

超高效液相三重四极杆质谱法测定中药中镇静催眠类违禁化学成分

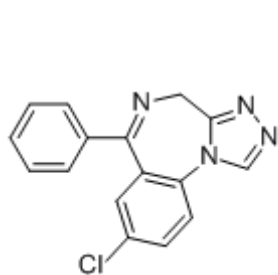
LCMSMS-012

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8030 测定中药中违禁化学成分艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、氯硝西泮和地西洋镇静催眠药物的含量测定方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离，三重四极杆质谱 LCMS-8030 进行定量分析。以格列齐特为内标的方法建立标准曲线，标准曲线范围为 5~400 ng/mL，相关系数均为 0.999 以上；精密度试验连续 6 次进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.076 % 和 1.98 % 以下，艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、地西洋的样品溶液定量限为 0.25 ng/mL，氯硝西泮的样品溶液定量限为 5ng/mL，为打击中药市场非法添加镇静催眠化学成分提供方法和手段。

关键词：艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、氯硝西泮、地西洋三重四级杆质谱

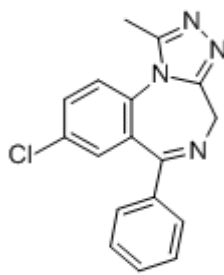
中药非法添加西药成分，宣称能在短期内治愈或极大改善某些疾病。镇静催眠类化学成分三氮唑苯并二氮卓类药物艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑和安定类药物氯硝西泮及地西洋由于良好的镇静安神作用，会被非法添加入某些中药产品中。艾司唑仑 (Estazolam)、阿普唑仑 (Alprazolam)、三唑仑 (Triazolam)，地西洋及氯硝西泮 (Clonazepam) 的化学结构式如图 1-5 所示。

本文建立了中药中艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑，地西洋及氯硝西泮违禁化学成分含量的超高效液相三重四级质谱的含量测定方法，为有效打击中药中非法添加西药提供手段和工具。



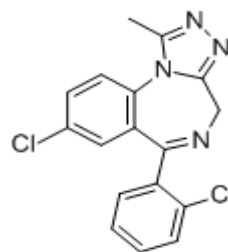
C₁₆H₁₁ClN₄

图 1 艾司唑仑化学结构式



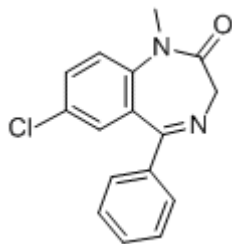
C₁₇H₁₃ClN₄

图 2 阿普唑仑化学结构式



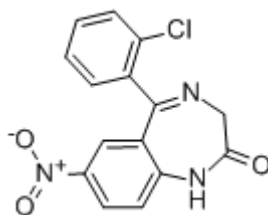
C₁₇H₁₂Cl₂N₄

图 3 三唑仑化学结构式



C₁₆H₁₃ClN₂O

图 4 地西洋化学结构式



C₁₅H₁₀ClN₃O₃

图 5 氯硝西泮化学结构式

实验部分

1.1 仪器

实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8030 联用系统，具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四级杆质谱仪，Labsolution ver. 5.41 色谱工作站；Sigma 3K15 离心机；瑞士梅特勒电子分析天平；Milli-Q 超纯水仪。

1.2 分析条件

液相色谱条件

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：20 ms

延迟时间：2 ms

MRM 参数：见表 2

表 2: MRM 参数列表

No.	Name	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q1 Pre Bias (V)
1	艾司唑仑	295.00	267.05*	-15.0	-25.0	-18.0
			205.10	-15.0	-40.0	-21.0
2	阿普唑仑	309.10	205.10*	-15.0	-45.0	-21.0
			281.00	-15.0	-25.0	-20.0
3	氯硝西洋	316.00	270.05*	-16.0	-25.0	-19.0
			214.00	-16.0	-40.0	-15.0
4	三唑仑	343.00	308.05*	-17.0	-25.0	-22.0
			239.00	-17.0	-45.0	-26.0
5	格列齐特 (IS)	324.10	127.15*	-16.0	-20.0	-13.0
			110.15	-16.0	-20.0	-23.0
6	地西洋	285.00	193.10*	-14.0	-30.0	-13.0
			154.10	-14.0	-30.0	-30.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制:

