

高效液相色谱—串联质谱法鉴定 中成药中的格列本脲^{*}

姚骏骅, 周丽华, 张东娣, 查庆民

(中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘要:建立了一种简便、快速、灵敏、准确、可靠地鉴定中成药制剂中是否添加格列本脲的高效液相色谱—串联质谱(HPLC-MS/MS)分析方法。HPLC色谱柱为ThermoHypersil BDS C8柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为甲醇/乙腈/水(含φ=0.1% HAc)的体积比为55:15:30;流速为0.5 mL·min⁻¹。HPLC-MS与HPLC-MS/MS以离子阱为检测器,采用正、负2种离子检测模式进行检测。运用此方法成功地确证了3种用于治疗糖尿病的中西复方药中均含有格列本脲。

关键词:高效液相色谱—质谱/质谱;格列本脲;中成药

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:0529-6579(2005)01-0053-05

目前用于治疗糖尿病的中西复方制剂越来越多^[1,2]。临床研究表明,含有格列本脲(glibenclamide, 优降糖)的中成药具有较好的降糖作用^[3,4]。中成药成份复杂、繁多,用传统的分析方法如TLC、HPLC、GC/MS等把格列本脲完全分离出来,往往比较困难。且前两者需复杂的样品制备过程,不能给出结构信息,在专一性和灵敏度上均有一定缺陷;后者虽灵敏度较高、专属性强,但需要衍生化,操作较复杂。为了检验中成药制剂中是否添加有格列本脲,有必要建立快速、灵敏、准确、可靠的分析方法。HPLC-MSⁿ是研究复杂样品成分分析很有效的方法。可在一级质谱条件下获得很强的待测物准分子离子峰,几乎不产生碎片离子,并且可借助MSⁿ($n=2\sim10$)准分子离子进行多级裂解,进而获得丰富的结构信息。在复杂样品分析中,HPLC-MS/MS具有灵敏度高、专一性强等独特的优势^[5-8]。本文建立了鉴定添加在中成药制剂中格列本脲的HPLC-MS/MS法,并用该法确证了3种用于治疗糖尿病的市售中西复方药中均含有格列本脲。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国Thermo Finnigan公司LCQ DECA XP型液相色谱—质谱联用仪,配有电喷雾离子化源(ESI)、Xcalibur数据处理系统;PDA检测器、Surveyor四元

泵、自动进样器。甲醇(HPLC级)、乙腈(HPLC级)、冰醋酸(分析纯)、超纯水。供试品降糖药片、降糖胶囊、消渴降糖胶囊均购自药店,格列本脲标准对照品(供检查、含量测定用)来自中国药品生物制品检定所。

1.2 高效液相色谱条件

色谱柱:ThermoHypersil BDS C8柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相:甲醇/乙腈/水(含φ=0.1% HAc)的体积比为55:15:30;流速:0.5 mL·min⁻¹;柱温:室温;进样量:10 μL。紫外检测波长为274 nm。

1.3 质谱条件

离子化源:(±)ESI;加热毛细管温度:300℃;鞘气(N₂)流速:30流量单位(arbitrary units);辅助气(N₂)流速:30流量单位(arbitrary units);喷雾电压:4 kV。同时采用一级全扫描质谱及MS/MS两种方式检测,扫描范围150~550,MS/MS的相对碰撞能为30%。

1.4 样品处理

取4粒药片或5颗胶囊的内容物,置50 mL量瓶中,加甲醇12 mL,超声处理使溶解,加流动相稀释到刻度,摇匀,过滤,滤液作为供试品溶液。另准确称取格列本脲对照品20 mg于50 mL量瓶中,加甲醇12 mL,超声处理使溶解,加流动相稀释到刻度,摇匀。精密量取25 mL,置50 mL量瓶中,加流动相稀释到刻度,摇匀,作为对照品溶

* 收稿日期:2004-05-27

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(990209)

