

## HPLC-MS/MS 检测中药保健品中非法添加成分的研究

吴俊辉<sup>1</sup>, 罗辉泰<sup>2</sup>, 沈小玲<sup>1</sup>, 黄芳<sup>2</sup>, 胡英杰<sup>1</sup> (1. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405; 2. 中国广州分析测试中心, 广东 广州 510070)

**摘要:** **目的** 采用高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS), 建立同时测定某“中药保健品”中非法添加的4种降糖药二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、格列苯脲的方法。**方法** 采用 Thermo BDS Hypersil C<sub>8</sub>(2.1 mm × 100 mm, 2.4 μm) 色谱柱, 0.2% 甲酸水溶液(A)和乙腈-甲醇(6:4, v/v)(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 在电喷雾正离子模式下, 以多反应监测(MRM)模式测定, 定量离子对为 m/z 129.9 → 70.9(二甲双胍)、m/z 205.9 → 59.9(苯乙双胍)、m/z 357.9 → 134.9(罗格列酮)、m/z 494.0 → 169.0(格列苯脲)。**结果** 同时检出了4种降血糖化学药物。检出限为 0.06 ~ 0.5 ng·mL<sup>-1</sup>, 定量限为 0.21 ~ 1.62 ng·mL<sup>-1</sup>, 在3个不同浓度的添加水平下, 4种化学药物的平均回收率为 66.3% ~ 110.2%, 相对标准偏差(RSD)为 2.3% ~ 12.2%。**结论** 该方法可快速、准确地检测保健食品中非法添加二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、格列苯脲4种降血糖化学药, 具有专属性强、灵敏度高的特点。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 多反应监测 MRM; 降糖药; 保健食品; 非法添加

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0606-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.021

### Simultaneous Determination of Four Antidiabetics Added to a Health-Care Food Illegally by HPLC-MS/MS

WU Junhui<sup>1</sup>, LUO Huitai<sup>2</sup>, SHEN Xiaoling<sup>1</sup>, HUANG Fang<sup>2</sup>, HU Yingjie<sup>1</sup> (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. China National Analytical Center(Guangzhou), Guangzhou 510070 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To develop a HPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of metformin, phenformin, rosiglitazone, and glibenclamide, four antidiabetics which were illegally added into a health-care food. **Methods** The separation was performed on a Thermo BDS Hypersil C<sub>8</sub> column(2.1 mm × 100 mm, 2.4 μm) by gradient elution with the mixture of 0.2% aqueous formic acid(A) and acetonitrile-methanol(6:4, v/v)(B) as mobile phase. The flow rate was set at 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The detection of 4 target chemicals was performed by positive-ion electrospray ionization mass spectrometry(ESI-MS) in multiple-reaction monitoring(MRM) mode. The transitions of four antidiabetics executed as following: m/z 129.9 → 70.9 for metformin, m/z 205.9 → 9.9 for phenformin, m/z 357.9 → 134.9 for rosiglitazone, m/z 494.0 → 368.8 for glibenclamide. **Results** Four antidiabetics had been simultaneously identified from the health-care food by the established method. The limits of detection(LOD, S/N ≥ 3) and quantitation(LOQ, S/N ≥ 10) were 0.06~0.5 ng·mL<sup>-1</sup> and 0.21~1.62 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively. The average recoveries of the four analytes at three spiked concentration levels were 66.3% to 110.2% with relative standard deviations (RSDs) at 2.3%~12.2%.

**Conclusion** The established method is convenient, rapid and accurate, and can be used for simultaneous determination of multiple antidiabetics in a health-care food which is labeled as a product of pure medicinal herbs.