分别精密称取艾司唑仑、氯硝西洋、阿普唑仑、三唑仑、地西洋，内标物格列奇特约 2 mg (精确到 0.01 mg)，置 10 mL 量瓶中，加甲醇使溶解并定容至刻度，摇匀，即得浓度为 200 μg/mL 的艾司唑仑、氯硝西洋、阿普唑仑、三唑仑、地西洋、格列齐特的标准储备溶液。甲醇依次稀释得内标格列奇特溶液 1 μg/mL。

最终配制标准混合溶液，标准曲线工作溶液中内标物格列奇特浓度为 50 ng/mL，各化合物浓度如表 3 所示。

1.3.2 样品溶液制备

前处理方法：取空白样品约 0.2 g (精确至 1 mg) 于 10 mL 塑料离心管中，加入 5 mL 甲醇后，称重。涡旋 60 s 后，超声 15 min，放冷后，再称重，用甲醇补足减失的重量。4500 rpm 离心 10 min。取样品溶液 20 μL，分别加入 1 μg/mL 内标溶液及镇定催眠类违禁化学成分系列浓度标准溶液各 20 μL 后，加甲醇稀释至 0.4 mL，涡旋 30 s 后，13000 转离心 10 min。取上清液转入液相小瓶中，进样 5 μL，进行 HPLC-MS/MS 分析。同时做空白基质样品实验

