

HPLC 同时测定中成药中 13 种非法添加的降糖类化学药物

张学斌, 李俊, 张瑄(台州市药品检验研究院, 浙江 台州 318000)

摘要: 目的 建立同时测定中成药中非法添加 13 种降糖化学药物的方法。方法 采用 HPLC-DAD 进行测定, CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-十二烷基硫酸钠溶液(pH 3.5)为流动相进行梯度洗脱, DAD 检测器扫描, 提取波长 235 nm, 片剂、颗粒剂、丸剂、胶囊剂、口服液等中成药样品经甲醇提取, 通过保留时间和紫外吸收光谱进行定性, 峰面积外标法定量。检测的阳性样品以 UPLC-MS 进行确证, ESI 源, 正离子模式, SRM 扫描。结果 13 种降糖类药物成分能完全分离, 在 0.5~20 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 回收率为 94.36%~104.30%, RSD 为 0.5%~3.2%; 检出的 1 批阳性样品, 通过 UPLC-MS 能够得到确证。结论 该方法操作省时、结果准确可靠, 适用日常监管检验。

关键词: 中成药; 降糖作用; 非法添加; 高效液相色谱; 超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)01-0086-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.011

引用本文: 张学斌, 李俊, 张瑄. HPLC 同时测定中成药中 13 种非法添加的降糖类化学药物[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 86-92.

Simultaneously Detecting of 13 Kinds of Illegal Hypoglycemic Additives in Chinese Patent Drug by HPLC

ZHANG Xuebin, LI Jun, ZHANG Xuan(Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To construct an approach which can be used to assess the concentration of 13 illegal chemical hypoglycemic additives in Chinese patent drug simultaneously. **METHODS** HPLC-DAD was employed in this research. CAPCELL PAK C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The samples were eluted by methanol-sodium dodecyl sulfate solution with gradient concentration. DAD detector was used with wavelength of 235 nm. Different forms of Chinese patent drug were analyzed, which included tablets, granules, pills, capsules and oral solution. The samples were extracted using methanol. Qualitative results were determined using retention time and ultraviolet spectrum. Quantitative results were obtained via external standard method based on the area of absorption peak. The positive samples were verified using UPLC-MS (ESI, positive ion mode, SRM scanning). **RESULTS** The 13 hypoglycemic chemicals were completely separated. The linearity were good when the concentration in the range of 0.5–20 μg·mL⁻¹. The recoveries rate were 94.36%–104.30% with RSDs of 0.5%–3.2%. One batch of samples were tested positive, which was verified using UPLC-MS. **CONCLUSION** The method is timesaving and reliable, which is suitable for daily drug controlling supervision.

KEYWORDS: Chinese patent drug; hypoglycemic effect; illegal additive; HPLC; UPLC-MS

糖尿病当前已成为威胁人民健康的第一慢性病。中成药有其独特的疗效和不良反应发生率^[1-3], 得到广大患者的认可。市场上降糖类中成药种类多, 销售量大, 有不法分子在中成药中非法添加化学药物, 以牟取利益, 消费者在不知情的情况下服用这些中成药容易对其身心健康造成巨大危害。目前对降糖类中成药非法添加化学药品的检测方法报道很多, 一般为薄层色谱法^[4-6]、HPLC^[7-14]和 UPLC-MS^[15-21]。中国对于非法添加降糖药物现行的有 3 个检验补充方法, 分别为国家药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件(批准件编号: 2009029,

2011008, 2013001)^[22-24], 检测成分包括盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列本脲、格列美脲、甲苯磺丁脲、马来酸罗格列酮、格列齐特、瑞格列奈、盐酸吡格列酮、格列喹酮、格列吡嗪、盐酸丁二脲、格列波脲等 13 种降糖药成分, 检测方法包含 TLC、HPLC 和 UPLC-MS 等。3 个补充检验方法包含多个色谱系统, 采用的样品处理方法也不同, 日常监管如需检测以上非法添加的降糖类化学药物成分需分别进行样品处理, 采用不同色谱系统进行检测, 费时费力, 效率低下, 且没有盐酸二甲双胍的含量测定方法。为解决以上不足, 本研究尝试建立可同时测定非法添加 13 种降糖化学药

基金项目: 浙江省药品监管系统科技计划项目(2020008)

作者简介: 张学斌, 男, 硕士, 副主任药师 E-mail: zhangxuebin2@163.com

物成分的 HPLC-DAD 定性定量方法和 UPLC-MS 确证方法, 以期在日常监管提供技术支持。

1 仪器与试剂

Alliance 2695 型高效液相色谱仪、2998 二极管阵列检测器、Empower3 色谱工作站(美国 Waters 公司); Accela-TSQ Quantum Access 液质联用仪(Thermo 公司)。

