationship within their respective concentration range ($r \geq 0.9999$), and their precision, stability, limit of detection, limit of quantitation and recovery rate met the standards. Illegally added glyburide was detected in Jiangtangning. **Conclusion:** The method is simple, accurate, and suitable for the determination of 9 illegally added anti-diabetic chemical components above.

[Key words] Chinese patent medicines; illegally added; anti-diabetic chemical components; HPLC-MS

中成药成分复杂,人工掺入化学物质后不易被发现,导致了不法分子制假售假,随意夸大疗效宣传,牟取暴利,这已成为目前药品市场监管的突出问题^[1]。中成药非法添加化学药不仅影响我国药品

市场秩序,更对人民群众的用药安全造成了不可预知的危害^[2]。此类非法添加的化学药一般为对某类疾病疗效确切、价格低廉、来源广泛、隐蔽性强的药品,且添加量具有不确定性,常规的检验手段难以

[收稿日期] 20150818(005)

[基金项目] 江苏高校品牌专业建设工程项目(PPZY2015A097)

[第一作者] 孟丽,讲师,硕士,从事中药制剂研究,Tel:0515-88159951,E-mail:li_972@163.com

[通讯作者] * 欧阳八四,主任中医师,硕士,从事中药学、中医学研究,Tel:18094251530,E-mail:oybasi@163.com

发现^[3]。目前,发展较为成熟的几种常用的检测方法有化学法、薄层色谱法、高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用技术、超高效液相色谱法、高效毛细管电泳技术、红外光谱法、拉曼光谱法等,为药品技术监督工作提供了参考^[4]。

糖尿病通常伴有大量的并发症。长时间服用降糖类西药可能造成较大的不良反应,因此,越来越多的患者选择中成药治疗。降糖类中成药添加化学药的现象十分普遍^[5],主要有以下 4 类化学成分,双胍类、磺脲类、噻唑烷酮类、格列奈类^[6]。本文结合实践,对目前市场上出现的降糖类中成药进行检测,为打击降糖类中成药中非法添加化学药提供有力的数据支持。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters, 2998 型 PDA 检测器, Empower II 色谱工作站), 1290-6538 型液质联用仪(美国 Agilent, ESI 离子源), Wondasil C₁₈-WR 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 岛津), Spursil C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3 μm, Dikma), XS105DU 型 1/10 万电子天平(Mettler Toledo)。

甲醇、乙腈为色谱纯,超纯水为自制(美国 Millipore 公司),其他试剂均为分析纯。

对照品 甲苯磺丁脲(批号 200321, 纯度 99.5%), 格列本脲(批号 201105, 纯度 99.5%), 格列齐特(批号 201004, 纯度 99.9%), 格列吡嗪(批号 201203, 纯度 99.5%), 格列喹酮(批号 201002, 纯度 99.3%), 格列美脲(批号 201102, 纯度 99.1%), 马来酸罗格列酮(批号 200701, 纯度 99.5%), 瑞格列奈(批号 201303, 纯度 99.8%), 均购自中国食品药品检定研究院。

样品 养阴降糖片(批号 110901), 降糖宁(批号 120903), 消糖灵片(批号 20140503)均来自市场抽验。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 岛津 Wondasil C₁₈-WR 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇为流动相 A, 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液为流动相 B(0 ~ 3 min, 40% A; 3 ~ 10 min, 40% ~ 60% A; 10 ~ 30 min, 60% A; 30 ~ 40 min, 60% ~ 80% A; 40 ~ 60 min, 80% A), 检测波长 235 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 质谱条件 Dikma Spursil C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3 μm), 流动相同 2.1 项下, 流

速 0.3 mL·min⁻¹。电喷雾电离源(ESI), 参数正离子扫描, 离子源电压 3.5 kV, 毛细管温度 350 °C, 毛细管电压 135 V, 脱溶剂气 600 L·h⁻¹, 干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 12 L·min⁻¹, 扫描方式一级质谱、二级质谱全扫描, 扫描范围 *m/z* 50 ~ 1 000。