结果讨论

2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

50ng/mL 艾司唑仑、氯硝西洋、阿普唑仑、三唑仑、地西洋和内标格列齐特的混合标准品溶液谱图如图 6-11。

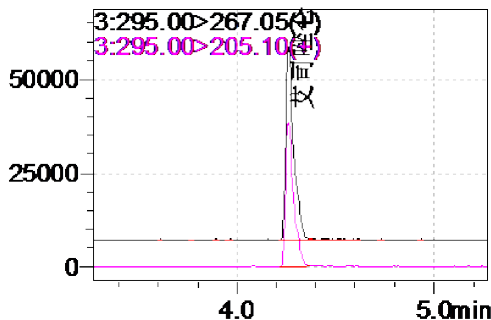


图 6 艾司唑仑谱图

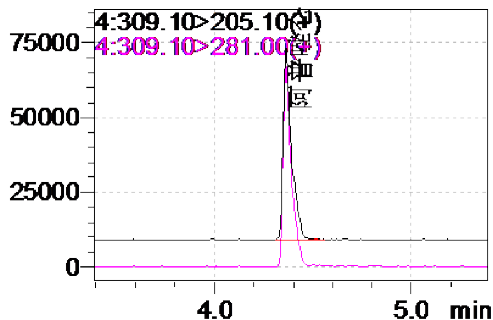


图 7 阿普唑仑谱图

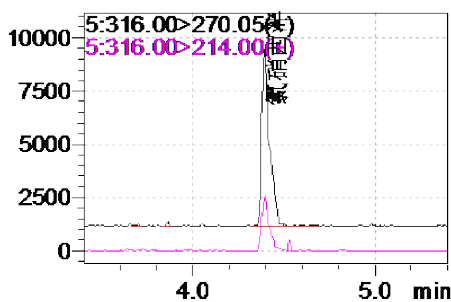


图 8 氯硝西洋谱图

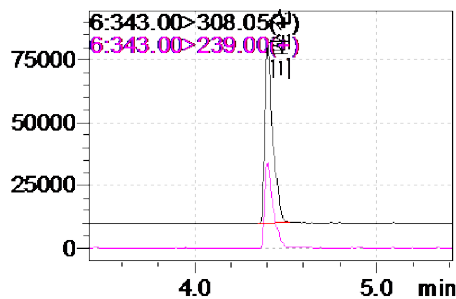


图 9 三唑仑谱图

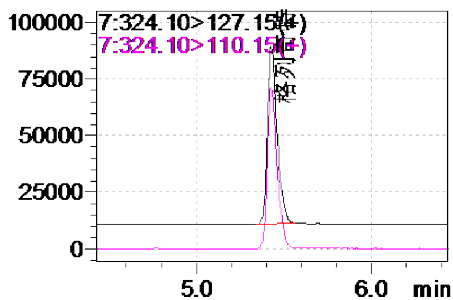


图 10 格列齐特谱图

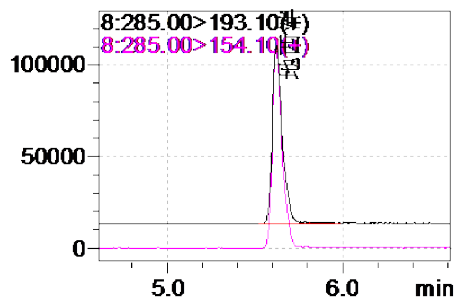


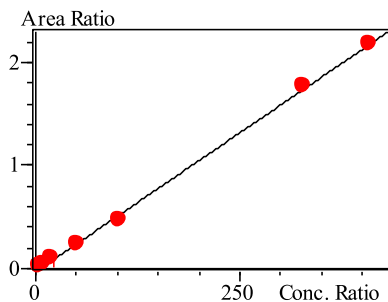
图 11 地西洋谱图

2.2 线性关系

艾司唑仑、氯硝西洋、阿普唑仑、三唑仑和地西洋标准品溶液实际浓度如表 3 所示。按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标（格列齐特内标物浓度设为 1），峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线及标曲方程见图 12-16。所得五个组分校准曲线线性关系良好，相关系数 $r > 0.999$ 。

表 3 标准工作溶液浓度（单位 ng/mL）

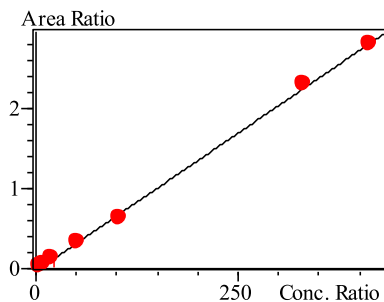
Name	Conc.(1)	Conc.(2)	Conc.(3)	Conc.(4)	Conc.(5)	Conc.(6)	Conc.(7)
艾司唑仑	5.12	10.26	20.5	51.26	103.04	328	410
阿普唑仑	5.18	10.36	20.7	51.76	103.5	331.2	414
氯硝西洋	5.16	10.3	20.6	51.5	103	329.6	412
三唑仑	5.06	10.12	20.24	50.6	101.2	323.82	404.78
地西洋	5.28	10.56	21.1	52.76	105.5	337.6	422



$$Y=0.0053906X-0.0310015$$

$$R=0.9995$$

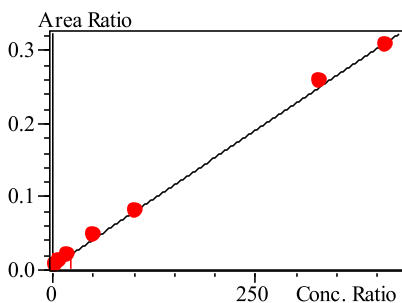
图 12 艾司唑仑标准曲线及方程



$$Y=0.00688183X-0.0293930$$

$$r=0.9995$$

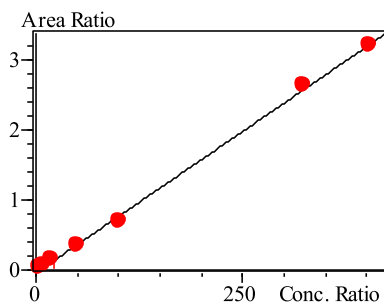
图 13 阿普唑仑标准曲线及方程



$$Y=-.0000746976X+0.00458575$$

$$R=0.9994$$

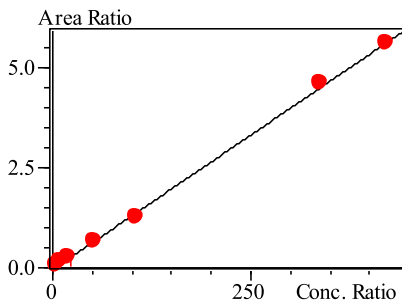
图 14 氯硝西洋标准曲线及方程



$$Y=0.00805656-0.0410559$$

$$r=0.9994$$

图 15 三唑仑标准曲线及方程



$$Y=0.0135141X-0.0460673$$

$$R=0.9996$$

图 16 地西洋标准曲线及方程

2.3 精密度试验

对浓度 4 的标准工作液连续测定 6 次, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重现性结果如表 3-1 和表 3-2 所示。结果显示: 标准品和内标物峰面积的 RSD % 在 2 % 以内, 保留时间的 RSD % 在 0.08 % 之内, 仪器精密度良好。

表 3-1 保留时间和峰面积重现性结果(n=6)

No.	艾司唑仑		阿普唑仑		氯硝西洋	
	Area	Area	Area	R.T	Area	R.T
1	81,045	120,450	120,450	3.984	6,172	4.393
2	82,074	123,414	123,414	3.984	6,467	4.390
3	80,205	125,774	125,774	3.984	6,319	4.399
4	77,678	125,958	125,958	3.983	6,524	4.392
5	81,549	122,874	122,874	3.983	6,435	4.390
6	80,113	122,896	122,896	3.982	6,433	4.391
Average	80,444	123,561	123,561	3.983	6,392	4.393
RSD%	1.153	阿普唑仑	阿普唑仑	0.018	1.98	0.076