盐酸二甲双胍(批号: 100664-201805; 含量: 99.9%)、盐酸苯乙双胍(批号: 100922-201001; 含量: 99.7%)、格列本脲(批号: 100135-201806; 含量: 99.9%)、格列美脲(批号: 100674-201904, 含量: 99.7%)、马来酸罗格列酮(批号: 100952-201902; 含量: 99.6%)、格列齐特(批号: 100269-201906; 含量: 99.9%)、瑞格列奈(批号: 100753-201303; 含量: 99.8%)、盐酸吡格列酮(批号: 100634-201703; 含量: 100%)、格列喹酮(批号: 100280-201403; 含量: 99.5%)、格列吡嗪(批号: 100281-201905; 含量: 99.5%)、格列波脲(批号: 520026-201401; 含量: 100%)等对照品来自中国食品药品检定研究院; 甲苯磺丁脲对照品(德国 DR Ehrenstorfer 公司, 批号: G1010498; 含量: 100%); 盐酸丁二脲对照品(加拿大 TRC 公司, 批号: 2-ESL-146-3; 含量: 100%)。14 批中成药为市售药品(包括胶囊剂、片剂、颗粒剂、丸剂、口服液), 信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of the samples

编号	样品名称	生产厂商	剂型	批号
1	降糖宁胶囊	厂家 1	胶囊剂	20201101
2	降糖宁胶囊	厂家 2	胶囊剂	201201
3	参芪降糖胶囊	厂家 3	胶囊剂	2004271
4	参芪降糖胶囊	厂家 3	胶囊剂	2006131
5	降糖胶囊	厂家 4	胶囊剂	210602
6	金芪降糖片	厂家 5	片剂	870130
7	消渴灵片	厂家 6	片剂	20122451
8	糖尿乐片	厂家 7	片剂	210310
9	参芪降糖片	厂家 8	片剂	2010125
10	消渴丸	厂家 9	丸剂	A01240
11	麦芪降糖丸	厂家 10	丸剂	210601
12	参芪降糖颗粒	厂家 11	颗粒剂	01200981
13	津力达颗粒	厂家 12	颗粒剂	B2012028
14	杞药消渴口服液	厂家 13	口服液	20210310

甲醇为色谱纯, 磷酸、三乙胺、十二烷基硫酸钠为分析纯, 甲酸为色谱级, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 HPLC-DAD 法定性定量

2.1.1 色谱条件 色谱柱: SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为十二烷基硫酸钠溶液(取十二烷基硫酸钠 0.35 g, 加 1 mL 三乙胺, 加水至 1 000 mL, 用磷酸调 pH 至 3.5)梯度洗脱(0~5 min, 40%A; 5~10 min, 40%→57%A; 10~23 min, 57%A; 23~30 min, 57%→80%A; 30~37 min, 80%A; 37~38 min, 80%→40%A; 38~55 min, 40%A), 检测波长: 235 nm; 210~400 nm 扫描, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温: 35 °C, 进样量: 20 μL。

2.1.2 对照品溶液配制 称取 13 种对照品约 10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇使其溶解并稀释至 400 μg·mL⁻¹ 的溶液为混合贮备液(4 °C 保存)。精密量取混合贮备液适量用甲醇逐步制成 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg·mL⁻¹ 的系列混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液配制 ①片剂、颗粒剂、丸剂等取 5 次剂量称重, 研细, 精密称取样品适量(约 1 次服用量), 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 15 min, 加甲醇至刻度, 摇匀。②胶囊剂取 5 次剂量的内容物称重, 精密称取样品适量(约 1 次服用量), 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 15 min, 加甲醇至刻度, 摇匀。③口服液取 5 次剂量混合, 精密量取 1 次剂量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 15 min, 加甲醇至刻度, 摇匀。取上述配制溶液滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。可根据检测结果适当稀释使检出浓度在线性溶液浓度范围内。

2.1.4 专属性考察 因中成药中基质复杂, 可能会影响各药物峰之间的分离度和方法的检出能力, 根据市场上常见的中成药剂型, 分别选用了胶囊剂、片剂、颗粒剂、丸剂和溶液剂的空白基质溶液将混合贮备液(400 μg·mL⁻¹)稀释到浓度为 10 μg·mL⁻¹ 的溶液进样, 对分离度进行了考察。本实验条件下, 13 种化学药物均能得到有效分离, 经 DAD 图谱确认可排除基质效应的干扰。典型的色谱图见图 1。

