

UPLC-MS/MS测定降糖类中成药及保健品中 11种化学药^{*}

杨钊, 陈安珍, 吴爱英, 李欣荣

(青岛市药品检验所, 青岛 266071)

摘要 目的: 建立一种测定降糖类中药制剂及保健品中添加 11种化学药的超高效液相-串联四级杆质谱方法。方法: 使用超高效液相-串联四级杆质谱的多反应监测(MRM)模式测定。以 Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱进行分离, 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液梯度洗脱, 流速: 0.2 mL·min⁻¹。离子化模式: ESI⁺。结果: 11种化学药测定的线性范围在 0.5~200.0 μg·L⁻¹ 之间, *r* 分别在 0.9976~0.9997 之间, 检出浓度分别在 0.1~3.6 ng·g⁻¹ 之间, 3个水平的回收率分别在 90.0%~118.7% 间。结论: 该方法快速、准确、灵敏, 可用于降糖类中药制剂及保健品中添加 11种化学药的测定。

关键词: 降糖; 中药制剂; 保健品; 超高效液相色谱; 串联四级杆质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2127-04

UPLC-MS/MS determination of eleven anti-diabetic chemical medicines in Chinese traditional patent medicine and health food^{*}

YANG Zhao, CHEN An-zhen, WU Ai-ying, LIX in-rong

(Qingdao Institute for Drug Control, Qingdao 266071, China)

Abstract Objective To establish a method for determination of 11 anti-diabetic medicines in traditional Chinese medicine preparations and health food by UPLC triple-quadrupole tandem mass spectrometer. **Method** Using UPLC-MS/MS to determine by multi-reactions monitoring (MRM) technology. The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column with a gradient mobile phase of methanol-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate with a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. Ion mode ESI⁺. **Results** The standard curves of the 11 chemical medicines showed good linearity over the concentration range of 0.5-200 μg·L⁻¹ and *r* = 0.9976-0.9997, respectively. The concentration of 11 chemical medicines were between 0.1-3.6 ng·g⁻¹ and the average recoveries were 90.0% - 118.7% at three levels. **Conclusion** The method is rapid and sensitive and suitable for the determination of 11 chemical medicines in traditional Chinese medicine preparations and health food.

Key words anti-diabetic; traditional Chinese medicine preparations; health food; UPLC; triple-quadrupole tandem mass spectrometer

糖尿病是一种以糖、脂肪和蛋白质代谢紊乱为特征的内分泌代谢性疾病。近年来, 随着人民生活水平的提高, 糖尿病的患病率在不断上升^[1]。在中成药和保健品中添加化学药的案例时有发生。目前用于检测降糖类中药制剂及保健品中添加化学药的高效液相-质谱联用法多采用对照法即将对照品的一级、二级质谱图与样品的对比以判定^[2,3] 检验结

果, 其选择性相对较差, 操作较烦琐。本文建立的超高效液相-串联四级杆质谱联用定性和定量检测降糖类中成药及保健品中添加 11种化学药的方法, 克服了已有方法的缺点, 是一种选择性强、灵敏度高、准确、快速的检测方法。

1 仪器与试剂

Acquity 超高效液相色谱仪 (UPLC, Quattro

* 山东省中青年科学家科研奖励基金 2006BS03037

第一作者 Tel: (0532) 85726847 E-mail: yangzhao1103@yahoo.com.cn

Premier XE 串联四极杆质谱仪, 美国 Waters 公司。

对照品盐酸二甲双胍 (批号 100664-200401、格列吡嗪 (批号 100281-200001、格列奇特 (批号 0269-9701、盐酸吡格列酮 (批号 100634-200401、格列苯脲 (批号 100135-200404、格列美脲 (批号 100678-200301、格列喹酮 (批号 100280-200301、马来酸罗格列酮 (批号 100952-200701、甲苯磺丁脲 (批号 100500-200801 和瑞格列奈 (批号 100753-200501 均购自中国药品生物制品检定所。盐酸苯乙双胍对照品 (批号 0373-G USP。降糖类中成药 30 批, 为监督抽检药厂的产品; 其他降糖类产品 15 批, 为个人送检的保健品、食品或非法医疗机构的产品。甲醇为 Merck 公司色谱纯试剂; 醋酸铵为 ACROS 公司分析纯试剂; 分析

用水为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm; 柱温: 35 °C; 流速: 0.2 mL · min⁻¹; 流动相: 甲醇 - 10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液梯度洗脱, 0~6.0 min 甲醇 53% → 70%, 6.0~7.5 min 甲醇 70% → 100%, 7.5~10.0 min 甲醇 100% → 55%; 进样量: 10 μL。

