

# LC-MS/MS测定中成药制剂中 12种口服降糖药

潘炜, 郑顺利, 毛希琴, 于利军, 董广彬

(大连市产品质量监督检验所, 大连 116021)

**摘要** 目的: 建立液相色谱-串联四级杆质谱的分析方法, 以对中成药制剂及其包装胶囊壳中的 12种口服降糖药进行快速筛查、定性识别和准确定量。方法: 被添加在中成药制剂及其包装物中的二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、吡格列酮、格列吡嗪、瑞格列奈、甲苯磺丁脲、格列齐特、格列苯脲、那格列奈、格列美脲、格列喹酮等西药成分用 80% 甲醇提取, 以 0.2% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相梯度洗脱, 在 ACQUITY UPLC DBH C<sub>18</sub> 色谱柱上分离, 串联四级杆质谱检测, MRM 方式采集并定量。结果: 除二甲双胍的线性范围较窄外, 其余 11 种化合物都表现出良好的线性范围和相关性 ( $0.0025 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $r \geq 0.9959$ ), 用 3 个浓度 ( $0.005, 0.01, 5 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 进行精密度和回收率实验, 6 次测定的 RSD 为 1.7% ~ 11.4%, 回收率 93.2% ~ 109.7%, 最低定量限 (LLOQ) 规定为添加回收试验中  $S/N \geq 10$  的最低添加浓度, 其范围  $0.005 \sim 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 本法可用于中成药制剂中口服降糖药的定量检验。

**关键词:** 中成药制剂; 口服降糖药; 液相色谱串联质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0569-06

## LC-MS/MS determination of 12 antidiabetic agents in traditional Chinese medicine preparation

PAN Wei, ZHENG Shun-li, MAO Xi-qin, YU Li-jun, DONG Guang-bin

(Dalian Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Dalian 116021, China)

**Abstract Objective** To develop a highly selective LC-MS/MS method using a tandem quadrupole mass spectrometer detector for rapid screening, identification and quantification of 12 antidiabetic agents added in the traditional Chinese medicine preparations. **Methods** Gliclazide, gliclazide, glyburide, glibenclamide, gliquidone, repaglinide, nateglinide, pioglitazone, rosiglitazone, metformin, phenformin and tobutamide added in the blank ground samples were extracted with 80% methanol and were separated from an ACQUITY UPLC DBH C<sub>18</sub> column with a gradient mobile phase of 0.2% formic acid water solution (A) - acetonitrile (B). A tandem quadrupole mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used in positive ion mode; multiple reaction monitoring (MRM) was performed to quantify above mentioned compounds. **Results** Eleven linear calibration curves were obtained in the concentration range of  $0.0025 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  with  $r \geq 0.9959$  except that metformin calibration curve were in narrow range. Accuracy and recovery were determined at three concentration ( $0.005, 0.01, 5.0 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), RSD ( $n = 6$ ) was 1.7% - 11.4% in accuracy and 93.2% - 109.7% in recovery. The lowest limits of quantification (LLOQ) were defined as the lowest concentration giving the signal-to-noise  $\geq 10:1$ , the data were from  $0.005$  to  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . **Conclusion** The results indicate that the method can be used in quantification measure of antidiabetic agents added in traditional Chinese medicine preparations.

**Key words** traditional Chinese medicine preparation; antidiabetic agent; LC-MS/MS

双胍类、磺酰脲类、胰岛素增敏剂和餐时血糖调节剂等口服降糖药因其服用后起效迅速、降糖作用显著而被广泛添加到中成药制剂中或制成中西药复方制剂, 亦有置入中成药胶囊的囊壳材料中而起作用

的, 这种现象已受到社会关注。已有几项研究针对中成药和保健品中的降糖药的测定<sup>[1-4]</sup>, 多为定性测定或是某类降糖药的定量测定, 目前关于中成药中的西药成分测定未见较为全面的文献方法和调查

