

## 分析测试

## 降糖类中成药中非法添加化学成分的测定

付大友, 陈祥辉, 谭文渊, 王绍楠, 张小芳

(四川理工学院材料与化学工程学院, 四川 自贡 643000)

**摘要:**通过超声-微波协同萃取仪预处理样品,建立了降糖类中成药中非法添加的盐酸二甲双胍、格列苯脲、格列吡嗪3种化学物质同时分离测定的高效液相色谱方法。采用 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱,以  $V(0.1 \text{ mol/L}$  磷酸二氢钠缓冲液):  $V$ (甲醇)为 30:70 作流动相,流速为  $1.0 \text{ mL/min}$ ,检测波长为  $233 \text{ nm}$ ,柱温为  $30^\circ\text{C}$ ,进样量为  $20 \mu\text{L}$ 。该方法快速、灵敏度高、重现性好,适用于大批量样品的快速鉴别。

**关键词:**降糖类;中成药;非法;添加

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2012)01-0094-03

### Determination of chemicals mixed illegally in anti-hypoglycemic Chinese patent medicine

FU Da-you, CHEN Xiang-hui, TAN Wen-yuan, WANG Shao-nan, ZHANG Xiao-fang  
(Material and Chemical Engineering College, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract:** In this paper, the HPLC method of separating and determining three kinds of chemical compounds, metformin hydrochloride, glibenclamide and glipizide, which were mixed illegally in antidiabetic traditional Chinese medicine, was established after the pretreatment of sample by ultra sonic-microwave-assisted extractor. The details are shown as follows: ZORBAX Eclipse XDB-C18 column, mobile phase of  $0.1 \text{ mol/L}$  sodiumhydrogen phosphate buffer solution-methanol (30:70 of volume ratio),  $1 \text{ mL/min}$  of flow rate,  $233 \text{ nm}$  of detection wave length,  $30^\circ\text{C}$  of column temperature and  $20 \mu\text{L}$  of the volume of injection. The method is rapid, highly sensitive and reappearing consistently. Therefore, it is suitable for the rapid identification of the multitudinous samples.

**Key words:** hypoglycemic; Chinese patent medicine; illegal; addition

据 2011 年我国最新一轮糖尿病患者统计报告显示,中国糖尿病患者已达 9 200 万人,未来 10~20 年,这一数字还将快速攀升。面对如此庞大的降糖药市场,一些不法生产厂商在一些降糖类中成药中非法添加化学成分,打着纯中药的牌子来骗取消费者的信任以牟取暴利。由于剂量不定,毒副作用无法控制,患者若在不知情的情况下持续、大量服用这样所谓的纯中药降糖制剂,易给患者带来不良反应,甚至造成药物性伤害。笔者对目前常用降糖类中成药中的违禁成分进行了探索,查阅有关资料<sup>[1-8]</sup>,建立了降糖类中成药中非法添加的盐酸二甲双胍、格列苯脲、格列吡嗪 3 种化学物质的同时分离测定方法,为中药检测工作者提供技术参考。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型、1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司生产, VWD/DAD 检测器, Agilent 1200 色谱工作站); CW-2000 型超声-微波协同萃取仪(上海新拓微波溶样测试技术有限公司生产); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产); AR1140

电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产); DHG-9075A 电热鼓风干燥箱(上海和羽良电子科技有限公司生产); TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司生产)。甲醇(分析纯)、(色谱纯); 乙腈(色谱纯); 异丙醇(色谱纯); 盐酸二甲双胍对照品、格列吡嗪对照品、格列本脲对照品均购于中国药品生物制品检定所; 常见降糖类中成药胶囊、丸剂、颗粒等购自各大药房; 磷酸二氢钠(色谱纯); 超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18 ( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ , 美国 Agilent 公司生产); 流动相:  $V$ (甲醇):  $V$ ( $0.1\%$  磷酸二氢钠) = 70:30; 波长:  $233 \text{ nm}$ ; 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 流速:  $1 \text{ mL/min}$ ; 进样量:  $20 \mu\text{L}$ ; 以色谱峰的保留时间定性, 以外标法峰面积定量。

### 2.2 溶液制备

#### 2.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取盐酸二甲双胍对照品  $8.282 \text{ mg}$ 、

收稿日期: 2011-10-08

基金项目: 四川理工学院研究生创新基金与四川省青年基金(Y2010022、11ZB253)

作者简介: 付大友(1964-), 男, 教授, 研究方向主要有色谱及其联用技术分析, 中药有效成分提取及分析, 环境分析监测技术研究, 0813-5505819。

格列吡嗪对照品 22.86 mg、格列本脲对照品 24.70 mg,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇超声 20 min 溶解后冷却并定容,配制成对照品的标准储备液。精密吸取对照品混合溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得对照品溶液。