2.2 质谱条件 离子化模式: ESI⁺; 检测方式: 多反应检测 (MRM; 毛细管电压: 3.0 kV; 萃取锥孔电压: 4 V; 离子源温度: 110 °C; 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂气流量: 550 L · h⁻¹; 锥孔气流量: 50 L · h⁻¹; 氦气流量: 0.18 mL · min⁻¹; 取样锥孔电压及碰撞能量见表 1。

表 1 质谱参数

Tab 1 MS parameters

化合物 (compound)	母离子 (parent ion <i>m/z</i>)	碎片离子 (fragment ions <i>m/z</i>)	锥孔电压 (cone voltage /V)	碰撞能量 (collision energy /eV)
盐酸二甲双胍 (metformin hydrochloride)	130.10	85.11	27	13
		71.16 [*]	27	17
盐酸苯乙双胍 (phenformin hydrochloride)	206.27	164.18	32	16
		105.13 [*]	32	24
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	271.26	154.87	32	17
		171.93	32	12
格列奇特 (gliclazide)	324.47	110.15	37	20
		127.16 [*]	37	17
盐酸吡格列酮 (pioglitazone hydrochloride)	357.45	119.14	32	45
		134.16 [*]	32	28
马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate)	358.29	106.87	50	34
		134.92 [*]	50	25
格列吡嗪 (glipizide)	446.53	347.32	30	14
		321.36 [*]	30	13
瑞格列奈 (repaglinide)	453.50	161.98	44	20
		230.25 [*]	44	27
格列美脲 (glinapiptide)	491.62	126.15	32	25
		352.37 [*]	32	13
格列苯脲 (glibenclamide)	494.56	169.14	31	37
		369.33 [*]	31	13
格列喹酮 (gliquidone)	528.51	167.14	32	30
		403.36 [*]	32	12

注 (note): * 标注代表定量离子 (means quantification ion)

2.3 对照品溶液的制备 取对照品盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、甲苯磺丁脲、格列奇特、盐酸吡格列酮、马来酸罗格列酮、格列吡嗪、瑞格列奈、格列美脲、格列苯脲和格列喹酮 13.62, 14.71, 10.68, 15.09, 12.39, 9.90, 12.88, 10.33, 14.86, 15.26

13.25 mg 精密称定, 分别置 11 个 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成对照品储备液并保存于冰箱中。分别精密量取上述 11 种对照品储备液适量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得每 1 mL 含 100 μg 的混合对照品储备液并保存于冰箱中。将上述

混合对照品储备液用甲醇 - 10 mmol·L⁻¹醋酸铵溶液 (1:1 稀释得每 1 mL 含 1 μg 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取片剂或丸剂, 细致研磨粉碎; 或取胶囊剂, 取出内容物连同胶囊壳细致研磨粉碎, 取约 0.3 g 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入约 40 mL 甲醇 - 10 mmol·L⁻¹醋酸铵溶液 (1:1 超声 (250 W, 25 kHz 处理 10 min 放冷后定容至刻度。将上述溶液高速离心 (不小于 10000 r·min⁻¹, 取上清液用甲醇 - 10 mmol·L⁻¹醋酸铵溶液 (1:1 稀释 100 倍, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 标准曲线的制备 将混合对照品溶液用甲醇 - 10 mmol·L⁻¹醋酸铵溶液 (1:1 逐级稀释, 得混合对照品系列溶液, 浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0 μg·L⁻¹。每个浓度平行 3 份, 在上述 UPLC-MS/MS 条件下测定, 各对照品定量离子的峰面积 (Y 对各组分浓度 (X 经回归处理, 得标准曲线。盐酸二甲双胍等 11 种对照品在 0.5~200.0 μg·L⁻¹ 范围内线性良好, 回归方程、相关系数等参数详见表 2。其中 50 μg·L⁻¹ 的混合对照品溶液的总离子流图见图 1。

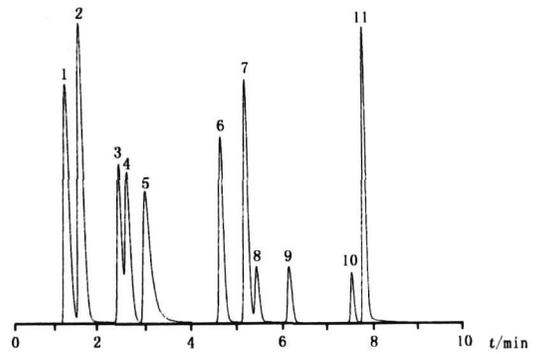


图 1 混合对照品溶液总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms for mixture of reference standards
 1 盐酸二甲双胍 (methformin hydrochloride) 2 盐酸苯乙双胍 (phenformin hydrochloride) 3 甲苯磺丁脲 (tolbutamide) 4 格列吡嗪 (glipizide) 5 格列奇特 (gliclazide) 6 马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate) 7 盐酸吡格列酮 (pioglitazone hydrochloride) 8 格列苯脲 (glibenclamide) 9 格列美脲 (glinepiride) 10 格列喹酮 (gliquidone) 11 瑞格列奈 (repaglinide)