数据。这些西药成分可采用液相色谱/紫外检测器法(或二极管阵列检测器)来测定,但由于中成药成分复杂,进行色谱/光谱测定时本底吸收高、易产生干扰,用液相色谱/光谱法识别与鉴定中成药中的西药成分有很多困难,极易导致错误结果。应用液相色谱/串联质谱法进行中成药及其包装材料中西药成分的测定,可同时检测出这4类共12种口服降糖药成分,方法灵敏,准确可靠。

## 1 仪器、药品与试剂

**1.1 仪器** 超高效液相色谱/串联质谱仪:美国 Waters 公司 ACQUITY Ultra Performance LC™ 超高效液相色谱仪, Waters Quattro Premier 串联四极杆质

谱仪,工作站软件 Masslynx 4.1。

**1.2 药品与试剂** 二甲双胍(metformin, Met)、苯乙双胍(phenformin, Phe)、吡格列酮(pioglitazone, Pio)、格列吡嗪(glipizide, Gli)、瑞格列奈(repaglinide, Rep)、格列齐特(gliclazide, Glic)、格列苯脲(glyburide, Glyb)、格列美脲(glimepiride, Glim)、格列喹酮(gliquidone, Gliq)等化学对照品,购自中国药品生物制品检定所。甲苯磺丁脲(tolbutamide, Tol)、罗格列酮(rosiglitazone, Ros)、那格列奈(nateglinide, Nat)等标准物购自 Sigma 公司。12种口服降糖药的化合物分子式、单同位素相对分子质量、化学结构图和 CAS 登录号等信息参见图 1。

