

快速筛查消渴类中成药中非法添加成分的 HPLC-DAD 数据库的建立

陈静, 张晓丹, 周国华^{*} (南京军区联勤部药品仪器检验所, 南京 210002)

摘要: 目的 在等度洗脱条件下建立 10 种化学降糖成分的 HPLC-DAD 数据库, 用于消渴类中成药中非法添加成分的现场快速筛查。方法 采用 Waters XTerra MSC₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱, 使用 2 种流动相: 流动相 I 为乙腈-0.02% 磷酸(55:45), 流动相 II 为乙腈-0.01% 三氟乙酸(25:75), 检测波长 229 nm, 参比波长 550 nm, 波长扫描范围为 190~600 nm。首先采集对照品的保留时间和光谱图, 建立数据库; 然后将样品中检出峰的保留时间与数据库比较, 初筛出可疑的化学成分; 最后将样品中可疑色谱峰的 DAD 光谱图与数据库中相应对照品的 DAD 光谱图比较, 快速筛查出非法添加的化学成分, 并对检出的化学成分进行 LC-MS 验证。结果 10 种化学降糖成分在上述 2 种等度洗脱条件下实现了完全分离; 采用本试验建立的方法检测了市售 12 批不同的消渴类中成药, 发现其中 5 批含有非法添加成分, 并且有 1 批同时含有 4 种非法降糖成分添加剂, LC-MS 验证结果准确。结论 本法可以准确有效地快速分离 10 种化学降糖成分, 为消渴类中成药的现场打假提供有力的技术支持。

关键词: 消渴类中成药; DAD 光谱库; 现场分析; 快速筛查

中图分类号: R927.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)05-0377-07

Development of HPLC-DAD Database for Rapid in Situ Screening of Ingredients Illegally Adulterated in Anti-Diabetic Traditional Chinese Medicines

CHEN Jing, ZHANG Xiaodan, ZHOU Guohua^{*} (*Nanjing Institute for Quality Control of Medical Material and Equipment, Nanjing 210002, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop the HPLC-DAD database of ten kinds of anti-diabetic chemicals at the condition of composition-constant mobile-phase for the rapid and in situ screening of ingredients illegally adulterated in anti-diabetic traditional Chinese medicines. **METHODS** HPLC was performed on Waters XTerra MSC₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm) column with two kinds of composition-constant mobile-phases: mobile phase I, acetonitrile-0.02% phosphoric acid(55:45); and mobile phase II, acetonitrile-0.01% trifluoacetic acid (25:75). The detection was performed at 229 nm with the reference wavelength of 550 nm, and DAD scanning range was 190–600 nm. At first, collect peak retention time and DAD spectrum of each reference for establishing a data library. Then, compare the peak retention time of a sample with that of the references in the database for screening suspicious substances in the sample. Finally, compare the obtained DAD spectrum of the substance with that of references in the DAD spectrum library for the further screening. Confirmation of the detected chemicals was performed by LC-MS. **RESULTS** Ten kinds of anti-diabetic medicines were well separated at the above two composition constant mobile phases. The screening results of 12 batches of different anti-diabetic traditional Chinese medicine indicated that there were 5 batches containing illegally adulterated components. And four kinds of illegally added chemicals were detected in 1 batch of samples. The assay results were confirmed by HPLC-MS. **CONCLUSION** The assay developed here is accurate and rapid in the separation of ten kinds of anti-diabetic chemicals, and can give a strong support for the in situ screening of chemicals illegally added in anti-diabetic traditional Chinese medicine.

KEY WORDS: anti-diabetic traditional Chinese medicines; DAD spectrum library; in situ analysis; rapid screening

近年来, 我国医药市场中有不法分子向中成药和保健品中加入非法添加物, 以牟取暴利, 军

民的用药安全受到了威胁^[1-2]。中成药和保健品中的非法添加物常常价格低廉, 对某类疾病疗效确

基金项目: 全军医学科学技术研究“十一五”计划科技攻关课题(08G025)