2.1.5 仪器精密度 取 20.0 μg·mL⁻¹ 混合对照品溶液进样 5 次, 计算 13 种化学药物的峰面积 RSD 为 0.3%~1.2%, 表明仪器精密度良好。

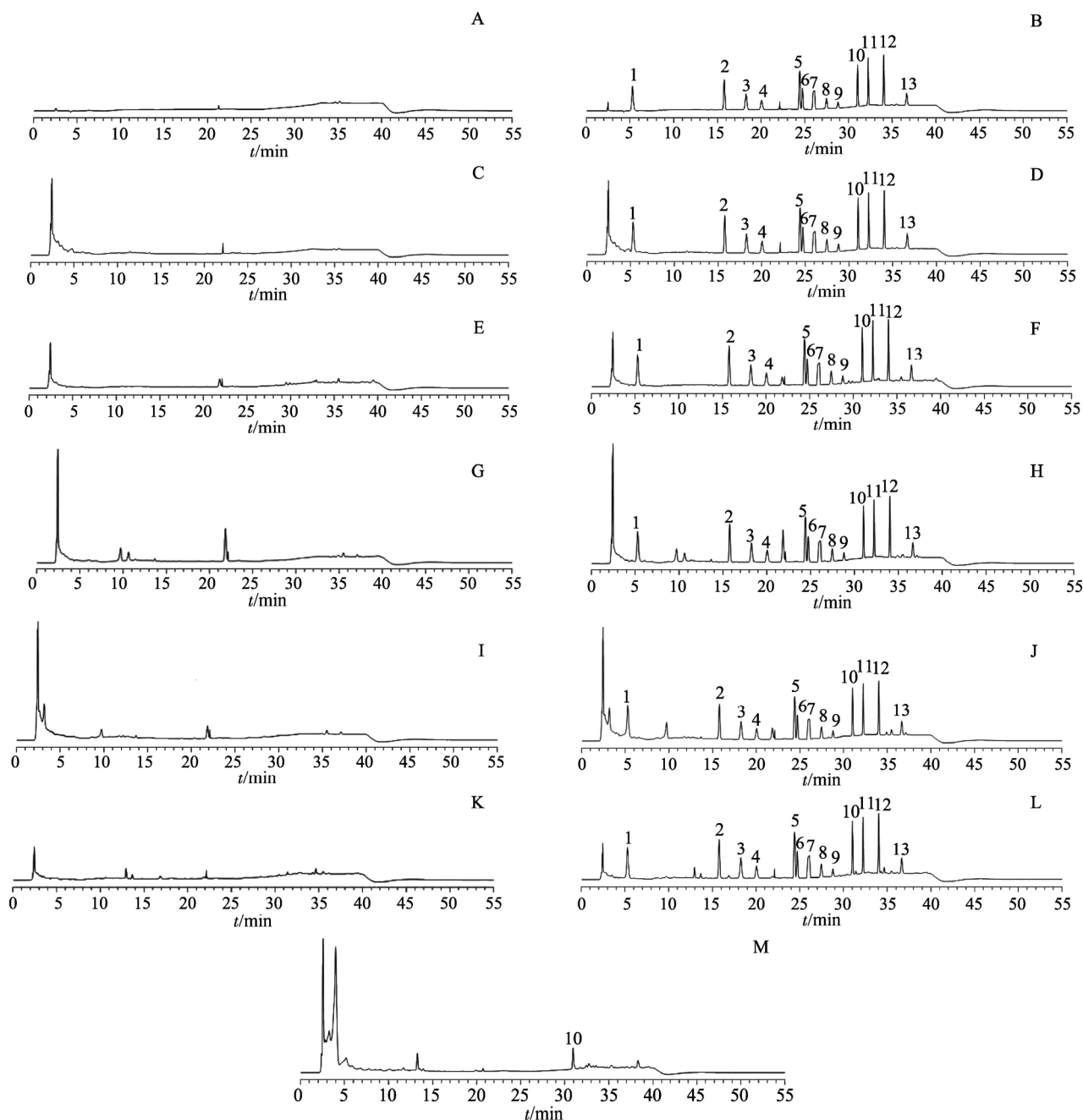


图 1 HPLC 分析图谱

A-空白溶液; B-对照品溶液; C-胶囊样品溶液; D-胶囊加标溶液; E-片剂样品溶液; F-片剂加标溶液; G-颗粒剂样品溶液; H-颗粒剂加标溶液; I-丸剂样品溶液; J-丸剂加标溶液; K-口服液样品溶液; L-口服液加标溶液; M-阳性样品; 1-盐酸二甲双胍; 2-甲苯磺丁脲; 3-格列吡嗪; 4-格列齐特; 5-盐酸丁二脲; 6-罗格列酮; 7-盐酸苯乙双胍; 8-盐酸吡格列酮; 9-格列波脲; 10-格列本脲; 11-格列美脲; 12-格列喹酮; 13-瑞格列奈。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank solution; B-reference sample solution; C-the test solution of capsule; D-the spiking solution of capsule; E-the test solution of tablet; F-the spiking solution of tablet; G-the test solution of granules; H-the spiking solution of granules; I-the test solution of pills; J-the spiking solution of pills; K-the test solution of oral liquid; L-the spiking solution of oral liquid; M-positive sample; 1-metformin hydrochloride; 2-tolbutamide; 3-glipizide; 4-gliclazide; 5-buformin hydrochloride; 6-rosiglitazone; 7-phenformin hydrochloride; 8-pioglitazone; 9-glibornuride; 10-glibenclamide; 11-glimepiride; 12-gliquidone; 13-repaglinide.

2.1.6 线性关系考察 取“2.1.2”项下混合对照品系列溶液分别进样,以各组分浓度(x , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,测得的峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到各化学药物成分的回归方程,结果见

表 2。结果 13 种降糖化学药物的相关系数均 >0.999 ,表明在各自线性范围内线性关系良好。

2.1.7 检出限及定量限 取对照品溶液($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),用不含上述药物成分的空白样品液

逐级稀释,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比3和10分别作为检出限与定量限,得到检出限为0.024~0.128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量限为0.121~0.505 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,结果见表2。与3个法定补充检验方法比较,本法二甲双胍、甲苯磺丁脲等9个药物的检出限和定量限低于法定补充检验方法,苯乙双胍、格列吡嗪等其他4个药物相近,满足灵敏度要求。