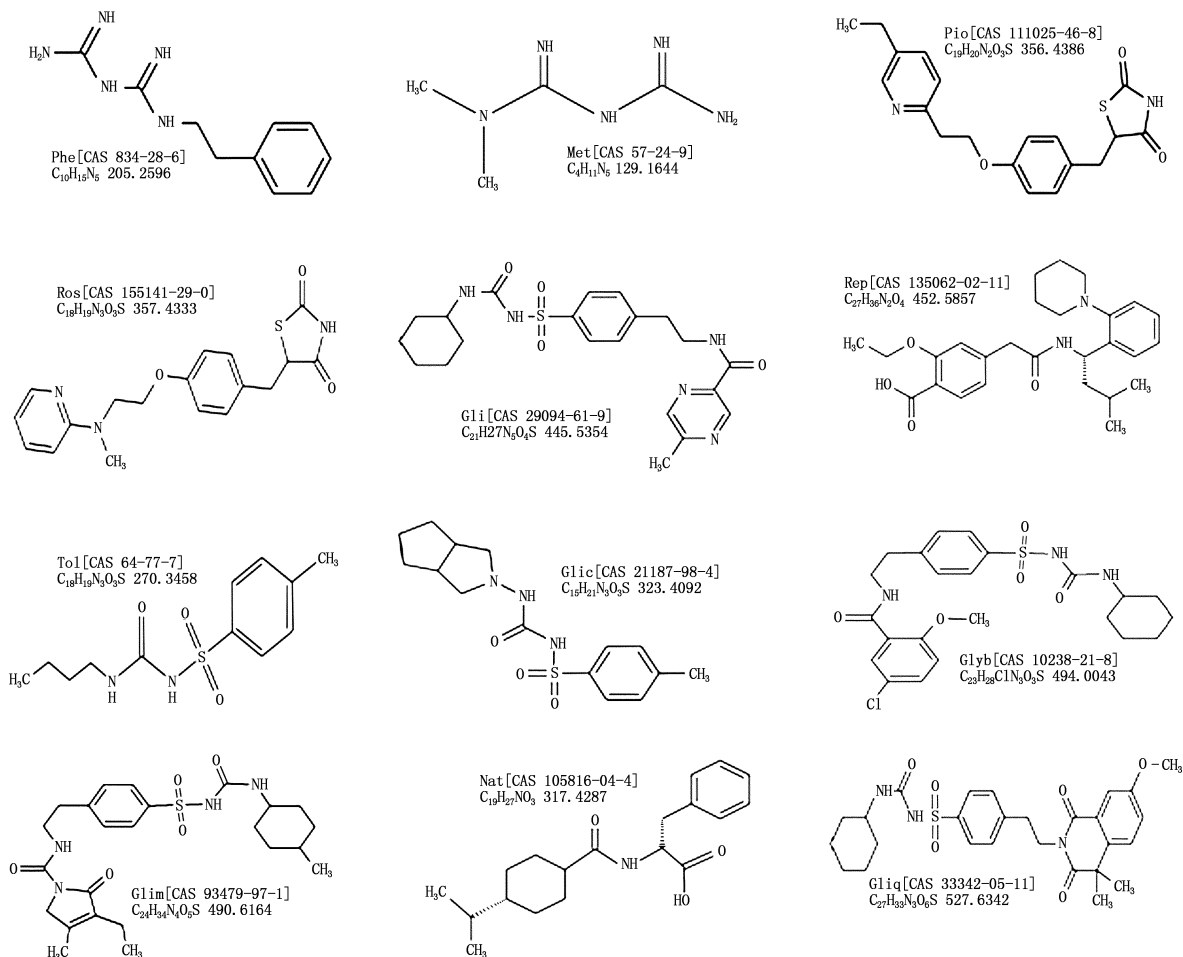


图 1 12种降糖药分子式、单同位素相对分子质量、化学结构图和 CAS 号

Fig 1 The formula mono-isotope relative molecular mass, chemical structure and CAS No. of 12 antidiabetic agents

所用试剂均为色谱纯,分析用水为  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ,市售中成药制剂购自大连市、沈阳市药店及专卖店。

## 2 溶液制备

**2.1 对照品溶液** 准确称取二甲双胍对照品 5.00 mg,其余各对照品称取 2.50 mg,用甲醇分别溶解定

容至 25.0 mL 为对照品储备液。分别移取对照品储备液各 1 体积,与 8 体积甲醇混合后为对照品混合溶液。准确移取对照品混合溶液 0.05、0.10、0.50、1.0、5.0、10.0 mL,用 80% 甲醇溶液定容至 100.0 mL。二甲双胍的标准曲线浓度为: 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,其余化合物标准曲线浓度均为:

0.0025 0.005 0.025 0.05 0.25 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 供试品溶液

取中成药片(丸)、胶囊内容物等,用样品捣碎机粉碎,称取 1.0 g(准确至 0.1 mg)于 100 mL 具塞三角瓶中,加 80% 甲醇 40 mL 在频率为 40 kHz 的超声波清洗器中提取 40 min 滤出提取液。用 80% 甲醇 40 mL 分 2 次重复提取残渣,合并 3 次提取液,用 80% 甲醇定容至 100.0 mL。经 0.2  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜过滤后,取滤液 2  $\mu\text{L}$  注入液相色谱/串联质谱仪测定。二甲双胍、苯乙双胍的校准曲线范围较窄,注意稀释提取液使待测物浓度在校准范围之内。

取胶囊剂包装壳,倒出胶囊内容物,用棉签擦净胶囊壳内附着的粉末,置于烘箱在 50  $^{\circ}\text{C}$  下干燥 2 h,用样品粉碎机粉碎成粉末(或剪成碎屑),称取 0.5 g(准确至 0.1 mg)于 50 mL 具塞三角瓶中,加甲醇 40 mL 在 90  $^{\circ}\text{C}$  水浴中回流提取 2 h 滤出滤液后,用甲醇 10 mL 分 2 次重复洗涤残渣,合并提取液和洗涤液于 50 mL 量瓶中并用甲醇补足至刻度。经 0.2  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜过滤后,取滤液 2  $\mu\text{L}$  注入液相色谱/串联质谱仪测定。

### 3 实验条件

**3.1 色谱条件** 色谱柱: ACQUITY UPLC DBH  $\text{C}_{18}$  (2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 0.2% 甲酸水

溶液(A), 乙腈(B); 梯度洗脱(0~1.2 min, 25% B; 1.3~4 min, 35% B; 4.6~8.1 min, 47% B; 8.2~10.0 min, 80% B); 流速 0.2  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量 2  $\mu\text{L}$ ; 室温。

