

辅助降糖胶囊中3种双胍类物质的快速筛查

Rapid screening of three kinds of guanidine contraband in auxiliary sugar reduction capsule

安莹¹ 周颖¹ 季剑波¹ 葛冬梅²

AN Ying¹ ZHOU Ying¹ JI Jian-bo¹ GE Dong-mei²

(1. 徐州工业职业技术学院, 江苏 徐州 221140; 2. 徐州市食品药品监督管理局, 江苏 徐州 221140)

(1. Xuzhou College of Industrial Technology, Xuzhou, Jiangsu 221140, China;

2. Xuzhou Food and Drug Administration, Xuzhou, Jiangsu 221140, China)

摘要:建立并验证了反相离子对—液质联用法对于辅助降糖胶囊中3种双胍类物质盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍、盐酸丁二胍进行快速筛查及定性定量检测的方法。以甲醇为样品提取溶剂,超声辅助萃取,选用安捷伦 C₁₈ (4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱,检测波长 235 nm,以甲醇—乙酸铵溶液(0.01 mol/L)为流动相进行梯度洗脱,流速 0.5 mL/min,进样量 5 μL。液相色谱检测后,进入质谱仪进行正离子模式扫描筛查。该分析方法下,加标回收率为 87.5%~108.4%,相对标准偏差为 0.5%~7.4%,精密度和准确度良好。

关键词:降糖;离子对试剂;液质联用;双胍类违禁品

Abstract: A method for rapid screening and qualitative and quantitative determination of three biguanides, MH, PH and BH, in Jiangtang capsules by reversed-phase ion-pair-LC-MS was established and validated. Anagilent technologies C₁₈ column (4.6×250 mm, 5 μm) was used for the determination at 235 nm. A methanol-B ammonium acetate solution (0.01 mol/L) was used as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 0.5 mL/min. After the HPLC detection, the mass spectrometer for positive ion mode scanning was used for screening. The recovery of standard addition was 87.5%~108.4%, and the relative standard deviation was 0.5%~7.4%, with good precision and accuracy.

Keywords: sugar reduction; ion pair reagent; HPLC-MS; biguanide contraband

保健食品可分为功能性保健食品和营养素补充剂两大类,降糖保健食品是功能性保健食品的一种。降糖保

健食品只能作为糖尿病人辅助调理的手段,不能作为降糖的主要方法。由于双胍类药物的降血糖效果较好,常有商家将其添加在降糖保健食品中,但双胍类物质对正常人无降低血糖作用,还会在体内蓄积,引起乳酸性酸中毒^[1]。根据中国食品药品管理法相关规定,保健食品不能代替药物使用且不得添加任何形式的西药成分。国家食品药品监督管理局《降糖类中成药中非法添加化学药品补充检验方法》及《降糖类中成药中非法添加盐酸丁二胍补充检验方法》等标准中给出了盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍及盐酸丁二胍的检测方法。目前常用的仪器检测技术有分光光度法、薄层色谱法、毛细管电泳法、高效液相色谱法、气相色谱—质谱法等^[2]。国家食品药品监督管理总局药品检验补充检验方法对降血糖类保健食品中非法添加化学药品的筛查和验证,共需用3个液相系统方法,耗时且繁琐。

目前学者^[3-5]普遍采用高效液相色谱法测定降糖类非法添加化学药物,但是与质谱法相比,高效液相色谱法的定性功能较差。近年来,液相色谱—串联四极杆质谱联用(LC-MS/MS)技术正逐渐成为非法添加化学药品检测的有效手段^[6-7]。与上述方法相比,反相离子对—液质联用法具有分析时间短、灵敏度高、专属性强、分离度高、定性功能强等特点,可用于多组分降糖类非法添加化学药物的同时检测,避免复杂基质干扰^[8]。

研究拟以市售辅助降糖胶囊为研究对象,探索利用反向离子对—液质联用法同时定量检测盐酸二甲双胍、盐酸苯乙双胍及盐酸丁二胍,根据药效学特性,建立一次性同时筛选降糖类保健食品中可能违法添加的3种双胍类化学药品的的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(配 DAD 检测器):1200 型,美国安

基金项目:江苏省教育厅高校“青蓝工程”扶持基金项目(编号:KC14SM085)

作者简介:安莹,女,徐州工业职业技术学院教授,硕士。

通信作者:葛冬梅(1975—),女,徐州市食品药品监督管理局高级工程师,博士。E-mail:40366932@qq.com

收稿日期:2020-06-14

捷伦科技有限公司;