作者简介:姚骏骅(1959年生),男,工程师;E-mail:pujarc02@zsu.edu.cn

液。

2 结果与讨论

格列本脲标准品的分子式为 $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ ，相对分子质量为 493，其 (+) ESI 一级全扫描质谱中，呈现出两组特征离子峰。一组为与格列本脲相对分子质量相当的准分子离子峰 $[M+H]^+$ (m/z 494) 及 $[M+2+H]^+$ (m/z 496)，另一组为 $[M+Na]^+$ 峰 (m/z 516) 及 $[M+2+Na]^+$ (m/z 518) (图 1, a)。两组峰 $[M+H]^+ / [M+2+H]^+$ 和 $[M+Na]^+ / [M+2+Na]^+$ 的 2 峰相对丰度比均约为 3:1，符合含 1 个氯原子化合物的质谱峰特征。上述特征为检验中成药中是否含格列本脲的定性分析及碎片归属提供了极为有用的依据。

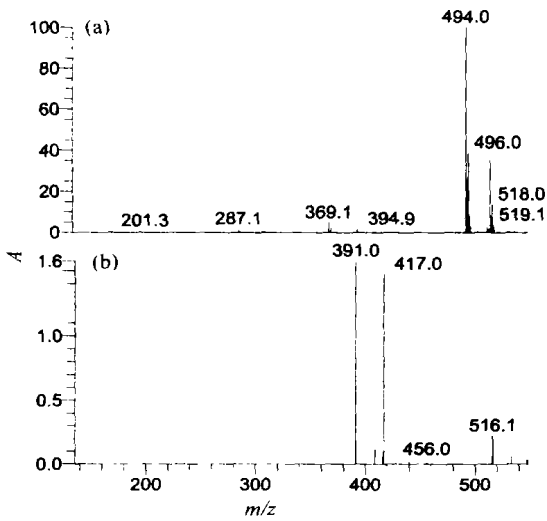


图 1 格列本脲标准对照品 (+) ESI-MS 质谱图 (a) 及 (+) ESI-MS/MS 质谱图 (b)
Fig 1 The (+) ESI-MS (a) and (+) ESI-MS/MS (b) spectra of glibenclamide

为了进一步提供更为可靠的定性依据，确保分析结果的准确性，本文对格列本脲对照品 MS 谱图中相关离子峰同时进行了 MS/MS 全扫描分析，并探讨了格列本脲质谱断裂与结构的相关性。在对格列本脲标准对照品进行二级质谱分析时发现，若选取准分子离子峰 $[M+H]^+$ (m/z 494) 进行分析，在同样的质谱条件下，所产生的碎片离子的信号较弱，检测灵敏度较低。故在实验中所有样品在进行 (+) ESI MS/MS 时，均选取 $[M+Na]^+$ 峰进行分析，以期获得更高的检测灵敏度。格列本脲标准对照品 $[M+Na]^+$ 峰 (m/z 516) 的 MS/MS 谱图中，主要碎片离子有 m/z 417 及 m/z 391 (图 1, b)，其在 (+) ESI 方式下 MS/MS 可能的裂解途径如图 2 所示。由此可知，碎片离子峰均由磺酰脲的酰胺键

断裂而产生。格列本脲标准对照品在 (+) ESI 一级全扫描及对 $[M+Na]^+$ (m/z 516) 进行 MS/MS 得到的离子流图中，其保留值约为 8.4 min (图 3a, 图 4a)。

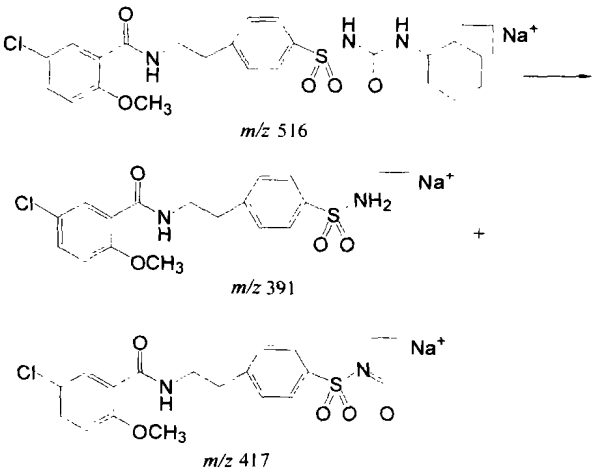


图 2 格列本脲标准对照品 $[M+Na]^+$ (m/z 516) 的 (+) ESI-MS/MS 可能裂解途径
Fig 2 The possible fragmentation route of $[M+Na]^+$ (m/z 516) of glibenclamide by (+) ESI-MS/MS