表2 13种降糖化学药物的线性回归方程、相关系数、范围、检出限、定量限

Tab. 2 Linear regression equation, correlation coefficient, concentration range, detection limit and quantitation limit of 13 hypoglycemic additives

化合物名称	回归方程	<i>r</i>	范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出限/ 定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
盐酸二甲双胍	$y=89\,747x-18\,483$	0.999 7	0.479~19.141	0.048 0.239
甲苯磺丁脲	$y=56\,510x-3\,880$	0.999 9	0.510~20.400	0.051 0.255
格列吡嗪	$y=66\,768x-5\,832$	0.999 9	0.516~20.636	0.052 0.260
格列齐特	$y=51\,894x-7\,502$	0.999 8	0.510~20.420	0.128 0.256
盐酸丁二脲	$y=72\,629x-5\,145$	0.999 9	0.498~19.940	0.025 0.125
马来酸罗格列酮	$y=43\,557x-3\,394$	0.999 9	0.503~20.139	0.050 0.252
盐酸苯乙双胍	$y=68\,277x-4\,432$	0.999 9	0.516~20.638	0.052 0.129
盐酸吡格列酮	$y=42\,386x-5\,984$	0.999 9	0.520~20.780	0.052 0.130
格列波脲	$y=34\,056x-4\,376$	0.999 9	0.505~20.200	0.126 0.505
格列本脲	$y=60\,547x-4\,122$	0.999 9	0.534~21.359	0.053 0.133
格列美脲	$y=67\,022x-2\,521$	0.999 9	0.503~20.119	0.050 0.126
格列喹酮	$y=74\,946x-1\,006$	0.999 9	0.481~19.323	0.024 0.121
瑞格列奈	$y=26\,082x-2\,817$	0.999 9	0.503~20.140	0.126 0.503

2.1.8 回收率 精密称取中成药胶囊剂样品(批号:20201101)内容物约2.0 g,共9份,分成3组,每组分别精密加入对照品混合溶液0.5,2,5 mL,按“2.1.3”项下的样品溶液配制方法配成高中低3个浓度的加标溶液进行回收率试验,各药物的回收率在94.36%~104.30%,结果见表3。

2.1.9 重复性 精密称取中成药胶囊剂样品(批号:20201101)内容物约2.0 g,共6份,分别精密加入对照品混合溶液2 mL,按“2.1.3”项下的样品溶液配制方法制备,得到的溶液分别进样测定,结果13种化学药物RSD为1.2%~2.8%。表明该方法重复性较好。

2.1.10 溶液稳定性 按“2.1.2”项下的方法制备20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,分别在0,6,12,24,36 h进样,计算13种化学药物的峰面积RSD为0.6%~2.0%,表明溶液稳定性较好。

2.2 UPLC-MS 确证

2.2.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7 μm);流速:0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;

