

试验选择了 C<sub>4</sub> (丁基)液相色谱柱。C<sub>4</sub> 柱用于快速分离混合极性样品,其与 C<sub>8</sub> 或 C<sub>18</sub>柱相比疏水性较小,通常可用于水相成分高的洗脱液。在利用相同的流动相时,与 C<sub>8</sub> 或 C<sub>18</sub>柱相比,C<sub>4</sub> 柱对非极性化合物的保留时间更短,对极性化合物没有明显影响,适合分离含极性范围广组分的混合物。C<sub>4</sub> 键合相能给出较短的分析时间和较高的分辨率。而奥硝唑为极性化合物,水溶性较好,故采用 C<sub>4</sub> 液相色谱柱。

流动相选择甲醇 醋酸铵缓冲液,奥硝唑保留时间在 10.4 min 左右,内标保留时间在 6.5 min 左右。奥硝唑和内标峰形良好,基线平稳,血浆内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定。血浆样品的处理曾比较过甲醇、乙腈、三氯乙酸 (10%) 沉淀蛋白,结果发现,用甲醇、乙腈沉淀蛋白后,测试灵敏度下降以及保留时间不稳定;而用三氯乙酸 (10%) 沉淀蛋白,测试效果较好,色谱峰位置基本稳定,故采用三氯乙酸 (10%) 沉淀蛋白。

试验结果显示,健康受试者口服奥硝唑受试制剂 1.0 g 后吸收较迅速,于 1.69 h 达血药浓度峰值 17.55 μg·mL<sup>-1</sup>。消除半衰期平均为 15.90 h。药动学参数与文献<sup>[5-6]</sup> 相近,两种奥硝唑片的药动学性质相似。本试验结果表明两种制剂具有生物等效性。

整个研究期间,18 例健康志愿者中无 1 例因不良反应而终止试验,其血常规、血液生化、尿常规以及心电图检查在试验前后未见异常,说明本品在试验剂量下表现出良好的安全性。

## REFERENCES

- [1] WANG J WANG Z S ZHU G H, *et al* Clinical application and adverse reactions of omidazole[J]. *HerMed* (医药导报), 2006 25 (7): 711-712
- [2] TANG H F. Clinical trails for treatments of acute anaerobic infection illness and trichomonas vaginalis with Omidazole Tablet[J]. *Chin JH osp Pharm* (中国医院药学杂志), 2001 21(11): 833-836
- [3] DAIZ Y, LIU Y K, WANG F. *Practical Antibiosis Pharmacology* (实用抗菌药理学) [M]. The 2<sup>nd</sup> Edition Shanghai Shanghai Science and Technology Press 1998
- [4] SFDA. Technology Guidelines of Bioavailability and Bioequivalence Study in Human Body for Chemical/Pharmaceutical Preparations (化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则) [S]. GCL2-1, 2005 12-14 8-10.
- [5] WEN Q, LI J S DONG R Q, *et al* Investigation of bioequivalence of domestic omidazole tablet/capsule vs imported omidazole tablet in healthy volunteers[J]. *China Pharm* (中国药师), 2003 6 (5): 259-260, 301
- [6] LI Q WANG B J GUO R C. Study of the pharmacokinetics and bioequivalence of omidazole capsules and imported omidazole tablets in healthy volunteers[J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2002 18(2): 119-121

(收稿日期: 2010-08-30)

## 直接实时分析质谱超速分析在药品监管中的应用

王铁松, 张喆, 赵明, 车宝泉, 高青, 王威\* (北京市药品检验所, 北京 100035)

**摘要:** 目的 建立直接实时分析质谱 (DART-MS) 超速分析方法应用于药品监管检验工作。方法 DART-MS 将实时直接分析离子源 (DART) 与离子阱质谱联用, 离子源放电电压为 4 kV, 载气为氦气, 流速为 6 L·min<sup>-1</sup>, 温度为 400 °C。在不进行样品色谱分离的前提下, 直接分析被测物质或其溶液。结果 DART-MS 与液质联用相比检定效率提高近 50 倍, 对西地那非、米诺地尔等已知物质可在 20 s 内检测出, 对未知衍生物可在 4 min 内完成其多级质谱研究, 对传统液相色谱法难以分析的辅料如混合脂肪酸甘油酯等也能准确分析。结论 DART-MS 样品处理简单, 方法准确速度快, 能广泛应用于非法添加、药物污染、制剂辅料成分的快速检定, 开创了药品监管的新方法, 能有效提高对突发安全事件的反应能力。

**关键词:** 直接实时分析质谱; 米诺地尔; 西地那非; 辅料; 快速检测

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)09-0699-05

## Ultra Speed Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS) for Drug Administration

WANG Tiesong ZHANG Zhe ZHAO Ming CHE Bao-quan GAO Qing WANG Wei\* (*Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035 China*)

