

## LC-MS/MS 法定性检测保健品中非法添加的降糖药

张建丽, 王占良, 张亦农

(国家体育总局反兴奋剂中心, 北京 100029)

**摘要:**建立了同时检测保健品中非法添加的 10 种化学降糖药的分析方法。用甲醇直接提取, 以  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵 (pH 3.5) 和乙腈为流动相, 采用 Agilent Zorbax SB  $\text{C}_{18}$  ( $100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 3.5 \mu\text{m}$ ) 色谱柱进行分离, 电喷雾离子源, 正离子多反应监测扫描方式分析检测。除阿卡波糖和二甲双胍的检测限为  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  外, 其他降糖药的检测限均不高于  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 10 种降糖药的回收率为 75.2%~116.9%。

**关键词:**保健品; 降糖药; LC-MS/MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)05-0271-04

## Detection of Antidiabetics in Health Products by LC-MS/MS

ZHANG Jian-li, WANG Zhan-liang, ZHANG Yi-nong

(China Anti-Doping Agency, The State Sport General Administration, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Total of 10 antidiabetics illegally mixed into health products were simultaneously detected by LC-MS/MS. Methanol was used as the extraction solution. Mobile phase was included  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ammonium formate (pH 3.5) and acetonitrile. Agilent Zorbax SB  $\text{C}_{18}$  ( $100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 3.5 \mu\text{m}$ ) column was used to separate the compounds, and mass data were acquired with the ESI(+) MRM mode. The LODs of acarbose and metformin are  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , and the LODs of the other antidiabetics are no more than  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Recoveries of 10 drugs are 75.2%-116.9%.

**Key words:** health products; antidiabetics; LC-MS/MS

近年来, 有些不法生产厂家为了提高降糖类保健品的降血糖效果, 在号称纯中药制剂的保健品中非法添加了化学类降糖药。但其通常添加的药量是没有保证的, 这就很有可能造成过量服用化学类降糖药而引起低血糖症<sup>[1-2]</sup>。现有的文献报道该类药物的检测方法主要有 HPLC 法<sup>[3-7]</sup>, TLC 法<sup>[6]</sup> 和液质联用法<sup>[1,8-9]</sup>。而上述方

法多数仅能检测两种或少数几种降糖药物, 唯一一篇文献可以同时检测 10 种降糖药, 但采用的却是定性能力较差的紫外检测器。本工作采用 LC-MS/MS 法同时检测 10 种化学降糖药, 该方法具有快速、简便、专属性强等优点, 适合保健品中非法添加化学类降糖药的常规检测。

## 1 试验部分

### 1.1 主要仪器与装置

Agilent 1200HPLC-6410MS/MS; 美国 Agilent 公司产品, 配有电喷雾离子源; AB135-S 型十万分之一电子天平; 瑞士 Mettler 公司产品; PM200 型电子天平; 瑞士 Mettler 公司产品; LD5-10B 低速离心机; 北京医用离心机厂产品; 超纯水机; 美国 Millipore 公司产品; 振荡器: 德国 GmbH & Co. KG 公司产品; 涡旋混合器: 美国 Barnstead 公司产品。

### 1.2 主要材料与试剂

阿卡波糖、二甲双胍、格列喹酮、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪、罗格列酮、格列齐特、那格列奈、苯乙双胍对照品; 中国药品生物制品检定所提供; 甲酸铵(色谱纯); Sigma-Aldrich 公司产品; 甲醇、乙腈和甲酸(色谱纯); 迪马公司产品。

### 1.3 试验条件

**1.3.1 色谱条件** Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 2.1 mm × 3.5 μm); 流动相为 10 mmol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵(pH 3.5)和乙腈; 洗脱梯度: 0 min 时乙腈 15%, 6 min 时乙腈 75%, 12 min 时乙腈 75%; 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C。

**1.3.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI), 正离子电离, 离子源温度 320 °C, 干燥气流速 10 L · min<sup>-1</sup>, 雾化气压力 2.76 × 10<sup>5</sup> Pa, 扫描方式为多反应监测(MRM)。

### 1.4 对照品溶液的制备

分别精密称取 10 mg 对照品, 分别加入到 10 mL 量瓶中, 加入 5 mL 甲醇, 振荡溶解, 再用甲醇稀释并定容至刻度, 混匀, 即得各对照品储备液(1 g · L<sup>-1</sup>)。量取 1 mL 对照品储备液, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 作为对照品工作液。

### 1.5 样品的前处理

称取约 0.5 g 待测样品于 10 mL 带盖玻璃试管中, 加入 5 mL 甲醇, 涡旋振荡 30 s, 再往复振荡 20 min, 离心后取 1 mL 上清液, 于 65 °C 氮气流下吹干, 再用 1 mL 初始比例流动相溶解残留物, 经 0.45 μm 针头滤器过滤后, 待进样分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的选择

通过比较不同碰撞能量下离子对响应强度的变化, 对 10 种降糖药的质谱条件进行优化, 结果列于表 1。

表 1 10 种降糖药的质谱条件及特征离子  
Table 1 Mass spectrometric parameters and diagnostic ions for 10 antidiabetics