2.3 溶液的配制

2.3.1 混合对照品储备液 称取甲苯磺丁脲、格列本脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮、格列美脲、马来酸罗格列酮、瑞格列奈、盐酸吡格列酮对照品约 10 mg, 精密称定, 加甲醇定容至 25 mL, 制成约 0.4 g·L⁻¹ 的各对照品储备溶液。

2.3.2 供试品溶液 取胶囊剂内容物或片剂适量(约 1 次口服剂量), 研细过 80 目筛, 置具塞锥形瓶中, 加三氯甲烷 20 mL, 超声 10 min, 放冷, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL 蒸干, 残渣加甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考查 精密量取上述混合对照品储备液, 用甲醇制成每 1 mL 分别约含 4, 8, 16, 32, 40, 80, 160, 320, 400 μg 的溶液。分别取 10 μL 注入液相色谱仪, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标得各降糖成分对照品的线性回归方程和相关系数, 见表 1。

2.4.2 精密度试验 精密量取质量浓度为 400 mg·L⁻¹ 的供试品溶液, 重复进样 6 次, 测得对照品溶液峰面积, 9 种成分峰面积积分值的 RSD 分别为 0.3%, 0.4%, 0.3%, 0.3%, 0.2%, 0.6%, 0.3%, 0.3%, 0.3%。表明仪器精密度较好。

2.4.3 重复性试验 取降糖宁样品 6 粒, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 测得格列本脲峰面积 RSD 0.2%, 表明该方法重复性较好。

2.4.4 稳定性试验 精密量取质量浓度为 400 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 各进样 10 μL, 测定对照品溶液中 9 个成分峰面积, 计算 RSD, 结果对照品峰面积积分值的 RSD 分别为 0.3%, 0.1%, 0.1%, 0.5%, 0.2%, 0.3%, 0.3%, 0.5%, 0.3%。表明对照品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 检出限测定 取混合对照品储备液适量, 用甲醇稀释成质量浓度为 2 mg·L⁻¹ 的溶液, 进样 10 μL, 根据峰高以 S/N = 3 确定检出限。9 个成分检出限分别为 22.5, 19.5, 19.7, 20.5, 23, 21.8, 21.4, 18.8, 18.3 ng。

2.4.6 定量限测定 同检出限测定方法, 将上述对

表 1 10 个成分线性方程、相关系数、检测范围

Table 1 Linear equations, correlation coefficient and detection range

成分	线性方程	相关系数	检测范围/ng
甲苯磺丁脲	$Y = 2.0 \times 10^6 X + 4\ 703.4$	0.999 9	4.50 ~ 450.40
格列吡嗪	$Y = 2.0 \times 10^7 X - 29\ 727$	0.999 9	3.90 ~ 390.00
格列齐特	$Y = 2.0 \times 10^7 X - 62\ 752$	0.999 9	3.94 ~ 393.60
马来酸罗格列酮	$Y = 2.0 \times 10^7 X - 56\ 779$	0.999 9	4.10 ~ 409.60
盐酸吡格列酮	$Y = 1.0 \times 10^7 X - 56\ 907$	0.999 9	4.60 ~ 460.40
格列本脲	$Y = 3.0 \times 10^7 X - 99\ 549$	0.999 9	4.37 ~ 436.80
格列美脲	$Y = 3.0 \times 10^7 X - 50\ 227$	1	4.29 ~ 428.80
格列喹酮	$Y = 3.0 \times 10^7 X - 21\ 116$	0.999 9	3.76 ~ 376.40
瑞格列奈	$Y = 1.0 \times 10^7 X - 7\ 214.2$	0.999 9	3.66 ~ 365.60

照品储备液分别稀释后进样,根据峰高以 $S/N = 10$ 确定定量限。9 个成分定量限分别为 90.0, 78.0, 78.7, 81.9, 92.1, 87.4, 85.8, 75.3, 73.1 ng。

2.4.7 加样回收率试验 取养阴降糖片,按照 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,精密加入 9 种对照品溶液 10 mL,加甲醇定容至 25 mL,平行制备 6 份,按 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表 2。可以看出 9 种对照品的回收率及 RSD 均符合要求。

