

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.15.009

降糖类中成药和保健食品中 13 种非法添加成分检测方法改进

黎 隽¹,裴小龙²,张 丽²,王一欣²

(1. 陕西省医疗器械质量监督检验院,陕西 西安 712046; 2. 陕西省食品药品检验研究院,陕西 西安 710061)

摘要:目的 建立测定降糖类中成药中 13 种非法添加成分的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),以乙腈为流动相(A)、0.02 mol/L 乙酸铵溶液为流动相(B)梯度洗脱,流速为 0.2 mL/min,检测波长为 235 nm,柱温为 35 ℃。结果 13 种降糖药物分离度良好,质量浓度线性范围为 0.313 8~59.93 μg/mL,相关系数在 0.999 以上;回收率为 94.13%~104.53%,RSD 为 1.09%~6.82% (n=8)。结论 该方法简便准确,重复性好,检出限低,能有效控制降糖类中成药和保健食品的质量。
关键词:中成药;保健食品;降糖类;非法添加成分;高效液相色谱法;药品监管

中图分类号:R932;R284.1;R255.4

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)15-0026-04

Improvement of Detection Method for 13 Illegal Components Added into Anti-Diabetic Chinese Patent Medicine and Health Food

LI Jun¹, PEI Xiaolong², ZHANG Li², WANG Yixin²

(1. Shaanxi Institute of Medical Device Quality Supervision and Inspection, Xi'an, Shaanxi, China 712046; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710061)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of 13 illegal components added into anti-diabetic Chinese patent medicine and health food. **Methods** The chromatographic column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ column(150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase A was acetonitrile, the mobile phase B was 0.02 mol/L ammonium acetate solution with gradient elution, the flow rate was 0.2 mL/min, the detection wavelength was 235 nm and the column temperature was 35 ℃. **Results** For 13 anti-diabetic drugs, the separation was good, the linear range was 0.313 8~59.93 μg/mL, the correlation coefficient was higher than 0.999, the recovery was in the range of 94.13%~104.53%, RSD was in the range of 1.09%~6.82% (n=8). **Conclusion** The method is simple, accurate, and reproducible, it has low detection limit and can effectively control the quality of anti-diabetic Chinese patent medicines and health food.
Key words: Chinese patent medicine; health food; anti-diabetic agent; illegally added components; HPLC; drug administration

目前,市场上很多降糖中成药和保健食品常会非法添加一些常用降糖类西药^[1]。原国家食品药品监督管理总局颁布的降糖类中成药和保健食品高效液相色谱检测法(批准件编号分别为 2009029,2011008,2013001)中测定 13 种非法添加成分需要采用 2 种方法,不仅耗时长(2 种方法共耗时近 120 min),且流动相离子对试剂的配制十分复杂(庚烷磺酸钠 0.505 6 g,加三乙胺 1.4 mL,加水至 1 000 mL,用磷酸调节 pH 至 3.5 ± 0.05),成本也很高。本研究中通过改变流动相的成分,在不影响检验效果的情况下缩短检验时间至 35 min,提高了检测效率,节约了检测成本。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:Agilent Infinity 1290 型高效液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器。

试剂:盐酸二甲双胍对照品(批号为 100664-200602),盐酸苯乙双胍对照品(批号为 100922-201001),格列吡嗪对照品(批号为 100281-200602),格列齐特对照品(批号为 100269-200603),马来酸罗格列酮对照品(批号为 100952-200701),盐酸吡格列酮对照品(批号 100634-200401),格列本脲对照品(批号为 100135-200404),格列美脲对照品(批号为

100674-201102),格列喹酮对照品(批号为 100280-201002),瑞格列奈对照品(批号为 100753-201102),格列波脲对照品(批号为 520026-201401),均购自中国食品药品检定研究院;样品为市场监督抽检降压类中成药及保健食品;盐酸丁二胍对照品(批号为 1-RLJ-70-1,加拿大 TRC 公司);甲苯磺丁脲对照品(批号为 SZBAOBXV,德国 Fluka 公司);乙腈、乙酸铵(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);检测器:二极管阵列检测器;检测波长:235 nm,210 nm~400 nm;柱温:35 ℃;流动相:乙腈(A)-0.02 mol/L 乙酸铵溶液(B),梯度洗脱程序见表 1;流速:0.2 mL/min;检测波长:235 nm;进样量:2 μL。