表 3-2 保留时间和峰面积重现性结果(n=6)

No.	三唑仑		地西洋	
	Area	R.T	Area	R.T
1	128,433	4.405	158,250	5.630
2	129,324	4.406	160,096	5.626
3	131,829	4.407	158,638	5.625
4	130,670	4.406	156,750	5.621
5	130,011	4.403	157,629	5.622
6	135,343	4.406	155,184	5.623
Average	130,935	4.404	157,758	5.624
RSD%	1.87	4.405	1.07	0.061

2.3 样品实验

样品前处理方法参照 1.3.2 样品溶液制备方法，同时做空白基质样品实验。考察了四种中药的基质，两种是胶囊样品，两种是颗粒样品，对待测组分没有干扰。

2.3.1 方法灵敏度

样品溶液定量限结果如表 4 所示。

表 4. 定量限结果

化合物	最终样品溶液 浓度 (ng/mL)	样品含量 ($\mu\text{g/g}$)
艾司唑仑	0.5	0.25
阿普唑仑	0.5	0.25
氯硝西洋	5	2.5
三唑仑	0.5	0.25
地西洋	0.5	0.25

2.3.2 空白基质及样品溶液谱图

各组分和内标的空白颗粒基质谱图及加标后相当于最终样品溶液浓度为 5 ng/mL 谱图如图 17-21 (内标格列齐特为 50 ng/mL)

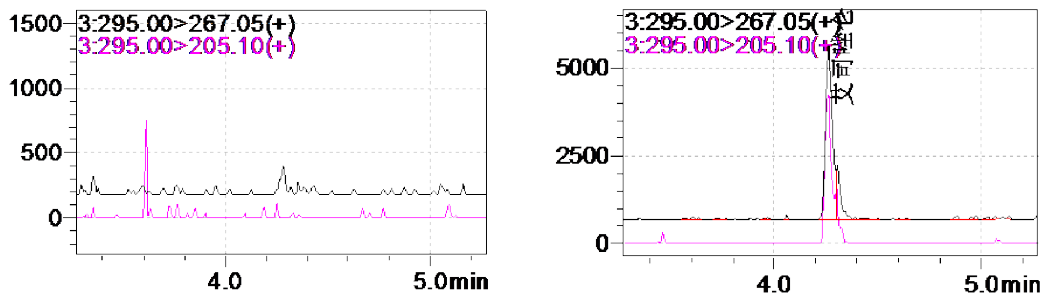


图 17 艾司唑仑空白基质和样品谱图

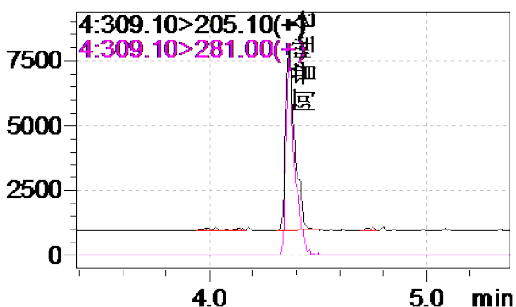
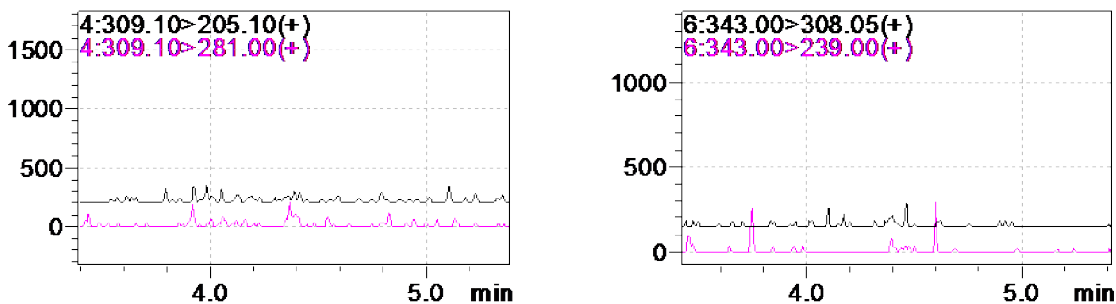


