

中药制剂和保健品中 11 种化学降糖药的快速检验^{*}高珊^{1,2}, 于黎明², 毕开顺^{1*}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110013 2 大连市药品检验所, 大连 116021)

摘要 目的: 建立检测中药制剂和保健品中非法掺入化学降糖药的专属性方法。方法: 采用液相色谱-离子阱质谱联用法。色谱条件: Agilent TC C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.01% 三氟乙酸-乙腈为流动相, 柱温 30 ℃, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm; 质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI) 正离子检测, 扫描方式采用全扫描-一级质谱、选择离子二级质谱 (MS/MS), 质荷比范围 50~800 *m/z*, 干燥气温度 350 ℃, 干燥气流速 8 L·min⁻¹, 雾化气压力 206.7 kPa 分流比 1:1。结果: 11 种化学降糖药实现了同时分离与专属鉴定; 利用本法, 从 42 个样品中检测出 6 种非法添加化合物。结论: 本法可以有效地用于快速检测中药制剂和保健品中非法添加的化学降糖药。

关键词 中药制剂; 保健品; 高效液相色谱-离子阱质谱; 降糖药; 快速检验

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1715-04

HPLC-MS/MS fast detection of eleven kinds of anti-diabetic agents in traditional Chinese medicines and health care products^{*}GAO Shan^{1,2}, YU Li-ming², BIKai-shun^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110013 China 2 Dalian Institute for Drug Control Dalian 116021 China)

Abstract Objective To develop a specific method for the identification of 11 chemical drugs added illegally into traditional Chinese medicines and health care products **Methods** The liquid chromatography-ion trap mass spectrometry method was used HPLC separations were performed on an Agilent TC C₁₈ column with the mobile phase of 0.01% trifluoacetic acid and acetonitrile by gradient elution at the flow rate of 0.6 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 230 nm. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the postived ion mode with two scan modes including full scan MS and full scan MS-MS, the scan range was 50~800 *m/z*, the temperature of drying gas was 350 ℃, the flow rate of drying gas was 8 L·min⁻¹, the pressure of nebulizer gas was 206.7 kPa **Result** Eleven kinds of anti-diabetic agents were well separated and clearly identified by HPLC-MS/MS. Six kinds of anti-diabetic agents have been successfully detected among the 42 drugs on the market **Conclusion** The developed method can be able to apply for the fast detection of anti-diabetic agents added illegally into traditional Chinese medicines and health care products

Key words traditional Chinese medicines, health care products, anti-diabetic agents, HPLC-MS/MS, detection

目前, 少数中成药和保健品中肆意添加处方药的问题日趋严重, 威胁着人们的身心健康, 危害着消费者。由于中成药成分异常复杂, 一些传统的分析方法越来越难以满足药检工作的需求, 制约了药品监督管理部门对制假者的及时查处。高效液相色谱-离子阱串联质谱技术 (HPLC-MS/MS), 既具有高效液相色谱的高分离性能, 又同时具备质谱结构鉴定专属性强的优点, 是目前公认的高灵敏、高

效率的检测技术和方法之一^[1]。本研究旨在建立 HPLC-MS/MS 方法, 实现对中药制剂和保健品中化学降糖药的快速检验。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series LC MSD Trap SL, 包括四元泵、脱气机、自动进样器、柱温箱及紫外检测器、电喷雾离子化源 (ESI) (美国 Agilent 公司); 流动注射泵 (KD-Scientific USA); 超声波发生器 (上海科导超

* 大连市科学技术局资助项目 (2007E11SF180)

** 通讯作者 Tel (024) 23986296 E-mail: bikaishun@yahoo.com

声仪器公司)。

二甲双胍(原料药,大连南美制药有限公司);苯乙双胍(原料药,大连南美制药有限公司);罗格列酮(原料药,天津市药品检验所提供);甲苯磺丁脲(SIGMA公司,CAS号64-77-7纯度99.7%);对照品吡格列酮(批号100634-200401)、瑞格列奈(批号100753-200501)、格列吡嗪(批号100281-200001)、格列齐特(批号100269-200402)、格列本脲(批号100135-200404)、格列美脲(批号100674-200301)、格列喹酮(批号100280-200301)均购自中国药品生物制品检定所。供试品均由市场购得(共收集到42个样品)。甲醇、乙腈为色谱纯(德国Merck公司)。其他化学试剂为分析纯,水为超纯水。

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流速:0.6 mL · min⁻¹;柱温:30 ℃;检测波长:230 nm;进样量均为1 μL;流动相为0.01%三氟乙酸与乙腈,梯度条件:0~8 min乙腈由20%增加到60%;8~20 min乙腈由60%增加到80%。