2.1.2 质谱条件

高效液相色谱仪:LCMS-8040;色谱柱:Zorbax SB-C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流速:0.2 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:2 μL;离子源:电喷雾离子源;电离模式:ESI+(正离子模式);流动相:甲醇(A)-

第一作者:黎隽,女,主管药师,研究方向为药品及医疗器械检验检测,(电子信箱)50485559@qq.com。

表1 高效液相色谱流动相梯度洗脱程序表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	10	90	25.0	45	55
1.0	10	90	28.0	75	25
6.0	28	72	33.0	75	25
12.0	35	65	33.1	10	90
20.0	45	55	35.0	10	90

表2 质谱流动相梯度洗脱程序表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	10	90	18.0	45	55
1.0	10	90	22.0	45	55
5.0	30	70	27.0	65	35
13.0	30	70	32.0	65	35

0.01 mol/L 乙酸铵溶液(B), 梯度洗脱程序见表2。

2.2 溶液制备

阳性对照品溶液: 称取13种对照品各10 mg, 精密称定, 分别置10 mL容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成质量浓度约为1 g/L的单标贮备液。临用时, 吸取不同体积各单标贮备液置同一25 mL容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成质量浓度为50 μg/mL的混标贮备液。详见表3。取上述13种单标贮备液各2.0 mL, 置同一25 mL容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成质量浓度分别为106.10, 106.20, 109.10, 67.12, 110.50, 97.84, 100.40, 99.12, 89.20, 103.80, 96.96, 166.50, 99.84 μg/mL的加标用混标贮备液。

表3 阳性对照品溶液

对照品	取样量(g)	单标贮备液折纯后浓度(g/L)	单标贮备液吸取体积(mL)	混标贮备液折纯后浓度(μg/mL)
盐酸二甲双胍	0.013 26	1.326	0.9	47.74
盐酸丁二胍	0.013 28	1.328	0.6	31.87
盐酸苯乙双胍	0.013 64	1.364	0.6	32.74
甲苯磺丁脲	0.008 39	0.839	1.5	50.34
格列吡嗪	0.013 81	1.381	0.9	49.72
格列齐特	0.012 23	1.223	1.3	63.60
格列波脲	0.012 55	1.255	0.5	25.10
格列本脲	0.012 39	1.239	0.9	44.60
马来酸罗格列酮	0.011 15	1.115	1.0	44.60
盐酸吡格列酮	0.012 97	1.297	1.0	51.88
格列美脲	0.012 12	1.212	0.9	43.63
瑞格列奈	0.020 81	2.081	0.9	74.92
格列喹酮	0.012 48	1.248	1.0	49.92

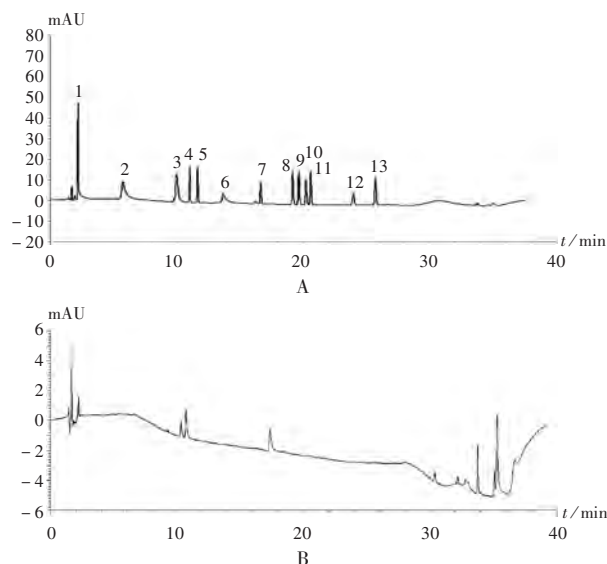
供试品溶液: 取市场监督抽检的降压类中成药及保健食品作为供试品, 每份取10粒(取胶囊内容物进行测定), 混匀, 精密称取相当于1次的服用剂量, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇25 mL, 称定质量, 超声提取30 min, 放至室温再称定质量, 用甲醇补足减失的质量。摇匀, 经

