

苯二氮草类药物的气相色谱 – 质谱联用法定性分析方法研究*

朱小红 李涛 朱建荣

(陕西省食品药品检验所, 西安 710061)

摘要 目的: 建立气相色谱 – 质谱联用法定性分析在改善睡眠类保健食品及中成药中非法添加的苯二氮草类 10 种药物。方法: 采用溶剂超声或液 – 液萃取方式对样品进行提取富集, 气相色谱 – 质谱联用(GC – MS) Scan 模式进行定性检测, 采用 DB – 5 ms 毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 程序升温: 初始温度 120 °C (1 min), 10 °C · min⁻¹ 升至 230 °C, 15 °C · min⁻¹ 升至 270 °C (20 min) 选择 EI 离子源, 溶剂延迟 2.5 min, 质谱扫描 40 ~ 350 amu。结果: 在选定的色谱条件下, 能够在 30 min 内快速检测苯二氮草类 10 种药物, 并得到较好的分离; 样品筛查结果发现 2 批样品中分别添加了氯硝西泮和劳拉西泮。结论: 该法快速、准确, 专属性强, 可用于快速筛查违禁药物。

关键词: 气相色谱 – 质谱; 苯二氮草类药物; 保健食品; 中成药; 非法添加; 违禁药物; 快速筛查

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011) 12 – 2289 – 05

GC – MS Identification of benzodiazepine drugs*

ZHU Xiao – hong, LI Tao, ZHU Jian – rong

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710061, China)

Abstract **Objective:** The research aimed to establish a GC – MS method for detection of 10 kinds benzodiazepine drugs added illegally in health foods and traditional Chinese medicines of improve sleeping. **Method:** Using solvent extraction or liquid – liquid extraction method to get the enrichment of samples. Qualitative analysis by GC – MS and scan mode was carried out. The analytical capillary column was DP – 5 ms (30 m × 0.25 mm Ø. 25 μm). The oven temperature was set at 120 °C (1 min) initially, it was programmed rising by 10 °C · min⁻¹ up to 230 °C, rising by 15 °C · min⁻¹ up to 270 °C (20 min). The EI ion source was selected and the solvent was delayed by 2.5 min. The MS scanning was set at the range of 40 – 350 amu. **Result:** At the selected chromatographic conditions, 10 kinds of chemical drugs could get a better separation within 30 min. Clonazepam and lorazepam were detected in two batches of samples. **Conclusion:** This method is rapid, accurate, selective and suitable for fast qualitative detection of drugs added illegally.

Key words: GC – MS; benzodiazepine drugs; health – care food; Chinese patent medicine; illegal accession; illegal substance; rapid determination

保健食品及中药制剂中非法添加化学药品是近年来出现的 1 种高科技制假手段, 这种手段具有隐蔽性, 但对患者的身体具有伤害性, 是保健食品、药品质量管理中的薄弱环节。由于缺乏相应的检测手段和方法, 制约了食品、药品监督管理部门对制假者的及时查处工作。在改善睡眠类保健食品及中成药中非法添加镇静催眠药(sedative – hypnotic drug), 具有易产生耐受性和依赖性的特点, 对消费者的身

体健康造成极大威胁^[1, 2]。

目前, 我国临床应用的催眠药物有第一代的巴比妥类和第二代的苯二氮草类药物(benzodiazepine drugs)。巴比妥类药物在上世纪 60 ~ 70 年代应用普遍, 目前在临床上已很大程度上被苯二氮草类药物(劳拉西泮、地西泮、氯氮草、咪达唑仑、硝西泮、氯硝西泮、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑)所替代, 奥沙西泮为氯氮草、地西泮的体内活性代谢产物。镇

静催眠类药物的检测方法主要有薄层色谱法^[3]、HPLC法^[4]、HPLC/MS/MS法^[5]、气相色谱氮磷检测法^[6]和GC/MS法^[7],但多见于某一类药物,尿样或血样中的分析方法。GC-MS联用技术以其特有的优势在添加药物检测中发挥着重要的作用^[8],其同时具有气相色谱高分离性能及质谱准确鉴定化合物结构的特点,既快速又准确。

本研究建立了一种简单、灵敏、专属的在改善睡眠类保健食品及中成药中添加苯二氮草类药物(奥沙西洋、劳拉西洋、地西洋、氯氮草、咪哒唑仑、硝西洋、氯硝西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑10种)定性检测方法,为建立此类标准和技术监控提供依据。

