

中药降糖制剂中非法掺入的化学降糖药物成分的检测

刘起中¹, 李慧义², 杭太俊³ (1. 山东省临沂市药品检验所, 山东 临沂 276001; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 3. 中国药科大学药物分析室, 南京 210009)

摘要:目的 建立能够同时检查中药制剂中可能非法添加的 10 种化学降糖药物成分 (盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、甲苯磺丁脲、格列吡嗪、格列齐特、罗格列酮、吡格列酮、格列本脲、格列美脲、格列喹酮) 的 HPLC。方法 采用 Thermo-ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.01 mol·L⁻¹ 的醋酸铵溶液 (A)-甲醇 (B) 梯度洗脱, 紫外 230 nm 检测, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果 在选定的色谱条件下, 10 种化学降糖药物有很好的分离。结论 该法灵敏准确, 有助于降糖中药制剂的质量检验监督。

关键词: 高效液相色谱法; 盐酸二甲双胍; 盐酸苯乙双胍; 甲苯磺丁脲; 格列吡嗪; 格列齐特; 罗格列酮; 吡格列酮; 格列本脲; 格列美脲; 格列喹酮

中图分类号: R917.101 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)01-0061-03

Determination of Chemical anti-diabetic Components Illegally Mixed in Traditional Chinese Medicines

LIU Qi-zhong¹, LI Hui-yi², HANG Tai-jun³ (1. Shandong Linyi Institute for Drug Control, Linyi 276001, China; 2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China; 3. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 21009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC gradient elution method for the simultaneous determination of 10 type chemical anti-diabetic components (Metformin Hydrochloride, Phenformin Hydrochloride, Tolbutamide, Glipizide, Gliclazide, Rosiglitazone, Pioglitazone, Glibenclamide, Glimepiride, or Glipizide) which may illegally adulterated into traditional Chinese medicines. **METHODS** The chromatographic conditions included the analysis column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate and methanol, flowing rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 230 nm. **RESULTS** 10 type chemical anti-diabetic medicines were separated well under the selected chromatographic conditions. **CONCLUSION** The method was proved to be sensitive and accurate, and could be used for the quality control and assurance of the traditional Chinese anti-diabetic medicines.

KEY WORDS: HPLC; metformin hydrochloride; phenformin hydrochloride; tolbutamide; glipizide; gliclazide; rosiglitazone; pioglitazone; glibenclamide; glimepiride; glipizide

近年来伴随着人们饮食习惯的改变, 糖尿病的发病率呈逐年上升趋势。降糖药物的临床需求一直很大, 特别中药降糖制剂由于具有治疗和调理的双重功效, 在临床上受到了重视并得到广泛应用。但目前一些不法分子, 为了提高疗效擅自在中药降糖制剂中掺入化学降糖药物成分, 对患者的健康与生命安全造成了重大危害。因此提高鉴别这类制剂中非法添加的化学成分的能力, 建立灵敏可靠的实验方法十分必要。已有报道用 RP-HPLC 两种色谱分离系统同时检测中药保健品中的 7 种化学降糖药物成分^[1], 液相色谱-质谱联用

法鉴别化学降糖成分苯乙双胍、格列本脲、格列齐特^[2-3]等。笔者研究建立了高效液相梯度洗脱法, 能够同时鉴别中药降糖制剂中可能非法添加的 10 种化学降糖药物成分, 方法灵敏准确。

1 仪器与试药

Waters600E 高效液相色谱仪系统, 在线脱气机, 四元泵, 2996 二极管阵列检测系统, Milennium32 色谱工作站, 2771 自动进样器; Milipore 超纯水制备系统。

盐酸二甲双胍 (批号 100664-200401)、格列吡嗪 (批号

作者简介: 刘起中, 男, 副主任药师 Tel: (0539) 8056533 E-mail: lqzly@163.com

100281-200001)、格列齐特(批号 100269-200402)、吡格列酮(批号 100634-200401)、格列本脲(批号 100135-200404)、格列美脲(批号 100674-200301)、格列喹酮(批号 100280-200301)、罗格列酮(纯度 99.6%)、盐酸苯乙双胍(纯度 99.8%)、甲苯磺丁脲(纯度 99.5%)对照品均由中国药品生物制品检定所提供;供试品为市售中药降糖保健品(市场监督抽样药品);所用试剂甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余所用试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