作者简介: 王铁松, 男, 硕士, 主管药师 研究方向: 药品检验、药品打假 \* 通讯作者: 王威, 男, 硕士, 主管药师 研究方向: 药品检验、药品打假 Tel (010) 66124424 Email wangtiesong@hotmail.com

**ABSTRACT OBJECTIVE** To establish an ultra speed direct analysis in real time (DART)- ion trap mass spectrometry method for screening of shampoo and herbal remedies for the presence of illegal additives. **METHODS** The DART temperature was 400 °C, the helium flow rate was 6 L·m<sup>-1</sup> and the mass cone voltage was 4 kV. The solution was directly screened using a 12-DIP sampler. **RESULTS** The speed of DART-MS was 50 times faster than that of LC-MS for identifying the additives including minoxidil, sildenafil and mixed glycerides. **CONCLUSION** Each additive studied was rapidly identified within 20 seconds by DART-MS, suggesting this technique can be used for drug administration. However, its sensitivity and quantitation still requires further study and improvement. **KEY WORDS** DART; minoxidil; sildenafil; experiment; ultra speed analysis.

药物作为特殊的商品一直以来都被重点监管,近年来形势的发展向药品检验工作者也提出了更高的要求。面对新时代药品监管的挑战,研究者试图通过具有常压快速离子化能力的直接实时分析离子源(DART)来寻求突破。DART的工作原理是在大气压条件下通过放电使氦气产生激发态原子,并对该激发态原子进行快速加热和电场加速,使其能够解析并瞬间离子化待测样品。DART商品化程度高,操作简单,仅需将样品置于离子源出口和质谱采样口间即可在几秒钟内对存在于液体、固体或材料表面的化合物进行无损分析,并可通过调节轰击气流温度对表面分子进行差异化解析电离。

笔者利用DART直接实时分析的特性,研究了检查生发剂中米诺地尔、核查国家评价性抽验样品中辅料脂肪酸甘油酯、检定非法添加西地那非等物质的超速质谱分析方法,对28批生发剂进行了米诺地尔检查,对24枚吡喹酮国家抽样品进行了辅料核查,对40批样品进行了西地那非非法添加检定,还对1个未知成分进行了多级质谱研究。这4项定性鉴定工作用传统液质联用法累计耗时50余小时,而用DART-MS法不但与前者结果一致,而且累计耗时仅60 min,极大的提高了检验效率。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

LCQ Advantage离子阱质谱仪(美国Thermo公司),DART实时直接分析离子源(美国IonSense公司)。辅料混合脂肪酸甘油酯(马应龙药业集团股份有限公司,批号090601)。色谱纯甲醇,去离子水。米诺地尔对照品(minoxidil,批号100238-199701)、枸橼酸西地那非对照品(sildenafil citrate,中国食品药品检定研究院)。所有供试品均为抽验样品。

### 1.2 米诺地尔的检测方法与结果

**1.2.1 DART-MS条件** 离子源条件:正离子模式,放电电压为4 kV,载气为氦气,流速为6 L·m<sup>-1</sup>,温度为400 °C。轰击角度为0度,离子源出口与样品水平距离为4 mm,与质谱采样口距离为10 mm。质谱条件:正离子检测,一级质谱扫描全扫描,质量数范围100~1 000,二级质谱全扫描( $m/z = 210$ ),相对碰撞能量40%,质量数范围70~250。用12孔道玻璃探针直接蘸取样品后置于DART离子源前进行检测。

**1.2.2 结果** 米诺地尔对照品DART-MS检测的质谱见图1,2。累计28批次样品的仪器分析过程仅耗时10 min,结果均未检出米诺地尔。

**1.2.3 检测限** 取米诺地尔对照品用甲醇-水(1:1)溶解并逐级稀释后与空白样品充分混合,分别进行测定,以 $S/N > 3:1$ 计算,加样回收检测限浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,能完全满足检测要求。

### 1.3 辅料混合脂肪酸甘油酯的检测方法与结果

**1.3.1 DART-MS条件** DART离子源条件及样品溶解测定方法与“1.2.1”方法相同。质谱条件为正离子检测,一级质谱扫描全扫描,质量数范围180~1 000,二级质谱全扫描( $m/z = 656$ 及 $m/z = 712$ ),相对碰撞能量40%,质量数范围180~1 000。

