

降糖类中药制剂中添加化学药品的检测方法研究

刘惠军,付萍萍,刘敏芳,陈维壹,董秋香,张月寒,赵志伟,孙志强(保定市药品检验所,河北 保定 071051)

摘要:目的 建立降糖类中药制剂中同时检测盐酸二甲双胍等 6 种化学药品的 HPLC。方法 采用 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以离子对试液 (取庚烷磺酸钠 0.5 g, 加三乙胺 1.4 mL, 加水至 1 000 mL, 用磷酸调节 pH 值至 3.5 $\pm$ 0.05) 甲醇为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 233 nm。结果 6 种化学药品均能得到较好的分离, 且在一定的进样量范围内呈现良好的线性。结论 本法快速、简便, 能同时对 6 种化学药品进行定性、定量分析, 可用于鉴定降糖中药制剂中是否添加化学药品。

关键词:降糖类中药制剂; 化学药品; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R927.11

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2008)06-0525-03

Study on the Method for Examining of the Chemical Medicine in Traditional Chinese Medicinal Antidiabetic Preparations

LIU Hui-jun, FU Ping-ping, LIU Min-fang, CHEN Wei-yi, DONG Qiu-xiang, ZHANG Yue-han, ZHAO Zhi-wei, SUN Zhi-qiang (Baoding Institute for Drug Control, Baoding 071051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method with gradient operation for the examining of metformin hydrochloride, phenformin hydrochloride, glibenclamide, glipizide, gliclazide, gliquidone in traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations.

METHODS Chromatographic assay was performed on a column of hypersil C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), using sodium heptanesulfonate solution (contain 0.5 g sodium heptanesulfonate and 1.4 mL triethylamine in 1000 mL of water, adjusted to pH 3.5 $\pm$ 0.05 with H_3PO_4) - methanol as the mobile phase with the flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹. The detective wavelength was set at 233 nm.

RESULTS Six compositions could be well separated. And their calibration curves were good over the range of definite sampler.

CONCLUSION The method is quick, convenient and can be used to analyze the quality and quantity for six chemical medicine. It can be employed to the examination of the chemical medicine in traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations.

KEY WORDS: traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations; chemical medicine; HPLC

近年来中药制剂的发展比较迅速,但暗自添加化学药品的行为也时有发生,这不仅严重违反了国家的有关法律法规,而且极易造成药害事故。特别是患者在不知情的情况下长期、大量服用所谓的纯中药降糖制剂,会使药物用量掌握不当,引发更多的疾病,甚至引起生命危险^[1]。因此有必要建立灵敏、可靠的分析方法对中药降糖制剂中非法添加的化学药品进行测定。本实验参照有关文献^[2],采用高效液相色谱法,利用 DAD 检测器,建立了降糖中药制剂中添加盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列喹酮 6 种临床常用的降糖化学药品的检测方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, ChemStation A. 10. 01 色谱工作站, G1379A 真空脱气机, G1311A 泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315BDAD 检测器; BP211D 电子

天平; pH-3C 型精密酸度计。

格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列喹酮对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号分别为 100135-200404, 100281-0001, 100269-200402, 100280-200301); 盐酸二甲双胍 (天津新新药业集团有限公司, 批号: 20040407, 含量为 99.1%), 盐酸苯乙双胍 (山东科源制药有限公司, 批号: 0606001, 含量为 99.4%); 样品为市售; 甲醇、庚烷磺酸钠为色谱纯试剂, 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 离子对试液 (取庚烷磺酸钠 0.5 g, 加三乙胺 1.4 mL, 加水至 1 000 mL, 用磷酸调节 pH 值至 3.5 $\pm$ 0.05, 以下同) - 甲醇 (0 ~ 3 min: 70: 30; 3 ~ 6 min: 70: 30 $\rightarrow$ 25: 75; 6 ~ 13 min:

基金项目: 河北省科学技术研究与发展指导计划课题 (06276419)

