

三重四极杆液质联用仪测定镇静类保健品中苯二氮卓类药物

LCMSMS-115

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定镇静类保健品中苯二氮卓类药物 (咪达唑仑, 艾司唑仑, 硝西泮, 阿普唑仑, 氯硝西泮, 三唑仑, 地西泮) 的方法。采用外标法快速、准确地测定 7 种苯二氮卓类药物, 其在 0.5 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 相关系数均大于 0.999; 不同浓度的精密度实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03 ~ 0.23% 和 0.73 ~ 5.77% 之间, 仪器精密度良好; 7 种物质的检出限在 0.04 ~ 0.10 $\mu\text{g/L}$ 之间, 定量限 0.17 ~ 0.40 $\mu\text{g/L}$; 样品加标回收率在 75.9 ~ 125.0% 间。

关键词: 苯二氮卓类 镇静类保健品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

苯二氮卓类药物 (Benzodiazepines, BZDs) 多为 1, 4- 苯并二氮卓的衍生物, 临床常用的有 20 余种, 因其具有镇静催眠、抗焦虑、抗惊厥、肌肉松弛和安定作用, 常被不法厂商添加于镇静安神类中成药及保健食品中, 以增强其疗效。但是服用 BZDs 可产生头晕嗜睡、乏力、昏迷、呼吸抑制等副作用, 长期服用容易产生耐受性、依赖性和成瘾性。因此, 我国法律明确规定, 禁止在中成药及保健食品中添加化学

药物成分。2012 年 3 月, 国家食品药品监督管理局公布的《保健食品中可能非法添加的物质名单 (第一批)》50 种物质中就包含 BZDs; 其中还要求相关部门制定检测方法。为应对此要求, 建立 BZDs 药物的检测方法是十分必要。

目前, 中成药及保健食品中 BZDs 的测定方法主要有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱 / 质谱法 (GC/MS)、气相色谱 - 串联质谱法 (GC-MS/MS)、液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS); 但鉴于 LC-MS/MS 可对多组分进行定性和定量分析, 同时具有灵敏度高, 检出限低的特点, 是近年来 BZDs 检测的主要研究方向。因此, 本文参考相关文献方法, 建立测定镇定类保健品中 BZDs 的超高效液相色谱 - 串联质谱分析方法, 可供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.54 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III

2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm

流动相: A - 0.1% 甲酸水溶液; B - 乙腈

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 10 μL

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	45
2.50	Pumps	Pump B Conc.	45
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
4.10	Pumps	Pump B Conc.	20
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

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 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度: 400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 20 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

编号	中文名	英文名	CAS号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	咪达唑仑	Midazolam	59467-64-0	326.05	291.10*	-17	-27	-30
					249.10	-17	-37	-25
2	艾司唑仑	Estazolam	29975-16-4	295.00	267.05*	-15	-24	-28
					241.10	-15	-24	-25
3	硝西洋	Nitrazepam	146-22-5	282.05	236.10*	-14	-24	-16
					207.25	-14	-35	-22
4	阿普唑仑	Alprazolam	28981-97-7	309.05	281.10*	-16	-27	-30
					274.15	-16	-25	-19
5	氯硝西洋	Clonazepam	1622-61-3	316.00	270.05*	-16	-25	-29
					241.05	-16	-37	-16
6	三唑仑	Triazolam	28911-01-5	343.00	308.05*	-17	-28	-21
					238.90	-17	-45	-25
7	地西洋	Diazepam	439-14-5	285.00	222.10*	-14	-32	-20
					193.10	-14	-26	-22

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制:

用乙腈:水(20/80, v/v)溶液做溶剂,将10 mg/L混合标液溶液稀释成0.5、1、5、20和50 µg/L不同浓度的混合标准工作液。

1.3.2 样品前处理方法:

称取1.0 g试样(胶囊、片剂同时将糖衣和胶囊壳碾碎)于50 mL离心管中,加入50 mL甲醇,超声提取20 min,然后以10000 rpm转速高速离心10 min,取出1 mL上清液,用乙腈:水(20/80, v/v)溶液稀释1倍,经0.45 µm微孔滤膜过滤后,用液质分析。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

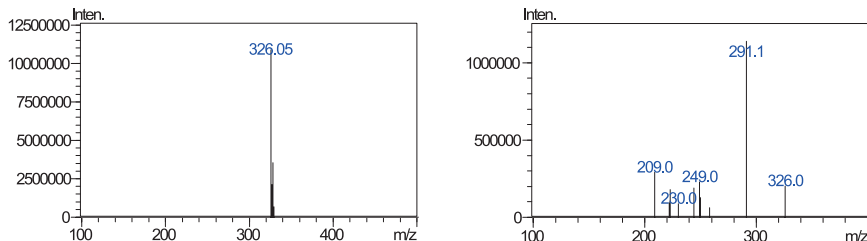


图1 咪达唑仑的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-32V,右图)