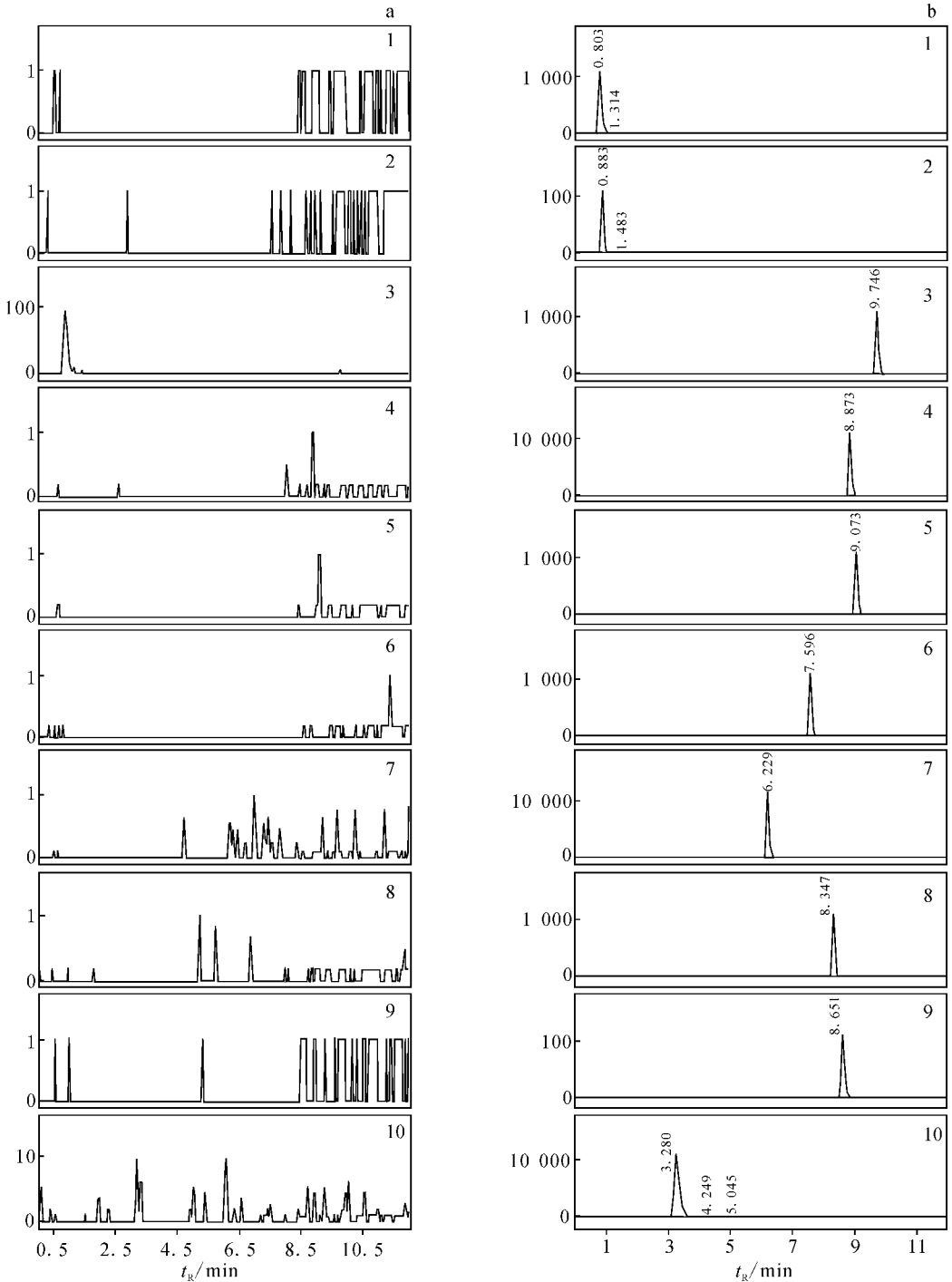
化合物	碎裂电压/V	离子对/(m/z)	碰撞能量/eV
阿卡波糖 Acarbose	100	646/304 *	15
		646/146	30
		646/646	5
二甲双胍 Metformin	100	130/71 *	5
		130/85	8
		130/113	5
格列喹酮 Gliquidone	100	528/403 *	5
		528/386	15
		528/322	25
格列本脲 Glibenclamide	100	494/369 *	5
		494/304	20
		494/169	25
格列美脲 Glimepiride	100	491/352 *	5
		491/126	20
		491/491	5
格列吡嗪 Glipizide	100	446/321 *	5
		446/286	15
		446/347	5
罗格列酮 Rosiglitazone	100	358/135 *	20
		358/107	30
		358/94	30
格列齐特 Gliclazide	100	324/127 *	15
		324/153	15
		324/110	15
那格列奈 Nateglinide	100	318/166 *	5
		318/120	10
		318/272	5
苯乙双胍 Phenformin	100	206/60 *	15
		206/105	25
		206/206	5