2.6 检出浓度和定量浓度的测定 根据盐酸二甲双胍等 11 种对照品 $SN = 3$ 时的溶液浓度, 计算出测定方法的检出浓度; 根据 $SN = 10$ 时的对照品溶液浓度, 计算出测定方法的定量浓度。详见表 2。

表 2 11 种化学药的定量相关参数

Tab 2 The quantification parameters of the 11 chemical drugs

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	r	LOD /ng·g ⁻¹	LOQ /ng·g ⁻¹
盐酸二甲双胍 (methformin hydrochloride)	Y = 728.6X + 196.5	0.9988	3.3	9.6
盐酸苯乙双胍 (phenformin hydrochloride)	Y = 118.9X + 190.3	0.9978	1.3	4.1
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	Y = 666.5X + 77.7	0.9996	1.1	3.5
格列奇特 (gliclazide)	Y = 249.6X - 22.3	0.9997	3.6	9.8
盐酸吡格列酮 (pioglitazone hydrochloride)	Y = 2911X + 922.9	0.9976	0.2	0.6
马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate)	Y = 3236X + 966.5	0.9991	0.1	0.4
格列吡嗪 (glipizide)	Y = 355.9X + 73.3	0.9991	3.1	9.1
瑞格列奈 (repaglinide)	Y = 2431X + 833.9	0.9987	0.2	0.7
格列美脲 (glinepiride)	Y = 568.3X + 80.0	0.9991	0.3	1.0
格列苯脲 (glibenclamide)	Y = 448.5X + 49.3	0.9992	0.6	2.2
格列喹酮 (gliquidone)	Y = 603.2X + 26.8	0.9995	1.5	4.8

2.7 精密度试验 取 50.0 μg·L⁻¹ 混合对照品液在拟定的 UPLC-MS/MS 条件下连续测定 6 次, 盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、甲苯磺丁脲、格列奇特、盐酸吡格列酮、马来酸罗格列酮、格列吡嗪、瑞格列奈、格列美脲、格列苯脲和格列喹酮定量离子的峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.4%, 1.1%, 0.5%, 0.8%, 1.5%, 0.6%, 1.1%, 0.5%, 0.7%, 0.8% (n = 6, 表明方法的精密度良好。

2.8 回收率试验 选择不含盐酸二甲双胍等 11 种化学药的试验样品, 细致研磨粉碎, 取约 0.3 g 精密

称定, 共取 9 份, 分置 50 mL 量瓶中, 分别加入甲醇 - 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (1:1 约 40 mL, 每 3 份 1 组, 分别精密加入混合对照品储备液 0.5, 2.5, 5.0 mL, 按“2.4”项下方法提取, 终浓度分别为 10.0, 50.0, 100.0 μg·L⁻¹。在拟定的 UPLC-MS/MS 条件下测定并计算平均回收率, 见表 3。

2.9 重复性试验 取其他降糖类产品中的 2 号样品 (平糖安胶囊, 批号 080516 约 0.3 g 精密称定, 按“2.4”项下方法提取, 平行 6 份, 在上述 UPLC-MS/MS 条件下测定。盐酸二甲双胍、格列奇特、马

表 3 11种化学药的平均回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 The average recoveries of the 11 chemical drugs

化合物 (compound)	$C/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		
	10	50	100
盐酸二甲双胍 (methformin hydrochloride)	118.7 ± 3.5	107.3 ± 2.1	99.5 ± 0.9
盐酸苯乙双胍 (phenformin hydrochloride)	104.5 ± 4.1	101.5 ± 1.8	90.0 ± 1.5
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	103.0 ± 2.2	101.7 ± 1.3	100.5 ± 1.9
格列奇特 (gliclazide)	108.6 ± 3.8	104.2 ± 1.5	102.5 ± 1.7
盐酸吡格列酮 (pioglitazone hydrochloride)	99.8 ± 1.0	105.3 ± 1.8	98.3 ± 1.2
马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate)	100.5 ± 0.8	98.9 ± 0.7	101.0 ± 1.7
格列吡嗪 (glipizide)	100.3 ± 4.5	97.1 ± 2.9	93.6 ± 1.8
瑞格列奈 (repaglinide)	101.7 ± 1.9	100.2 ± 2.2	99.2 ± 0.8
格列美脲 (glimepiride)	101.5 ± 4.2	99.4 ± 1.0	100.2 ± 2.2
格列苯脲 (glibenclamide)	100.8 ± 4.5	100.5 ± 1.7	98.6 ± 1.6
格列喹酮 (gliquidone)	102.2 ± 2.6	99.1 ± 1.6	99.4 ± 1.1