作者简介: 陈静, 女, 药士
Tel: (025)84514223

Tel: (025)80867152-8006

E-mail: ghzhou@public1.ptt.js.cn

E-mail: cwtcj2388@163.com

^{*}通信作者: 周国华, 男, 教授, 博士

切,但其添加手段隐蔽,且掺假者添加的化学成分种类不确定,给各级药检机构的监测工作带来了困扰^[2]。

目前关于现场检测非法添加物的文献较少,而且多为对假药的外观包装鉴定;实际工作中快检箱的应用也仅限于成分简单的化学药品,对于现今药品市场上中成药和保健品的检测却无能为力^[3-5]。由于中成药成分复杂,且可用于非法添加的化学药品种类繁多,采用常规方法难以快速筛查到非法添加物,但适应症明确的中成药,成分确定,可预先根据对照品的色谱光谱特征建立数据库,用于中成药中非法添加成分的快速筛查^[6]。

目前发现除降糖药外,常见的非法添加化学药品的中成药及保健品还有补肾壮阳类、减肥类、降血压类、镇静催眠类、抗癫痫类、镇咳平喘类、抗风湿类、抗菌消炎类等^[7-9],本试验以消渴类中成药为例,以常见的10种非法添加化学降糖成分为研究对象,建立了色谱保留时间和相应的DAD光谱特征为参数的数据库,通过对9种市售消渴类中药的检测,证明本方法可准确有效地对消渴类中成药中非法添加的化学成分进行快速筛查。

1 实验与方法

1.1 仪器与试药

1.1.1 仪器 Agilent HP1100液相色谱仪(包括自动进样器,柱温箱,DAD检测器)。岛津LCMS-2020AT液相色谱质谱联用仪。色谱柱为Waters XTerra MSC₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.1.2 试药 对照品盐酸二甲双胍(批号:100664-200401);盐酸苯乙双胍(批号:100922-200701);盐酸罗格列酮(批号:100673-200401);盐酸吡格列酮(批号:100634-200401);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),以上对照品均购自中国药品生物制品检定所。甲苯磺丁脲(江苏鹏鹞药业有限公司,批号:0905263)。

供试品为本所在市场购得。流动相中所用甲醇、乙腈均为色谱纯(默克公司)。其他化学试剂为分析纯,水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 液相色谱条件 Waters XTerra MSC₁₈色谱

柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相I为乙腈-0.02%磷酸(55:45),流动相II为乙腈-0.01%三氟乙酸(25:75)。检测波长229 nm,参比波长550 nm,波长扫描范围190~600 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子模式,雾化气压力207 kPa,干燥气为氮气,干燥气温度300 ℃,流速10 L·min⁻¹,毛细管电压4 000 V,分子量扫描范围100~600,柱尾分流2:1。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%^[10]。

1.2.3 溶液配制

1.2.3.1 对照品溶液 依次称取对照品盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、盐酸罗格列酮、盐酸吡格列酮、格列吡嗪、格列齐特、格列本脲、格列美脲和格列喹酮各10 mg,分别置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得浓度约为200 μg·mL⁻¹的9种对照品贮备溶液。称取约相当于10 mg的甲苯磺丁脲片细粉,置于50 mL量瓶中,加入约40 mL甲醇,超声20 min使溶解,冷却,定容,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得浓度约为200 μg·mL⁻¹的甲苯磺丁脲贮备溶液。分别精密量取盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、盐酸罗格列酮、盐酸吡格列酮、格列吡嗪、格列齐特、格列本脲、格列美脲和格列喹酮对照品贮备溶液和甲苯磺丁脲贮备溶液各5 mL,置同一50 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得各成分浓度约为20 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

1.2.3.2 供试品溶液 取供试品胶囊剂10粒(或片剂10片、丸剂10丸、颗粒剂10袋),内容物研细,称取约相当于一次服用量的细粉,置50 mL量瓶中,加甲醇约40 mL,超声20 min,冷却,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

为了在一次分析中将非法添加的可能化学降糖成分同时分离,通常需要采用梯度洗脱的方法^[10],但梯度洗脱对便携式或车载HPLC系统是个挑战,如果采用等组成流动相进行多成分分析,将大大提高方法的适用性。然而,各种可能的化学降糖成分,其化学结构差异较大,如二甲双胍和苯乙双胍属于双胍类;吡格列酮及罗格列酮属于噻唑

烷二酮类；而甲苯磺丁脲、格列吡嗪、格列齐特、格列本脲、格列美脲和格列喹酮属于磺酰脲类。所以难以在一次等组流动相分离中将极性不同的所有成分同时分离，本试验采用加有不同改性剂的流动相进行等度洗脱，实现可能化学降糖成分的分离。