注: \* 表示定量离子对

### 2.2 方法的专属性

分别取约 0.5 g 空白制剂的粉末和添加了检测限浓度的 10 种降糖药的相同制剂粉末,按照 1.5 方法进行操作。所得到的定量离子对多

反应监测色谱图示于图 1。结果表明,在 10 种降糖药出峰的位置,空白样品中无干扰峰出现,该方法具有较好的专属性。



注:1. 阿卡波糖;2. 二甲双胍;3. 格列喹酮;4. 格列本脲;5. 格列美脲;  
6. 格列吡嗪;7. 罗格列酮;8. 格列齐特;9. 那格列奈;10. 苯乙双胍

图 1 空白样品的多反应监测图(a)和空白样品中添加了对照品的多反应监测图(b)

Fig. 1 MRM chromatographs of blank samples(a) and blank samples spike with the mixture of anti-diabetics standards(b)

### 2.3 方法的检测限和回收率

除阿卡波糖和二甲双胍的检测限为  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  外,其他降糖药的检测限均不高于  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

阿卡波糖和二甲双胍在低( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、中( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、高( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )3种浓度下的回收率分别为  $75.8\% \sim 81.6\%$ ,  $75.2\% \sim 83.1\%$ ; 格列喹酮、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪、格列齐特、那格列奈、苯乙双胍在低( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、中( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、高( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )3种浓度下的回收率分别为  $76.0\% \sim 82.3\%$ ,  $81.7\% \sim 96.1\%$ ,  $78.4\% \sim 93.5\%$ ,  $91.7\% \sim 108.5\%$ ,  $88.8\% \sim 100.8\%$ ,  $94.1\% \sim 108.4\%$ ,  $99.8\% \sim 116.9\%$ ,  $96.1\% \sim 111.1\%$ 。

### 3 结论

建立了同时检测保健品中非法添加的 10 种降糖药的定性分析方法。该方法简便、准确可靠,适合保健品中非法添加该类药物的常规检测。

#### 参考文献:

[1] 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苯脲[J].沈阳药科大学学报,2005,22(1):

19-22.

- [2] 夏铮铮,杨成钢,张小松,等.中药保健品中非法掺入格列苯脲的检测[J].中国药房,2006,17(4):314-316.
- [3] 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.
- [4] 朱炳辉,龙朝阳,吴西梅,杨杏芬.固相萃取/高效液相色谱法中成药和保健品中7种降糖化学药物的检测[J].分析测试学报,2008,27(5):534-537.
- [5] 李莉,徐海娥.HPLC法测定保健食品及中药制剂中化学降糖药的含量[J].中国卫生检验杂志,2009,19(6):1271-1272.
- [6] 万庆,管玉云,程正.保健食品中非法添加磺酰脲类降糖药的定性方法研究[J].安徽医药,2008,12(10):899-900.
- [7] 刘起中,李慧义,杭太俊.中药降糖制剂中非法掺入的化学降糖药物成分的检测[J].中国现代应用药学杂志,2008,25(1):61-63.
- [8] 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.
- [9] 林艳萍,司端运,刘昌孝.液质联用分析中药降糖制剂中掺入的西药成分[J].天津大学学报,2008,41(6):720-724.

=====  
(上接第 270 页)

### 3 结论

本实验采用液相色谱-串联质谱法结合固相萃取技术,建立了同时确证人尿中利他林和利他林酸的方法。在本实验的仪器条件下,检测时间较短(7 min),同时检测灵敏度较高。实验结果表明,该条件易于控制、结果准确、加样回收率稳定、重现性好,能满足 WADA 对此类药物最低检测能力( $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的要求。该方法可以应用于常规的尿样检测。

#### 参考文献:

[1] AOYAMA T, KOTAKI H, SASAKI T. Nonlinear kinetics of threo-methylphenidate enantiomers in a patient with narcolepsy and in healthy volunteers [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1993, 44(1):79-84.

[2] DEVANE C L, MARKOWITZ J S. New methylphenidate formulations for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. Drug Metab Dispos, 2000, 28(6):620-624.

[3] MOFFAT A C, OSSELTON M D, WIDDOP B.

Clarke's analysis of drugs and poisons[M]. London: Pharmaceutical Press, 2004.

- [4] 世界反兴奋剂药物,2008年禁用清单[R].北京:国家体育总局科教司,2008.
- [5] NAKAJIMA K, KOTAKI H. Determination of methylphenidate and its main metabolite in plasma by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry[J]. Chem Pharm Bullet, 1986, 34(4):1701-1708.
- [6] MARCHEI E, FARRE M. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry determination of methylphenidate and ritalinic acid in conventional and non-conventional biological matrices[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(2):434-439.
- [7] FERNANDEZ M, LALOUP M, WOOD M, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of multiple hallucinogens, ketamine, ritalinic acid and metabolites in urine [J]. J Anal Toxicol, 2007, 31(8):497-504.