2.2 质谱条件 离子化方式:电喷雾离子化(ESI);扫描方式:正离子扫描,采用全扫描一级质谱、选择离子二级质谱(MS/MS),质荷比范围50~800 *m/z*;干燥气温度350 ℃,干燥气流速8 L · min⁻¹,雾化气压力206.7 kPa,分流比为1:1。

2.3 溶液制备

对照品溶液:分别称取对照品二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、甲苯磺丁脲、吡格列酮、瑞格列奈、格列吡嗪、格列齐特、格列本脲、格列美脲、格列喹酮各10 mg各置于100 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀。分别精密量取5 mL,置同一50 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀。即得浓度均为10 μg · mL⁻¹的对照品溶液。

供试品溶液:取胶囊剂10粒(或片剂10片、丸剂10丸、颗粒剂10袋内容物),研细,取1 g置100 mL量瓶中,加甲醇50 mL,超声15 min,冷至室温,加甲醇定容,摇匀,即得。

3 结果与讨论

3.1 11种化学降糖药的色谱定性检测 目前,有关化学降糖药的色谱定性检测已有文献报道。在色谱优化过程中发现采用文献的方法^[2],以0.1%甲酸为流动相时,在230 nm处有吸收,干扰严重,后改用三氟乙酸,11种常见降糖药得到了良好的分离。

如图1中所示。根据对照品出峰保留时间,可以确定其色谱峰流出顺序依次是:二甲双胍(1, 2.6 min)、苯乙双胍(2, 5.4 min)、罗格列酮(3, 7.4 min)、吡格列酮(4, 8.2 min)、瑞格列奈(5, 11.3 min)、格列吡嗪(6, 12.2 min)、甲苯磺丁脲(7, 12.6 min)、格列齐特(8, 14.1 min)、格列本脲(9, 15.8 min)、格列美脲(10, 16.5 min)、格列喹酮(11, 19.0 min)。图中保留时间位于10~11 min之间的色谱峰来自于对照品8(格列齐特)。

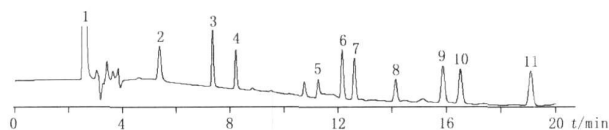


图1 HPLC色谱分离图

Fig 1 HPLC chromatogram

1. 二甲双胍(metformin) 2. 苯乙双胍(phenformin) 3. 罗格列酮(rosiglitazone) 4. 吡格列酮(pioglitazone) 5. 瑞格列奈(repaglinide)
6. 格列吡嗪(glipizide) 7. 甲苯磺丁脲(tolbutamide) 8. 格列齐特(gliclazide) 9. 格列本脲(glyburide) 10. 格列美脲(glinapiride)
11. 格列喹酮(gliquidone)

这11种降糖药的良好分离,为进一步质谱定性检测奠定了基础。据我们所知,本篇是首次报道了对11种降糖药的同时分离。

3.2 11种化学降糖药的MS/MS定性特征质谱

目前,临床常用降糖药可分为双胍类(1-2)、噻唑烷二酮类(3-4)、苯甲酸衍生物(非磺脲类胰岛素促泌剂)(5)、磺酰脲类(6-11)等。表1中列出了这11种降糖药的MS/MS测定结果。对照品3的母离子峰为*m/z* 358.2,对*m/z* 358.2进行二级全扫描质谱分析,产生的主要碎片离子有*m/z* 135.1,其质谱裂解途径可能是醚键断裂产生碎片离子峰。对照品7母离子峰为*m/z* 271.2,对*m/z* 271.2进行二级全扫描质谱分析,产生的主要碎片离子有*m/z* 155.0和172.0,其质谱裂解途径可能是由磺酰键容易断裂生成相应的碎片离子。其他降糖药的MS/MS特征质谱图已经有文献报道^[2]。结合HPLC色谱图,就能实现对这11种降糖药的定性检测。

3.3 市售中成药及保健品的检测结果 随机从市场上购买的35个厂家20种42批次的中成药及保健品做为供试品,在相同色谱及质谱条件下,通过比较供试品溶液与对照品溶液中色谱峰的保留时间、MS/MS特征谱图,确定供试品中是否添加了上述11种化学降糖药。通过对42个样品的测试发现少数样品中有掺假行为,表2中列出了发现有掺伪现象的5种供试品,分别是糖尿乐胶囊(S1)、虫胶胶囊

