

液质联用法检测中成药和保健食品中 添加辅助降血糖类药品的研究

殷帅, 吴公平, 雷玉萍

(湖南省药品检验所, 长沙 410001)

摘要 目的: 建立准确、灵敏的 HPLC-MS/MS 方法, 检测中药制剂及保健食品中非法添加 11 种辅助降血糖类化学药物。方法: 样品经甲醇提取后, 采用液相色谱-电喷雾离子化质谱法测定。色谱条件: Ultimate XB-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm), 柱温 30℃, 流动相以甲醇-0.1% 乙酸铵溶液进行梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min⁻¹; 质谱条件: 以电喷雾电离源正离子模式进行质谱数据采集。结果: 在上述色谱及质谱条件下, 11 种辅助降血糖类化学药物的 HPLC 色谱图分离度良好, 质谱分辨率符合鉴别要求。HPLC-MS/MS 方法测定上述化学物质的最小检出量为 0.01~1.4 mg·kg⁻¹。结论: 该方法简便、快捷, 灵敏度、准确性、重现性均可满足定性检查的要求。

关键词: 液相色谱 质谱联用; 电喷雾离子化质谱; 辅助降血糖类化学药物; 非法添加

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)12-2400-04

HPLC-MS/MS determination of auxiliary hypoglycemic agents in traditional Chinese medicine and healthy foods

YIN Shuai, WU Gong-ping, LEI Yu-ping

(Hunan Provincial Institute for Drug Control, Changsha 400001, China)

Abstract Objective To develop an HPLC-electrospray ion trap mass spectrometry method for identifying eleven kinds of auxiliary hypoglycemic agents in traditional Chinese medicine preparations and healthy foods. **Methods** The liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry method was used to detect the samples extracted with methanol. The HPLC chromatographic determinations were run on an Waters HPLC MSD trap using Ultimate XB-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) column. The column temperature was 30℃. The mobile phase were gradient of 0.1% ammonium acetate solution and methanol at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. The mass spectrometer conditions were as follows. The fragmentation pattern of these drugs was analyzed by the mass spectrometer after being separated by HPLC, operated in positive ion. **Results** A good resolution of eleven kinds of auxiliary hypoglycemic agents were obtained by HPLC and MS. The determination limits were in the range of 0.01-1.4 mg·kg⁻¹. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and accurate.

Key words HPLC-MS/MS; electrospray ion trap mass spectrometry; auxiliary hypoglycemic agents; illegal to add

糖尿病是一种常见慢性内分泌代谢性疾病, 多伴有并发症, 且发病率有逐年增高的趋势, WHO 最近发表报告指出, 糖尿病已成为威胁人类生命的三大杀手之一。由于糖尿病的终身不可愈性以及耐药性、抗药性及药物的副作用等原因, 当今糖尿病的治疗方案, 世界各国都十分推崇饮食疗法, 大力强调饮食疗法的重要性, 强调在饮食疗法基础上配合运动治疗、药物治疗等的整体治疗方案。但此方案显效

缓慢, 疗程较长, 与降血糖类化学药品的生物疗效相比有着显著的差异, 因此, 少数不法分子为了牟取暴利, 在所谓的纯天然中药制剂及保健食品中非法添加化学药品, 号称“速效、根治”, 以虚假广告误导消费者^[1]。由于处方中没有标明添加的种类和剂量, 如使用不当, 将对服用者的健康和生命造成威胁。一般常见的辅助降糖保健食品中非法添加的降糖类化学药品分为: 1. 磺脲类降糖药如第一代的甲苯磺

丁脲等,第二代的格列苯脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮等,第三代的格列美脲。2 双胍类降糖药,如苯乙双胍和二甲双胍。3. 餐时血糖调节剂,如瑞格列奈。4 噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,如罗格列酮、吡格列酮等。本方法可在一个条件下同时鉴别出 11 种降血糖类药物,方法简便,准确率、灵敏度高,可完成中成药和保健食品中非法添加降血糖类药物的鉴别检查。

1 仪器与试剂

美国 Waters 公司的 Quattro Premier XE 三重四极杆液质联用仪,ESI 电离源;美国 Waters 公司的高效液相色谱仪,四元泵、脱气机、自动进样器、柱温箱及二极管阵列检测器。