为适应不同极性成分的分离，比较了有机相甲醇和乙腈，发现相同水相时，乙腈的分离效果明显优于甲醇，故选择乙腈-水为基础流动相，流动相的极性通过改变乙腈的比例来调节，在水中加入不同的改性剂进行实验。根据分子结构，噻唑烷二酮类和双胍类化合物有碱性，可与酸结合，故选择酸性较强的三氟乙酸为改性剂；而磺酰脲

类化合物碱性较前者弱，故选择酸性较弱的磷酸作为改性剂^[11]。通过试验，发现流动相 I 能较好地分离格列吡嗪、甲苯磺丁脲、格列齐特、格列本脲、格列美脲和格列喹酮，而其余 4 种物质由于出峰太快，在色谱图中形成一宽峰，未得到分离；而流动相 II 能较好地分离盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、盐酸罗格列酮和盐酸吡格列酮。结果表明 10 种化学降糖药相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，理论板数均大于 2 000，空白介质不影响降糖药色谱峰的检出，分离结果见图 1。故本试验所选 2 种极性不同和含有不同改性剂的流动相等度洗脱能使 10 种常见化学降糖成分的检出率达到 100%。

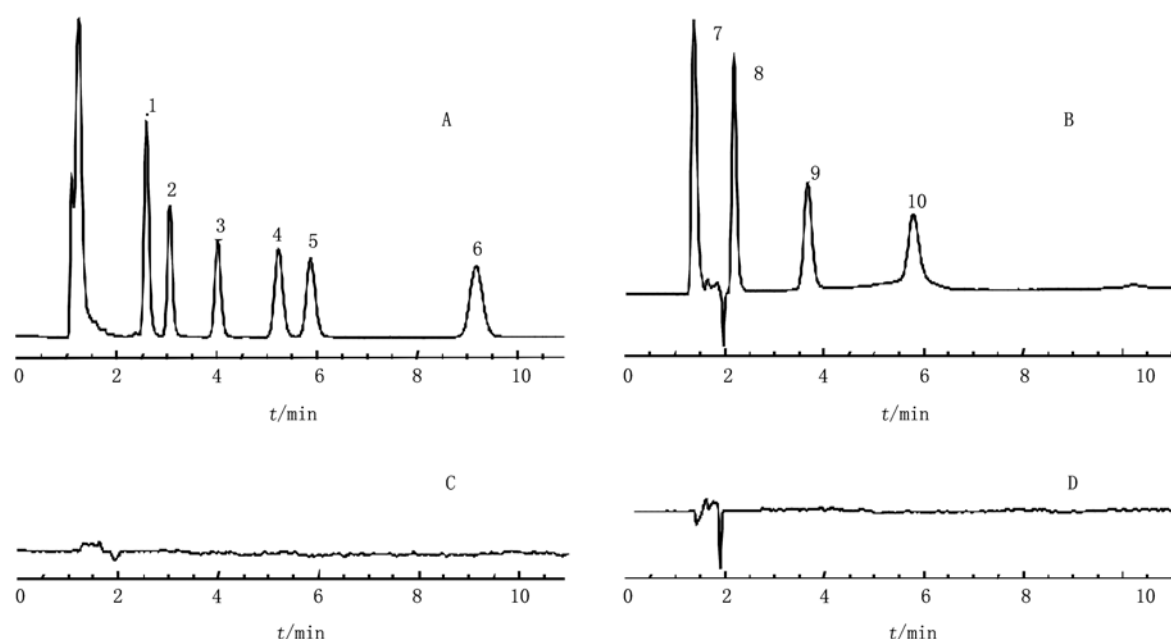


图 1 混合对照溶液和空白介质在流动相 I (A 和 C)和 II(B 和 D)条件下的色谱图

1-格列吡嗪；2-甲苯磺丁脲；3-格列齐特；4-格列本脲；5-格列美脲；6-格列喹酮；7-盐酸二甲双胍；8-盐酸苯乙双胍；9-盐酸罗格列酮；10-盐酸吡格列酮

Fig 1 HPLC chromatograms of standard solution mixture and blank solvent by mobile-phase I (A and C)and mobile-phase II (B and D)