1 仪器与试剂

岛津GCMS-QP2010气相色谱-质谱联用仪,NIST05、NIST05s、WILEY7标准质谱库。DB-5ms毛细管色谱柱,低温冷冻高速离心机(Anke-GL-20G,上海安亭科学仪器厂),氮气吹干装置(MTN-1800 W, AUTO SCIENCE)。

10种对照品奥沙西洋、劳拉西洋、地西洋、氯氮草、咪哒唑仑、硝西洋、氯硝西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑,均购于中国食品药品检定研究院。

氯仿、丙酮、无水乙醇均为分析纯。

20批样品均为市售样品。

2 实验条件

气相条件:DB-5ms弹性石英键合毛细管柱;程序升温条件(初始温度120℃,保持1min,以10℃·min⁻¹升温至230℃,以15℃·min⁻¹升温至270℃,保持20min;分流比5:1;载气(He,纯度大于99.99%)流速1.7mL·min⁻¹;进样口温度280℃;接口温度300℃;采用恒压模式,柱压135kPa;进样量1μL;质谱条件:电子轰击电离源(EI,70eV)温度为250℃;Scan模式采集,扫描的质量范围:40~350amu,溶剂延迟时间2.5min。

3 对照品溶液的配制

取对照品奥沙西洋、劳拉西洋、地西洋、氯氮草、咪哒唑仑、硝西洋、氯硝西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑适量,根据表1分别选择无水乙醇、氯仿作为溶剂制成每1mL中含1mg的对照品储备液;临用时,加氯仿稀释至各40μg·mL⁻¹。结果见图1。

4 样品前处理

4.1 固体样品 取供试品(胶囊取2粒内容物,片剂取4片,颗粒剂取1袋,均研细;软胶囊取2粒内容物),分别用无水乙醇、氯仿各10mL超声处理20min,3000r·min⁻¹离心5min,取上清液于另一干燥

试管中,氮气流吹干,再各自用1mL无水乙醇、氯仿溶解,经0.45μm针头滤器过滤后,待进样分析。

4.2 液体样品 取供试品[口服液取10mL,糖浆取5mL,酒剂取10mL(蒸去乙醇)]加水10mL,加氯仿振摇提取3次,每次10mL,合并氯仿提取液,离心5min,取上清液经氮气流吹干,再各自用1mL无水乙醇、氯仿溶解,经0.45μm针头滤器过滤后,待进样分析。

5 方法灵敏度

取“1.3”项下对照品溶液适量,加氯仿分别稀释制成20,10,5,2,1,0.5μg·mL⁻¹的检测限试验溶液,按“2”项下条件进样分析,试验结果定量限均在0.5~5ng之间(表1,S/N=10:1),可满足定性筛查的需要。

6 结果与讨论

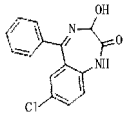
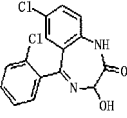
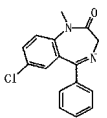
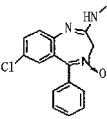
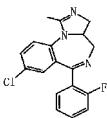
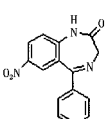
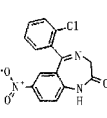
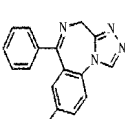
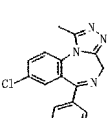
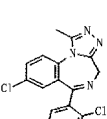
6.1 色谱条件的选择 10种苯二氮草类药物(奥沙西洋、劳拉西洋、地西洋、氯氮草、咪哒唑仑、硝西洋、氯硝西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑)极性较弱,熔点低,加热易挥发,一般选用弱极性或中等极性毛细管色谱柱,程序升温分离,气相色谱检测对于定性判断有一定的局限性,用质谱进一步确证。

6.2 质谱条件的选择 从GC/MS总离子流图可以看出,混合标准溶液中的10种化合物具有良好的分离度,满足色谱分离要求。10种化合物的质谱采集后首先进行保留时间比对,再与标准质谱库NIST05、NIST05s、WILEY7数据检索结果相对照,确认结构,初步判断出所含化学药物种类。

6.3 质谱裂解行为的推断 苯二氮草类化合物3,5~10的质谱结果中均含有分子离子峰,结构中含有氯原子,在EI源分析中发生断裂,其谱图中有[M⁺-CL]峰,也出现了[M⁺-CL-CH₃]峰,以上这些离子均可用于此类药物离子峰度的对照参考。