The mo ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 0.01 mol·L⁻¹ 的醋酸铵溶液 (A) 甲醇 (B) 流动相, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 柱温 30℃。梯度条件: 0 min (35% B) → 3 min (35% B) → 15 min (45% B) → 20 min (55% B) → 30 min (65% B) → 35 min (65% B)。理论塔板数按 10 个对照品峰计算均不低于 3 000。在该色谱条件下, 各对照品与样品均能得到很好的分离。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、甲苯磺丁脲、格列吡嗪、格列齐特、罗格列酮、吡格列酮、格列本脲、格列美脲、格列喹酮对照品各 10 mg 同置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密量取贮备液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取供试药用的一定数量的片剂、或胶囊的内容物研细, 精密称取适量 (约相当于一次口服剂量) 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇约 30 mL 超声处理 30 min, 放冷至室温, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜滤过, 滤液作为供试品液。

2.4 系统适用性试验

按“2.3”项下方法配制 14 种不含化学降糖成分的中药保健品的供试品溶液, 每种溶液各取 5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 各加入对照品贮备液 3 mL, 用甲醇定容, 摇匀, 得混合液。分别将混合液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录液相色谱图, 结果表明, 10 种对照品的分离度均大于 2.5 以上, 供试品中的其他组分峰与 10 个对照品峰之间的分离度均不小于 1.2。结果见图 1 图 2。

表 1 加样回收率结果 (n=6)

Tab 1 Results of recovery tests (n=6)

样品	平均回收率 / %									
	盐酸二甲双胍	盐酸苯乙双胍	甲苯磺丁脲	格列吡嗪	格列齐特	罗格列酮	吡格列酮	格列本脲	格列美脲	格列喹酮
苦瓜口含片	102.9	101.6	98.5	97.4	99.4	98.6	100.2	100.1	99.4	98.3
蜂胶胶囊	103.2	98.4	99.2	96.9	100.4	98.3	98.6	99.7	100.6	100.1
茯苓山药片	98.7	101.4	97.9	96.7	98.8	99.4	98.7	100.9	97.9	99.0

2.7 供试品检验结果

经对多批中药降糖制剂进行检测, 结果在苦瓜口含片、

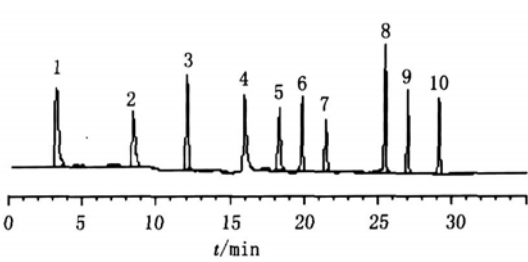


图 1 对照品溶液色谱图

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

Fig 1 HPLC chromatograms of standard solution

1 - Metformin Hydrochloride; 2 - Phenformin Hydrochloride; 3 - glibutamide; 4 - Glipizide; 5 - Gliclazide; 6 - Rosiglitazone; 7 - Pioglitazone; 8 - Glibenclamide; 9 - Glimepiride; 10 - Gliquidone

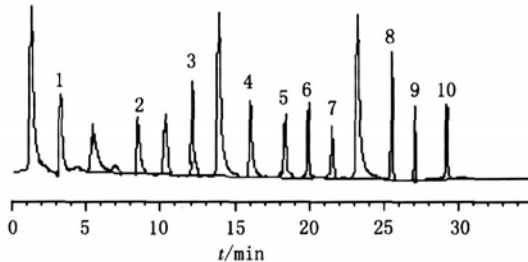


图 2 样品溶液色谱图

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

Fig 2 HPLC chromatograms of sample solution

1 - Metformin Hydrochloride; 2 - Phenformin Hydrochloride; 3 - glibutamide; 4 - Glipizide; 5 - Gliclazide; 6 - Rosiglitazone; 7 - Pioglitazone; 8 - Glibenclamide; 9 - Glimepiride; 10 - Gliquidone

2.5 检测限试验

将“2.4”项下的混合液用甲醇稀释至不同的浓度注入液相项色谱仪, 依法测定, 按 3 倍信噪比计算检测限, 10 种对照品的最低检测限均低于 0.01 μg·mL⁻¹。

2.6 加样回收率实验

分别精密取对照品贮备液 1, 5, 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 其余步骤按“2.3”项下同法操作。分别取制备的溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 依法测定, 记录液相色谱图, 按外标法以峰面积计算回收率, 回收率结果见表 1。