**Keywords:** LC-MS/MS; Multiple reaction monitoring(MRM); Antidiabetic; Health-care food; Illegal addition

收稿日期: 2014-05-20

作者简介: 吴俊辉, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药化学分析。Email: 634627940@qq.com。通讯作者: 胡英杰, 博士, 研究员, 研究方向: 中药化学分析。Email: yingjiehu@gzucm.edu.cn。

保健食品由药食两兼物品制备,《保健食品注册管理办法(试行)》规定不得添加任何化学药物(西药)<sup>[1]</sup>。我国有数量较多的糖尿病、糖耐量异常人群,降糖药物和相应保健品需求量大,因此,建立一种中药制剂和保健食品中非法添加化学药物的检测方法,以防止制假行为尤为重要。检测非法添加化学物质的方法主要有薄层色谱法(TLC)<sup>[2-3]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[4-6]</sup>、高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法<sup>[7-10]</sup>。其中高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法利用 HPLC 分离目标化合物,用质谱检测目标分子母离子及其二级碎片离子,能够保证定性的可靠性,实验操作也较为简便、快捷,逐渐发展成为复杂组分中小分子有机物检测的主要手段。待检保健食品为某品牌“养胰平糖黄精山药胶囊”,已进入市场销售。其说明书声称是由山药、黄精、葛根、茯苓等纯天然草本植物制成的“纯天然药食产品”,适于中老年血糖偏高人群服用,在一些地方作为一种“高效”降血糖中药推销。为检查其中是否非法添加降血糖化学药物<sup>[11]</sup>,我们采用 LC-MS/MS 法对该检品进行了分析。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器** Agilent 1200 RRLLC 高分离度快速液相色谱仪、G1314C VWD (SL) 可变波长紫外检测器、6410B Triple Quad 三重四极杆质谱仪,美国安捷伦公司; Sartorius BT25S 电子天平,德国赛多利斯公司; AS 3120 超声波发生器,Auto Science 公司。

**1.2 试剂及材料** 测试样品:某品牌养胰平糖黄精山药胶囊,购于某医药商店,批号:20110401,无保健食品批号。对照品:盐酸二甲双胍(Metformin,批号:100664-200401)、盐酸苯乙双胍(Phenformin,批号:100922-200701)、马来酸罗格列酮(Rosiglitazone,批号:100135-200404)、格列苯脲(Glibenclamide,批号:100952-200701),均购自中国药品生物制品检定所。甲醇,分析纯,广州化学试剂厂;甲酸及乙腈,色谱纯,德国 Merck 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱:Thermo BDS Hypersil C<sub>8</sub> (2.1 mm × 100 mm, 2.4 μm); 保护柱:Phenomenex C<sub>8</sub> SecurityGuard; 流动相:A:0.2% 甲酸水溶液,B:乙腈-甲醇(6:4); 设置梯度(A+B=100%):0 min, 80%A; 1.50 min, 75%A; 1.51 min, 60%A; 7.00 min, 40%A; 7.01 min, 30%A; 8.00 min, 20%

A. 流速:0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

**1.3.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI); 正离子扫描模式; 扫描方式为多反应监测(MRM)模式; 干燥气(N<sub>2</sub>)温度:350 °C; 干燥气(N<sub>2</sub>)流量:10.0 L·min<sup>-1</sup>; 雾化气(N<sub>2</sub>)压力:275.8 kPa; 电喷雾电压:4000 V; 质谱参数见表 1。

表 1 4 种降糖药的质谱采集参数

Table 1 Parameters for ESI-MS/MS data of the 4 antidiabetics

序号	化合物	保留时间 /min	监测离子对 /m/z	碎裂电压 /V	碰撞能量 /V
1	二甲双胍	1.6	129.9→70.9*	80	24
	Metformin		129.9→59.9		12
2	苯乙双胍	4.9	205.9→104.9	115	28
	Phenformin		205.9→59.9*		16
3	罗格列酮	3.8	357.9→134.9*	135	28
	Rosiglitazone		357.9→106.9		40
4	格列苯脲	7.4	494.0→368.8	115	12
	Glibenclamid		494.0→169.0*		40