0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

阴性对照品溶液: 由于降糖类中成药和保健品制剂配方的多样性, 本试验中采用的阴性样品为胶囊剂, 选取历次监督抽检中有代表性的, 经过质谱验证确认未添加化合物的中成药或保健品。

2.3 方法学考察

干扰试验: 分别取2.2项下混标贮备液的10倍稀释液、阴性对照品溶液注入色谱仪, 按拟订色谱条件进行测定。结果阴性对照品溶液色谱中, 在对照品溶液相应位置无干扰峰, 说明本试验条件下阴性样品中的其他成分对测定无干扰。色谱图见图1。



1. 盐酸二甲双胍
2. 盐酸丁二胍
3. 盐酸苯乙双胍
4. 甲苯磺丁脲
5. 格列吡嗪
6. 格列齐特
7. 格列波脲
8. 格列本脲
9. 马来酸罗格列酮
10. 盐酸吡格列酮
11. 格列美脲
12. 瑞格列奈
13. 格列喹酮

A. 阳性对照品溶液 B. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

线性关系考察与检出限测定: 分别精密吸取0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 6.0, 8.0 mL混标贮备液置10 mL容量瓶中, 加甲醇至刻度, 得系列混合标准曲线溶液。在拟订色谱条件下, 以对照品溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。以对应质量浓度的色谱峰峰高大于3倍信噪比的质量浓度乘以进样体积(2 μL)得本方法的检出限。结果见表4。

精密度试验: 将混标贮备液连续进样6次。结果盐酸二甲双胍、盐酸丁二胍、盐酸苯乙双胍、甲苯磺丁脲、格列吡嗪、格列齐特、格列波脲、马来酸罗格列酮、格列本脲、盐酸吡格列酮、格列美脲、瑞格列奈、格列喹酮峰面积的RSD分别为3.76%, 1.71%, 3.18%, 0.92%, 0.87%, 0.99%, 1.22%, 1.95%, 1.93%, 1.16%, 0.90%, 1.06%和0.77% (n=6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取混合对照品溶液, 室温放置, 分别于

表4 线性关系考察与检出限测定结果

对照品	混合标准曲线溶液质量浓度($\mu\text{g/mL}$)							回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	检出限(ng)
	1	2	3	4	5	6	7				
盐酸二甲双胍	0.596 8	1.193 0	2.387	4.774	9.547	28.64	38.19	$Y = 3.790\,35 \times 10^4 X + 1.889\,068 \times 10^4$	0.999 6	0.597 0 ~ 38.19	2
盐酸丁二胍	0.398 4	0.796 8	1.594	3.187	6.374	19.12	25.50	$Y = 5.424\,836 \times 10^4 X - 3.779\,042 \times 10^3$	0.999 3	0.398 4 ~ 25.50	1
盐酸苯乙双胍	0.409 3	0.818 5	1.637	3.274	6.548	19.64	26.19	$Y = 5.318\,887 \times 10^4 X + 2.715\,208 \times 10^3$	0.999 2	0.409 3 ~ 26.19	1
甲苯磺丁脲	0.629 3	1.259 0	2.517	5.034	10.07	30.20	40.27	$Y = 2.476\,693 \times 10^4 X + 6.125\,582 \times 10^3$	0.999 5	0.629 0 ~ 40.27	2
格列吡嗪	0.621 5	1.243 0	2.486	4.972	9.943	29.83	39.77	$Y = 2.688\,101 \times 10^4 X + 6.916\,826 \times 10^3$	0.999 5	0.621 5 ~ 39.77	2
格列齐特	0.795 0	1.590 0	3.180	6.360	12.72	38.16	50.88	$Y = 2.232\,615 \times 10^4 X - 2.380\,047 \times 10^3$	0.999 4	0.795 0 ~ 50.88	2
格列波脲	0.313 8	0.627 5	1.255	2.510	5.020	15.06	20.08	$Y = 4.400\,393 \times 10^4 X + 8.152\,764 \times 10^3$	0.999 4	0.313 8 ~ 20.08	1
格列本脲	0.557 5	1.115 0	2.230	4.460	8.920	26.76	35.68	$Y = 3.211\,099 \times 10^4 X + 7.756\,994 \times 10^3$	0.999 4	0.586 5 ~ 37.54	2
马来酸罗格列酮	0.557 5	1.115 0	2.230	4.460	8.920	26.76	35.68	$Y = 3.561\,119 \times 10^4 X + 8.786\,894 \times 10^3$	0.999 4	0.557 5 ~ 35.68	2
盐酸吡格列酮	0.648 5	1.297 0	2.594	5.188	10.38	31.13	41.50	$Y = 2.334\,361 \times 10^4 X + 6.140\,018 \times 10^3$	0.999 43	0.648 5 ~ 41.50	2
格列美脲	0.545 4	1.091 0	2.182	4.363	8.726	26.18	34.91	$Y = 3.562\,328 \times 10^4 X + 8.420\,379 \times 10^3$	0.999 4	0.545 4 ~ 34.91	2
瑞格列奈	0.936 5	1.873 3	3.746	7.492	14.98	44.95	59.93	$Y = 1.805\,753 \times 10^4 X + 6.344\,292 \times 10^3$	0.999 4	0.936 5 ~ 59.93	2
格列喹酮	0.624 0	1.248 0	2.496	4.992	9.984	29.95	39.94	$Y = 3.077\,011 \times 10^4 X + 8.156\,342 \times 10^3$	0.999 5	0.624 0 ~ 39.94	2