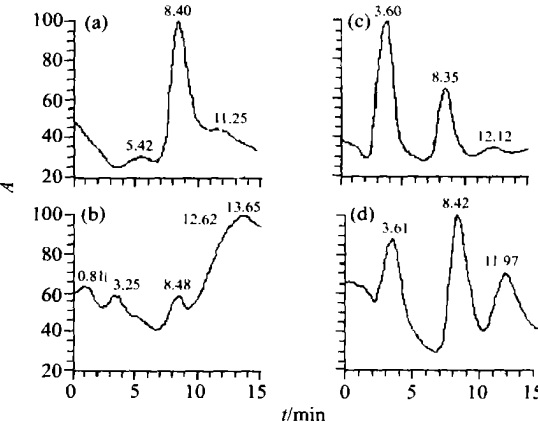


图 3 格列本脲的 (+) ESI-MS 全扫描离子流图
Fig 3 TIC F: (+) ESI-MS of glibenclamide
(a) 标准对照品; (b) 降糖药片;
(c) 降糖胶囊; (d) 消渴降糖胶囊

图 3b, 图 3c, 图 3d 及图 4b, 图 4c, 图 4d 分别为降糖药片、降糖胶囊、消渴降糖胶囊在 (+) ESI 一级全扫描及对 $[M+Na]^+$ (m/z 516) 进行 MS/MS 得到的离子流图，3 种样品在 ~ 8.4 min 均出现格列本脲特征峰。其 MS 图中均出现 $[M+H]^+$ (m/z 494), $[M+2+H]^+$ (m/z 496), $[M+Na]^+$ (m/z 516) 及 $[M+2+Na]^+$ (m/z 518) 特征离子峰，MS/MS 图中主要碎裂离子峰为 m/z 417 及 m/z 391。三者的出峰保留值、MS 与 MS/MS 谱

图特征及峰值均与格列本脲标准对照品相吻合，据此可以确证上述 3 种用于治疗糖尿病的中西复方药中均含有格列本脲。

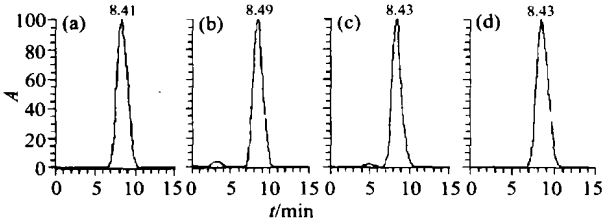


图 4 格列本脲 $[M+Na]^+$ (m/z 516) 的 (+) ESI-MS/MS 全扫描离子流图

Fig. 4 TIC F; (+) ESI-MS/MS of $[M+Na]^+$ (m/z 516) of glibenclamide

(a) 标准对照品; (b) 降糖药片;
(c) 降糖胶囊; (d) 消渴降糖胶囊

对于上述 4 种样品，(–) ESI-MS/MS 与 (+) ESI-MS/MS 分析同步完成。格列本脲标准对照品的 (–) ESI 一级全扫描质谱中，呈现与格列本脲相对分子质量相当的准分子离子峰 $[M-H]^-$ (m/z 492) 及含氯的特征同位素峰 (m/z 494)，两者的相对丰度比约为 3:1。选取 $[M-H]^-$ 峰 (m/z 492) 进行 MS/MS 分析，主要碎片离子有 m/z 367 及 m/z 460 (图 5)。格列本脲标准对照品在 (–) ESI 方式下 MS/MS 可能的裂解途径如图 6 所示。格列本脲标准对照品在 (–) ESI 一级全扫描及对 $[M-H]^-$ (m/z 492) 进行 MS/MS 得到的离子流图中，其保留值约为 8.4 min (图 7a，图 8a)。