三重四极杆液质联用仪:4500 型,美国应用生物系统公司。

1.2 试剂

盐酸二甲双胍(MH)标准品、盐酸苯乙双胍(PH)标准品、盐酸丁二胍(BH)标准品:纯度均大于 99%,中国药品生物制品检定所;

甲醇、乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

甲醇:色谱纯,德国 Merk KGaA 公司;

庚烷磺酸钠、三乙胺、乙酸铵、醋酸铵:色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 供试样品

苦瓜洋参软胶囊、黄芪红景天铬酵母软胶囊、黄精山药复合颗粒、葛根苦瓜铬胶囊:益丰堂药店。

1.4 试验方法

1.4.1 液相色谱条件 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDS C₁₈ (4.6×250 mm, 5 μm)液相色谱柱,二极管阵列检测器,检测波长选择 235 nm,扫描波长范围 200~400 nm,柱温设置 30 °C,流速 1.0 mL/min,进样量 20 μL,称取 0.505 6 g 庚烷磺酸钠,加入 1.4 mL 三乙胺,加水定容至 1 000 mL,用磷酸调节 pH 值至 3.5,制成 2 mmol/L 的庚烷磺酸钠离子对试剂,以甲醇(A)和离子对试剂(B)为流动相进行梯度洗脱。进样时间 40 min。梯度洗脱程序为:0~10 min,20% A;10~12 min,20%→40% A;12~30 min,40% A;30~31 min,40%→20% A;31~40 min,20% A。

1.4.2 液质联用条件

(1) 色谱条件:采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1×50 mm, 18 μm)反相色谱柱,检测波长选择 235 nm,柱温设置 40 °C,流速 0.5 mL/min,进样量 5 μL,以甲醇(A)—0.01 mol/L 乙酸铵溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,分流比为 5:1。梯度洗脱程序为:0~3 min,40% A;3~10 min,40%→60% A;10~30 min,60% A;30~40 min,60%→80% A;40~41 min,80% A;41~45 min,80%→40% A;45~60 min,40% A。

(2) 质谱条件:电喷雾电离源(ESI),正离子扫描(ESI+),毛细管电压 4.5 kV,干燥气体温度 400 °C,干燥气流量 10 L/min,一级质谱全扫描、二级质谱全扫描,扫描范围 m/z 50~1 000。

1.4.3 标准储备液的配制 分别精确称取 MH、PH、BH 标准品 10.0 mg,用甲醇稀释后,配制成 0.5 mg/mL 的标准储备液。放入 4 °C 冰箱中保存备用。临用时,各取 10 mL 混合制成混合标准品溶液。

1.4.4 标准曲线的绘制 移取一定量的 1.4.3 所述混合标准品储备液,用甲醇加以稀释,制成不同浓度的混合标准品溶液,进样 10 μL,在 1.4.1 所述条件下分析,以标准

品溶液浓度为横坐标,以色谱检测峰面积为纵坐标,作标准工作曲线,得出各曲线的线性回归方程。

1.4.5 供试样的前处理 取胶囊 4 粒,去外囊壳后将内容物,研细,精密称取适量(约相当于 1 次服用量)置于 50 mL 锥形瓶中,分别以水、乙醇—水($V_{乙醇}:V_{水}=1:1$)、乙醇、甲醇—水($V_{甲醇}:V_{水}=1:1$)、甲醇为提取剂进行提取,加入量 25 mL,于 50 °C、功率 400 W 条件下超声萃取 30 min,冷至室温,用提取剂稀释至刻度,摇匀、用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。根据目标物质的提取率确定提取剂。

1.4.6 加标回收试验 选取阴性供试样品加标回收开展试验,样品分 2 组,加入 2 种不同浓度的混合标准溶液,各做 3 个平行,按 1.4.5 方法进行供试样处理,在 1.4.1 所述液相条件下测定;分别计算加标回收率和相对标准偏差(RSD)。

2 结果与讨论

2.1 提取剂的选择

分别考察水、乙醇—水($V_{乙醇}:V_{水}=1:1$)、乙醇、甲醇—水($V_{甲醇}:V_{水}=1:1$)、甲醇对目标物质的提取率,结果(见图 1)发现:当以其他试剂为提取剂时,样品中 MH、PH、BH 的提取率均不如以甲醇为提取剂的高,这是因为 3 种对照品属于中高极性化合物,而甲醇的极性较大的缘故。基于相似相溶,甲醇对目标物质的溶解性高于其他溶剂^[9]。故试验选择甲醇为提取剂。