表 2 9 种化学成分加样回收率试验

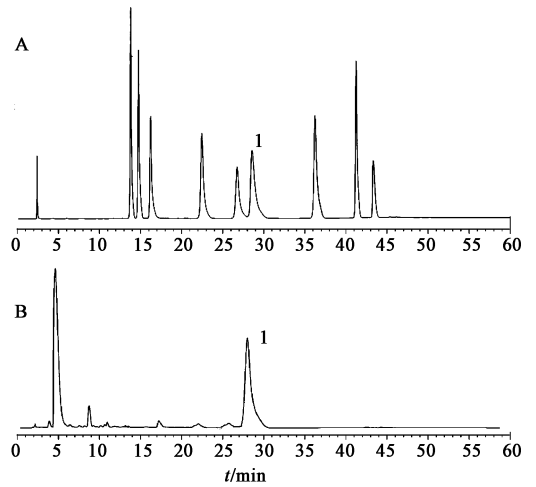
Table 2 Recovery of 9 chemical reference substances

成分	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
甲苯磺丁脲	3.53	3.48	98.5	1.8
格列吡嗪	3.46	3.33	96.2	1.9
格列齐特	3.66	3.51	95.9	2.0
马来酸罗格列酮	3.28	3.16	96.4	1.8
盐酸吡格列酮	3.72	3.69	99.2	1.6
格列本脲	3.44	3.33	96.7	2.0
格列美脲	3.51	3.33	95.0	1.5
格列喹酮	3.48	3.37	96.8	1.9
瑞格列奈	3.38	3.29	97.5	1.0

注:样品中量均为 0 mg。

2.4.8 样品测定 用本文建立的方法,对养阴降糖片、降糖宁、消糖灵片进行检测,其中,养阴降糖片和消糖灵片未检出与混合对照品保留时间一致的色谱峰,显示其中无非法添加。降糖宁中检出与格列本脲对照品保留时间($t_R = 26.67$ min)一致的色谱峰,并比较了两者的紫外光谱图,均在 231.0, 300.9 nm 处有最大吸收。混合对照品、降糖宁色谱图见图 1,结果发现降糖宁中含有疑似格列本脲物质,且其紫

外光谱图与格列本脲对照品紫外光谱图相似。



A. 混合对照品; B. 降糖宁; 1. 格列本脲

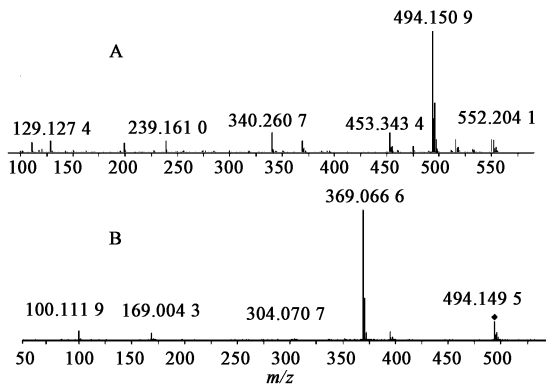
图 1 降糖宁 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Jiangtangning

2.4.9 质谱确认 在上述条件下用正离子扫描方式对格列本脲对照品进行 LC-MS 分析,一级扫描质谱得到准分子离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 494.150 9,对其进行二级扫描质谱分析,得到主要碎片离子有 100.111 9, 169.004 3, 369.066 6。见图 2。

在相同条件下,对降糖宁溶液进行 LC-MS 分析,通过一级扫描质谱检测到疑似格列本脲峰的准分子离子,其质荷比与格列本脲对照品相同,对准分子做二级质谱分析,得到与对照品完全一致的碎片离子,相应图谱见图 3。

通过液相色谱保留时间、紫外光谱比对,以及进一步以三对离子 (m/z 494.150 9 \rightarrow 100.111 9, 494.150 9 \rightarrow 169.004 3, 494.150 9 \rightarrow 369.066 6) 作定性分析。结合准分子离子和二级质谱裂解碎片的信息,经与对照品比较,证实该降糖宁中含有格列本脲。