对照品为盐酸苯乙双胍、盐酸二甲双胍、甲苯磺丁脲、格列齐特、格列吡嗪、格列本脲、格列美脲、盐酸吡格列酮、马来酸罗格列酮、格列喹酮和瑞格列奈,均由中国药品生物制品检定所提供;供试品为市场上购得的样品;甲醇、乙腈均为进口色谱纯;乙酸铵为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱: Ultimate XB - C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相 A: 0.1% 乙酸铵溶液, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱: 0~10 min, B 相由 15% → 30%, 10~25 min, B 相由 30% → 45%, 25~55 min, B 相由 45% → 75%, 55~65 min, B 相为 75%, 65~70 min, B 相由 75% → 15%, 70~75 min, B 相为 15%; 流速 0.2 mL · min⁻¹; 检测器: PDA (210~400 nm); 进样量: 10 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 源电压 3.5 kV; 毛细管电压 25V; 脱溶剂气温度: 350 °C; 鞘气流速: 500 L · min⁻¹; 正离子全扫描模式; 扫描范围 50~800。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取对照品盐酸苯乙双胍、盐酸二甲双胍、甲苯磺丁脲、格列齐特、格列吡嗪、格列本脲、格列美脲、盐酸吡格列酮、马来酸罗格列酮、格列喹酮和瑞格列奈 (纯度均大于 99%) 约 10 mg 分置 10 mL 量瓶中,加甲醇适量使溶解,并稀释至刻度,摇匀,再分别精密量取上述对照品溶液各 1 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液 (每 1 mL 中含 11 种对照品各 10 μg)。

2.2.2 供试品溶液

2.2.2.1 固体试样 取供试样品适量,研细,混匀,精密称取 0.2~1.0 g (相当于 1 次服用量)于具塞三角瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,超声处理 (250 W, 33 kHz) 30 min,取出,放冷至室温,用甲醇补重,过滤。作为供试品溶液。

2.2.2.2 液体试样 取液体试样 50 mL 以上,混匀,精密吸取 10~20 mL (相当于 1 次服用量),减压浓缩至近干,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。过滤,作为供试品溶液。

2.3 11 种化学药品的色谱及质谱图特性

精密量取“2.2.1”及“2.2.2”项下对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,按“2.1.1”及“2.1.2”项下条件进样测定,液相色谱图见图 1,紫外吸收图见图 2,总离子流图见图 3,特征离子流图见图 4,各化合物准分子离子及对准分子离子进行二级全扫描分析所得碎片离子见表 1。

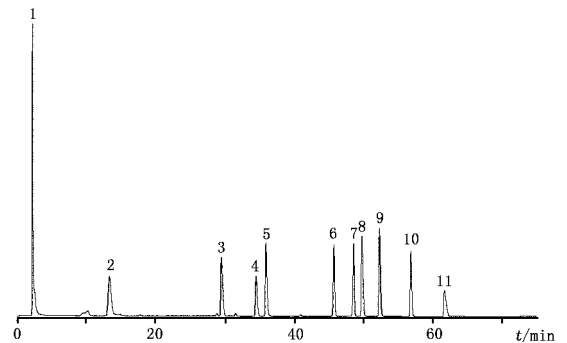


图 1 液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

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

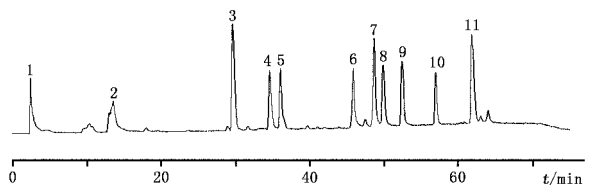


图 2 总离子流图

Fig 2 Total ion-current chromatograms

1~11. 同图 1 (same as Fig 1)

2.4 重复性试验 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液,连续进样 5 次,紫外检测器 HPLC 图谱中保留时间的 RSD 均在 1% 之内,显示方法稳定性良好。

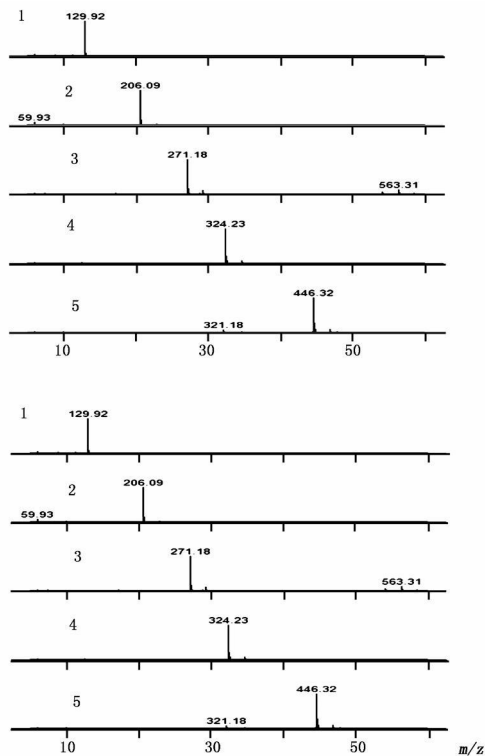


图 3 特征离子流图

Fig 3 Characteristic ion-current graphs

1~ 5. 同图 1 (same as Fig 1)