2.2 洗脱程序的选择

双胍类物质极性大,分离时易受基质干扰,可通过离子对试剂促进样品中目标物质离子化来改善峰形。考查庚烷磺酸钠和十二烷基硫酸钠,因十二烷基磺酸钠溶解时易产生泡沫影响检测器稳定性,导致结果出现误差,故选用庚烷磺酸钠配制离子对试剂。梯度洗脱色谱图如图 2 所示,MH、BH、PH 保留时间分别为 0.76, 1.59, 3.19 min,可以同时分离 MH、BH、PH,并得到较好的峰形。

2.3 质谱条件的选择

基于目标物质特性,考查在正、负离子扫描模式下的质谱响应,如图 3 所示,在正离子扫描模式下 MH、PH、BH 均可获得良好的色谱峰形和较高的响应值,故最终选

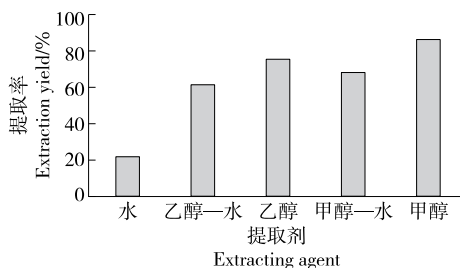


图 1 不同提取剂的提取效果

Figure 1 Extraction effects of different extractants

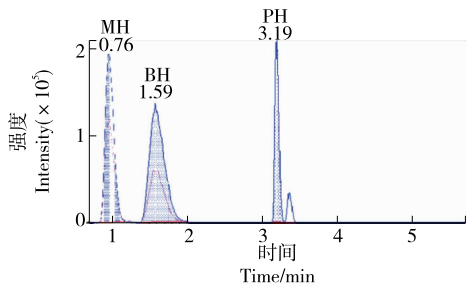


图2 梯度洗脱 MH、PH、BH 色谱图

Figure 2 Chromatogram of gradient elution of MH, PH and BH

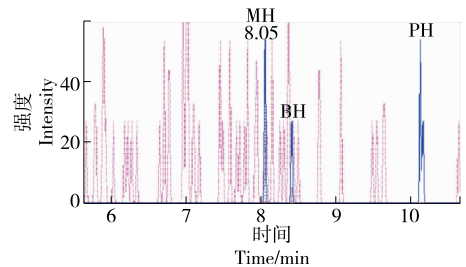


图3 混合对照品溶液的总离子流色谱图

Figure 3 Chromatogram of total ion flow of the mixed control solution

择在正离子模式下对3种目标物质进行扫描分析。

2.4 方法学验证

经方法学验证,3种标准品的线性关系良好,相关系数 $>0.999\ 0$,检出限为 $0.018\sim0.077$,相关参数见表1。如表2所示,该方法的加标回收率为 $87.5\%\sim108.4\%$,精密度(以峰面积的相对标准偏差RSD计)为 $0.5\%\sim7.4\%$,精密度、准确度均良好。

表1 3种标准品的线性回归方程及检出限

Table 1 Linear regression equations and detection limits of the three standards

标准品	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	相关系数 (R^2)	检出限/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
MH	$0.2\sim100$	$Y=18\ 275.01x+7.02$	0.998 5	0.077
PH	$0.2\sim100$	$Y=7\ 763.63x+4.00$	0.998 4	0.068
BH	$0.2\sim100$	$Y=5\ 321.96x+8.17$	0.998 5	0.018

表2 3种化学药品在阴性供试样中的加标回收率

Table 2 Standard recovery rates of the three chemicals in negative samples ($n=3$)

加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %
5.3	91.8	0.3	21.3	102.7	6.9
4.5	103.6	2.5	28.3	104.5	3.2
6.8	108.4	3.8	31.5	87.5	3.0

2.5 供试品溶液的定性测定

采用液质联用法进行确认。精密量取1.4.3标准品溶液和供试品溶液各 $5\ \mu\text{L}$,注入液质联用仪,在1.4.2所述条件下分析,获得标准品及供试品的色谱图和质谱图(图4~6)。结果发现,供试品溶液与标准品溶液质谱峰不一致,由此可确定5个样品中均不含有MH、BH及PH。

