

液相色谱—质谱联用法检测 2 种中药降糖制剂中非法掺入的二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲

刘福艳¹, 谢元超¹, 刘福强², 王文笙³, 刘广桢¹

(1 山东省药品检验所 济南 250101; 2 山东省邹城市中心店镇食品药品监督管理局

邹城 273512; 3 山东鲁抗医药股份有限公司, 济宁 272021)

摘要 目的: 建立检测降糖类中成药中非法掺入化学合成降糖药的专属性方法。方法: 采用液相色谱—电喷雾质谱联用法。液相色谱: 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈; 流动相 B 为 0.02 mol·L⁻¹ 醋酸铵 (1000 mL 含冰醋酸 1.0 mL); 流动相 C 为甲醇, 梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C。质谱: 电喷雾电离源 (ESI) 正离子检测; 质荷比范围 m/z 40~600 干燥气温度 350 °C; 干燥气流速 10 L·min⁻¹; 干燥气压力 276 kPa 源电压为 5 kV。通过相对分子质量、一级、二级质谱碎片信息、液相色谱保留时间和紫外光谱四方面的信息, 对降糖类中成药的提取液进行定性鉴别和定量测定。结果: 3 批降糖类中成药, 1 批被检测到同时掺有二甲双胍和格列本脲, 1 批被检测到同时掺有苯乙双胍和格列本脲, 1 批未检出。结论: 该方法选择性强, 灵敏度高, 可作为分析中药降糖制剂中非法掺入二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪和格列本脲的有效检测方法。

关键词: 液相色谱—离子阱质谱联用; 中药降糖制剂; 二甲双胍; 苯乙双胍; 格列吡嗪; 格列本脲

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0440-05

LC-MS determination of metformin, phenformin, glipizide and glyburide illegally mixed into two kind of antidiabetic Preparations of Traditional Chinese medicine

LIU Fu-yan¹, XIE Yuan-chao¹, LIU Fu-qiang², WANG Wen-sheng³, LIU Guang-zhen¹

(1 Shandong province Institute for Drug Control Jinan 250101, China; 2 Shandong province Zoucheng city zhongxindian town food and drug administration, zoucheng 273512, China; 3 Shandong Lukang Pharmaceutical Co. Ltd, Jinan 272021, China)

Abstract Objective To develop a specific method for the identification of metformin, glyburide, glipizide and phenformin illegally added into Chinese medicine antidiabetic preparations. **Methods** The liquid chromatography—ion trap mass spectrometry method was used. LC: Agilent C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisting of acetonitrile (phase A), 0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate (per 1000 mL contains 1.0 mL acetic acid, phase B), and methanol (phase C) with gradient elution, a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, column temperature 25 °C. MS: positive electrospray ionization (ESI⁺) and two scan modes including full scan MS and full scan MS-MS, the scanning range of 40~600 m/z , the drying gas temperature of 350 °C, the drying gas flow rate of 10 L·min⁻¹, the drying gas pressure of 276 kPa, the ionization voltage of 5 kV. After separated by HPLC, the organic extraction of Chinese medicine preparations was analyzed. The obtained pseudomolecular ions, fragment ions and retention time were used to identify and determine the four drugs by comparison with reference substances. **Results** Three traditional Chinese medicine preparations were identified. One was mixed by Metformin and Glyburide, another was mixed by Phenformin and Glyburide and another was not found illegally mixed. **Conclusion** The method is specific, sensitive, accurate, thus may be used to detect the illegal traditional Chinese medicine antidiabetic preparations.

Key words HPLC-MS; traditional Chinese medicine antidiabetic preparations; metformin; phenformin; glipizide; glyburide