A. 一级质谱; B. 二级质谱(图 3 同)

图 2 格列本脲质谱

Fig. 2 MS-MS of gliburide

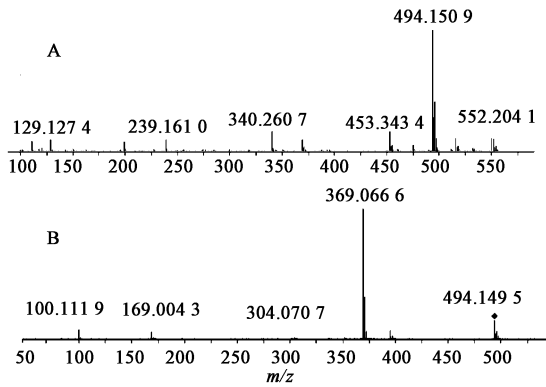


图 3 降糖宁疑似格列本脲峰质谱

Fig. 3 MS-MS of suspected gliburide peak in Jiangtangning

3 讨论

9 种对照品在各自浓度范围内,呈现良好的线性关系($r \geq 0.9999$),精密度、稳定性、检出限、定量限、回收率均符合规范,3 种中成药中,通过液相保留时间、紫外吸收光谱、质谱准分子离子及裂解碎片的确认,检测出降糖宁中非法添加了格列本脲。本文所建立的方法简便快速准确、经济实用,先通过高效液相确认药品中有无非法添加,再通过质谱对几种非法添加的成分进行鉴定。适用于上述 9 种降糖类化学成分的检测。

由于非法添加降糖类化学药品的种类多变,现有液相色谱方法还不能一次性完全检测出所有违规添加物,因此国家相继出台了多个补充检验方法(国家食品药品监督管理局药品补充检验方法和检验项目批准件 2009029,2011008,2013001),可以对

甲苯磺丁脲、格列本脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮、格列美脲、马来酸罗格列酮、瑞格列奈、盐酸吡格列酮、盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列波脲、盐酸丁二脲等 13 种非法添加的化学成分进行检测,这为中成药及相关的保健品中非法添加化学药品的检测方法的建立和完善提供了重要参考。本研究也是进一步完善了降糖中成药中非法添加物的检测标准和检测物,达到更佳检测结果,进一步提高了检测水平^[7]。

另外值得注意的是,非法添加降糖类化学成分的中成药一般都不在正规渠道销售,而是通过网络、邮购等方式,药监部门很难进行有效监管。因此,主管部门应加大宣传力度,提高人民安全用药意识,引导人民购买正规来源的药品。同时,药监部门应加大查处非法经营行为,严惩无证经营、制假贩假、谋取暴利的违法分子,保障药品市场的稳定发展^[8]。

[参考文献]

- [1] 何琳,王凌. 色谱技术在检测中成药和保健食品中非法添加化学物质的应用研究进展[J]. 安徽医药, 2011, 15(10): 1306-1309.
- [2] 朱峰,阮丽萍,马永建,等. 超高效液相色谱-串联质谱联用法同时检测降糖类和减肥类保健品中 20 种非法添加的化学降糖药物[J]. 色谱, 2014, 32(1): 13-20.
- [3] 刘福艳,李军,谢元超,等. 中成药中非法添加化学药品的现状与分析检测对策[J]. 中国药事, 2008, 22(12): 1067-1069, 1071.
- [4] 陈祥辉,李文明,李艳清,等. 中成药非法添加化学成分检测方法研究进展[J]. 中医药导报, 2011, 17(6): 126-128.
- [5] 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.
- [6] 谢志浩. 健康产品中非法添加化学成分快速筛查方法理论与实践[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2011: 67.
- [7] 杨峥嵘. 保健食品中非法添加化学药品检测方法研究进展[J]. 医药导报, 2013, 32(9): 1190-1194.
- [8] 黄海燕,饶伟文,钟建理. 降糖类中成药和保健食品中非法添加化学药品的研究概况[J]. 中国药业, 2014, 23(5): 94-96.

[责任编辑 顾雪竹]