表 1 11种降糖药的 MS/MS测定结果

Tab 1 MS/MS analysis results of eleven kinds of anti-diabetic agents

化合物名称 (compound name)	母离子 (parent ion)	主要碎片离子 (main products ion of MS ₂)
二甲双胍 (metformin)	130.1	60.3/85.1/113.0
苯乙双胍 (phenformin)	206.1	60.3
罗格列酮 (rosiglitazone)	358.2	135.1
吡格列酮 (pioglitazone)	357.2	134.1
瑞格列奈 (repaglinide)	453.3	162.1/230.2
格列吡嗪 (glipizide)	446.3	321.1
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	271.2	155.0/172.0
格列齐特 (gliclazide)	324.2	127.1
格列本脲 (glyburide)	494.3	369.1
格列美脲 (glimepiride)	491.3	352.2
格列喹酮 (gliquidone)	528.3	403.1

表 2 5种供试品的 MS检测结果

Tab 2 Detection results of five kinds of test samples

供试品* (sample)	生产批号 (Lot No)	母离子 (parent ion)	主要碎片离子 (main products ion of MS ₂)	被确认添加物 (compound detected)
S1	20061106	324.2	127.1	格列齐特 (gliclazide)
S2	20071020	130.1	60.3/85.1/113.0	二甲双胍 (metformin)
		358.1	135.0	罗格列酮 (rosiglitazone)
		491.3	352.1	格列美脲 (glimepiride)
S3	20070422	358.1	135.0	罗格列酮 (rosiglitazone)
S4	20060805	206.1	60.3	苯乙双胍 (phenformin)
		494.3	369.1	格列本脲 (glyburide)
S5	—	358.2	135.1	罗格列酮 (rosiglitazone)
		494.2	369.1	格列本脲 (glyburide)

(S2)、复合苦瓜营养胶囊 (S3)、玉盘消渴片 (S4)、糖尿康复丸 (S5)。这 5 种供试品的色谱图见图 2。从保留时间上看, S1 色谱流出峰中, 含有与对照品 8 保留时间一致的组分; 经进一步确证, 该组分的母离子峰 m/z 324.2, 主要碎片峰 m/z 127.1 (表 2) 也与对照品 8 (表 1) 的 MS/MS 相吻合。据此可以推断 S1 中添加了格列齐特。同理, 经过 HPLC-MS/MS 鉴定, 推断 S2 中添加了二甲双胍、罗格列酮和格列美脲; S3 中添加了罗格列酮; S4 中添加了苯乙双胍和格列苯脲; S5 中添加了罗格列酮和格列苯脲。这些添加物的 MS/MS 特征谱图如图 3 至图 7 中所示。其中罗格列酮为首次发现的非法添加物 (此前未见文献报道); 并且在检测出有掺伪现象的 5 种供试品中, 有 3 个品种添加了罗格列酮。由此可见, 罗格列酮非法添加物应引起药检部门的关注。

其他的供试品中未发现有此 11 种非法添加物。

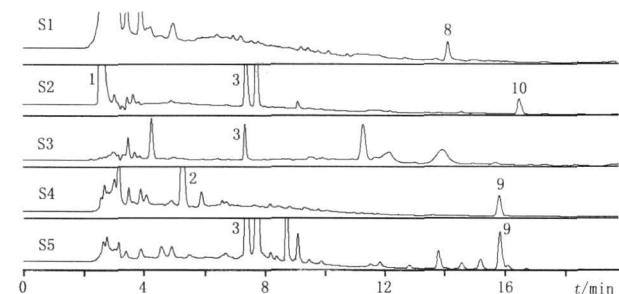


图 2 糖尿乐胶囊 (S1)、虫胶胶囊 (S2)、复合苦瓜营养胶囊 (S3)、玉盘消渴片 (S4)、糖尿康复丸 (S5) 的 HPLC 色谱分离图

Fig 2 The HPLC chromatograms of the test samples from S1 to S5

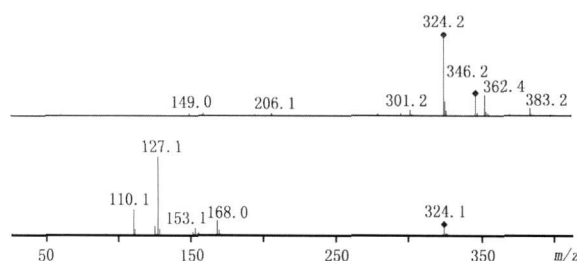


图 3 糖尿乐胶囊 (S1) 中添加的格列齐特的 MS/MS 质谱图

Fig 3 The MS/MS spectrograms of gliclazide added in Tangniaole capsule (S1)