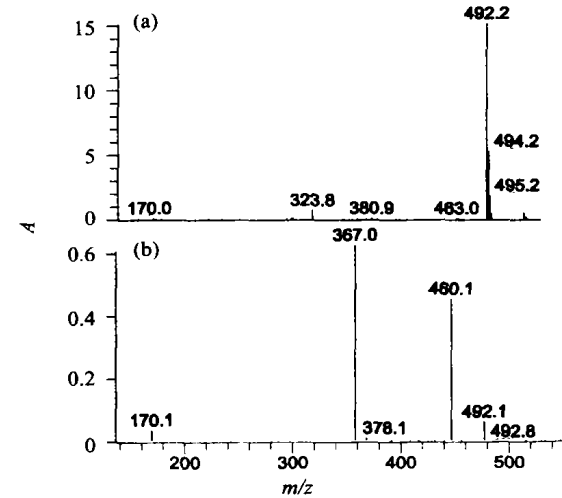


图 5 格列本脲标准对照品 (–) ESI-MS 质谱图 (a) 及 (–) ESI-MS/MS 质谱图 (b)

Fig. 5 The (–) ESI-MS (a) and

(–) ESI-MS/MS (b) spectra of glibenclamide

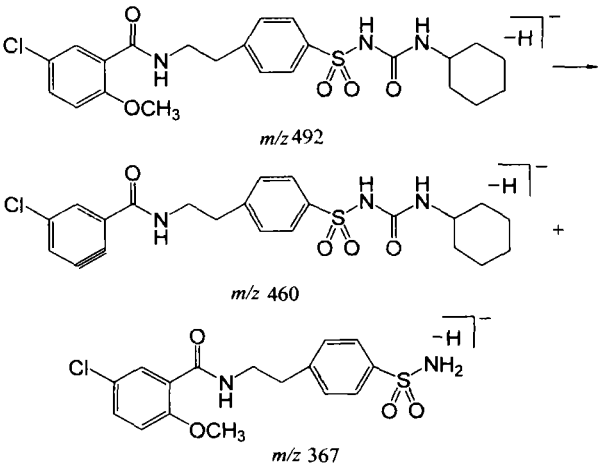


图 6 格列本脲标准对照品 $[M-H]^-$ (m/z 492) 的 (–) ESI-MS/MS 可能裂解途径

Fig. 6 The possible fragmentation route of

$[M-H]^-$ (m/z 492) of glibenclamide by (–) ESI-MS/MS

图 7b，图 7c，图 7d 及图 8b，图 8c，图 8d 分别为降糖药片、降糖胶囊、消渴降糖胶囊在 (–) ESI 一级全扫描及对 $[M-H]^-$ (m/z 492) 进行 MS/MS 得到的离子流图，3 种样品在 ~8.4 min 出现保留值。保留值、MS 及 MS/MS 谱峰特征及峰值均与格列本脲标准对照品相吻合，据此可以进一步确证上述 3 种用于治疗糖尿病的中西复方药中均含有格列本脲。

分别对比图 3 与图 4，图 7 与图 8 可知，HPLC MS/MS 具有比 HPLC MS 更优越的性能。格列本脲存在于 4 种不同的底物中，不同的底物具有不同的组成成分。因此在图 3 和图 7 中检测出多个离子峰。而使用 HPLC MS/MS 则可以克服背景干扰，提高对格列本脲检测的信噪比，因此对复杂样品仍可达到很高的灵敏度。应用 MS/MS 可在有大量杂质的混合物中分析待测物质，提高分析的专一性和灵敏性，可以获得更多的化学结构信息。在 HPLC MS/MS 测定中，对于质谱图中显示的每种化学成分，均可以得到其相对分子质量、二级质谱图及保留时间的信息，将这三方面信息与标准品相对照，即可对化合物精确定性。

图 9 为 4 种样品经过 HPLC MS/MS 分析得到紫外色谱图。比较紫外色谱图与相应的质谱离子流图 (图 3，4，7，8) 可知：色谱图中格列本脲出峰保留值为 8.11 min，与质谱离子流图中出峰保留值不同。这主要是由联用中流动相到达两种检测器的顺序不同所引起；紫外色谱图中，在同样的色谱条件下，只有图 9a 与图 9d 中出现保留值为 8.11 min 的色谱峰，而所有质谱离子流图均在约为 8.4 min 出