1-glipizide; 2-tolbutamide; 3-gliclazide; 4-glibenclamide; 5-glimepiride; 6-glurenor; 7-metformin hydrochloride; 8-phenformin hydrochloride; 9-rosiglitazone hydrochloride; 10-pioglitazone hydrochloride

2.2 数据库中色谱参数的选择

色谱过程为溶质分子在流动相与固定相中的动态平衡过程，在某一色谱条件下，各成分因分配系数的大小不同而被分离，且在特定色谱条件下，各成分的分配系数是固定的，因而保留时间作为定性参数是可行的。

一般说来，DAD 光谱主要可提供分子中的共轭体系的结构信息，可据此判断共轭体系中取代基的位置、种类和数目，不能给出整个分子的结构信息。但将其用于已知范围内的成分鉴别却有很好的准确性，通常非法添加物为已知范围内的化学药物，一定条件下其色谱保留时间和紫外吸

收光谱特征可以由对照品获得。对适应症明确的中成药来说,其非法添加物种类是明确的,故可以预先建立相应的数据库,当被测物出现可疑峰时,可以结合保留时间和紫外光谱特征信息筛查候选物。

2.3 数据库的建立

2.3.1 保留时间数据库的建立 在特定色谱条件下,色谱流出物的保留时间是相对固定的,但相同类型不同厂家的色谱柱分离性能不一定相同,故以3种不同厂家的色谱柱(柱1、柱2、柱3的厂家依

次为 Waters, SHIMADZU 和 Alltina)为例进行实验,其他色谱条件相同,每种色谱柱,在2种流动相条件下各进5针混合对照品溶液,结果表明各成分的保留时间重复性好,而不同的色谱柱之间各成分的保留时间有较大差异,结果见表1。另外,即使使用同一色谱柱,在不同的液相色谱仪和柱温等条件下,色谱峰的保留时间也有差异,因此建议使用本方法现场检测时尽量使用固定的色谱柱,并事先在固有实验条件基础上建立各色谱柱的保留时间数据库,以提高此方法应用的准确性。

表1 对照品混合物经不同色谱柱分离的保留时间($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The retention time of the references separated by the columns from different manufactures($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

对照品	色谱柱					
	柱1		柱2		柱3	
	保留时间/min	RSD/%	保留时间/min	RSD/%	保留时间/min	RSD/%
格列吡嗪	2.588±0.001	0.050	3.175±0.004	0.14	3.411±0.001	0.032
甲苯磺丁脲	3.054±0.003	0.091	3.845±0.01	0.26	3.971±0.003	0.078
格列齐特	4.009±0.004	0.099	5.316±0.01	0.26	5.576±0.004	0.075
格列本脲	5.220±0.006	0.11	7.200±0.02	0.32	7.766±0.008	0.10
格列美脲	5.861±0.005	0.083	8.268±0.02	0.23	8.737±0.007	0.081
格列喹酮	9.163±0.01	0.12	13.78±0.03	0.25	13.94±0.02	0.13
盐酸二甲双胍	1.371±0.003	0.26	1.327±0.005	0.41	1.660±0.02	0.89
盐酸苯乙双胍	2.184±0.008	0.37	2.222±0.008	0.38	3.899±0.03	0.67
盐酸罗格列酮	3.663±0.02	0.60	3.718±0.04	1.10	9.225±0.07	0.77
盐酸吡格列酮	5.789±0.03	0.58	6.306±0.06	0.93	14.45±0.07	0.68

2.3.2 DAD 光谱库的建立 根据图1中各色谱峰的DAD-UV光谱图及其3D图谱建立10种化学降糖成分光谱图的数据库,见图2。由图2可见,10种化学降糖成分的DAD-UV光谱图有较大差异,甲苯磺丁脲和格列齐特的DAD-UV光谱虽然相似,但其保留时间有明显差别。因此可以通过综合分析色谱流出物的保留时间和光谱特征信息,得出可靠的结论。

2.4 样品的测定

2.4.1 HPLC 初步筛查 9批供试品溶液分别在流动相条件I、II下进行色谱分析,将样品色谱图中的各峰保留时间与数据库比较,发现有1批样品有可疑色谱峰,其保留时间依次为5.289 min(S1), 5.922 min(S2); 1.503 min(S3), 2.185

min(S4), 3.760 min(S5), 分别与数据库中格列本脲、格列美脲、盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍和盐酸罗格列酮的保留时间几乎一致,见图3。