茯苓山药片、蜂胶胶囊、糖人健胶囊、绿因糖平口含片、糖安美片、苦乐康胶囊、降糖茶、糖新胶囊的样品液相色谱图中,

发现了和格列吡嗪、格列美脲、格列本脲、格列齐特、盐酸苯乙双胍对照品保留时间一致的色谱峰,采用二极管阵列检测器进行检验,证实这些检出成分的紫外吸收图谱和相应对照品的完全一致。同时对苦瓜口含片、茯苓山药片、蜂胶胶囊已鉴定出的西药成分进行了定量,其中10批苦瓜口含片检出格列吡嗪,含量0.52~1.04 mg/片,8批蜂胶胶囊中检出格列本脲,含量在0.08~0.78 mg/粒,6批茯苓山药片检出格列本脲,含量在0.06~1.02 mg/片。

3 讨论

3.1 结果确证

为保证检验结果准确无误,对阳性样品进行了LC-MS及MS-MS确证。采用正离子检测模式,分别检测到格列吡嗪准分子离子 $[M+H]^+$ 峰446、格列美脲 $[M+H]^+$ 峰491、格列本脲 $[M+H]^+$ 峰494、格列齐特 $[M+H]^+$ 峰324、苯乙双胍 $[M+H]^+$ 峰206;进行二级质谱全扫描可得各化合物主要碎片离子有:格列吡嗪 m/z 321、286,格列美脲 m/z 351、126,格列本脲 m/z 369、169,格列齐特 m/z 127、110,苯乙双胍 m/z 189、60;在相同条件下进行测定,阳性样品提取液中分别检测到上述化合物准分子离子及相应的碎片离子。LC-MS²检验结果证实本实验方法的准确性。

3.2 方法适应性试验

本实验建立的线性梯度色谱法在 Waters600E、Shimadzu LC-2010C和 Agilent1100高效液相色谱三种仪器系统上分别操作,10种成分的保留时间及峰面积重复性良好(RSD均小于0.6%)。

3.3 检测波长的选择

从二极管阵列检测器检测得到的紫外吸收图谱可以看出,10种成分中有6种在230nm波长左右有最大吸收,另4种成分在该波长处亦有较大的吸收,故将测定波长选在230nm能达到理想的检测灵敏度。

3.4 流动相的选择

考察了不同的流动相成分组成:A相曾分别选用不同浓度的磷酸二氢钾、磷酸铵、磷酸二氢铵,效果都不理想。最后选用0.01 mol/L的醋酸铵溶液,不但应用于HPLC梯度洗脱结果令人满意,而且也适合在需要用液相质谱做进一步确证时,选用该流动相。

3.5 近年来,中药中非法添加化学药物有愈演愈烈之势,同时掺入多种低浓度的化合物(或药物的同系物、衍生物)是新趋势之一^[4]。因此建立“一法多检”的检验方法具有重要意义。尽管LC-MS或GC-MS联用技术是目前各国普遍采用的确证此类掺假行为的终极方法^[5-6],但质谱仪器价格昂贵,操作要求高,仪器不普及,限制了在基层的打假应用。建立快速、简便、高通量的HPLC检验方法,适合基层药监、药检部门发现打击此类不法行为。本实验应用HPLC梯度洗脱法分析鉴别中药降糖制剂中10种比较常用的化学降糖药物,一次分析过程可在30 min内完成,方法灵敏准确,具有较好的专属性,可作为检查中药降糖制剂中可能非法添加上述化合物药物的初检方法。

REFERENCES

- [1] Y Q, CHE B Q. Detection of western antidiabetics in traditional Chinese medicines for health care by RP-HPLC[J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2005, 40(4): 316-317.
- [2] DONG Y, KONG Z, ZHONG D F. Detection of phenformin and glyburide illegally mixed into traditional Chinese medicine antidiabetic preparations by the liquid chromatography-mass spectrometry method[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2005, 22(1): 19-22.
- [3] WANG T J, QIU Y H, LI Y L, et al. Detection of phenformin and gliclazide illegally mixed into traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations by LC-QMS[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(12): 1453-1455.
- [4] LU F, LE J, CHEN G L, et al. Analysis of counterfeit measures against traditional Chinese medicines adulterated by synthetic drugs[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(1): 6-9.
- [5] LIU S Y, WOO S O, KOH H L. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances[J]. J Pharm Biomed Anal, 2001, 24(5-6): 983-992.
- [6] LAU A J, HOLMES M J, WOO S O, et al. Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 31(2): 401-406.

收稿日期:2007-06-20