6.4 质谱库的建立 气相色谱具有极强的分离能力,仅以保留时间定性,中药成分复杂,其固有成分往往会给添加的化学成分检测带来干扰,可能出现“假阳性”问题。GC-MS是复杂混合物分离、检测和确证的有力工具,不仅根据样品中待测组分在图谱上的保留时间,更主要是根据在此保留时间内化合物裂解的特征离子碎片,由质谱仪按其分子量和分子结构对化合物准确定性。实验中,根据各化合物的总离子流图上的色谱保留时间及提取相应的质谱图,对非法添加的化合物进行鉴定,同时将其质谱图存入自建的数据库,为以后非法添加化合物鉴定提供数据。

表 1 标准谱库信息
Tab 1 Library of reference substance

序号 (No)	药物 (drug)	结构式 (structure)	相对分子量 (relative molecular mass)	CAS 编号 (CAS Number)	可选溶剂 (solvent selection)	相对保留 时间(t_R) /min	EI 源检测离子 (main products ion) /m/z	定量限 (LOQ) /ng
1	奥沙西洋(oxazepam)		286. 71	604 – 75 – 1	氯仿、乙醇 (chloro- form ethanol)	14. 93	239 267 205 77 1772	2
2	劳拉西洋(lorazepam)		321. 16	846 – 49 – 1	乙醇(ethanol)	15. 61	239 274 302 75 111	2
3	地西洋(diazepam)		284. 74	439 – 14 – 5	氯仿(chloroform)	15. 84	283* , 256 , 221 , 110 , 77 156	0. 5
4	氯氮革(chlordiazepoxide)		299. 75	58 – 25 – 3	氯仿(chloroform)	16. 53	282 220 77 124	0. 5
5	咪哒唑仑(midazolam)		325. 77	59467 – 70 – 8	乙醇(ethanol)	17. 36	325* , 310 297 163 75	1
6	硝西泮(nitrazepam)		281. 27	146 – 22 – 5	氯仿、乙醇 (chloro- form ethanol)	19. 66	280* , 253 , 234 , 206 , 264	1
7	氯硝西洋(clonazepam)		315. 72	1622 – 61 – 3	氯仿、丙酮 (chloro- form acetone)	21. 05	314* 280 234 205 75	2
8	艾司唑仑(estazolam)		294. 74	29975 – 16 – 4	氯仿(chloroform)	22. 12	293* , 259 , 205 , 239 , 137 77	5
9	阿普唑仑(alprazolam)		308. 76	28981 – 97 – 7	氯仿、乙醇 (chloro- form ethanol)	23. 08	308* , 279 , 273 , 204 , 77 102	5
10	三唑仑(triazolam)		343. 21	28911 – 01 – 5	氯仿(chloroform)	25. 45	342* , 313 , 238 , 203 , 75 102	1

注(note) : * 标记为分子离子峰(mark for molecular ion peak)
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