中药是我国的传统医学宝藏, 由于其源于天然产物, 毒副作用小, 深受老百姓的欢迎。众所周知, 中药

制剂具有治疗周期相对较长,起效相对较慢的特点,常用于慢性病的治疗调理。糖尿病是我国发病率较高的慢性病,降糖中药制剂具有比较广泛市场空间。近年来,一些不法分子利用人们对降糖类中药及其制剂的偏爱,为增加产品的功效,在制剂中非法添加化学合成降糖药,这些化学降糖药在有效控制血糖的同时也具有一定的毒副作用,如苯乙双胍可引起糖尿病乳酸性酸中毒,病死率高达 50% ~ 80%,且症状体征无特异性,一旦确诊,病情严重,治疗困难,美国 FDA 早已禁止用于临床,我国糖尿病协会也禁止 60 岁以上的老年人服用苯乙双胍^[1,2]。若患者在不知情的情况下长期大量服用此类非法掺入化学降糖药的所谓中药制剂,可能造成严重的不良反应,甚至会危害患者的生命。因此,有必要建立灵敏、可靠的分析方法对降糖类中成药掺入的化学合成药进行鉴定。液相-质谱联用技术由于其专属性强,灵敏度高的优点,越来越多地应用于中成药或保健品非法添加药物成分的鉴别,成为打假治劣的一把利剑。液质联用技术用于鉴定中药降糖制剂中非法掺入苯乙双胍、格列齐特^[1]、格列本脲^[3]的方法研究陆续见报道,但是同时检测几种化学降糖药的方法尚不多见,本文建立了高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用法可同时对中药制剂中是否非法掺入二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲进行快速、准确的判断。

1 材料与仪器

盐酸二甲双胍对照品(批号:10064-200401),格列本脲对照品(批号:100135-200404),格列吡嗪(批号:100281-200001)均由中国药品生物制品检定所提供。盐酸苯乙双胍原料(99.0%)由潍坊制药厂提供。3批不同厂家的降糖类中成药“降糖宁胶囊”(批号:20060712)“甘露消渴胶囊”(批号:20060501)“降糖舒片”(批号:061001)分别由济南市食品药品监督管理局稽查大队、枣庄市食品药品监督管理局稽查大队和淄博市食品药品监督管理局抽样提供。甲醇、乙腈为色谱纯(天津康科德科技有限公司),乙酸铵、冰醋酸为分析纯,(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。

Agilent 1200-6320 离子阱液质联用仪,配有 1200 系统(四元泵、自动进样器、柱温箱)、二极管阵列检测器(DAD)电喷雾离子化源(ESI)、数据处理系统。

2 实验方法

2.1 HPLC 条件 色谱柱:Agilent C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈;流动相 B 为 0.02 mol·L⁻¹ 醋酸铵(1000 mL 含冰醋酸 1.0 mL);流动相

C 为甲醇;流速:0.4 mL·min⁻¹,线性梯度洗脱(见表 1),检测波长:235 nm,柱温:25 °C;进样量 10 μL。

表 1 流动相洗脱程序

Tab 1 Gradient elution fraction

时间 /min (time)	流动相 A % (mobile phase A)	流动相 B % (mobile phase B)	流动相 C % (mobile phase C)
0	20	60	20
2	20	60	20
5	68	24	8
15	68	24	8
16	20	60	20
25	20	60	20

2.2 MS MS-MS 条件 电喷雾离子化正离子检测方式(ESI⁺)质荷比范围: m/z 40~600 干燥气温度:350 °C;干燥气流速:10 L·min⁻¹;干燥气压力:276 kPa 源电压:5 kV;毛细管温度:275 °C,毛细管电压:15 V。采用全扫描一级质谱、选择离子二级全扫描质谱检测方式。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液 取上述 4 种对照品适量用稀释液溶解配制成 250 μg·mL⁻¹ 的溶液作为对照品储备溶液,稀释液为 0.02 mol·L⁻¹ 醋酸铵-0.1% 醋酸水溶液-乙腈-甲醇(60:20:20);另各取 5 mL 定容至 25 mL 作为混合对照溶液。

2.3.2 供试品溶液 取“降糖宁胶囊”或“甘露消渴胶囊”各 10 粒,将内容物混合均匀,取“降糖舒片”10 片,混合后研细,精密称取相当于 4 粒(片)的样品细粉,置 100 mL 量瓶中,加入流动相稀释液约 80 mL,超声(600 W, 40 kHz)提取 10 min,放冷至室温,静置约 10 min 用稀释液稀释至刻度,取上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤,取滤液稀释 10 倍后用于 HPLC、MS/MS/MS 分析。