3 结论

建立了一种利用反相离子对一液质联用法同时快速筛查检测降糖胶囊中3种双胍类物质的快速筛查和确证的方法,样品提取方便快捷,可同时获取一级、二级精确

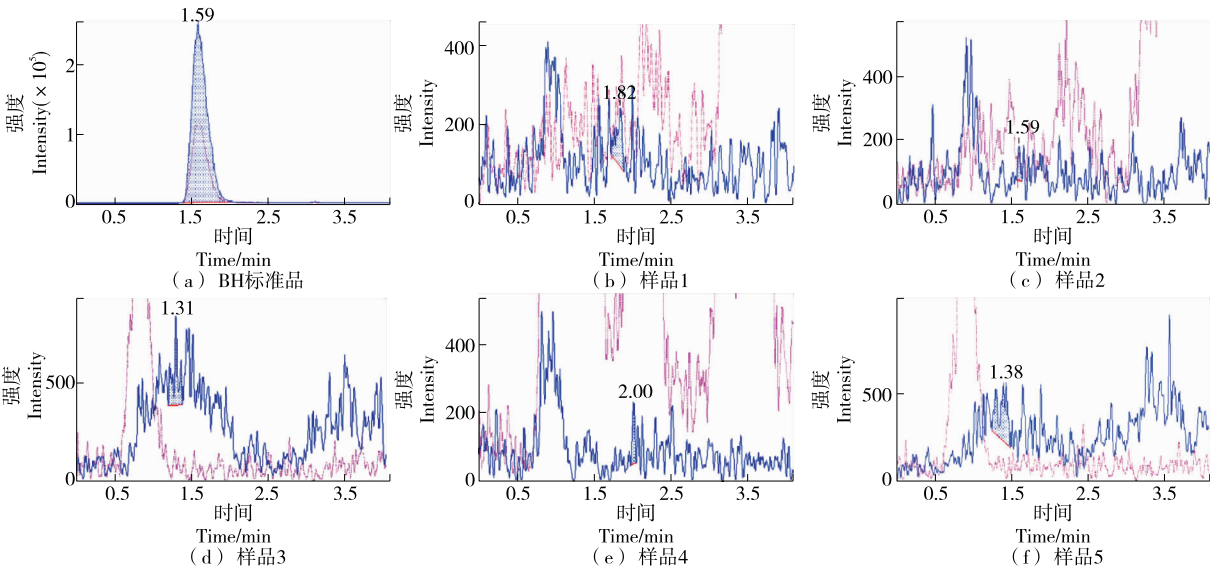


图4 标准品BH和供试样对照质谱图

Figure 4 Mass spectrogram of reference standard BH and sample supplied

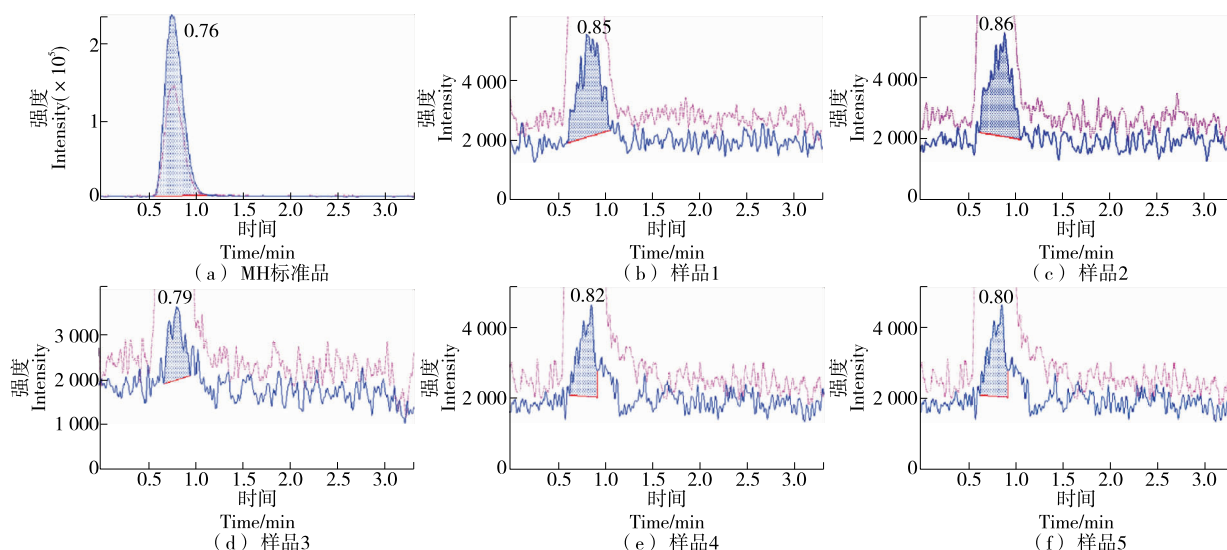


图 5 标准品 MH 和供试样对照质谱图

Figure 5 Mass spectrometry chromatogram of reference standard MH and sample supplied