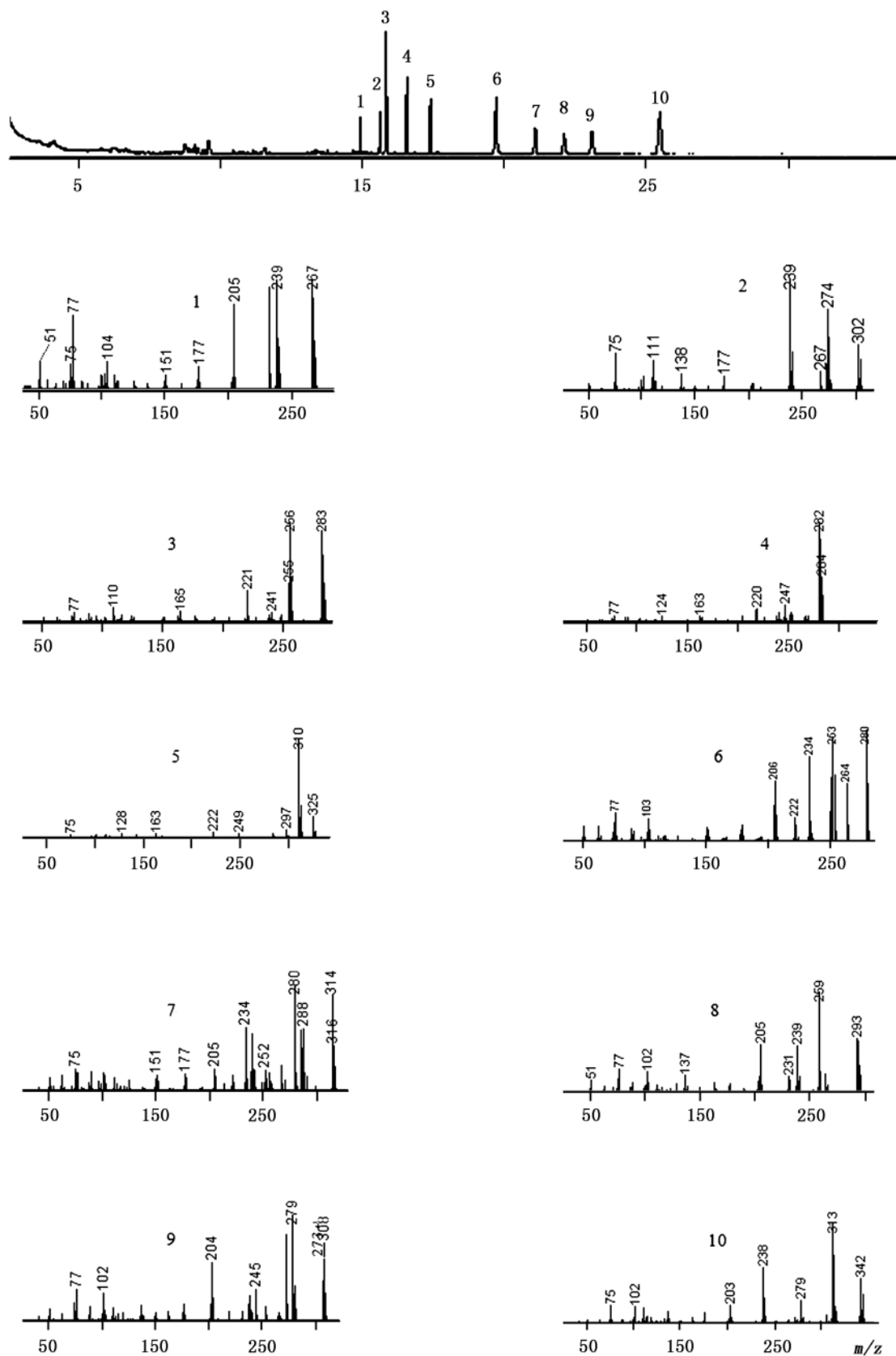


图1 化合物1~10的对照品全扫描质谱图和相关质谱图($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Fig 1 The total ion-chromatogram (full scan mode $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and the mass spectra of compound 1~10

6.5 专属性 选用固体样品(胶囊剂、片剂、颗粒剂、软胶囊)和口服液等中成药或保健食品制剂各1批,并另取以上样品各1份,分别添加10种对照品混合溶液($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)1 mL,按照“4”及“2”项下方法处理和测定,比较色谱及质谱图,只在个别样品色谱图中出现与部分对照品保留时间接近的色谱峰,经与对照品质谱碎片离子比对和谱库检索后,即排除其干扰。拟检的10种苯二氮䓬类药物能与制剂中共存物质区分。该法选用的毛细管色谱柱分离性能强,兼具离子碎片比对以及谱库检索技术,专属性较好。

6.6 方法重复性 取“3”项下对照品溶液,连续进样6次,保留时间的RSD为0.25%,质谱碎片离子一致。

6.7 适用性试验 试验中另外选择了HP-5 ms毛细管色谱柱以及不同批号的DB-5 ms、Rtx-5 ms色谱柱,并对程序升温方式和离子源温度等进行了改变,测试结果能够通过设计的系统适用性试验,说明该检测方法对可变试验因素的抗干扰能力较强,适用性较好。

6.8 样品的测定 本次研究共收集安神类保健食品及中成药15批(样品来源:企业及患者提供和市場购买),其中13批未发现添加此类化学药物,2批(2号、10号)分别掺入氯硝西洋和劳拉西洋。

6.9 定量测定 采用SCAN模式得到全质谱图后,进行质谱定性,初步确定可疑样品,进而根据各目标物的保留时间和表1中的特征离子,采用SIM模式在不同时间段选择不同的特征离子进行扫描、定量。