3 实验结果

3.1 盐酸二甲双胍、格列本脲、格列吡嗪、苯乙双胍对照品的色谱、光谱及质谱行为

采用正离子检测方式对盐酸二甲双胍、格列本脲、格列吡嗪、苯乙双胍 4 种对照品溶液进行 HPLC、MS 和 MS-MS 分析,4 种对照品保留时间分别为:二甲双胍 3.9 min,苯乙双胍 5.9 min,格列吡嗪 10.7 min,格列本脲 12.5 min。准分子离子峰 $[M+H]^+$ 质荷比(m/z)分别为:二甲双胍 130,苯乙双胍 206,格列吡嗪 446,格列本脲 494。选择 $[M+H]^+$ 进行二级全扫描质谱(MS/MS)分析,产生的碎片离子峰 m/z 分别为二甲双胍 60,苯乙双胍 60 和 164,格列吡嗪 321,格列本脲 369。其一、二级全扫描质谱图与质谱裂解途径如图 1 所示:

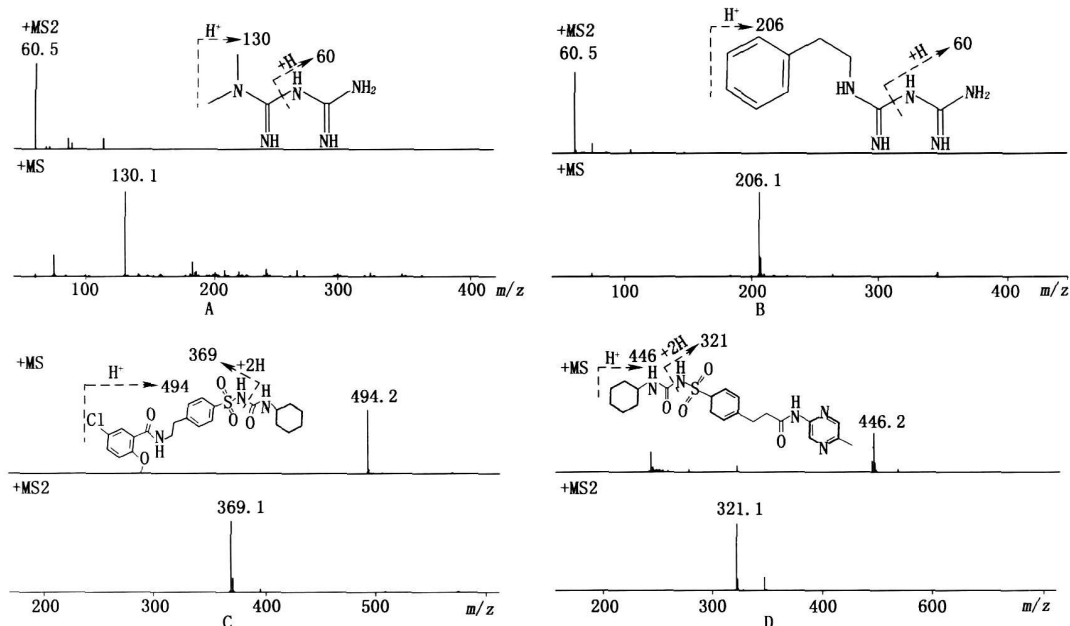


图 1 对照品的一、二级全扫描质谱图与质谱结构式裂解

Fig 1 The full scan MS, MS² spectrum and the fragmentation of reference substance

A. 二甲双胍 (metformin) B. 苯乙双胍 (phenformin) C. 格列本脲 (glyburide) D. 格列吡嗪 (glipizide)

3.2 样品的定性检测

在相同的色谱及质谱条件下对 3 批降糖类中成药的提取液进行 HPLC、MS 和 MS-MS 分析,“降糖宁胶囊”和“甘露消渴胶囊”均检测到格列本脲的准分子离子即 m/z 369, 对 m/z 369 进行二级全扫描质谱分析,产生与格列本脲对照品完全一致的碎片离子。“降糖宁胶囊”同时检测到二甲双胍的准分子离子即 m/z 130, 对 m/z 130 进行二级全扫描质谱分析,产生与二甲双胍对照品完全一致的碎片离子。“甘露消渴胶囊”同时检测到苯乙双胍的准分子离子即 m/z 206, 对 m/z 206 进行二级全扫描质谱分析,产生与二甲双胍对照品完全一致的碎片离子。且紫外光谱、液相色谱保留时间均与相应的对照品一致,相应的谱图见图 2。