注:带“\*”号者为定量离子对。

**1.3.3 对照品溶液制备** 精密称取二甲双胍、苯乙双胍、格列本脲、罗格列酮对照品适量,加甲醇溶解并配制成每 1 mL 各含二甲双胍 4 μg, 苯乙双胍 2 μg, 格列本脲 2.5 μg, 罗格列酮 3 μg 的溶液作为对照品储备溶液。其他浓度的对照品溶液由储备液加甲醇稀释得到。

**1.3.4 供试品溶液制备** 取胶囊 4 粒,去壳,将内容物研成细粉,精密称取 0.5 g,置 100 mL 容量瓶中,加入甲醇 80 mL,超声处理 10 min,放冷至室温,加甲醇定容至刻度,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。调整稀释倍数确保供试品溶液的浓度在线性范围内。

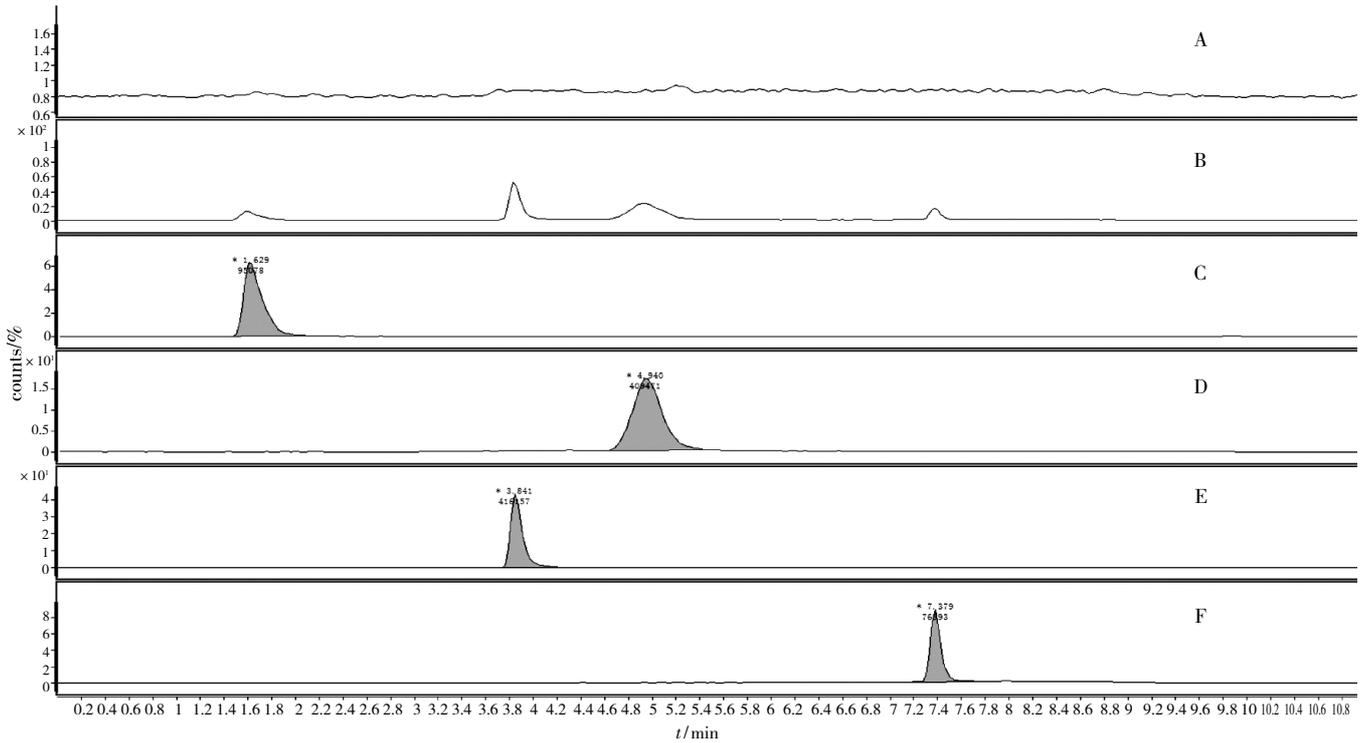
**1.3.5 阴性对照溶液制备** 按测试样品说明书处方制备含有中药材,不含盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、格列本脲、马来酸罗格列酮的制剂作为阴性样品,按供试品溶液制备方法制备。