2.4.2 DAD 光谱初步确证 分别将可疑供试品溶液在流动相条件I、II下各可疑色谱峰的DAD-UV及3D图谱(图4)与对照品(图2)一一对照,发现可疑供试品溶液中的色谱峰S1, S2, S4和S5的光谱特征分别与对照品格列本脲、格列美脲、盐酸苯乙双胍和盐酸罗格列酮一致,而色谱峰S3虽与盐酸二甲双胍的保留时间相似,但其DAD-UV及3D图谱却与对照品有着显著差异。因而,排除了可疑供试品含有盐酸二甲双胍的可能性,初步确证供试品可能非法添加了格列本脲、格列美脲、盐酸苯乙双胍和盐酸罗格列酮。

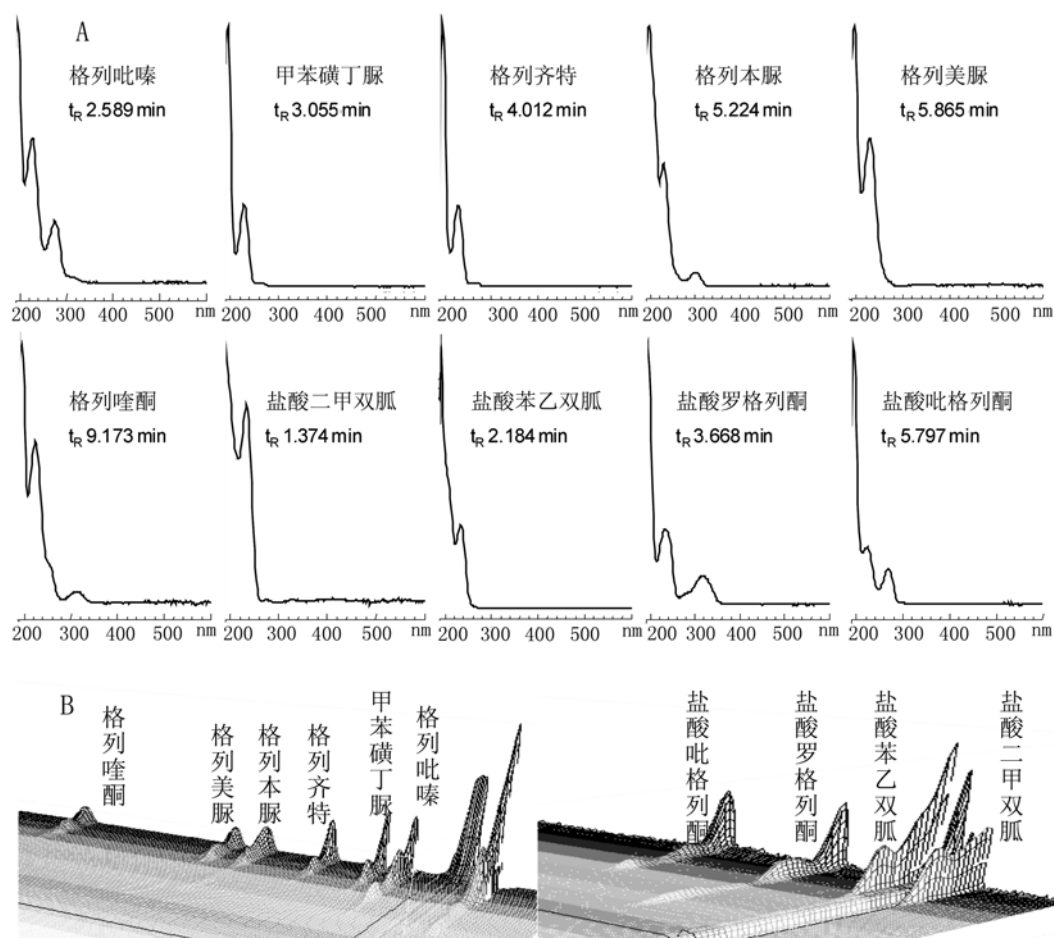


图 2 10 种化学降糖成分的 DAD-UV 光谱图(A)和 3D 图谱(B)