结合紫外光谱、液相色谱保留时间、准分子离子和二级质谱裂解碎片四方面的信息,可以证实 3 批降糖类中成药中,“降糖宁胶囊”被非法掺入二甲双胍和格列本脲,“甘露消渴胶囊”被非法掺入苯乙双胍和格列本脲,“降糖舒片”未掺入,结果为阴性。

3.3 线性关系考察

取对照品储备溶液用稀释液制备含二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲浓度分别为 50, 25, 10, 5, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照溶液,分别取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,依据对照品溶液

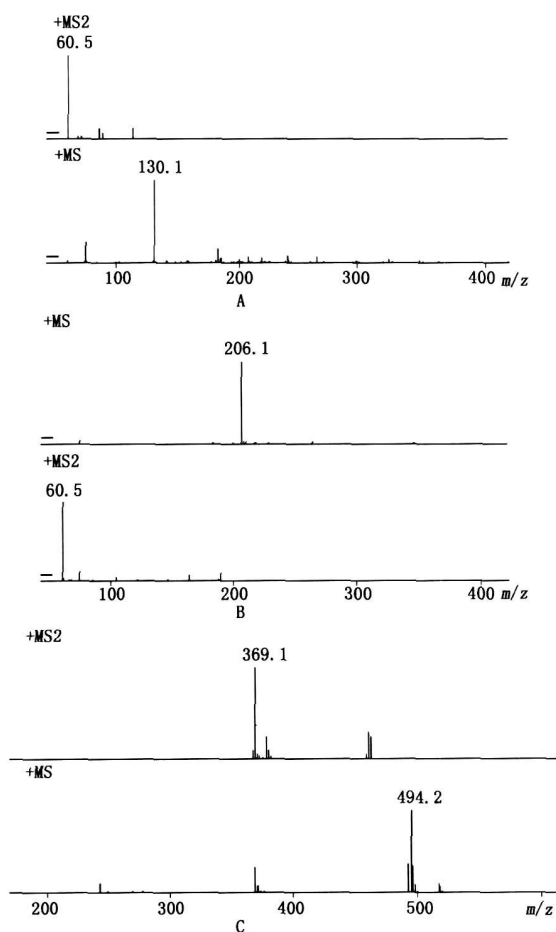


图 2 样品监测典型的一、二级全扫描质谱图

Fig 2 The typical full scan MS, MS² spectrum of sample solution

A. 二甲双胍 (metformin) B. 苯乙双胍 (phenformin) C. 格列本脲 (glyburide)

浓度和液相色谱紫外检测峰面积, 以对照品溶液的峰面积为纵坐标, 以对照品溶液浓度为横坐标, 用加权最小二乘法 (权重系数 $1/x^2$) 进行线性回归, 得到二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲的标准曲线分别为:

$$Y = 260.39X - 228.27, r = 0.9997,$$

$$Y = 211.52X - 134.95, r = 0.9995,$$

$$Y = 117.84X - 22.817, r = 0.9999,$$

$$Y = 127.75X - 52.615, r = 0.9991,$$

线性范围分别为: $1.0 \sim 50.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1.1 \sim 55.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1.0 \sim 50.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1.0 \sim 50.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明, 线性关系良好。

3.4 进样精密度试验

取 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照溶液, 连续进样 6 次, 考察 4 种对照品溶液的峰面积, 测得二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲峰面积的 RSD 分别为: 1.2%, 0.9%, 1.5% 和 1.9%。

3.5 最低检测限与定量限

按信噪比 3:1 计, 二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲的最低检测限分别为: 2.8, 1.8, 1.0 和 1.1 ng。按信噪比 10:1 计, 二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲的定量限分别为: 9.2, 5.9, 3.3 和 3.6 ng。