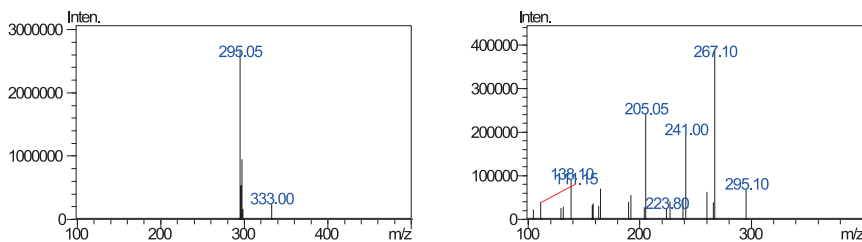


图2 艾司唑仑的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-30V,右图)

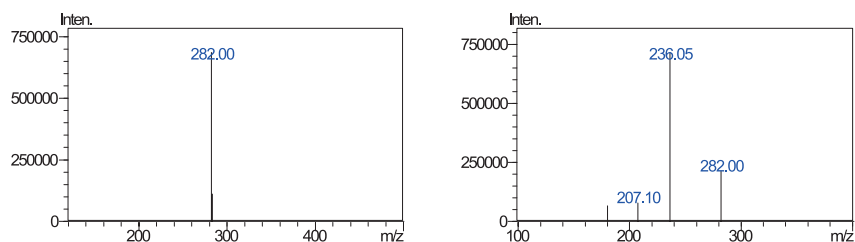


图3 硝西洋的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-25V，右图）

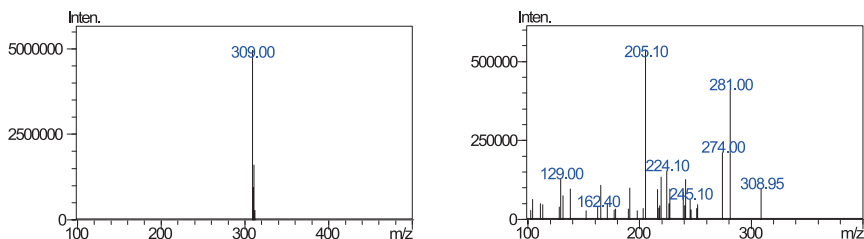


图4 阿普唑仑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-35V，右图）

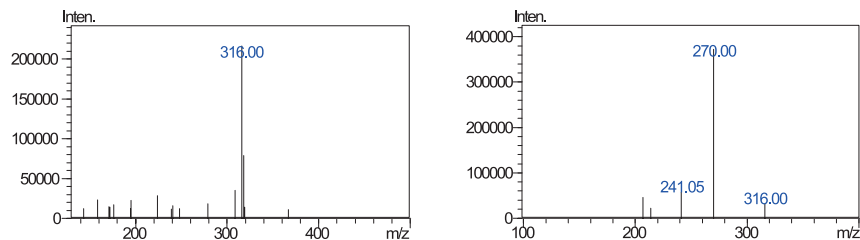


图5 氯硝西洋的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-28V，右图）

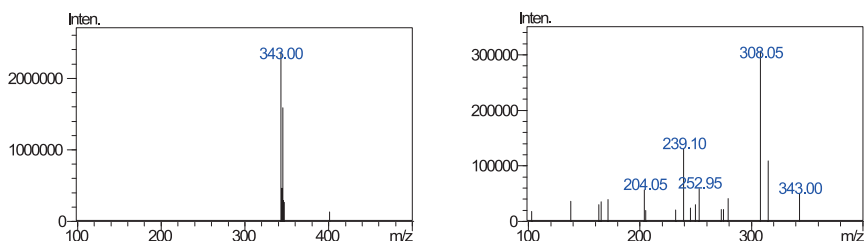


图6 三唑仑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-33V，右图）

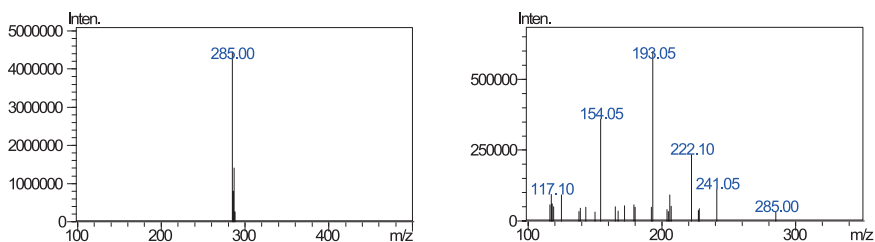


图7 地西洋的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-35V，右图）

2.2 标准溶液的 MRM 色谱图

1.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液的 MRM 色谱如图 8 所示。

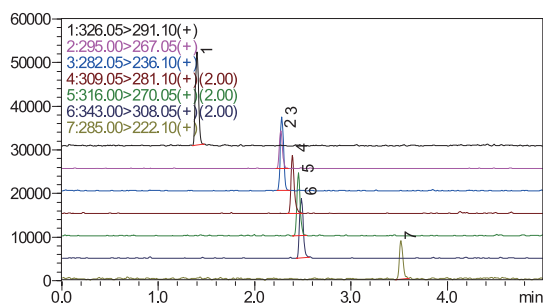


图8 1.0 µg/L混合标样的MRM图

(1 咪达唑仑, 2 艾司唑仑, 3 硝西泮, 4 阿普唑仑, 5 氯硝西泮, 6 三唑仑, 7 地西洋)

2.3 线性关系

将浓度为 0.5、1、5、20 和 50 µg/L 混合标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法制作校准曲线，如图 9 ~ 图 15 所示。

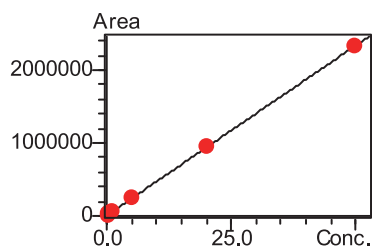