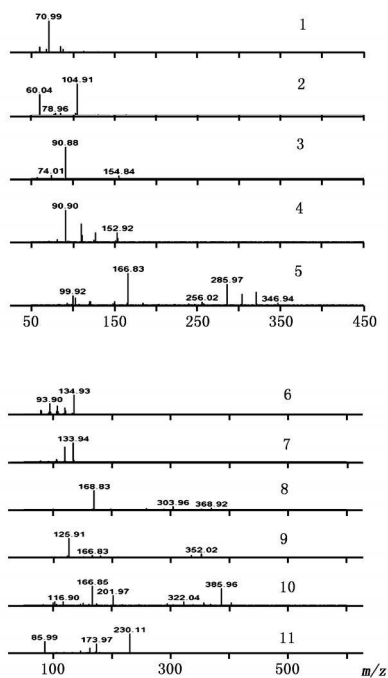


图 4 碎片离子流扫描图

Fig 4 Daughter ion scan graphs

1~ 11. 同图 1 (same as Fig 1)

2.5 灵敏度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,加甲醇逐步稀释后加入空白样品中,按“2.2.2”

进行供试品处理后,按“2.1.1”和“2.1.2”项下条件测定,上述药物的待测量在 $0.01 \sim 1.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间时,二级质谱选择离子检测图 (MRM) 中色谱峰的信噪比 (S/N) 在 3 左右。

表 1 11 种化合物准分子离子及主要碎片离子质荷比

Tab 1 Pseudo molecular ions and their ions at full scan MS/MS for 11 substances name m/z

$[M + H]^+ +$ Fragment ions from full scan MS/MS

名称 (component)	准分子离子 (pseudo molecular ions) m/z	碎片离子 (fragment ions from full scan MS/MS) m/z	最低检出限 (limit of detection) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
格列本脲 (glipizide)	494.3	168.8 ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2\text{Cl}$) 369.2 ($\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{13}\text{NHCO} + \text{H}$)	0.03
格列齐特 (gliclazide)	324.3	109.9 ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}$) 152.9 ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NNHCO}$)	0.28
格列喹酮 (gliquidone)	528.3	166.8 ($\text{C}_8\text{H}_7\text{SO}_2$) 403.3 ($\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{NHCO} + \text{H}$)	0.25
格列吡嗪 (glipizide)	446.3	99.7 ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}$) 321.2 ($\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{NHCO} + \text{H}$)	0.33
格列美脲 (glinepiride)	491.4	125.8 ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}$) 352.2 ($\text{M} - \text{C}_7\text{H}_{13}\text{NHCO} + \text{H}$)	0.13
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	271.4	74.0 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_3$) 90.9 (C_4H_7) 154.9 ($\text{C}_7\text{H}_7\text{SO}_2$)	1.4
瑞格列奈 (repaglinide)	453.4	85.8 ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}$) 161.9 ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$) 230.2 ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{C}_5\text{H}_{10}$)	0.02
盐酸二甲双胍 (metformin hydrochloride)	130.2	60.1 (CH_6N_3) 71.1 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_2$)	0.15
盐酸苯乙双胍 (phenformin hydrochloride)	206.3	60.1 (CH_6N_3) 105.0 (C_8H_9)	0.08
马来酸罗格列酮 (rosiglitazone maleate)	358.3	94.0 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{NNH}_2$) 107.0 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{NNCH}_3$) 135.0 ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2$)	0.03
盐酸吡格列酮 (pioglitazone hydrochloride)	357.3	118.8 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N} - \text{CH}_3$) 133.9 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}$)	0.01

2.6 数据检索库的建立 保健食品和中成药一般基质复杂,含有多种化合物,常规方法如薄层色谱法和高效液相色谱法等易出现假阳性结果,且费时费力。本方法记录了所测化学药品的紫外光谱图、一级质谱图和二级质谱图,使用质谱仪器自身所配软件储存上述信息,并录入相应名称、结构等信息,因此,当分析未知物时,可先根据采集的信息在库中搜索匹配的药物。另外,我们还通过液质联用优化软

件,经同位素峰形和丰度比较,可以确定目标化合物的精确相对分子质量,减少样品中相对分子质量与目标化合物非常近似的杂质的干扰,使得结果准确性大大提高。搜索到相匹配物质后,再取相应对照品进样分析,既减少了交叉污染的可能性,又可节省大量的摸索试验时间,实现短时间内对未知成分进行确认的目的^[2]。