### 2.2.2 供试品溶液的制备

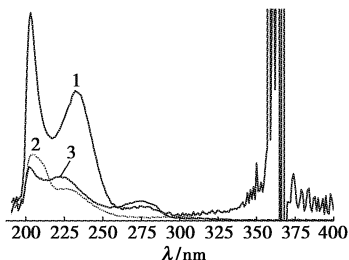
取胶囊剂各 5 粒(或丸剂 10 丸)去壳,研细,精密称取 0.125 g,每种样品称取 3 次,分别置于同样规格的提取器中,各自加入 20 mL 甲醇,在功率为 100 W,时间为 300 s 的条件下,用超声-微波协同萃取仪提取。冷却过滤,分别置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀并用 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

### 2.3 混合标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.5, 17.5, 20 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,加色谱纯甲醇定容,摇匀,分别进样 20  $\mu\text{L}$ ,记录峰面积。以对照品峰面积对进样量进行线性回归,其中盐酸二甲双胍线性回归方程为: $Y = 92.71988X + 55.71129, R = 0.99988$ ;格列吡嗪的线性回归方程为: $Y = 46.70023X + 55.87578, R = 0.99990$ ;格列本脲线性回归方程为: $Y = 37.27477X + 28.08522, R = 0.99988$ 。结果表明,各降糖药在其相应的线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.4 波长的选择

用 TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计在 200~400 nm 波长下对标准溶液进行扫描。盐酸二甲双胍的最大紫外吸收波长为 235 nm,格列吡嗪最大紫外吸收波长为 225 nm 和 275 nm,格列本脲最大紫外吸收波长为 204 nm 和 228 nm,但在 233 nm 处 3 种物质都有较大吸收,并且出峰峰形最佳,故选择 233 nm 作为检测波长。紫外-可见光谱图见图 1。



1—B 二甲双胍;2—D 格列本脲;3—F 格列吡嗪

图 1 降糖中成药中违禁成分的紫外吸收光谱图

## 2.5 样品测定

### 2.5.1 对照品的测定

取对照品溶液,在上述色谱条件下分析,根据对照品出峰保留时间,可以确定其色谱峰出峰顺序。由图 2 可见,混合对照品溶液中的 3 种成分盐酸二甲双胍、格列吡嗪、格列本脲的保留时间分别为 1.435, 3.239, 7.297 min,各相邻色谱峰的分度度均大于 1.5,分离效果满足分析样品的要求。混合对照品溶液的色谱图见图 2。

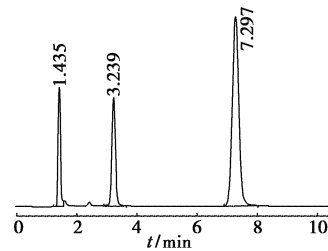


图 2 混合对照品溶液的色谱图

### 2.5.2 供试品的测定

取供试品溶液,在上述色谱条件下分析。实验谱图通过与混合对照品溶液的分色色谱图(如图 2)对比,根据保留时间定性,确定 3 种供试品均含有盐酸二甲双胍;1 种供试品含有格列吡嗪,2 种供试品含有格列本脲(见图 3)。

### 2.6 精密度实验

取混合对照品溶液,重复进样 5 次,根据色谱图测得的 3 种化学添加物质的峰面积,求得相对标准偏差(RSD)分别为:盐酸二甲双胍的 RSD 为 0.34%;格列吡嗪的 RSD 为 0.38%;格列本脲的 RSD 为 0.29%。RSD 为 0.2%~0.4% ( $n=6$ )表明本方法的精密度较好。

### 2.7 稳定性实验

将样品中检出的阳性样品每隔一定时间(0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h)进样 1 次,测定其峰面积,结果盐酸二甲双胍的 RSD 为 1.2%,格列吡嗪的 RSD 为 1.3%,格列本脲的 RSD 为 1.0%,表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

### 2.8 最低检出限

取已知浓度混合对照品溶液,以不同比例稀释后进行测定,此时信噪比为 3 时,测得盐酸二甲双胍为 9.8 ng,格列吡嗪为 8.6 ng,格列本脲为 9.3 ng。

### 2.9 加标回收率

取已知含量的样品适量,分别加入一定量的混合对照品,按供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下测定含量。测得盐酸二甲双胍平均加标回收