**3.2 串联质谱条件** 离子化模式: ESI(+); 离子源喷雾电压: 3.5 kV; 离子源温度: 110  $^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂气温度: 400  $^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂气流量: 600  $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 锥孔反吹气流量: 60  $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 采集方式: 多反应监测(MRM)。

### 4 结果和讨论

**4.1 色谱条件的优化** 双胍类口服降糖药水溶性较好,而磺酰脲类、胰岛素增敏剂和餐时血糖调节剂等口服降糖药醇溶性较好。在  $\text{C}_{18}$  反相色谱系统中,双胍类物质保留较弱,从柱上流出较快,通常采用离子对色谱法增加其在  $\text{C}_{18}$  柱上的保留,其余 3 类物质在  $\text{C}_{18}$  柱上保留行为合适。为了能在 1 种色谱条件下同时检测这 4 类物质,本实验弱化色谱柱的分离,利用质谱检测的专属性,仅在流动相中添加辅助离子化作用的甲酸,调整了 0.2% 甲酸水溶液-乙腈二元梯度,完成了 12 种成分的分离,二甲双胍是唯一的出峰较早可能受中药内源物质干扰的化合物,也借助质谱的选择性提取离子获得有效确证。采用同一色谱系统进行 4 类药物的分离,提供了监测工作方便快捷的手段。

表 1 12 种口服降糖药的质谱检测参数

Tab 1 The ESI-MS-MS spectral data for the 12 antidiabetic agents

化合物 (compound)	保留时间 (retention time) / min	母离子 (parent ion) $m/z$	锥孔电压 (cone voltage) $V$	子离子 (daughter ions) $m/z$	碰撞能量 (collision energy) $eV$
Met	0.63	130 $[M+H]^+$	21	71.2 84.9	20 20
Phe	0.90	206 $[M+H]^+$	23	60.2 105.0	20 25
Ros	1.36	358 $[M+H]^+$	30	93.9 134.9	35 25
Pib	1.95	357 $[M+H]^+$	20	119.0 134.1	45 30
Glp	4.65	446 $[M+H]^+$	20	167.1 321.3	30 15
Rep	4.80	453 $[M+H]^+$	20	162.1 230.2	20 25
Tol	5.11	271 $[M+H]^+$	20	90.8 154.8	30 15
Glic	6.11	324 $[M+H]^+$	25	110.2 127.2	20 18
Glyb	7.96	494 $[M+H]^+$	20	169.0 369.2	35 15
Nat	8.45	318 $[M+H]^+$	20	124.9 165.8	15 15
Glm	8.72	491 $[M+H]^+$	20	126.1 352.3	30 15
Gliq	9.43	528 $[M+H]^+$	25	386.1 403.3	20 15

**4.2 质谱条件的优化** 优化了质谱检测中毛细管电压 (capillary voltage)、锥孔电压 (cone voltage)、碰撞能量 (collision energy)、脱溶剂气流速和温度 (desolvation gas flow, desolvation gas temp)、锥孔气流速 (cone gas flow) 等参数, 确定灵敏度最高、稳定性和重现性最好的选择性提取离子作为定量离子 (quantification ion trace), 次之的作为辅助离子 (secondary

ion trace)。由此优化出 12 种口服降糖药的一级质谱的锥孔电压和二级质谱的碰撞能量参数, 见表 1 所示。对色谱峰按出峰时间进行分时采集, 最大程度增加了对提取离子的扫描时间 (dwell time), 使得多反应监测离子 (MRM) 谱图的灵敏度和重现性获得增强。12 种口服降糖药的选择提取离子 MRM 谱图如图 2 所示。