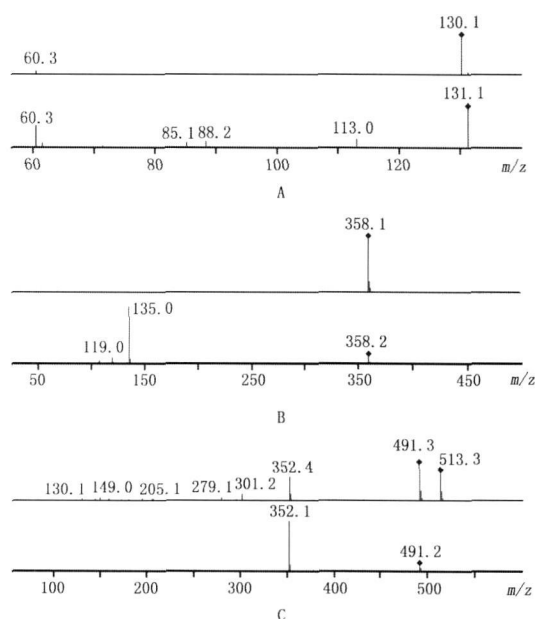


图 4 虫胶胶囊 (S2) 中添加剂二甲双胍 (A)、罗格列酮 (B) 和格列美脲 (C) 的 MS/MS 质谱图

Fig 4 The MS/MS spectrograms of metformin (A), rosiglitazone (B) and glimepiride (C), added in Chongjiao capsule (S2)

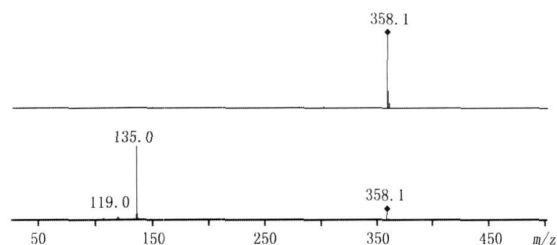


图5 复合苦瓜营养胶囊(S3)中添加物罗格列酮的MS/MS质谱图
Fig 5 The MS/MS spectrograms of rosiglitazone added in Fuhekuguang capsule (S3)

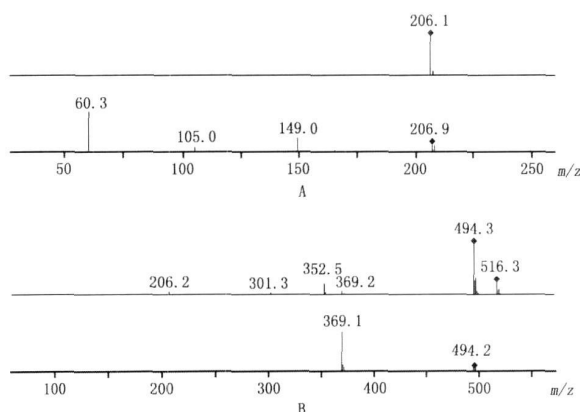


图6 玉盘消渴片(S4)中添加物苯乙双胍(A)和格列美脲(B)的MS/MS质谱图
Fig 6 The MS/MS spectrograms of phenformin(A) and glimepiride(B) added in Yupanxiaoke tablet (S4)

3.4 最低检出限 取对照品溶液,以不同比例稀释后测定,信噪比为3时,最低检出限分别为:二甲双胍 5 ng 格列吡嗪和格列美脲 3 ng 其余均为 1 ng

4 小结

建立了一种快速、有效、准确定性检测化学降糖药的HPLC-MS/MS方法。利用本法,可以同时检

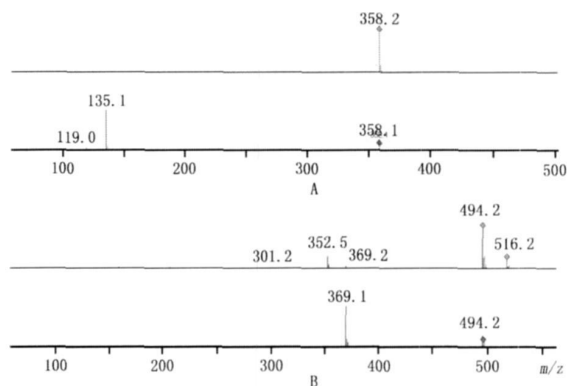


图7 糖尿康复丸(S5)中添加物罗格列酮(A)和格列本脲(B)的MS/MS质谱图
Fig 7 The MS/MS spectrograms of rosiglitazone (A) and glyburide (B) added in Tangniaokangfu pill (S5)

测 11种常见的降糖药物;通过对 20种 42批次市售中成药及保健品的检测,验证了本法具有较高的实际应用价值,可用于快速、准确检测市售降糖类中成药及保健品中是否添加非法化学药成分,为药品打假工作、净化药品市场提供有力的技术支持。

参考文献

- 1 LU Feng(陆峰), LE Jian(乐健), CHEN Gui-liang(陈桂良), et al. Analysis of counterfeit measures against traditional Chinese medicines adulterated by synthetic drugs(中药掺杂化学药物的分析及其对策). *J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(1): 6
- 2 ZHANG Zhe(张喆), GAO Qing(高青), YU Qian(余倩), et al. 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

(本文于 2009年 3月 25日修改回)