3.6 阳性样品的测定

精密取“2.3”项下供试品溶液各 10 μL 进样分析, 按外标法以峰面积计算含量。色谱图见图 3 结果见表 2。

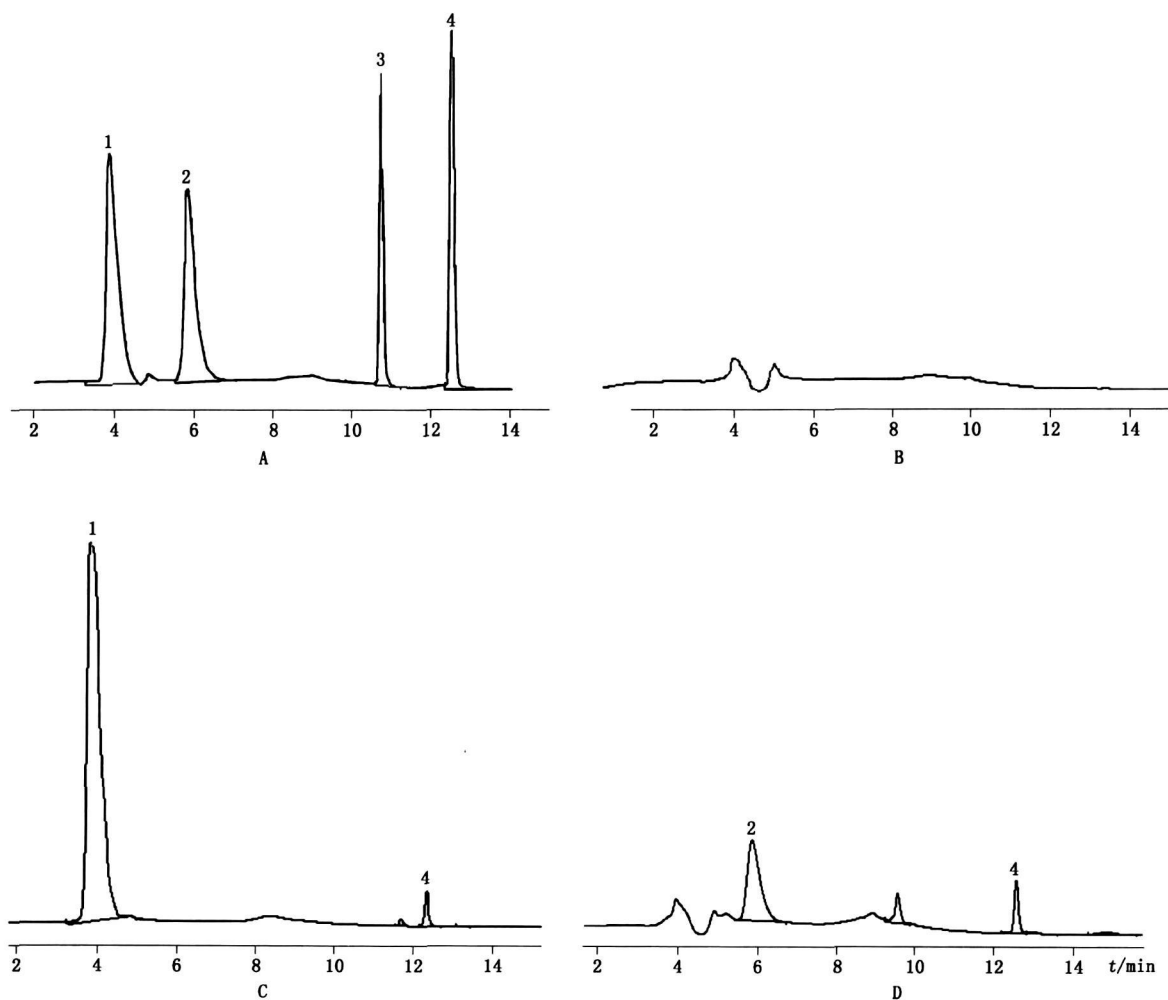


图 3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

A. 对照品 (reference substance) B. 降糖舒片 (jiangtangshu tablets) C. 降糖宁胶囊 (jiangtangning capsules) D. 甘露消渴胶囊 (ganluxiaoke capsules)

1. 二甲双胍 (metformin) 2. 苯乙双胍 (phenformin) 3. 格列吡嗪 (glipizide) 4. 格列本脲 (glyburide)

表 2 3种中药制剂中二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪和格列本脲的含量 (mg 粒⁻¹, mg 片⁻¹, n= 2)