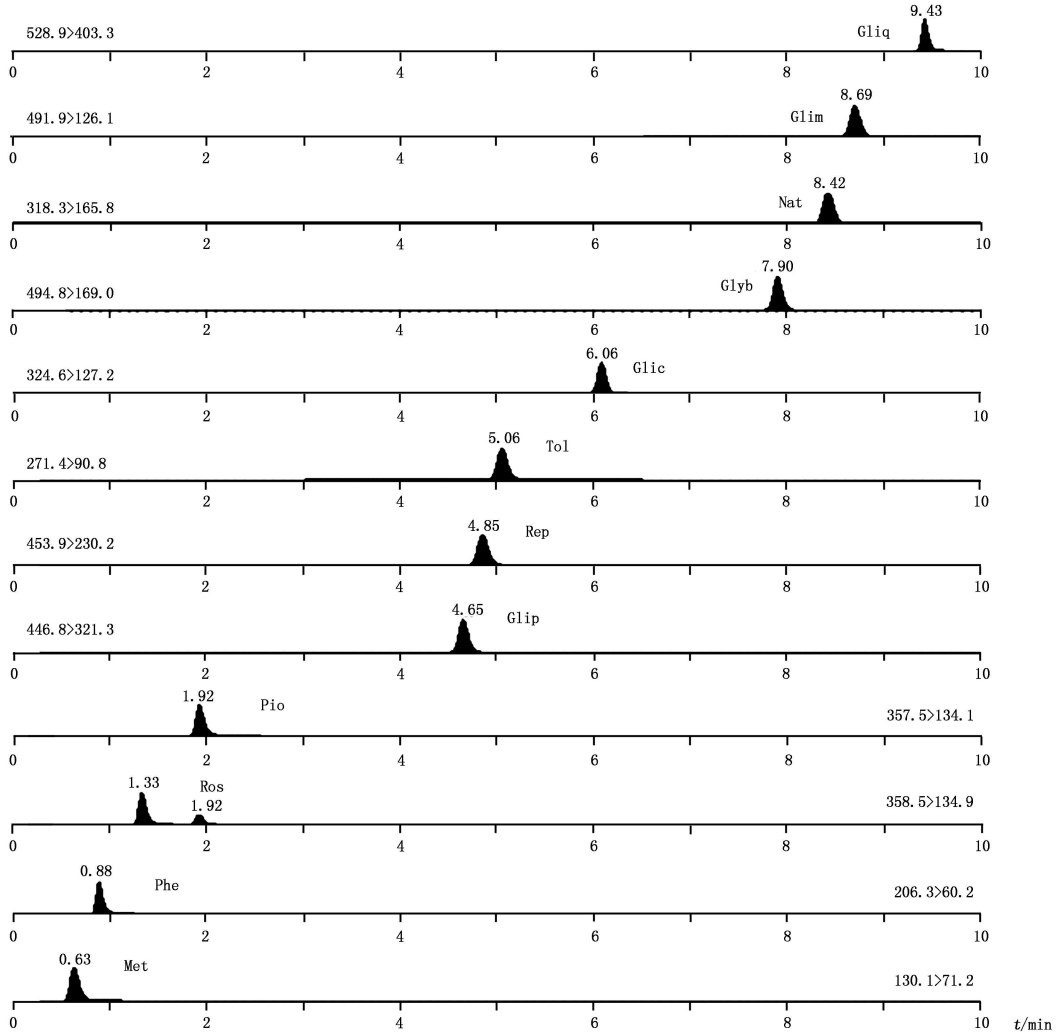


图 2 12 种口服降糖药的提取离子谱图

Fig 2 The typical MRM chromatograms of 12 antidiabetic agents

**4.3 标准曲线、回收率、检出限、精密度**

取“2.1”项所述的对照品溶液进行测定, 在本文条件下, 盐酸二甲双胍的检测灵敏度相对较低, 标准曲线浓度范围也较窄:  $0.005 \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其余化合物标准曲线范围:  $0.0025 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。12 种口服降糖药的标准曲线方程和相关系数见表 2。

回收率、检出限、精密度方法参数的确认用空白基质加标回收试验来完成。以不含任何西药成分的中药粉末为空白基质, 将标准混合溶液按  $0.002, 0.1, 5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  3 个水平定量加入空白基质中, 挥干溶剂后置于烘箱中  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  干燥 2 h, 按上述方法提取并测定, 以标准曲线外标法计算测定结果。回收率以测定量对加入量的百分比值计; 最低定量限 (LLOQ)