来酸罗格列酮和格列苯脲的平均添加量分别为 0.58%, 6.89%, 0.12%, 0.26%; RSD($n = 6$) 分别为 1.2%, 1.1%, 2.3%, 1.8%, 证明此方法重复性良好。2号样品的总离子流图见图 2。

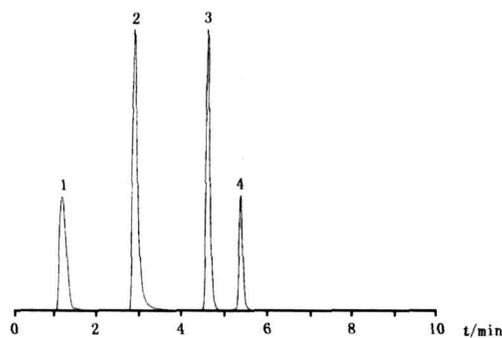


图 2 2号样品的总离子流图

Fig 2 Total ion chromatograms of the No. 2 sample

1. 盐酸二甲双胍 (methformin hydrochloride) 2. 格列奇特 (gliclazide)
3. 马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate) 4. 格列苯脲 (glibenclamide)

2.10 稳定性试验 取 $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合对照品溶液分别在配制后 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24 h 用上述 UPLC-MS/MS 条件测定。根据盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、甲苯磺丁脲、格列奇特、盐酸吡格列酮、马来酸罗格列酮、格列吡嗪、瑞格列奈、格列美脲、格列苯脲和格列喹酮定量离子的峰面积计算 RSD ($n = 7$) 分别为 1.5%, 0.7%, 2.2%, 0.8%, 2.0%, 2.4%, 1.3%, 2.0%, 0.8%, 1.6%, 1.9%。说明对照品溶液 24 h 内稳定。

2.11 样品测定 45批样品分别按“2.4”项下方法提取,各平行 2份,在上述 UPLC-MS/MS 条件下测定。降糖类中成药 30批中有 1批添加了格列本脲,添加量为 0.71%,与该产品的处方量相符(产品的处方中含有格列本脲)。15批其他降糖类产品中有

11批违法添加了化学药,具体情况见表 4。

表 4 其他 15批降糖类产品添加结果

Tab 4 The result of the 11 chemical drugs mixed into 15 samples

化合物 (compound)	添加浓度范围 (concentration range %)	添加次数 (mixed into times)
盐酸二甲双胍 (methformin hydrochloride)	0.58 ~ 1.08	4
盐酸苯乙双胍 (phenformin hydrochloride)	0.38 ~ 0.60	5
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	/	0
格列奇特 (gliclazide)	6.89 ~ 8.81	3
盐酸吡格列酮 (pioglitazone hydrochloride)	0.12 ~ 0.15	2
马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate)	0.12	1
格列吡嗪 (glipizide)	/	0
瑞格列奈 (repaglinide)	/	0
格列美脲 (glimepiride)	0.60	1
格列苯脲 (glibenclamide)	0.24 ~ 0.79	9
格列喹酮 (gliquidone)	/	0

3 讨论

在被检验的 30批正规药厂生产的降糖类中成药中均未发现违禁添加。15批其他降糖类产品中有 11批 (约 73%) 添加了化学药,其中有 1种保健品竟同时添加了 4种化学药。添加次数较多的是盐酸苯乙双胍和格列苯脲,添加范围分别为 0.38% ~ 0.60% 和 0.24% ~ 0.79%,添加量差别很大。

本文在前期建立的同时检测 8种降糖化学药的 UPLC-MS/MS 方法基础上,增加了甲苯磺丁脲、马来酸罗格列酮、瑞格列奈 3种对照品,改用本法,取得了较好的分离效果。样品的测定在 10 min 内完成,可用于该类药品快速检测。

参考文献

- CAIHan-qing (蔡寒青), LOU Jin-ning (娄晋宁). Progress and prospects of the islet transplantation on diabetic patients (胰岛移植治疗糖尿病的进展和有待解决的问题). *Chin Med Biotechnol* (中国医药生物技术), 2007, 2(6): 401
- ZHANG Cui-ying (张翠英), LIZhen-guo (李振国), XU Jin-ling (徐金玲). Detection of seven anti-diabetic medicines in traditional Chinese medicines and health foods by UPLC-MS/MS (中药制剂及保健品中违禁添加 7种降糖药物的 LC-MS/MS 定性检测). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43(9): 707
- LN Yan-ping (林艳萍), SIDuan-yun (司端运), LIU Chang-xiao (刘昌孝). Detection of synthetic compounds illegally mixed into traditional Chinese medicine anti-diabetic preparation by liquid chromatography-mass spectrometry (液质联用分析中药降糖制剂中掺入的西药成分). *J Tianjin Univ* (天津大学学报), 2008, 41(6): 720

(本文于 2009年 9月 7日修改回