进样量:5 μL 。流动相:A-甲醇,B-0.1%甲酸,梯度洗脱(0~2 min,10%A;2~8 min,10% $\rightarrow$ 90%A;8~10 min,90%A;10~10.1 min,90% $\rightarrow$ 10%A;10.1~15 min,10%A)。

2.2.2 质谱条件 电喷雾电离正离子模式(ESI^+);选择反应监测扫描(SRM);喷雾电压:4 000 V;毛细管温度:350 $^{\circ}\text{C}$;鞘气(N_2):20 arb;辅助气(N_2):5 arb;碰撞气(Ar)压力:1.5(1 mTorr=0.133 Pa),母离子、子离子、碰撞能量等见表4。

表3 13种降糖化学药物的回收率结果(*n*=9)

Tab. 3 Result of recovery rate of 13 hypoglycemic additives (*n*=9)

化合物名称	加入量/ μg	回收率/%			平均值/ %	RSD/ %
盐酸二甲双胍	217.4	100.51	101.78	98.21	100.5	1.8
	869.5	97.06	95.54	95.60	96.1	0.9
	2 174	99.26	98.55	99.41	99.1	0.5
甲苯磺丁脲	230.2	101.00	99.26	98.83	99.7	1.1
	920.8	99.21	96.63	97.66	97.8	1.3
	2 302	96.06	98.07	97.75	97.3	1.1
格列吡嗪	228.5	103.41	101.99	100.46	102.0	1.4
	913.8	101.14	97.91	97.12	98.7	2.2
	2 285	96.85	97.48	95.85	96.7	0.8
格列齐特	222.5	100.34	97.43	96.08	98.0	2.2
	889.9	102.15	99.84	96.84	99.6	2.7
	2 225	96.48	98.04	95.05	96.5	1.5
盐酸丁二胍	228.5	101.64	101.97	102.41	102.0	0.4
	914	97.68	96.20	98.17	97.3	1.1
	2 285	96.39	95.44	96.15	96.0	0.5
马来酸罗格列酮	230.9	97.46	96.48	99.3	97.7	1.5
	923.5	96.29	96.45	99.65	97.5	1.9
	2 309	100.39	98.19	99.64	99.4	1.1
盐酸苯乙双胍	219.2	100.69	95.79	97.72	98.1	2.5
	877.0	97.67	97.92	98.64	98.1	0.5
	2 192	101.05	99.99	100.14	100.4	0.6
盐酸吡格列酮	233.3	100.73	102.76	98.69	100.7	2.0
	933.2	97.62	95.05	95.96	96.2	1.4
	2 333	98.56	94.47	95.53	96.2	2.2
格列波脲	221.9	99.14	96.89	99.26	98.4	1.4
	887.6	99.06	99.03	96.86	98.3	1.3
	2 219	101.68	97.04	96.83	98.5	2.8
格列本脲	232.0	99.69	95.92	98.83	98.1	2.0
	927.9	104.30	100.93	102.01	102.4	1.7
	2 320	99.07	96.24	97.31	97.5	1.5
格列美脲	222.8	98.06	100.19	96.37	98.2	1.9
	891.3	99.38	99.40	98.28	99.0	0.6
	2 228	97.26	95.87	97.33	96.8	0.9
格列喹酮	206.7	102.46	100.41	99.68	100.8	1.4
	826.6	100.50	98.71	94.36	97.9	3.2
	2 067	99.28	98.82	102.20	100.1	1.8
瑞格列奈	234.4	98.75	96.94	99.18	98.3	1.2
	937.7	96.03	96.48	98.94	97.2	1.6
	2 344	98.48	98.23	96.86	97.9	0.9

表 4 各化合物质谱参数

Tab. 4 Parameters of MS for each chemical

检测化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
盐酸二甲双胍	1.00	130.2	60.4*, 71.4, 85.3	13, 20, 13
盐酸丁二胍	1.53	158.1	60.4*, 85.3, 141.2	15, 18, 13
盐酸苯乙双胍	4.07	206.1	60.4*, 77.3, 105.3	16, 47, 26
马来酸罗格列酮	5.50	358.2	94.3, 107.3, 135.2*	25, 34, 25
盐酸吡格列酮	6.05	357.1	118.2, 119.2, 134.2*	59, 41, 29
甲苯磺丁脲	7.03	271.2	91.3*, 155.2, 172.2	32, 16, 11
格列吡嗪	7.21	446.2	167.1, 286.1, 321.2*	27, 23, 12
格列齐特	7.35	324.1	91.2, 110.2, 127.2*	32, 21, 17
瑞格列奈	7.64	453.4	162.2, 174.2, 230.3*	20, 41, 28
格列波脲	7.85	367.0	152.1, 170.1*, 349.2	19, 15, 11
格列本脲	7.94	494.1	169.1, 304.1, 369.1*	29, 20, 12
格列美脲	8.15	491.2	126.2, 335.1, 352.2*	25, 22, 12
格列喹酮	8.42	528.2	202.1, 386.2, 403.2*	30, 22, 11

注: *-定量离子。

Note: *-quantitative ions.