3 讨论

3.1 流动相的选择 因质谱不能采用非挥发性盐作为流动相,经查阅相关文献^[3~5],选用甲醇-0.1%乙酸铵溶液、乙腈-0.1%乙酸铵溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液及甲醇-水4种流动相进行梯度洗脱。经比较,甲醇-0.1%乙酸铵溶液系统色谱峰分离效果好,各成分的分离度均能达到要求,峰形较好;而采用乙腈-0.1%乙酸铵溶液系统,吡格列酮和格列本脲无法分离;采用甲醇-0.1%甲酸溶液系统,吡格列酮和格列本脲无法分离;采用甲醇-水溶液系统,色谱峰峰形拖尾严重,且信号较低。

3.2 供试品配制 本试验中11种辅助降血糖药品的极性差异很大,如格列本脲等磺脲类降糖水溶性很小,我们曾用50%甲醇和纯甲醇作为提取溶剂,对11种降血糖药品做了提取率的考察,结果差别不大,另外中药制剂和保健食品中大多数样品含有浸膏、多糖,比较黏稠,如果用水相或含水相的流动相溶解,过滤困难^[6],因此,选择甲醇作为溶剂。

3.3 碎片离子分析 通过对11种辅助降血糖药经质谱打碎后,产生的碎片离子进行分析可知,双胍类降糖药(苯乙双胍和二甲双胍)均能产生质荷比为61(CH_6N_3)的碎片离子;磺脲类降糖药(格列苯脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列美脲)均能产生质荷比为126的碎片离子,不同的是格列美脲产生的碎片离子结构为 $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}$,能在正离子扫描模式下检出,格列苯脲、格列吡嗪、格列喹酮为在准分子离子中脱去一个荷比为126的碎片离子,结构均为 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NHCO}$,可能带有负电荷,在正离子扫描模式下未能检出,但在负离子扫描模式下可能检出,有待进一步研究。找出这些带有共性的碎片离子,有利于对一些在上述辅助降血糖药结构上进行修饰的未知药物进行检测分析。

3.4 本次试验对从市场上购买的具有降低血糖功效的中成药(27个品种)和保健食品(5个品种)进行了是否添加上述11种降血糖类化学药品的考察,结果发现27个中成药中有2个品种添加了格列本脲,1个品种添加了格列齐特;5个保健食品中有2个品种同时添加了格列本脲和格列美脲2种成分,1个品种同时添加了二甲双胍、苯乙双胍、格列本脲3种成分。保健食品中非法添加化学物质的普遍性和严重性远大于中成药,现阶段我们更应该加强对保健食品的监管力度。

参考文献

- 1 DONG Yong-cheng(董永成), DU Shi-ming(杜士明), CHEN Yong-shun(陈永顺), *et al* Types and ham of illegally added chemicals in Chinese traditional patent medicine and health food as well as Countermeasure against the phenomenon(中成药及保健品非法添加化学成分的类型、危害及对策). *LishizhenMed Mater Med Res*(时珍国医国药), 2006, 7(8): 1601
- 2 LEI Yu-ping(雷玉萍), YIN Shuai(殷帅), WU Gong-ping(吴公平). HPLC-MS/MS Determination of corticoid illegally adulterated in traditional Chinese medicine and health Food(中成药及保健品中非法添加肾上腺皮质激素类药物的检测方法). *Guojing J Tradit Chin Med Pharm*(中医药导报), 2009, 15(5): 81
- 3 LI Xiao-dong(李晓东), WANG Jin(王瑾), ZHANG Ya-jun(张雅军). LC-MS/MS determination of auxiliary hypoglycemic agents in healthy foods(液质联用检测中药保健品中掺加降糖化学药的方法研究). *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2005, 24(6): 41
- 4 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
- 5 XIA Shun-ning(夏顺宁), WANG Zhen-yuan(王贞媛), LI Dan(李丹). Studies on Identification for Glibenclamide, Gliclazide, Glinopiride Mixed in TangLeShu Capsules by HPLC-MS Method(HPLC-MS/MS法鉴别唐乐舒胶囊中非法添加的格列本脲、格列齐特、格列美脲成分). *Jiangsu Pharm Clin Res*(江苏药学与临床研究), 2006, 14(6): 363
- 6 GAO Qing(高青). Identification of Antihypertensive by HPLC/MS/MS and Its Database Development(液质联用检查15种降压类药物及数据检索库的建立). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2007, 42(21): 1665

(本文于2010年8月28日修改回)