Tab 2 Contents of metformin, phenformin, glyburide and glibizide in three traditional Chinese medicine preparations (mg per capsule, mg per tablet)

制剂 (preparations)	二甲双胍 (metformin)	苯乙双胍 (phenformin)	格列本脲 (glyburide)	格列吡嗪 (glibizide)
降糖宁胶囊 (jiangtangning capsules)	83. 2	未检出 (not detected)	5. 2	未检出 (not detected)
甘露消渴胶囊 (ganluxiaoke capsules)	未检出 (not detected)	3. 9	1. 5	未检出 (not detected)
降糖舒片 (jiangtangshu tablets)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)

4 讨论

4.1 方法的专属性 中药制剂中通常含有多种中药, 每种药材均含有多种组分, 采用紫外检测法或荧光法对中药提取物进行检测时, 由于选择性不强, 在干扰组分多的情况下, 对待测物的色谱分离提出了更高的要求, 单凭色谱保留时间判断, 容易出现假阳性结果。采用本文液相色谱-离子阱质谱联用法, 如果待测物中有相应的色谱峰, 则可进一步检测二极管阵列的紫外光谱, 并与对照品的二极管阵列紫外光谱相比较, 若光谱一致, 再进一步通过电喷雾进样, 观察是否含有对照品的准分子离子峰和二级质谱裂解碎片, 以便确定此保留时间的色谱峰为阳性, 如果紫外光谱、准分子离子峰和二级质谱裂解碎片和对照品不一致, 则可推断该色谱峰是保留时间一致的假阳性结果。ESI属于软电离技术, 其一级质谱一般获得准分子离子峰, 通过二级质谱检测, 可以对供试品进行结构确证, 大大提高了检测的专属性。

4.2 梯度洗脱条件的选择 虽然本文采用的液相色谱-离子阱质谱联用法可以通过对质荷比的筛选获得复杂基质中单一组分的色谱图, 不需要实现其与干扰组分间完全的色谱分离, 但是考虑到在打假实际工作中, 为了更好地提供确凿的证据, 我们在建立方法时优化了 HPLC 的洗脱条件, 使液相色谱条件有较强的专属性, 能够满足定性和定量的需要。因为涉及到二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲这 4 种化学降糖药, 所以选择适当的流动相和色谱条件使 4 种化学成分均取得良好的分离成为优化 HPLC 条件的关键, 作者分别对流动相 A、流动相 B 和流动相 C 进行不同的配比试验, 综合比较各色谱峰理论塔板数、分离度等方面的因素, 结果以“2. 1”所述的梯度洗脱条件最佳。

4.3 波长的选择 通过二极管阵列检测器在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描, 二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲这 4 种化学降糖药在 235 nm 均有比较理想的色谱峰响应值, 故选用 235 nm 为检测波长。

5 结语

本文通过 LC/MS 技术将高效液相色谱的高分离能力和质谱分析的高选择性相结合, 建立了鉴别降糖类几种中药制剂中非法掺入二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲的分析方法, 结合相对分子质量、一级、二级质谱碎片信息、液相色谱保留时间和紫外光谱四方面的信息, 增强了检测结果的可信度。该方法灵敏度高, 选择性强, 对打击降糖类中药制剂非法添加西药成分的制假行为, 保证人民群众用药安全具有现实意义。

参考文献

1 WANG Tie-jie(王铁杰), QU Ying-heng(邱颖恒), LI Yu-lan(李玉兰), et al. Detection of phenformin and glibizide illegally mixed into traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations by LC-QMS(液相色谱-串联四极杆质谱联用法测定中药降糖制剂中非法掺入的苯乙双胍和格列齐特的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(12): 1453

2 CHEN Zhi-song(陈志松). Eight case of old patients diabetes mellitus lactic acidosis due to phenformin(苯乙双胍致老年人糖尿病乳酸性酸中毒 8 例). *People's mil surg*(人民军医), 2001, 44(12): 714

3 SUN Yu-ming(孙玉明), SUN Ling-ling(孙苓苓), ZHONG Da-fang(钟大放). Detection of glyburide in traditional Chinese medicine by liquid chromatography-mass spectrometry method(液相色谱-质谱联用法检测某些中药制剂中的格列本脲). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(3): 326

(本文于 2008 年 12 月 6 日修改回)