2.2.3 样品溶液配制 根据液相检测结果, 样品溶液用 10% 甲醇稀释成适当浓度。

2.2.4 质谱条件优化 由于中成药中复杂基质的影响, 造成质谱检测有时会产生假阳性现象, 选择丰度最高的碎片离子为定量离子, 另外 2 个碎片离子作为定性离子, 考察定量离子和定性离子的丰度比以减少假阳性的发生, 对每种目标降糖类化学药物的碎片离子的碰撞能量等参数进行了优化最终确立了“2.2.2”项下的质谱条件。

2.3 结果

采用 HPLC 分别对降糖宁胶囊、金芪降糖片、参芪降糖颗粒、杞药消渴口服液、消渴丸等不同基质的 14 批样品进行了检测, 其中 1 批样品(样品 10)色谱保留时间及紫外光谱图与格列本脲对照品一致, 色谱图及紫外光谱图见图 1, HPLC 测得含量为每 5 丸 1.35 mg(每次服用量为 5~10 丸)。通过质谱 SRM 模式检测, 该批样品主峰的母离子和子离子均与对照品一致, 相对丰度比符合欧盟 2002/ 657/EC 法规关于定性判断时相对离子丰度的允许偏差范围, 确证检出格列本脲, 总离子流图见图 2。

3 讨论

3.1 样品提取方法优化

13 种药物在甲醇中均有较好的溶解性, 且提取后与流动相相溶, 故选择甲醇作为提取溶剂。其中格列本脲的溶解度相对较低, 为微溶于甲醇, 选取

检出了格列本脲的阳性样品进行样品处理方法的考察, 取样品按“2.1.3”项下的方法进行处理, 超声时间分别为 4, 8, 12, 15, 20, 30 min, 按本法测定, 记录格列本脲峰面积, 结果从 4~12 min, 峰面积增加, 12~30 min, 峰面积较为接近, 为了提取完全, 故设定超声时间为 15 min。

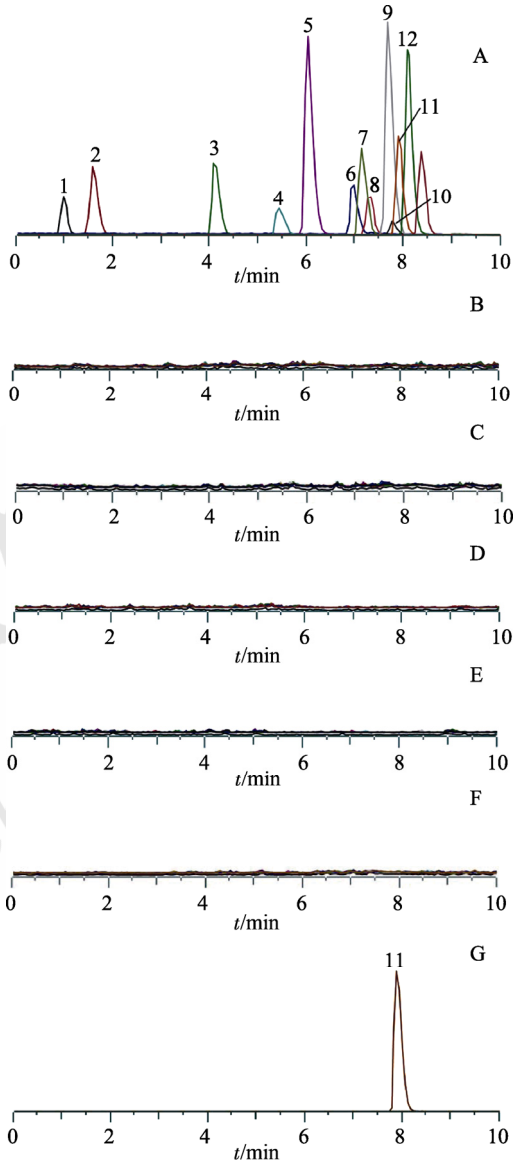


图 2 总离子流图

A-对照品溶液(10 ng·mL⁻¹); B-胶囊样品溶液; C-片剂样品溶液; D-颗粒剂样品溶液; E-丸剂样品溶液; F-口服液样品溶液; G-阳性样品; 1-盐酸二甲双胍; 2-盐酸丁二胍; 3-盐酸苯乙双胍; 4-罗格列酮; 5-盐酸吡格列酮; 6-甲苯磺丁脲; 7-格列吡嗪; 8-格列齐特; 9-瑞格列奈; 10-格列波脲; 11-格列本脲; 12-格列美脲; 13-格列喹酮。