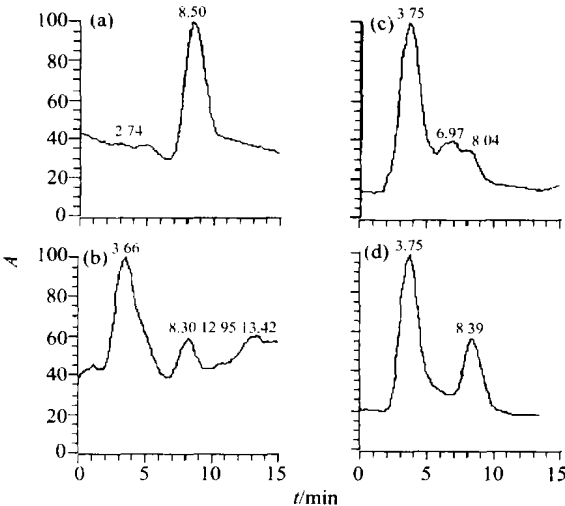


图 7 格列本脲的 (—) ESI-MS 全扫描离子流图

Fig 7 TIC F; (—) ESI-MS of glibenclamide

(a) 标准对照品; (b) 降糖药片;
(c) 降糖胶囊; (d) 消渴降糖胶囊

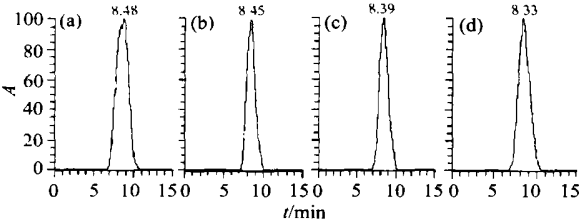


图 8 格列本脲 $[M+Na]^+(m/z\ 492)$ 的

(—) ESI-MS/MS 全扫描离子流图

Fig 8 TIC F; (—) ESI-MS/MS of

$[M+H]^+(m/z\ 492)$ of glibenclamide

(a) 标准对照品; (b) 降糖药片;
(c) 降糖胶囊; (d) 消渴降糖胶囊

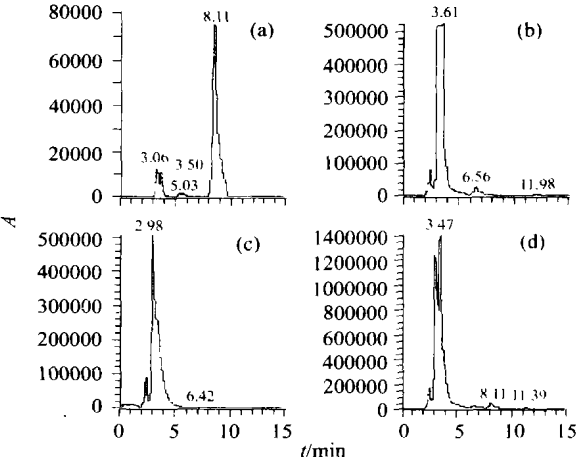


图 9 HPLC 紫外吸收色谱图

Fig 9 HPLC-UV chromatograms of glibenclamide

(a) 格列本脲标准品; (b) 降糖药片;
(c) 降糖胶囊; (d) 消渴降糖胶囊

二级质谱图与标准对照品的二级质谱图进行比对, 从而得到更强有力的定性结论。

参考文献:

[1] 廖庆文, 王宇红. 糖尿病的中西药物治疗进展[J]. 中国药业, 2000, 9(5): 54—55.

[2] 杜小莉, 张翠莲. 降血糖新药——格列本脲和盐酸二甲双胍复合片[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(11): 869—871.

[3] 陈卫东, 吕雄文. 药物治疗糖尿病的临床应用进展[J]. 安徽医药, 2003, 7(6): 413—414.

[4] 杨敏, 余细勇, 欧晓鹏. 中成药中格列本脲人体血浆浓度测定方法及药代动力学特性[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 77—79.

[5] WILLIAMS J D, BURINSKY D J. Mass spectrometric analysis of complex mixtures then and now: the impact of linking liquid chromatography and mass spectrometry [J]. International J Mass Spectrometry, 2001, 212(1—3): 111—133.

[6] CHAN S A, CHEN M J, LIU T Y. Determination of aristolochic acids in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry [J]. Talanta, 2003, 60(4): 679—685.

[7] WONG S K, TSUI S K, KWAN S Y. Analysis of proprietary Chinese medicines for the presence of toxic ingredients by LC/MS/MS [J]. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 30(1): 161—170.

[8] JONG T T, LE M R, HSIAO S S. Analysis of aristolochic acid in nine sources of Xixin, a traditional Chinese medicine, by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry [J]. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33(4): 831—837.