## 2 结果

### 2.1 方法学考察

**2.1.1 专属性实验** 取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,按 1.3.1 及 1.3.2 项下色谱和质谱条件进行分析,由图 1 可知,阴性对照溶液中未检测到干扰成分。供试品色谱图中在与对照品相对应的保留时间上,有相应的色谱峰,并且与其他峰分离,表明方法专属性良好。

**2.1.2 精密度试验** 精密吸混合对照品溶液 5 μL,连



A. 阴性对照品; B. 对照品; C. 二甲双胍; D. 苯乙双胍; E. 罗格列酮; F. 格列苯脲

图 1 测试样品的阴性对照品、对照品总离子流及 MRM 色谱图

Figure 1 Chromatograms of total ions of negative sample and standards, as well as MRM chromatograms of standards

续进样 6 次, 测定峰面积。二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、格列苯脲的 RSD 值分别为 2.2 %、3.8 %、4.3 %、2.6 %。

**2.1.3 重复性考察** 取同批次测试样品, 制备供试品溶液 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“1.3.1 及 1.3.2”项下色谱和质谱条件测定各成分峰面积, 并计算其 RSD 值。二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、格列苯脲的 RSD 值分别为 4.3 %、2.9 %、4.6 %、3.2 %。

**2.1.4 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品溶液 5  $\mu\text{L}$ , 分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 后进样测定, 二甲双胍、苯乙双胍、罗格列酮、格列苯脲峰面积的 RSD 值分别为 3.8 %、4.5 %、3.5 %、5.1 %、2.3 %、4.1 %, 表明供试品室温放置 12 h 内稳定。

**2.1.5 加样回收试验** 见表 2。精密称取阴性样品 18 份, 平均分成 3 组, 分别加入 3 种浓度水平的混合对照品溶液, 按“1.3.4”项下方法操作, 制备供试溶液, 进样分析。由表 2 可见, 添加量为 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  时双胍类药物的回收率较低(66 % ~ 68 %)、RSD 较大(12.2 %); 在 5 ~ 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  添加水平时, 4 种药物的回收率(88.5 % ~ 102.2 %)、RSD(2.3 % ~ 7.9 %)良好。说明方法准确可靠。

表 2 加样回收试验结果

Table 2 Results of recovery

化合物	取样量/g	添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
二甲双胍	0.5	0.5	0.33	66.3	11.9
	0.5	5.0	4.48	89.6	5.3
	0.5	10	9.12	91.2	3.2
苯乙双胍	0.5	0.5	0.34	68.3	12.2
	0.5	5.0	4.43	88.5	5.8
	0.5	10	9.27	92.7	7.9
罗格列酮	0.5	0.5	0.38	75.6	2.3
	0.5	5.0	4.79	95.7	3.6
	0.5	10	1.02	102.2	5.9
格列苯脲	0.5	0.5	0.37	74.6	5.3
	0.5	5.0	4.49	89.8	3.6
	0.5	10	9.36	93.6	3.2

**2.1.6 线性范围** 见表 3。在选定的色谱、质谱条件下, 取对照品储备液加甲醇稀释成 6 个水平的系列对照品工作溶液, 进行 LC-MS/MS 分析。以峰面积(y)和质量浓度(x,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )作标准曲线, 得到线性回归方程, 相关系数在 0.9983~0.9996 之间, 表明各化合物在相应的浓度范围内呈良好的线性关系。