Fig. 2 Total ion chromatograms

A-reference sample solution(10 ng·mL⁻¹); B-the test solution of capsule; C-the test solution of tablet; D-the test solution of granules; E-the test solution of pills; F-the test solution of oral liquid; G-positive sample; 1-metformin hydrochloride; 2-buformin hydrochloride; 3-phenformin hydrochloride; 4-rosiglitazone; 5-pioglitazone; 6-tolbutamide; 7-glipizide; 8-gliclazide; 9-repaglinide; 10-glibormuride; 11-glibenclamide; 12-glimepiride; 13-gliquidone.

3.2 关于盐酸二甲双胍测定方法的探讨

盐酸二甲双胍的极性相对较大,在普通的反相色谱条件下保留能力弱,而中成药的成分有较多极性物质,造成盐酸二甲双胍无法与中成药基质色谱峰完全分离,影响其定量。本法在保证足够准确性的前提下,采用较低的样品浓度来进行检测以尽可能地消除基质干扰,并采用离子对试剂十二烷基硫酸钠改变盐酸二甲双胍的保留,以能准确定量非法添加的盐酸二甲双胍。

3.3 方法灵敏度

根据文献[25],13种化学药物推荐的起效所需要的单次最小剂量为0.5 mg~0.25 g,其中瑞格列奈单次最小剂量最低,为0.5 mg,如按本研究方法制备得到的供试品溶液中瑞格列奈浓度为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (进样到HPLC中的量为400 ng),而本研究中瑞格列奈的定量限为 $0.503\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,完全满足该药物的定量检测的灵敏度要求。而其他12种化学药物的起效所需要的单次最小剂量均 $>1\text{ mg}$,起效所需要的浓度均在各药物定量限的50倍以上,

所以本方法完全满足13种非法添加化学药物定性定量检测的灵敏度要求。

3.4 小结

本研究参照中国药典2020年版四部9101药品质量标准分析方法验证指导原则对HPLC的专属性、线性、检出限、定量限等项目进行了考察,结果均符合相应的要求。采用本法对14批中成药品进行检测,结果发现1批阳性样品,由于中成药的阳性样品较少,故选取了日常检测中采用法定补充检验方法发现的6批阳性保健食品(胶囊剂:样品1、样品2;片剂:样品3、样品4;丸剂:样品5;颗粒剂:样品6)进行检测,经HPLC检测,并采用UPLC-MS检测确证,结果样品1检出二甲双胍和苯乙双胍成分;样品2检出苯乙双胍和格列本脲成分;样品3和样品4均检出格列本脲成分;样品5检出二甲双胍和格列本脲成分;中药制剂6检出二甲双胍、格列本脲和吡格列酮等成分,对上述阳性样品采用UPLC-MS检测,均得到确证,检测结果一致,见表5。

表5 阳性保健食品验证结果

Tab. 5 Validation results of positive health food

编号	样品名称	生产厂商	剂型	批号	检出化学药品
1	胰复糖康黄精苦瓜胶囊	厂家14	胶囊剂	20191228	二甲双胍、苯乙双胍
2	参麦氨基酸胶囊	厂家15	胶囊剂	20200613	苯乙双胍、格列本脲
3	复合蛋白压片糖果	厂家16	片剂	—	格列本脲
4	降糖1号	厂家17	片剂	—	格列本脲
5	降糖丸	厂家18	丸剂	—	二甲双胍、格列本脲
6	人參麥芽顆粒	厂家19	颗粒剂	20201021	二甲双胍、格列本脲、吡格列酮

研究表明,本法能同时检测13种降糖化学药物成分,与3个补充检验方法的筛选时间相比,能大幅缩短检测时间,同时实现了快速筛查、定量分析、质谱确证,方法结果准确可靠,适用于日常监管检验。

REFERENCES

[1] ZHU X Q, WANG B L. Mechanism of constituents migrating to blood of Jinqi Jiangtang tablet in treating diabetes mellitus by network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(4): 431-436.

[2] CHEN J S, ZHENG C. Application of Chinese herbal medicine intreatment of diabetes mellitus and its complications[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(23): 276-278.