图9 咪达唑仑的标准工作曲线

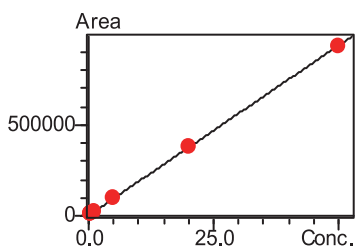


图10 艾司唑仑的标准工作曲线

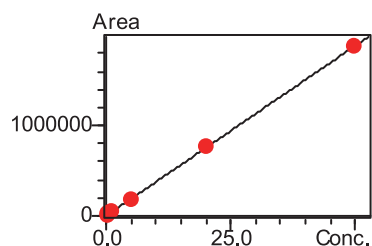


图11 硝西泮的标准工作曲线

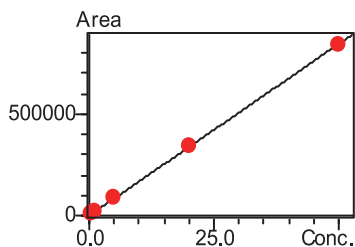


图12 阿普唑仑的标准工作曲线

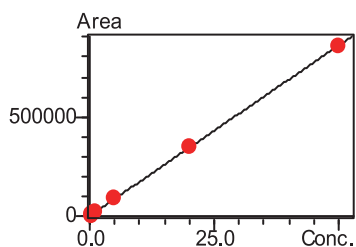


图13 氯硝西泮的标准工作曲线

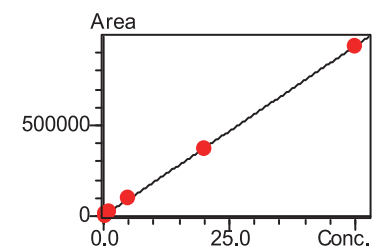


图14 三唑仑的标准工作曲线

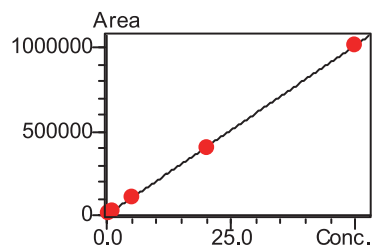


图15 地西洋的标准工作曲线

表3 7种物质的校准曲线参数

No.	名称	线性范围	校准曲线	相关系数 R
1	咪达唑仑	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (46687.0)X + (5569.65)$	0.9999
2	艾司唑仑	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (18687.0)X + (2226.34)$	0.9999
3	硝西泮	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (37702.3)X + (3394.27)$	0.9999
4	阿普唑仑	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (16930.2)X + (-137.049)$	0.9999
5	氯硝西泮	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (17171.6)X + (1151.02)$	0.9999
6	三唑仑	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (18783.0)X + (-642.364)$	0.9999
7	地西洋	0.5 ~ 50 µg/L	$Y = (20309.8)X + (759.258)$	0.9999