1,2,4,8 h时进样测定。结果峰面积的 RSD 均在 1.0% ~ 4.0% 范围内,表明加标样品溶液在 8 h 内稳定。

加样回收试验:称取 4 份同一阴性样品(编号 1~4),每份 0.5 g,置 25 mL 容量瓶中,分别加入不同体积(0.5,1.0,2.0,3.0 mL)的加标用混标贮备液,加甲醇适量,超声提取 30 min,放至室温,用甲醇定容至刻度,摇匀,取续滤液,过滤(0.45 μm 滤膜),即为加标样品待测液。每份待测液平行测定 2 次,按外标法计算回收率。结果见表 5。

2.4 供试品测定

取供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,在不同供试品溶液色谱中,出现与对照品溶液色谱保留时间相应的色谱峰。采用二极管阵列检测器比较相应色谱峰的紫外-可见吸收光谱,取吸收光谱与对照品溶液相同的供试品溶液,按 2.1.2 项下色谱条件进行检验,离

表5 加样回收试验结果($n=8$)

成分	平均回收率(%)	$RSD(\%)$	成分	平均回收率(%)	$RSD(\%)$
盐酸二甲双胍	104.40	3.56	格列本脲	99.84	1.09
盐酸丁二胍	94.13	4.60	马来酸罗格列酮	103.85	1.79
盐酸苯乙双胍	97.04	6.82	盐酸吡格列酮	101.34	1.37
甲苯磺丁脲	98.50	1.97	格列美脲	98.45	1.33
格列吡嗪	96.91	1.16	瑞格列奈	101.14	2.79
格列齐特	104.53	4.92	格列喹酮	101.08	1.37
格列波脲	98.86	2.50			

子驻留时间均为 20 ms,13 种非法添加成分离子碎片信息见表 6,质谱图见图 2。结果表明,高效液相色谱法检测呈阳性的供试品,均经质谱确认含有待测非法添加成分。