Fig 2 DAD-UV spectrum(A) and 3D spectrum(B) of ten kinds of anti-diabetic chemicals

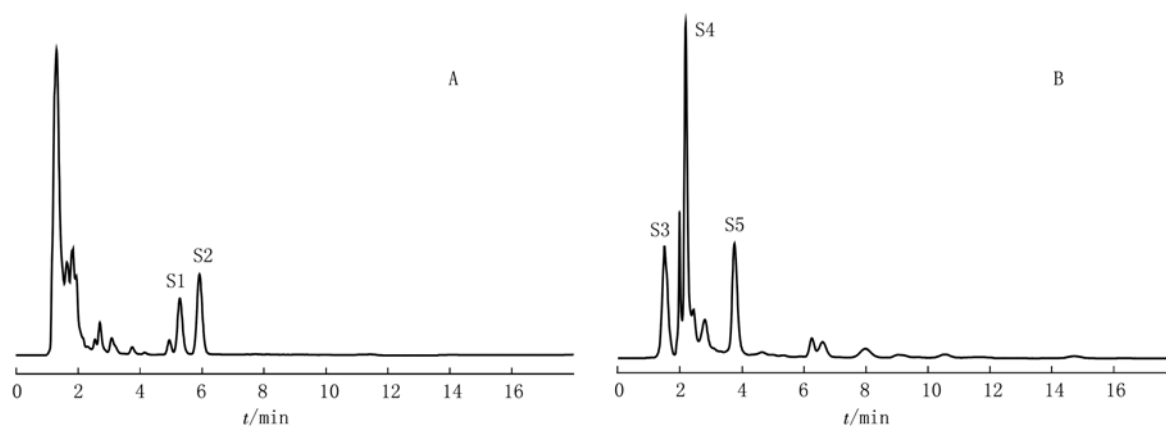


图 3 可疑供试品在流动相 I (A)和 II (B)条件下的色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of the suspicious sample by mobile-phase I (A) and mobile-phase II (B)

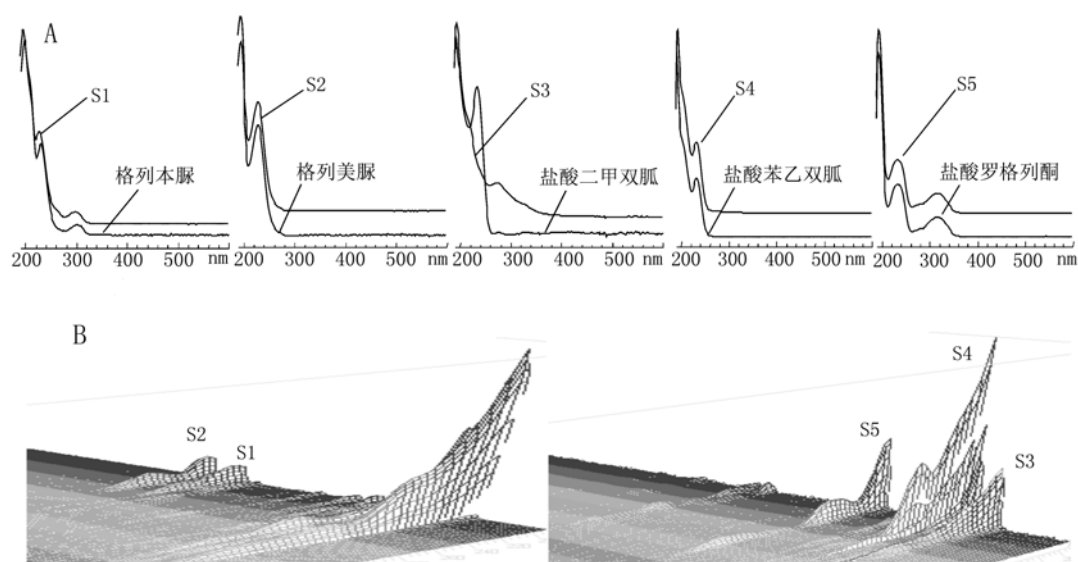


图4 样品可疑色谱峰的 DAD-UV 光谱图(A)和 3D 图谱(B)

Fig 4 The suspicious peaks' DAD-UV spectrum (A) and 3D spectrum (B) of the sample