6.10 回收率和基质效应 分别取胶囊剂、片剂、颗粒剂、软胶囊和口服液的中成药及保健食品制剂各1批,共10份样品,按照“4”项下方法处理至氮气流吹干,每个个体3份,加入对照品混合溶液1.0 mL,分别考察低、中、高3个浓度(0.8, 1.0, 1.2倍的对照品混合溶液 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),按照“2”项下条件进样检测,峰面积记录为B。分别取上述10份样品配制低、中、高3个浓度(0.8, 1.0, 1.2倍的对照品混合溶液)的质控样品,每个浓度5份样品,按照“4”项下方法处理后,进样,峰面积记录为C。对照品混合溶液低、中、高3个浓度(0.8, 1.0, 1.2倍的对照品混合溶液)进样,峰面积记录为A。基质效应 = $B/A \times 100\%$; 回收率 = $C/B \times 100\%$ 。低、中、高3个浓度的基质效应分别为 $96.0\% \pm 4.2\%$, $97.4\% \pm 3.8\%$, $94.0\% \pm 4.4\%$; 提取回收率分别为 $93.0\% \pm 3.1\%$, $94.6\% \pm 1.8\%$, $92.3\% \pm 4.4\%$ 。不同剂

型和不同处方品种的基质效应不影响定性、定量分析,提取回收率稳定,方法适用性较好。

7 结论

本研究采用气相色谱-质谱联用分析确证技术建立了保健食品及中药制剂中非法添加10种苯二氮䓬类药物的定性分析方法,确立了不同剂型样品提取富集的模式,该方法简单,灵敏度高、稳定性好,完全可以满足对非法添加化学药品的检测要求。

参考文献

- 1 ZHANG Li(张莉), DONG Jian-jie(董建杰), GUO Fang-hua(郭芳华). Reasonable use calm hypnotic drug case produce drug dependence (合理使用镇静催眠药以防产生药物依赖性). *Hebei Med* (河北医学) 2006, 12(11): 12
- 2 XIE Mei(谢梅), DAI De-yin(戴德银), XU Li(徐力). Calm hypnotic drug clinical application progress (镇静催眠药的临床应用进展). *Mod Med Health* (现代医药卫生) 2006, 22(20): 31
- 3 XIAO Li-he(肖丽和), LIU Ji-jin(刘吉金), GUAN Xiao-yin(关潇潇) *et al.* Fast detection of sedative-hypnotic drugs in traditional Chinese medicines and health foods by TLC (镇静安神类中成药及保健食品中非法添加化学成分的快速筛查方法研究). *China Mod Med* (中国当代医药) 2009, 16(14): 15
- 4 XIONG Jian-hua(熊建华), MAO Wei-qin(毛伟芹), LI Jin-long(李金龙). Qualitative and quantitative analysis of commonly used psychotropic drugs by HPLC(常用精神药物的HPLC的定性定量分析). *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志) 2007, 16(2): 118
- 5 LUO Jiang-nan(罗疆南), TAN Li(谭力), CAO Ling(曹玲) *et al.* Determination of 15 antiepileptic and hypnotic compounds illegally adulterated into traditional Chinese medicines by LC-MS/MS (LC-MS/MS法同时测定中药制剂中非法添加的15种抗癫痫药及镇静催眠类药物). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2010, 31(3): 162
- 6 JIANG Zhao-lin(姜兆林), TAN Jia-yi(谭家镒), YAO Li-juan(姚丽娟). Screening analysis of benzodiazepine medicines and selected metabolites in plasma and urine using gas chromatography with nitrogen phosphorus detection (尿和血浆中苯并二氮杂䓬类药物及其代谢产物的气相色谱-氮磷检测分析法). *J Anal Sci* (分析科学学报) 2005, 21(6): 639
- 7 WU Hui-qin(吴惠勤), JIN Yong-chun(金永春), CAI Ming-zhao(蔡明招) *et al.* Simultaneous determination of mental drug by gas chromatography-mass spectrometry(气相色谱-质谱法同时检测10种常见精神类药物). *Chin J Anal Chem* (分析化学研究报告) 2007, 4(35): 500
- 8 LI Tao(李涛), ZHU Xiao-hong(朱小红), LIN Fang(林芳). GC-MS determination of chemical drugs added illegally in chinese patent medicine and health food (GC-MS联用方法检测降压类中成药及保健食品中非法添加的化学药物). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2010, 31(12): 2212