作者简介: 刘惠军, 男, 副主任药师

Tel: (0312) 5906186

E-mail: lhj_y80@tom.com

25: 75 13~ 17 m in 25: 75[→] 70: 30 17~ 30 m in 70: 30); 流速为 1. 0 mL• m in⁻¹; 检测波长: 233 nm; 柱温为室温; 进样量为 20 μ L; 理论板数按 6 个对照品峰计算均不低于 2 000 在该色谱条件下, 样品与 6 个对照品均能得到很好的分离, 见图 1 (为供试液色谱图减去相应溶剂色谱图所得)。

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、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列喹酮各 10 mg 置同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇 70 mL, 超声 15 m in 使溶解, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液; 精密量取对照品储备液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 (每 1 mL 中含 6 种对照品各约 40 μ g)。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2”项下对照品储备液 2.5 10 20 40 80 100 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。以盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列吡嗪、格列齐特、格列本脲、格列喹酮

表 1 保留时间、线性范围、回归方程和相关系数表

Tab 1 Ret time, linear ranges, regression equation and correlation coefficients

峰号	名称	保留时间 /m in	线性范围 / μ g	回归方程	r 值
1	盐酸二甲双胍	3.9	0.082 00~ 4.100	$Y = 4\,254.80X + 104.973\,0$	0.999 8
2	盐酸苯乙双胍	8.8	0.087 23~ 1.745	$Y = 3\,758.96X + 59.214\,3$	0.999 9
3	格列吡嗪	9.7	0.079 52~ 3.976	$Y = 2\,550.63X + 102.214\,0$	0.999 7
4	格列齐特	10.2	0.084 88~ 4.244	$Y = 2\,133.44X + 40.295\,3$	0.999 8
5	格列本脲	11.7	0.081 68~ 4.084	$Y = 2\,627.90X + 25.290\,4$	1.000 0
6	格列喹酮	15.6	0.081 84~ 4.092	$Y = 3\,079.79X + 83.191\,1$	1.000 0

2.4 样品测定结果

对从临床上收集到的降糖胶囊、糖尿乐胶囊 (片)、降糖宁胶囊、降糖舒胶囊、降糖甲片、消渴降糖胶囊 (片)、消渴灵片、金芪降糖片、参芪降糖颗粒、苦瓜胰活素赛申胶囊、甘露消渴胶囊、降糖康颗粒、麦冬消渴胶囊、民间降糖中药粉末、民间降糖中药胶囊、民间降糖中药丸等 16 个品种共计 24 个样品, 各取 2 片 (粒) /袋, 置研钵中研细, 加甲醇 10 mL 分次研磨, 并转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇 5 mL 将研钵洗净, 洗液并入量瓶中, 超声 15 m in 使溶解, 加离子对试液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液分别作为供试品溶液, 分别在上述色谱条件下测定。经液相色谱图、紫外光谱及三维光谱图分析, 1 个样品中同时含有格列本脲与盐酸苯乙双胍 (浓度大约为 27.4 116.7 μ g• mL⁻¹), 3 个样品中分别含有格列本脲 (浓度大约为 136.23 79.2 μ g• mL⁻¹), 另 20 个样品中均未检出盐酸二甲双胍等 6 种化学药品。

2.5 加样回收率试验

2.5.1 供试品溶液的制备 消渴降糖片: 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取 10 片量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 15 m in 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入对照品储备液 0.2 5 10 mL, 加离子对试液稀释至刻度, 摇匀, 即得。糖尿乐胶囊: 取本品 20 粒, 分别除去包装, 精密称定, 将内容物研细, 精密称取 10 粒量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超