[3] WANG Q Q, QIAN C, SONG Z J, et al. Clinical research progress of Chinese patent medicine in the treatment of type 2 diabetes[J]. Shanghai Med & Pharm J(上海医药), 2019,

40(19): 29-31.

[4] WANG Q, SU J, QIN H P, et al. Determination of eleven antidiabetics illegally adulterated into Chinese patent drugs and health foods by TLC[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2010, 24(7): 647-649.

[5] LIU S H, WU C M. TLC method for examining of rosiglitazone hydrochloride and pioglitazone hydrochloride illegally added in anti-diabetic agents[J]. Chin J Ethnomedi Ethnopharm(中国民族民间医药), 2010, 19(17): 44-45.

[6] GUO S Y, WANG Y, SUN W Y, et al. Study on rapid screening method of illegal adding chemical drug in traditional Chinese medicine[J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2011, 24(5): 710-712.

[7] SUI H S, WANG L J, XIE F. Detection of 10 kinds of antidiabetics illegally added in traditional Chinese medicines and health care products by HPLC- DAD[J]. China Pharm(中国药业), 2015, 24(22): 110-112.

[8] 李雪靖, 潘颖, 鄢素会. 降糖中成药中非法添加化学药品的HPLC法快速检测[J]. 河北医药, 2008, 30(6): 882.

[9] 陈云平, 梁转欢, 王衍洪, 等. HPLC-DAD法快速筛查检测

- 中成药及保健品中违法添加双胍类化学降糖药物分析[J]. 数理医药学杂志, 2016, 29(6): 867-869.
- [10] NASHUNCHAOKETU, HOU Y, YOU L H, et al. Simultaneous determination of nine anti-diabetic drugs in Chinese traditional patent medicines by HPLC[J]. China Pharm(中国药师), 2010, 13(4): 465-467.
- [11] OU B L, SHENG J, TU J H, et al. Rapid screening and detection of 3 biguanides added in traditional Chinese medicines and health products by HPLC-DAD[J]. China Pharm(中国药师), 2014, 17(8): 1263-1267.
- [12] LIU H J, FU P P, LIU M F, et al. Study on the method for examining of the chemical medicine in traditional Chinese medicinal antidiabetic preparations[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2008, 25(6): 525-527.
- [13] LIU Q Z, LI H Y, HANG T J. Determination of chemical anti-diabetic components illegally mixed in traditional Chinese medicines[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2008, 25(1): 61-63.
- [14] LIU S H, WU L P. HPLC method for examining of rosiglitazone hydrochloride and pioglitazone hydrochloride illegally added in anti-diabetic agents[J]. J Gannan Med Univ(赣南医学院学报), 2021, 41(9): 887-891.
- [15] 隋海山, 王立娟, 戚威. HPLC-MS/MS 法检测中成药和食品中违法添加的 10 种降糖类药物[J]. 中国医药指南, 2016, 14(1): 36-37.
- [16] GU X Z. Detection of hypoglycemic drugs illegally added in Haokangshu capsules by UPLC/MS/MS[J]. China Pharm(中国药师), 2016, 19(7): 1387-1391.
- [17] ZHANG Z, GAO Q, YU Q, et al. Detection of anti-diabetic agents in traditional Chinese medicines and health care products by HPLC-MS/MS[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2007, 38(1): 39-43.
- [18] LIU J, WANG Z H, WANG X L, et al. Rapid detection of 14 chemical drugs illegally added in antidiabetic traditional Chinese medicine by LC-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(23): 3009-3014.
- [19] WANG Y Q, WANG Y C, CHEN L, et al. Screening for 26 illegally added chemicals in Chinese traditional formulated medicine and health products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-flight mass spectrometry[J]. Food Ferment Indust(食品与发酵工业), 2020, 46(5): 263-269.
- [20] QIN J, XIE B Y, YANG Y P, et al. Simultaneous determination of 13 kinds of illegal drugs in antidiabetic supplements by HPLC-MS/MS[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2019, 40(19): 192-197.
- [21] GENG Y F, GONG Y F, YANG P, et al. Rapid detection of 13 illegally added hypoglycemic chemicals in traditional Chinese medicine preparations and healthcare products by solid core particle chromatography combined with UPLC-MS/MS method[J]. Port Heal Control(口岸卫生控制), 2019, 24(4): 27-30, 33.
- [22] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件(2009029)[S]. 2009.
- [23] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件(2011008)[S]. 2011.
- [24] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件(2013001)[S]. 2013.
- [25] 中国药典. 四部[S]. 2015: 584-606.

收稿日期: 2021-10-16

(本文责编: 李艳芳)