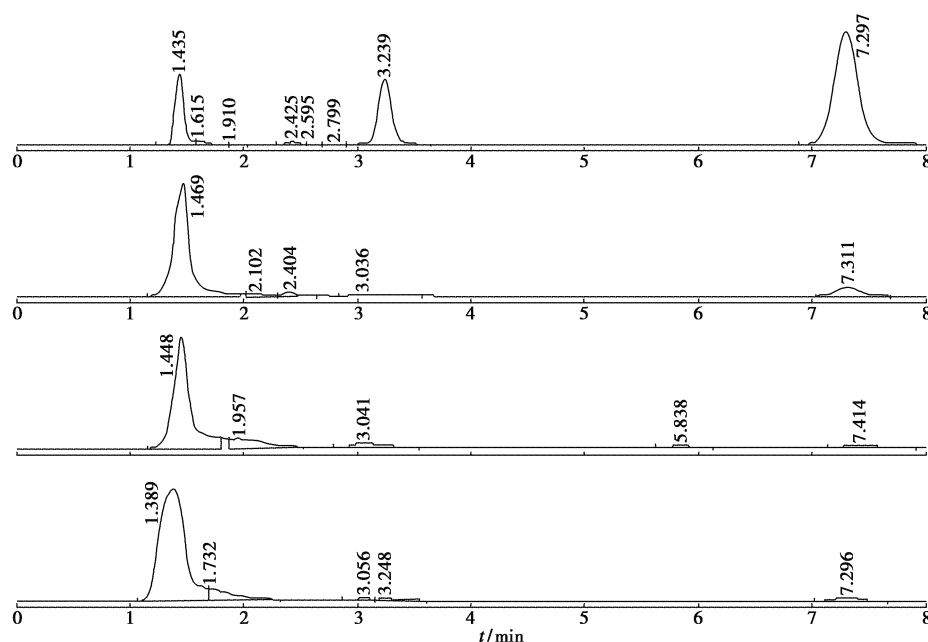


图3 供试品与对照品比较色谱图

检测其吸收峰值,根据外标法计算样品中非法化学物质有效成分的含量。结果怀疑2种降糖制剂含有盐酸二甲双胍、格列苯脲、格列吡嗪3种化学物质,另一种含有盐酸二甲双胍、格列吡嗪2种违禁成分,所含成分其测得含量见表2。

#### 4 结论

通过高效液相色谱法对中成药中3种非法添加化学物质同时进行测定,对流速、波长及流动相进行了选择。确定分离的最佳实验条件为:流速为1.0 mL/min,波长为233 nm,流动相为甲醇-0.1%磷酸二氢钠 [V(甲醇):V(0.1%磷酸二氢钠) = 70:30]。在上述条件下测定样品,样品峰与混合标准溶液峰的保留时间一致,即样品中含有非法添加的化学物质。该方法快速灵敏,耗样量少,且大大降低了流动相的用量。但为了进一步确证,特别是含量很低的某些化学成分,最好用质谱检测器对样品进行结构认证。

率为99.05%,相对标准偏差为2.6%;格列吡嗪平均加标回收率为93.46%,相对标准偏差为3.9%;格列本脲平均加标回收率为94.48%,相对标准偏差为4.5%。测定数据如表1所示。

表1 降糖药的加标回收率(n=9)

化合物名称	加标中质量浓度/ μg·mL <sup>-1</sup>	平均回收率/%	RSD/%
盐酸二甲双胍	1.68	99.05	2.6
格列吡嗪	4.34	93.46	3.9
格列本脲	5.14	94.48	4.5

### 3 降糖中成药中违禁成分的有效成分含量的计算

精确称量降糖中药制剂各3份,分别加入20 mL 甲醇,然后放入超声-微波协同萃取仪中进行提取,设定微波时间为300 s,微波功率100 W。冷却后过滤,滤液装入50 mL 容量瓶中用甲醇定容,用微孔滤膜过滤,在上述色谱条件下用高效液相色谱仪

表2 降糖药品中测得非法添加化学物质的含量

序号	称样量/g	盐酸二甲双胍平均		格列吡嗪平均		格列本脲平均	
		测得值/ mg·g <sup>-1</sup>	RSD/ %	测得值/ mg·g <sup>-1</sup>	RSD/ %	测得值/ mg·g <sup>-1</sup>	RSD/ %
样品1	0.1130	26.85	3.2			0.87	0.5
样品2	0.1135	15.23	0.21	0.953	2.2	0.867	2
样品3	0.1136	11.39	2.6				

#### 参考文献

- [1] 中国药典. 二部. 2005:594-599.
- [2] 吴卫涛. 高效液相色谱法同时鉴定保健品中非法添加的6种降糖药成分[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(22): 2703-2704.
- [3] 刘畅, 夏晶, 胡青, 等. LC/MS(n)法对中成药中非法添加9种镇静催眠类化学药品检测方法的研究[J]. 解放军药学报, 2009, 25(3): 254-256.
- [4] 翟海云, 吴燕红, 黄宝美, 等. 盐酸二甲双胍的毛细管电泳法快速测定[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(7): 923-926.
- [5] 刘晓哲. 茯苓山药片中添加格列本脲的定性方法研究[J]. 安徽医药, 2007, 11(7): 611-612.
- [6] 翟海云, 吴燕红, 黄宝美, 等. 盐酸二甲双胍的毛细管电泳法快速测定[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(7): 923-926.
- [7] 张翠英, 李振国, 徐金铃, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测中成药中添加格列本脲、格列吡嗪[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(2): 326-328.
- [8] The Commission of the European Communities. Commission decision of 12 August 2002 implementing council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[C]. Official Journal of the European Communities, 2002, L221: 8-36. ■