2.4.3 LC-MS 的确证 为了验证本方法的准确性,对上述样品进行了 LC-MS 确证。采用文献报道的 LC-MS 条件^[8],采用正离子检测模式。一级扫描质谱分析中,供试品一级图谱中在与对照品盐酸苯乙双胍、盐酸罗格列酮、格列本脲和格列美脲对应位置出现的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 依次为 206.25(同位素比 100:12.14:0.74)、358.10(同位素比 100:22.37:6.44)、494.25(同位素比 100:23.13:41.63)和 491.25(同位素比 100:28.24:8.92),而相应对照品的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 依次为 206.14(同位素比 100:12.84:0.00)、358.12(同位素比 100:21.71:7.38)、494.15(同位素比 100:27.30:41.09)、491.23(同位素比 100:28.82:9.55),验证了可疑供试品中非法添加了盐酸苯乙双胍、盐酸罗格列酮、格列本脲和格列美脲,表明 HPLC-DAD 数据库可以用于中成药中非法添加化学成分的快速筛查,结果准确可靠。

3 讨论

在本试验所建的 HPLC-DAD 的数据库中可发现对照品甲苯磺丁脲和格列齐特的 DAD 光谱特征几乎一致,但其 HPLC 保留时间有明显差别,分离度在 4.5 以上,这在一方面验证了保留时间参考定性是可行的,另一方面也验证了综合应用 HPLC-DAD 数据库所得结果的可靠性。

本试验建立了 HPLC 等度洗脱方法及 HPLC-DAD 数据库,在很大程度上降低了消渴类中成药中非法添加物检查错检、漏检可能性,进一步为

药检工作人员现场筛查提供技术支持。虽然目前市场上已有具光谱检索功能的液相色谱仪,但需要特定的仪器设备,所以在一些基层药检单位,也可采用本方法,通过自己建立数据库,提高快速筛查效率。

研究发现各成分经不同色谱柱分离保留时间有些差异,但其 DAD 光谱图相对稳定,可作为数据库中稳定的定性参数,而且,保留时间在同一色谱柱上较为稳定,故建立 HPLC-DAD 数据库是可行有效的。另外,本试验提供的研究思路可以拓展到其他八大类中成药中非法添加物的快速筛查,有助于早日规范药品市场。

REFERENCES

- [1] YAN J, LIU Z Q, CHENG Z T. Recent advances and analytic technique on determination of chemical drug mixed illegally in Chinese medicine and Chinese health care food [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2007, 42(9): 716-718.
- [2] LIU F Y, LI J, XIE Y C, et al. Recent advances and analytic technique on determination of chemical drug mixed illegally in TCPM [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2008, 22(12): 1067-1071.
- [3] CHEN H Z, GONG J H. The innovational philosophy of medicine administration and sample testing against the behavior of chemical medicine mixed illegally in Chinese medicine preparation [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2009, 128(16): 324-326.
- [4] QIAN C F. Application of the rapidly testing technique in medicine administration and sample testing [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2005, 9(3): 230-231.
- [5] LÜ C H. Recent advances and future of the rapidly teseting of Chinese medicine [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2006, 20(11): 652-653.
- [6] GAO H M, LI X M. Reasons of some problems and analytic technique on determination of chemical drug mixed illegally in

- Chinese medicine [J]. J Huaihai Med(淮海医药), 2007, 25(2): 165-166.
- [7] LI R. Detection of chemical components illegally adulterated into traditional Chinese medicine and health food [J]. China Pharm(中国药业), 2007, 16(18): 10-11.
- [8] DONG Y C, DU S M, CHEN Y S, et al. Types and the harm of chemicals illegally added in Chinese traditional patent medicine and health food as well as countermeasures against the phenomenon [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(8): 1601-1602.
- [9] WU X H, LI H D. Detection of chemicals illegally adulterated into Chinese traditional medicine and health food [J]. Her Med(医药导报), 2009, 28(3): 342-344.
- [10] GAO S, YU L M, BI K S. HPLC-MS/MS fast detection of eleven kinds of anti-diabetic agents in traditional Chinese medicines and health care products [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(10): 1715-1718.
- [11] GUO D, NA SHUN CHAO KE TU, WANG J H, et al. HPLC detection of high poarity anti-diabetic medicine added in anti-diabetic traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2009, 27(2): 211-215.
- 收稿日期: 2010-08-12