3 讨论

原方法中使用甲醇和离子对试剂作为流动相,虽可使各化合物得到很好的分离,但要分两步进行,每一步

表6 13种非法添加成分的离子碎片信息及相关电压参数

成分	定量离子对(m/z)	定性离子对(m/z)	Q1(V)	CE(V)	Q3(V)	成分	定量离子对(m/z)	定性离子对(m/z)	Q1(V)	CE(V)	Q3(V)
格列本脲	367.10/170.05	367.10/170.05	-17.0	-16.0	-18.0	格列本脲	494.00/368.85	494.00/368.85	-23.0	-14.0	-26.0
		367.10/152.05	-17.0	-20.0	-30.0			494.00/168.95	-23.0	-34.0	-18.0
丁二胍	158.10/60.00	158.10/60.00	-17.0	-15.0	-25.0	格列喹酮	528.10/403.05	528.10/403.05	-26.0	-13.0	-29.0
		158.10/43.00	-11.0	-33.0	-16.0			528.10/386.00	-26.0	-22.0	-27.0
苯乙双胍	206.10/60.00	206.10/60.00	-14.0	-16.0	-20.0	瑞格列奈	453.20/230.05	453.20/230.05	-16.0	-29.0	-25.0
		206.10/105.00	-14.0	-27.0	+20.0			453.20/162.00	-16.0	-20.0	-17.0
格列吡嗪	446.10/321.00	446.10/321.00	-16.0	-14.0	-22.0	罗格列酮	358.00/135.00	358.00/135.00	-17.0	-26.0	-25.0
		446.10/166.95	-16.0	-30.0	-30.0			358.00/119.00	-17.0	-40.0	23.0
格列美脲	491.10/351.90	491.10/351.90	-17.0	-14.0	-25.0	甲苯磺丁脲	271.00/74.05	271.00/74.05	-18.0	-13.0	-14.0
		491.10/125.95	-17.0	-28.0	-23.0			271.00/154.95	-18.0	-32.0	17.0
二甲双胍	130.10/71.00	130.10/71.00	-13.0	-21.0	-27.0	格列齐特	324.10/127.00	324.00/127.00	-15.0	-18.0	-24.0
		130.10/59.95	-13.0	-14.0	-23.0			324.10/110.05	-15.0	-21.0	-20.0
吡格列酮	357.00/134.00	357.00/134.00	-17.0	-29.0	-25.0						
		357.00/119.05	-17.0	-40.0	-23.0						