(下转第 60 页)

现目标峰。由此可以看出, 质谱的灵敏度要高得多, 很多在紫外检测器检测信号很弱或没有的组分, 质谱检测器都能容易地检测出来。此外, 由于格列本脲存在于 4 种不同的底物中, 不同的底物具有不同的组成成分, 对最佳色谱条件也有不同的要求, 在同样的色谱条件下进行色谱分析, 可能导致图 9b 与图 9c 不能出现 8.11 min 色谱峰。但本文中采用的 HPLC MS/MS 所具有的灵敏度弥补了这一缺陷。因此可以不用优化色谱条件而在同一条件下进行多种不同中成药的成分分析。

实验结果表明, 本方法简单、快速、灵敏、准确、可靠, 可用于确证多种治疗糖尿病的中西复方药中是否含有格列本脲。与 HPLC-MS 法相比, HPLC MS/MS 法具有更高的选择性, 使待测物免于其他成分的干扰, 而且可以进一步通过把待测物的

- [6] GUSEV A I, WILKINSON W R, PROCTOR A. Improvement of signal reproducibility and matrix/ comatrix effects in MALDI analysis[J]. Anal Chem, 1995, 67(6): 1034—1041.
- [7] CHANT W D, TANG K Y. Analysis of a bioactive β -(13) polysaccharide (Curdlan) using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrum, 2003, 17(9): 887—896.
- [8] CHAN P K, CHANT W D. Effect of sample preparation methods on the analysis of dispersed polysaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrum, 2000, 14(19): 1841—1847.
- [9] GIBSON B W, ENCSRROM J J, JOHN C M. Characterization of bacterial lipooligosaccharides by delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrum, 1997, 8(6): 645—658.
- [10] HARVEY D J, HUNTER A P. Use of a conventional point detector to record matrix-assisted laser desorption/ionization spectra from a magnetic sector instrument[J]. Rapid Commun Mass Spectrum, 1998, 12(22): 1721—1726.
- [11] KRAUSE J, STOECKLI M, SCHLUNEGGER U P. Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrum, 1996, 10(15): 1927—1933.
- [12] MOCK K K, DAVY M, COTTRELL J S. The analysis of underivatized oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 177(2): 644—651.

Determination of High Polymerization Degree Dextran by Matrix-assisted Laser Desorption ionization Time of flight Mass Spectrometry with a Novel Binary Matrix — 2, 5 Dihydroxybenzoic Acid/3-Amino-4-Hydroxybenzoic Acid)

ZHANG Dong di, ZHOU Li hua, DENG Hui min

(Instrumental Analysis & Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using a novel binary matrix — 2, 5 dihydroxybenzoic acid/3-amino-4-hydroxybenzoic acid (DHB+AHB), a dextran sample with a high polymerization degree ($n > 100$) without being further fractionated was directly determined by the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, and the molecular weight of the dextran up to more than 21 000 has been detected. The novel binay matrix was also compared with eight binary matrixes which have been reported before. The results showed that the larger mass range could be obtained and the dextran molecules were desorbed and ionized more efficiently and the reproducibility of spectra was enhanced when a novel binary matrix—DHB+AHB was used, also the resolution of spectra was increased.

Key words: MALDI TOF MS; dextran; 2, 5 dihydroxybenzoic acid/3-amino-4-hydroxybenzoic acid binary matrix

(上接第 56 页)

Identification of Glibenclamide in Traditional Chinese Medicines by High-performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

YAO Jun hua, ZHOU Li hua, ZHANG Dong di, ZHA Qing min

(Instrumentation Analysis & Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC MS/MS) was developed for the identification of glibenclamide added in Chinese traditional medicines. HPLC separation was carried out on a BDS C8 column (4.6 mm×150 mm, 5 μ m) using an isocratic mobile phase (CH₃OH/CH₃CN/0.1% HAc 55:15:30) in less than 15 min. HPLC MS and HPLC MS/MS were performed on an ion trap instrument in both positive and negative ionization mode. This method is simple, rapid, sensitive and reliable, and has been successfully applied to identify glibenclamide in three antidiabetic Chinese traditional medicines.

Key words: high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry; glibenclamide; Chinese traditional medicines