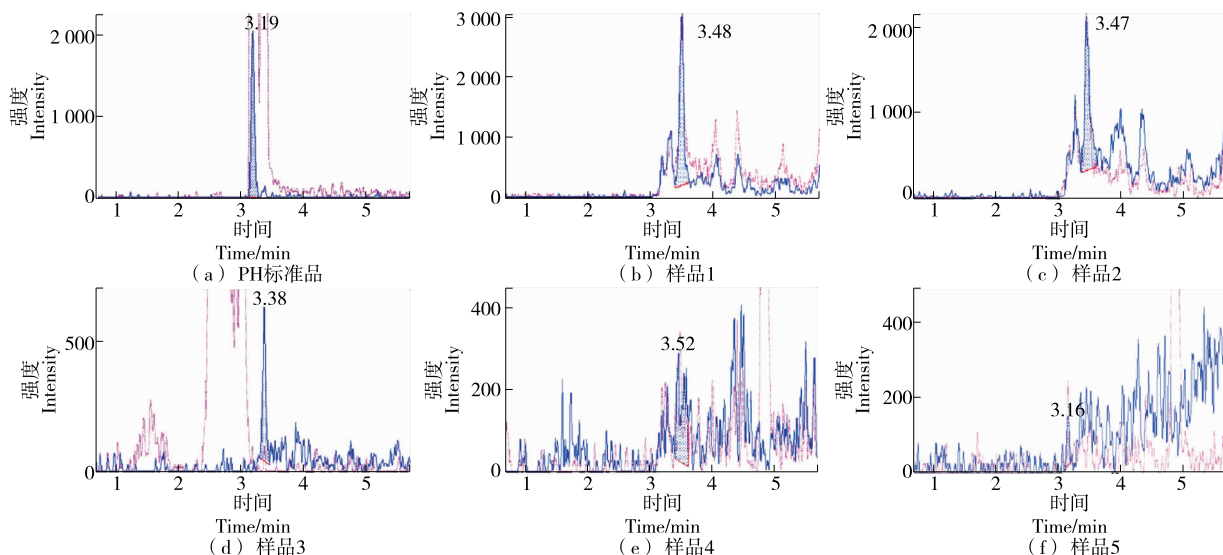


图 6 标准品 PH 和供试样对照质谱图

Figure 6 Mass spectrometry chromatogram of reference standard PH and sample supplied

质谱图,以一级母离子进行定量分析,可实现快速分析和测定。

参考文献

- [1] 张毅. 济南市售降糖保健品质量调查及西药成分检测[D]. 济南: 山东大学, 2015: 1-3.
- [2] 徐文峰, 金鹏飞. 降糖类中成药和保健食品中非法添加化学药物检测技术的研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(11): 2333-2337.
- [3] 谢秀娟. HPLC/UPLC-MS/MS 多维指纹图谱轮廓技术筛查降糖保健品中非法添加物[D]. 广州: 广东药科大学, 2018: 1-3.
- [4] 欧贝丽, 盛静, 屠婕红, 等. 快速筛查检测中成药及保健品中添加了 3 种双胍类化学降糖药物[J]. 中国药师, 2014, 17(8): 263-267.
- [5] 付大友, 陈祥辉, 谭文渊, 等. 降糖类中成药中非法添加化学成分的测定[J]. 现代化工, 2012, 32(1): 94-96.
- [6] 马微, 代汉慧, 陈冬东, 等. 减肥保健食品中违禁添加双胍类西药的分析方法研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 431-434.
- [7] 朱峰, 阮丽萍, 马永建, 等. 超高效液相色谱—串联质谱联用法同时检测降糖类和减肥类保健品中 20 种非法添加的化学降糖药物[J]. 色谱, 2014, 32(1): 13-20.
- [8] 刘畅, 孔令钰, 李楠, 等. HPLC 法检测保健品中违禁添加 9 种化学降糖药物[J]. 天津药学, 2018, 30(3): 24-28.
- [9] 王天楠, 张煌, 陈益胜, 等. HPTLC-DPPH 法定性定量分析保健品中芦丁[J]. 食品与机械, 2019, 35(1): 92-96, 142.