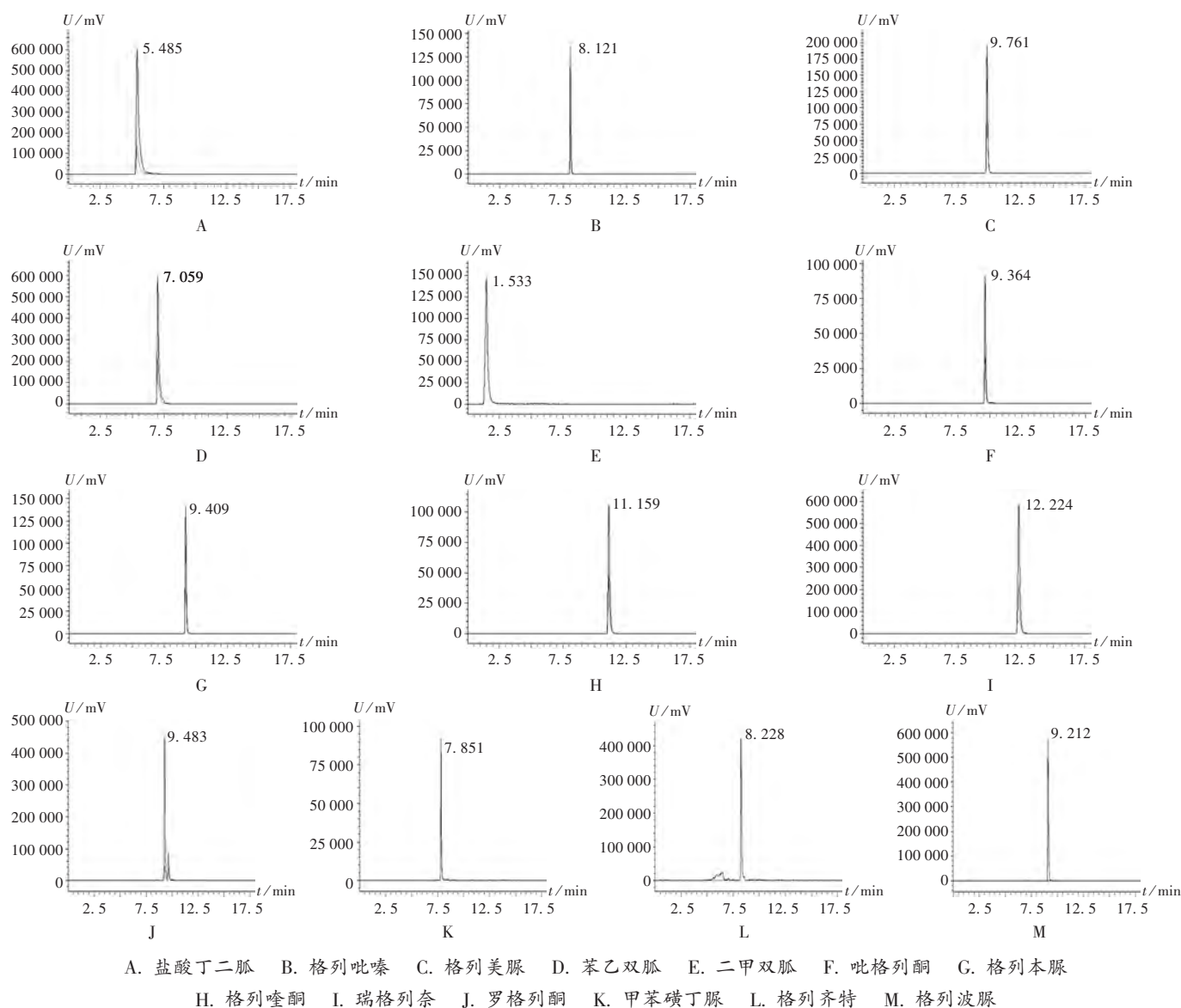


图2 质谱图

都要使用不同的流动相和洗脱程序,检验过程烦琐。考虑到非极性固定相,当溶剂极性增加时,待分离组分的保留值增加,分离度增大,利用这个原理改进方法,采用乙腈代替甲醇作为流动相A,延长了非离子型化合物的保留时间,从而达到了将其与离子型化合物(胍类)进行分离的目的。原方法中使用了离子对试剂(庚烷磺酸钠、三乙胺、磷酸水溶液)抑制溶质离子化,通过调整离子型化合物解离程度来调整其极性,最终达到调整其保留值、分离度的目的^[2-4],但离子对试剂成本较高,仅适用于离子型化合物的分离。考虑到低浓度的乙酸铵(0.005~0.01 mol/L)可提高离子化效率,且对11种降糖药物有很好的分离效果,而高浓度时(0.02~0.03 mol/L)则产生离子抑制效应,改变溶质极性、抑制峰形拖尾^[5],因此改进方法采用0.02 mol/L乙酸铵代替离子对试液,通过调整流动相的比例改善分离效果。

综上所述,本研究中对降糖类中成药的高效液相色谱

谱法流动相组分进行改进,不但能同时检测13种非法添加成分,且检测范围宽,检出限低,回收率高,线性关系良好,检测时间短,操作简单,费用低廉,可用于大批量市场监督抽检品非法添加物的快速筛查。

参考文献:

- [1] 张杰,孙红晶,杨涛涛. 我院2009~2011年降糖药用药分析[J]. 西北药学杂志,2013,28(6):639.
- [2] 刘宝,周莉莉,王骏,等. 基于二极管阵列检测器的色谱峰纯度的快速直观鉴定[J]. 光谱实验室,2011,28(4):128.
- [3] 张建丽,王占良,张亦农. LC-MS/MS法定性检测保健品中非法添加的降糖药[J]. 质谱学报,2009,30(5):271-274.
- [4] 邹汉法,张玉奎,洪名放. 反相离子对色谱中有机溶剂浓度和离子对试剂浓度对保留值的影响[J]. 化学学报,1994,52(11):68-73.
- [5] 施奈德LR,柯克兰JJ,格莱吉克JL. 实用高效液相色谱法的建立[M]. 张玉奎,王杰,张维冰,译. 第2版. 北京:华文出版社,2001:247-363.

(收稿日期:2019-02-12)