2.4 检出限和定量限

配制 0.5 µg/L 的混合标样，平行 7 次进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 MDL = 3.14 × S，定量限 LOQ=4 × MDL。

表4 7种物质的检出限与定量限(n=7)

No.	名称	标准偏差(S)	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
1	咪达唑仑	0.02	0.07	0.28
2	艾司唑仑	0.03	0.10	0.40
3	硝西洋	0.01	0.04	0.17
4	阿普唑仑	0.03	0.09	0.37
5	氯硝西洋	0.03	0.10	0.39
6	三唑仑	0.03	0.08	0.33
7	地西洋	0.03	0.10	0.38

2.5 精密度实验

配制如表 4 浓度的混合标液，重复进样 6 次。7 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03 ~ 0.23% 和 0.73 ~ 5.77% 之间，仪器精密度良好。

表5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

No.	名称	RSD% (0.5 µg/L)		RSD% (5 µg/L)		RSD% (50 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	咪达唑仑	0.23	4.19	0.12	3.06	0.08	1.38
2	艾司唑仑	0.08	5.45	0.09	2.10	0.04	0.87
3	硝西洋	0.14	3.58	0.08	1.78	0.03	1.71
4	阿普唑仑	0.19	5.77	0.10	2.98	0.03	1.11
5	氯硝西洋	0.10	4.29	0.08	2.48	0.04	0.92
6	三唑仑	0.20	3.72	0.11	3.20	0.03	0.73
7	地西洋	0.06	5.74	0.08	1.41	0.03	1.06

2.6 基质加标实验

按照 1.3.2 中样品制备方法，加标含量如表 6。测试结果显示：安神剂样品的加标回收率在 75.9 ~ 125.0% 之间；具体结果如表 6。样品与样品加标的色谱图如图 16、图 17 所示。

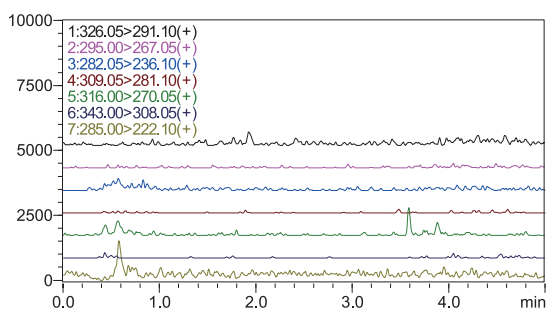


图16 安神剂样品的色谱图

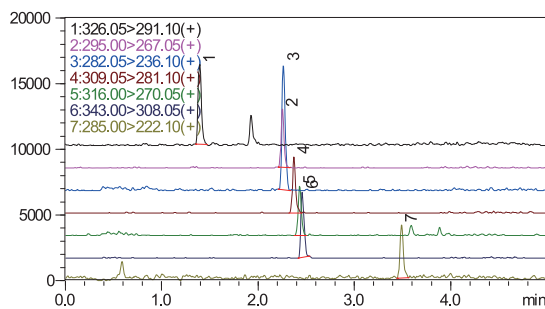


图17 0.05 mg/kg基质加标样色谱图

(1 咪达唑仑, 2 艾司唑仑, 3 硝西洋, 4 阿普唑仑, 5 氯硝西洋, 6 三唑仑, 7 地西洋)

表6 加标样的回收率结果

No.	样品名称	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率%		
			0.05 mg/kg	0.25 mg/kg	2.0 mg/kg
1	咪达唑仑	N.D	89.6%	75.9%	78.8%
2	艾司唑仑	N.D	80.4%	93.8%	101.7%
3	硝西洋	N.D	108.0%	112.0%	106.0%
4	阿普唑仑	N.D	118.4%	115.7%	107.4%
5	氯硝西洋	N.D	93.2%	88.3%	90.6%
6	三唑仑	N.D	125.0%	117.5%	112.7%
7	地西洋	N.D	88.6%	95.1%	94.9%

注: N.D表示未检出

结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定镇静类保健品中 7 种苯二氮卓类药物 (咪达唑仑, 艾司唑仑, 硝西洋, 阿普唑仑, 氯硝西洋, 三唑仑, 地西洋), 线性良好, 相关系数均大于 0.9999; 其检出限在 0.04 ~ 0.10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之间, 定量限 0.17 ~ 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之间; 安神剂样品加标的回收率在 75.9 ~ 125.0% 之间; 该方法具有分析速度快、灵敏高的特点, 适合测定镇定安神类药物中苯二氮卓类药物, 以应对国家食品药品监督管理局公布的《保健食品中可能非法添加的物质名单 (第一批)》中苯二氮卓类药物的监控。