表 2 12种降糖药定量离子、线性范围、标准曲线方程和相关系数

Tab 2 The linearity and coefficient of correlation about 12 antidiabetic agents

化合物 (compound)	定量离子对 (quantification ion trace)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Met	130.1 > 71.2	$Y = 702.26X - 915.61$	0.9959	0.005~0.1
Phe	206.3 > 60.2	$Y = 2099.0X - 691.91$	0.9987	0.0025~0.5
Ros	358.5 > 134.9	$Y = 933.69X - 1406.9$	0.9985	0.0025~0.5
Pib	357.5 > 134.1	$Y = 1804.6X - 854.39$	0.9972	0.0025~0.5
Glip	446.8 > 321.3	$Y = 279.32X - 985.27$	0.9986	0.0025~0.5
Rep	453.9 > 230.2	$Y = 1207.7X - 2053.9$	0.9993	0.0025~0.5
Tol	271.4 > 90.8	$Y = 628.57X - 1450.0$	0.9993	0.0025~0.5
Glic	324.6 > 110.2	$Y = 651.50X - 114.10$	0.9987	0.0025~0.5
Glyb	494.8 > 169.0	$Y = 343.91X - 524.55$	0.9994	0.0025~0.5
Nat	318.3 > 165.8	$Y = 479.04X - 658.57$	0.9992	0.0025~0.5
Glin	491.9 > 352.3	$Y = 289.80X - 144.81$	0.9998	0.0025~0.5
Gliq	528.9 > 403.3	$Y = 388.46X - 33.20$	0.9996	0.0025~0.5

为化合物定量离子  $SN \geq 10$  时的最小添加量; 每水平进行了 6 次平行实验, 以测出量的 RSD 表示方法精密度。观察 3 个水平的添加回收实验时, 低水平 ( $0.002 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 添加时可检出, 但不能定量回收, 可能与微细中药粉末的吸附有关。中水平 ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 和高水平 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的添加均获得好的回收率。中、高水平添加量相当于大部分市售中成药中降糖西药的检出含量。方法回收率、检出限、精密度情况见表 3。胶囊壳中的西药成分是在囊壳生产工艺中加入的, 因难以模拟实际工艺, 未设计回收试验, 仅将其制成细粉或碎屑, 用甲醇回流提取, 可满足实际样品的检测。

4.4 样品本底和干扰 按“2.2”项的方法分别对降糖中成药中常用的黄芪、茯苓、白术、黄连、大黄等中药和红色、黄色、蓝色、白色胶囊壳进行处理, 进样测定, 确定这些中药和胶囊溶出物及人工色素均不干扰测定。

4.5 实际样品测定 按“2.2”项的方法提取、标准曲线外标法定量测定了沈阳和大连市场上销售的降糖中成药制剂共 26 份, 对药片和药丸测定了制剂中的西药含量, 对胶囊则分别测定了内容物和胶囊壳中的西药含量, 有 14 份在药片、药丸、胶囊内容物和胶囊壳中查出口服降糖药共 5 种, 在药片和胶囊内容物中的西药成分主要是 2 种双胍类药物和格列苯脲, 只有 1 份药丸查出那格列奈。在胶囊壳中主要是甲苯磺丁脲, 有少量的格列苯脲, 其他种类的西药成分未检出, 测定结果见表 4。

表 3 12种口服降糖药的回收率、精密度、定量限

Tab 3 The accuracy, LLOQ and recoveries for the analysis of 12 antidiabetic agents