图 18 阿普唑仑空白基质和样品溶液谱图

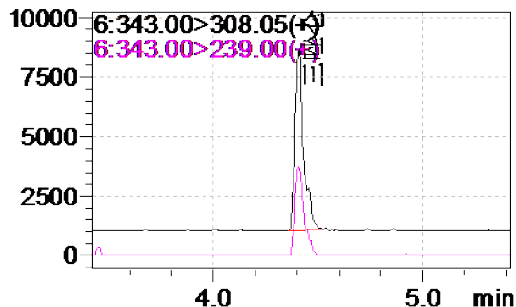
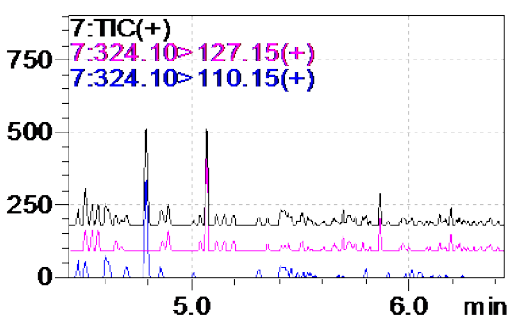
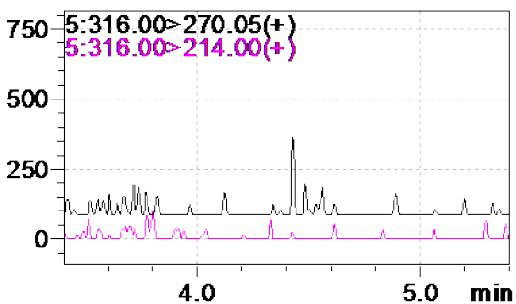


图 20 三唑仑空白基质和样品溶液谱图



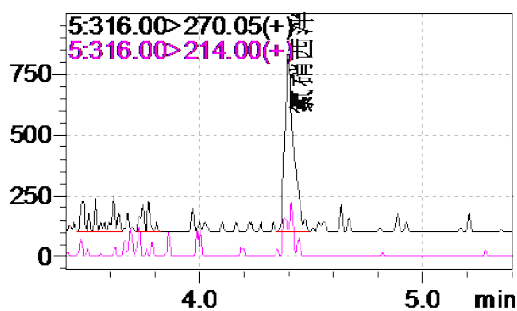


图 19 氯硝西洋空白基质和样品溶液谱图

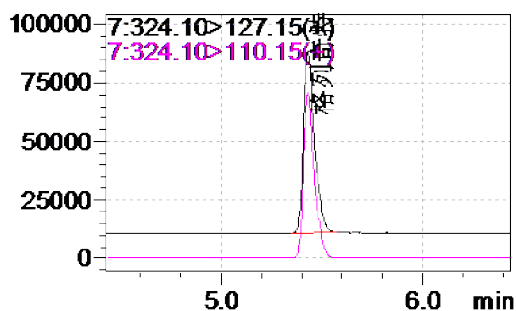


图 21 格列齐特空白基质和样品溶液谱图

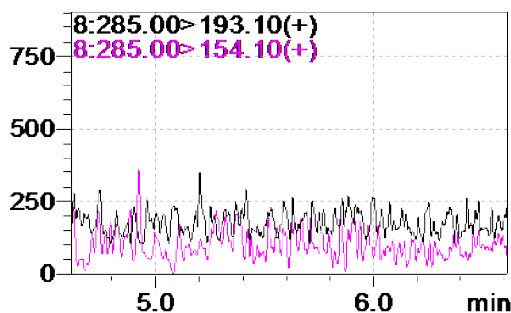
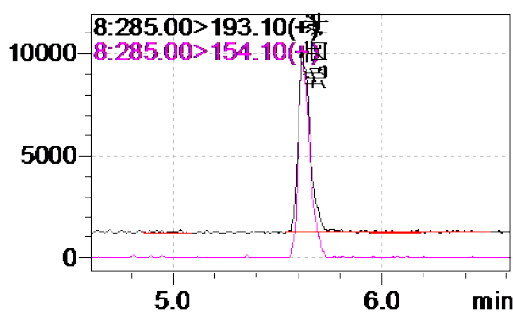


图 22 地西洋空白基质和样品溶液谱图



结论

建立了使用岛津超高效液相三重四极杆质谱 LCMS-8030 测定中药中非法添加的镇定催眠类西药成分的方法。该方法以格列齐特为内标，测定艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、氯硝西洋和地西洋的含量。此法分析速度快，精密度良好，线性关系好，可以作为打击市场上非法添加此类西药的手段和工具。