**2.2 样品含量测定** 运用本文建立的方法对测试样品进行检测, 检出了养胰平糖黄精山药胶囊中含二

表 3 4 种降糖药回归方程、相关系数、线性范围、检出限及定量限

化合物	回归方程	相关系数(R <sup>2</sup> )	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
二甲双胍	$y=533.1x+18.26$	0.9983	0.0016-0.16	0.16	0.53
苯乙双胍	$y=1062x-25.94$	0.9991	0.0016-0.16	0.16	0.54
罗格列酮	$y=1971x+57.19$	0.9996	0.0012-0.12	0.06	0.21
格列苯脲	$y=192.6x+12.99$	0.9986	0.002-0.2	0.51	1.62

甲双胍  $0.09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、苯乙双胍  $17.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、罗格列酮  $8.11 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  及格列苯脲  $2.49 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 质谱条件的优化 4 种降血糖化学药的全扫描二

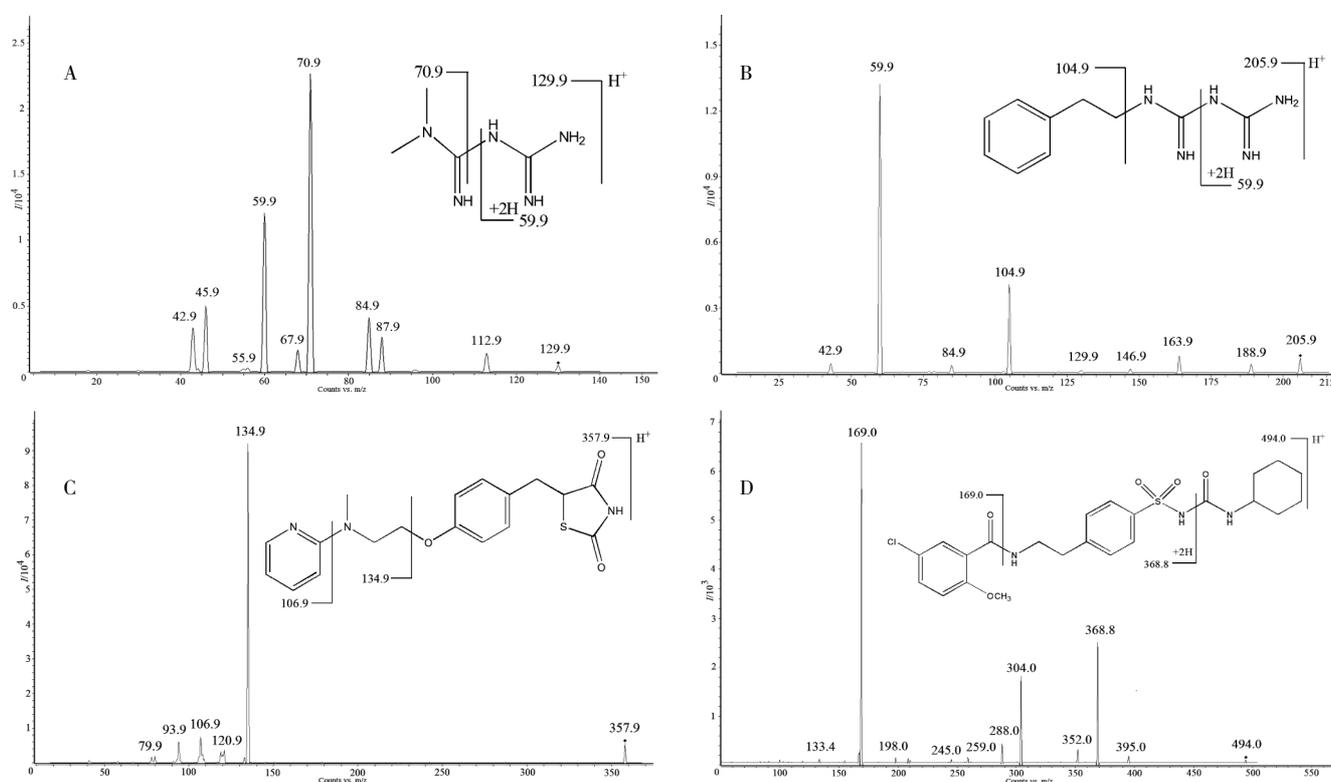


图 2 二甲双胍(A)、苯乙双胍(B)、罗格列酮(C)、格列苯脲(D)的二级质谱图主要质谱裂解产物  
Figure 2 Full-scan product ion spectra of  $[M+H]^+$  ions and fragmentation schemes for metformin (A), phenformin (B), rosiglitazone(C), and glibenclamide(D)

**3.2 色谱条件选择** 比较了 Zorbax XDB C<sub>18</sub>, Thermo BDS Hypersil C<sub>18</sub>, Thermo BDS Hypersil C<sub>8</sub> 及 Thermo HILIC 等不同色谱柱, 发现 C<sub>18</sub> 对格列苯脲的色谱保留较理想, 但对双胍类药物的保留较弱, 而 HILIC 亲水色谱柱对双胍类药物有较好保留, 但对格列苯脲则较差; 采用 Thermo BDS Hypersil C<sub>8</sub> 进行色谱分离, 效果较好。