化合物 (compound)	添加水平 (add level) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	回收率 (recoveries) /%	RSD /%	定量限 (LLOQ) / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Met	0.002	55.8	2.3	0.2
	0.1	69.2	2.9	
	5.0	98.2	5.3	
Phe	0.002	46.2	5.8	0.1
	0.1	50.7	6.2	
	5.0	93.6	6.6	
Ros	0.002	96.7	3.9	0.05
	0.1	100.3	4.7	
	5.0	102.6	2.8	
Pib	0.002	90.9	3.9	0.01
	0.1	95.6	5.8	
	5.0	102.0	4.9	
Glip	0.002	100.1	3.7	0.05
	0.1	107.2	7.2	
	5.0	98.8	6.7	
Rep	0.002	77.1	3.1	0.005
	0.1	92.2	6.9	
	5.0	109.7	7.0	
Tol	0.002	92.1	5.2	0.05
	0.1	99.3	2.3	
	5.0	98.9	1.9	
Glic	0.002	98.4	1.7	0.05
	0.1	97.9	9.3	
	5.0	104.7	8.8	
Glyb	0.002	84.8	8.2	0.05
	0.1	107.4	6.9	
	5.0	93.2	10.2	
Nat	0.002	85.9	2.9	0.05
	0.1	93.6	6.7	
	5.0	99.8	3.4	
Glin	0.002	81.4	11.4	0.05
	0.1	107.6	5.5	
	5.0	95.7	6.1	
Gliq	0.002	80.0	5.6	0.05
	0.1	106.9	4.8	
	5.0	100.9	3.2	

表 4 样品实测结果 ( $\text{mg g}^{-1}$ )  
Tab 4 the detection results of the actual samples

样品 (sample)	生产厂商 (factory)	检出部分 (positive part)	Phe	Met	Tol	Glyb	Nat
药片 (tablet)	1 A	药片 (tablet)	2.0	—	—	0.88	—
药丸 (pill)	1 B	药丸 (pill)	3.0	0.68	—	0.55	—
	2 C	药丸 (pill)	—	23.4	—	—	0.42
胶囊 (capsule)	1 D	内容物 (content)	11.2	20.6	—	3.1	—
	2 E	内容物 (content)	—	—	—	0.57	—
	3 F	囊壳 (shell of capsule)	—	—	—	10.6	—
	4 G	囊壳 (shell of capsule)	—	—	108.9	—	—
	5 H	囊壳 (shell of capsule)	—	—	34.2	—	—
	6 I	囊壳 (shell of capsule)	—	—	47.6	—	—
	7 I-1	囊壳 (shell of capsule)	—	—	14.8	—	—
	8 I-2	囊壳 (shell of capsule)	—	—	26.4	—	—
	9 I-3	内容物 (content)	31.8	—	—	—	—
	10 J	内容物 (content)	—	4.6	—	—	—
	11 K	内容物 (content)	—	—	—	5.1	—

4.6 结论 本法对中成药制剂和包装囊壳中双胍类、磺酰脲类、胰岛素增敏剂和餐时血糖调节剂等口服降糖药的定量测定快速、灵敏、准确，一次提取和进样可完成多类多成分的筛查，可用于药品监督检测工作。

#### 参考文献

- ZHANG Zhe (张喆), GAO Qing (高青), YU Qian (余倩). Detection of anti-diabetic agents in traditional Chinese medicines and health care products by HPLC-MS/MS (中药制剂及保健品中违禁添加 9 种化学降糖药的 HPLC-MS/MS 定性检测). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2007, 38(1): 39
- GUO Ji-fen (郭继芬), CHEN Xiao-yan (陈笑艳), ZHONG Da-fang (钟大放). Analysis of six anti-diabetics by liquid chromatography-mass spectrometry (6 种口服降糖药的液相色谱-质谱分

析). *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2000, 19(6): 5

- 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
- WAN Chun-hua (万春华), NI Yong-nian (倪永年), LONG Zhou-xiong (龙洲雄). Simultaneous determination of six kinds of western medicine of reducing blood sugar by RP-HPLC (反相液相色谱法同时测定六种降血糖西药成分). *Mod Sci Instr* (现代科学仪器), 2006, (6): 89
- Hoizey G, Lamiable D, Trenque T, et al. Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry and library searching. *Clin Chem*, 2005, 51(9): 1666

(本文于 2008 年 7 月 8 日修改回)