本脲、格列喹酮的进样量 (μ g) 为横坐标, 相应峰面积为纵坐标, 进行线性回归。结果见表 1。

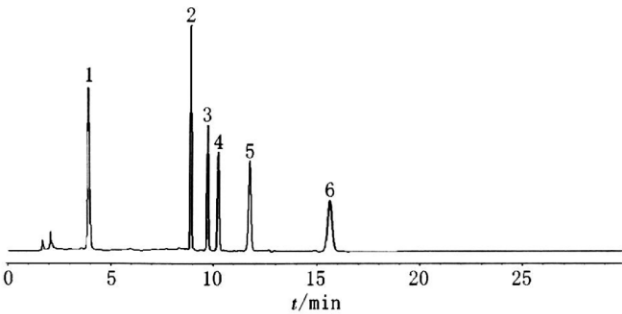


图 1 HPLC 图

1- 盐酸二甲双胍; 2- 盐酸苯乙双胍; 3- 格列吡嗪; 4- 格列齐特; 5- 格列本脲; 6- 格列喹酮

Fig 1 Chromatograms of HPLC

1- metformin hydrochloride; 2- phenformin hydrochloride; 3- glipizide; 4- gliclazide; 5- glibenclamide; 6- gliquidone

声 15 m in 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入对照品储备液 0.2 5 10 mL, 加离子对试液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.2 测定法 分别精密吸取供试品溶液与“2.2”项对照品溶液各 20 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。结果见表 2。

表 2 回收率测定结果

Tab 2 Results of recovery test

样品	盐酸二甲双胍 %	盐酸苯乙双胍 %	格列吡嗪 %	格列齐特 %	格列本脲 %	格列喹酮 %
消渴降糖片	102.4	96.4	99.6	98.1	104.4	105.0
糖尿乐胶囊	103.3	94.3	99.6	97.8	104.4	106.2

2.6 检测限的测定

将“2.2”项下对照品溶液用甲醇稀释, 分别制成每 1 mL 中含 6 种对照品各 10.2 1 μ g 的对照品溶液, 在上述色谱条件下进样测定。按 3 倍信噪比计算检测限, 6 种对照品的最低检测限不大于 1 μ g• mL⁻¹。

2.7 重复性试验

采用 C₁₈ 色谱柱 (BETASIL 125 mm × 4.6 mm, 3 μ m), 流速为 0.7 mL• m in⁻¹, 其它同“2.1”项色谱条件。取“2.2”项对照品溶液注入液相色谱仪, 出峰顺序依次为盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列吡嗪、格列齐特、格列本脲、格列喹酮。并参照有关文献^[2], 分别以甲醇-0.1% 磷酸二氢钠溶液

(用磷酸调节 pH 值至 3.0 ± 0.05) (70:30) 及甲醇 离子对试液 (30:70) 为流动相, 流速为 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 其他同“2.1”项色谱条件, 取“2.4”项供试品溶液同法测定, 与“2.4”项结论一致。

3 讨论

3.1 何笑荣等^[3]报道了应用 HPLC 对阿卡波糖的测定。笔者亦曾尝试阿卡波糖的测定, 但因其极性较强, 柱保留时间极短, 在“2.1”项色谱条件下较盐酸二甲双胍出峰早, 受中药制剂中极性成分干扰大, 无法检出, 尚有待进一步研究。

3.2 在同一色谱条件下同时分析以上 6 种降糖药物, 文献尚未见报道。由于 6 种成分极性相差较大, 且中药成分复杂, 故选择梯度洗脱进行测定。其结果可见 6 种降糖成分与中药能较好分离。

REFERENCES

- [1] CHEN Z S. Eight case of old patients diabetes mellitus Lactic acidosis due to phenformin[J]. People's Mil Surg(人民军医), 2001, 44(12): 714 - 715.
- [2] YU Q, CHE B Q. Examining of the Western medicine of antidiabetic in health care products of Chinese medicine by RP-HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2005, 40(4): 316 - 317.
- [3] HE X R, ZOU D, WU X J, *et al*. Determination of chemical medicines in the traditional Chinese medicines of anti-diabetes by RP-HPLC-DAD [J]. China Pharm(中国药师), 2005, 8(10): 827 - 829.

收稿日期: 2007-08-09