检品中苯乙双胍、格列苯脲、罗格列酮的

级质谱图及主要裂解途径见图 2, 二甲双胍准分子离子  $[M+H]^+$  为  $m/z$  129.9, 主要碎片离子有  $m/z$  70.9,  $m/z$  59.9, 苯乙双胍准分子离子  $[M+H]^+$  为  $m/z$  205.9, 主要碎片离子有  $m/z$  104.9,  $m/z$  59.9, 苯乙双胍准分子离子  $[M+H]^+$  为  $m/z$  205.9, 主要碎片离子有  $m/z$  104.9,  $m/z$  59.9 罗格列酮准分子离子  $[M+H]^+$  为  $m/z$  357.9, 主要碎片离子有  $m/z$  134.9,  $m/z$  106.9, 格列苯脲准分子离子  $[M+H]^+$  为  $m/z$  494.0, 主要碎片离子有  $m/z$  368.8,  $m/z$  169.0。选择母离子与碎片离子中丰度最高的离子作为定量离子对,  $m/z$  129.9 $\rightarrow$ 70.9 (二甲双胍),  $m/z$  205.9 $\rightarrow$ 59.9 (苯乙双胍),  $m/z$  357.9 $\rightarrow$ 134.9 (罗格列酮),  $m/z$  494.0 $\rightarrow$ 169.0 (格列苯脲)。

非法添加量较大, 在含量测定时, 可采用紫外检测器进行准确定量。

**3.3 非法添加多种化学药物的危害** 本研究从所谓的“保健食品”检出了 4 种降血糖化学药, 按照其说明书剂量 (每天 2 次, 每次 1~3 粒; 每粒 0.5 g) 推算, 日服的化药剂量: 苯乙双胍达 17.1~51.2 mg, 有造成乳酸性酸中毒危险<sup>[12-13]</sup>; 罗格列酮亦达 2.5~7.4 mg,

有可能超出临床常用剂量(4 mg/d), 该药禁用于心脏病、骨质疏松症等患者<sup>[4]</sup>; 格列本脲 8.1 ~ 24.3 mg, 有可能超出临床推荐的每日最大剂量(15 mg)。检测数据表明, 该“保健食品”可能在患者不知情的情况下产生化学药物的毒副作用伤害。

本文建立的 LC-MS/MS 同时测定某“保健食品”中非法添加的 4 种降糖药的方法, 具有准确、高效、灵敏的特点, 可为相关部门检测保健品中非法添加降糖药物提供技术依据。

### 参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理局. 保健食品注册管理办法 (试行)[EB]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1131/24516.html>.
- [2] 施亚琴, 姚静, 张启明, 等. 薄层色谱法快速筛查降血糖中成药及保健食品中添加磺酰脲类化学降糖药[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(1): 36-39.
- [3] 李亚琴, 钱丽华, 申兰慧. 薄层色谱法快检降糖中药添加的格列齐特[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(2): 319-320.
- [4] 余倩, 车宝泉. RP-HPLC 检查中药保健品中的西药降糖成分[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(4): 316-317.
- [5] 袁向华, 鲁玉侠, 蔡妙颜, 等. 蜂胶中盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍和格列本脲 HPLC 测定方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(7): 125-127.
- [6] 郭栋, 那顺朝克图, 王江华, 等. 高效液相色谱法测定降糖中成药中添加的高极性化学降糖药物[J]. 色谱, 2009, 27(2): 211-215.
- [7] 郭继芬, 陈笑艳, 钟大放. 6 种口服降糖药的液相色谱-质谱分析[J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 5-8.
- [8] 董宇, 孔璋, 钟大放. 液相色谱-质谱联用法检测中药降糖制剂中非法掺入的苯乙双胍和格列本脲[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(1): 19-22.
- [9] 刘福艳, 谢元超, 刘福强, 等. 液相色谱-质谱联用法检测 2 种中药降糖制剂中非法掺入的二甲双胍、苯乙双胍、格列吡嗪、格列本脲[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 440-444.
- [10] 罗疆南, 曹玲, 谭力, 付滢舟, 王玉. HPLC-MS/MS 检测中药及保健品中添加的 11 种降糖类化学药物[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(11): 862-864.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 保健食品中可能非法添加的物质[EB]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1162/76614.html>.
- [12] 时友忠, 李泰平. 苯乙双胍致中老年人糖尿病乳酸性酸中毒 2 例[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(3): 205-206.
- [13] 汤文璐, 王永铭, 杜文民, 等. 国内 42 年文献源抗糖尿病药物的不良反应分析[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(12): 753-758.
- [14] 国家食品药品监督管理局. 关于加强罗格列酮及其复方制剂使用的通知[EB]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0844/54802.html>.

(编辑: 邓响潮)

## 小儿清肺颗粒质量标准研究

刘玉明<sup>1</sup>, 蒋玉虎<sup>1</sup>, 张海滨<sup>2</sup> (1. 天津理工大学化学化工学院, 天津 300384; 2. 河北巨龙药业有限责任公司河北 南宫 055750)

**摘要:** 目的 制定小儿清肺颗粒(茯苓、清半夏、川贝母、百部等)的质量标准。方法 采用薄层色谱法(TLC)法对小儿清肺颗粒中茯苓、川贝母进行定性鉴别; 采用高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)对小儿清肺颗粒中川贝母的有效成分贝母辛和贝母素乙同时进行定量测定, 采用 Comatex C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.02%三乙胺水溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 漂移管温度 90 °C, 雾化室温度 35 °C, 载气压力 46.2 psi。结果 茯苓、川贝母的薄层斑点清晰, 分离度好, 专属性强, 阴性对照无干扰。贝母辛在 2.380 ~ 23.800 μg 范围内, 其进样质量的常用对数(X)与峰面积积分值的常用对数(Y)具有良好的线性关系( $r=0.9996$ ), 平均加样回收率为 99.6%, RSD 为 0.20%; 贝母素乙在 1.440 ~ 14.400 μg 范围内, 其进样质量的常用对数(X)与峰面积积分值的常用对数(Y)具有良好的线性关系( $r=0.9997$ ), 平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 0.43%。结论 所建立的方法可靠、准确、专属性强, 可用于小儿清肺颗粒的质量控制。

**关键词:** 小儿清肺颗粒; 质量标准; 高效液相色谱; 薄层色谱; 贝母辛; 贝母素乙

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0610-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.022

收稿日期: 2014-03-18

作者简介: 刘玉明, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物化学的教研工作及现代中药研究。Email: coumarin@tom.com。