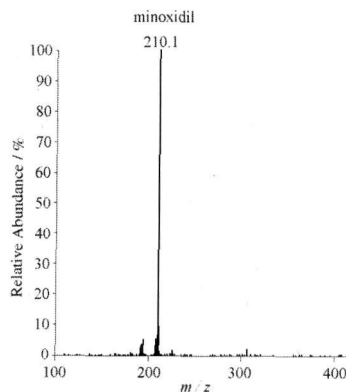


图1 米诺地尔对照品的一级质谱

Fig 1 DART-MS spectra of minoxidil

**1.3.2 结果** 混合脂肪酸甘油酯对照和栓剂样品的 DART-MS 质谱见图 3~6。3 个厂家 24 枚吲哚美辛栓剂分析过程仅耗时 15 min, 结果均检出含有混合脂肪酸甘油酯。

**1.3.3 检测限** 取混合脂肪酸甘油酯对照用甲醇-水 (1:1) 溶解并逐级稀释后分别进行测定, 以  $S/N > 3:1$  计算, 检测限浓度为  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 因溶液分析用量为  $1 \mu\text{L}$  故检测限为 2 ng。

**1.4 非法添加西地那非的检测方法与结果**

**1.4.1 DART-MS 条件** DART 离子源条件与“1.2.1”

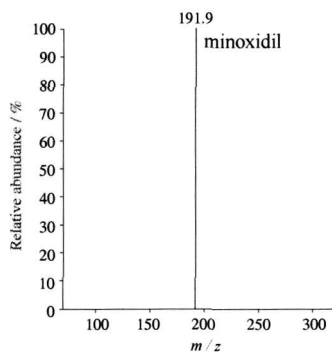


图2 米诺地尔对照品的二级质谱

Fig. 2 DART-MS/MS spectra of minoxidil

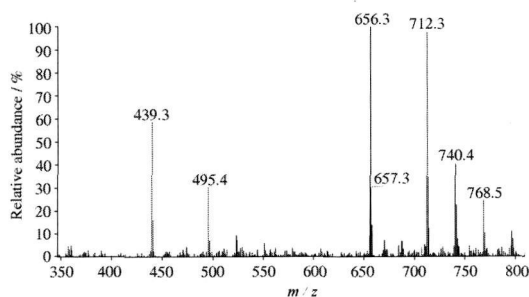


图3 混合甘油酯对照品一级质谱图

Fig. 3 DART-MS spectra of mixed glycerides

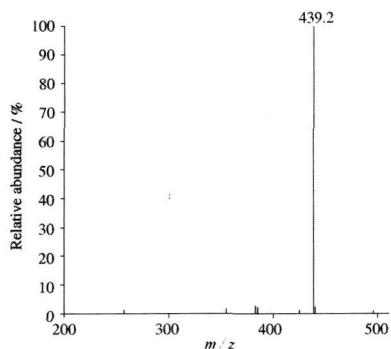


图4 混合甘油酯 m/z=656 峰二级质谱图

Fig. 4 DART-MS/MS spectra of mixed glycerides at m/z 656

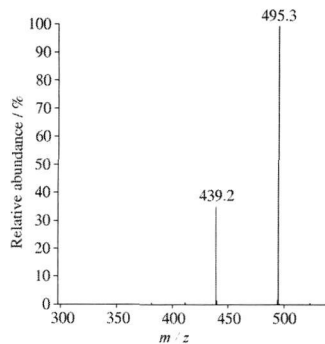


图5 混合甘油酯 m/z=712 峰二级质谱图

Fig. 5 DART-MS/MS spectra of mixed glycerides at m/z 712

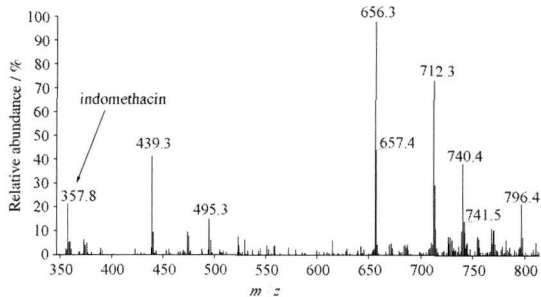


图6 吲哚美辛栓样品一级质谱图

Fig. 6 DART-MS spectra of indomethacin suppositories

方法相同。质谱条件为正离子检测, 一级质谱扫描全扫描, 质量数范围 100~1000, 二级质谱全扫描 ( $m/z = 475$ ), 相对碰撞能量 40%, 质量数范围 130~500。样品溶解测定方法与“1.2.3”相同。

**1.4.2 结果** 西地那非的 DART-MS 质谱见图 7、8。在 40 批样品中检出 13 批含有西地那非, 仪器分析过程仅耗时 25 min。

**1.4.3 检测限** 取枸橼酸西地那非对照品用甲醇-水 (1:1) 溶解并稀释后分别进行测定, 以  $S/N > 3:1$  计算检测限浓度为  $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 因溶液分析用量为  $1 \mu\text{L}$ , 故检测限为 100 ng。

**1.4.4 固体样品原形态直接分析法检测西地那非** 研究中除对样品溶液进行测定外, 还尝试用快装夹固定胶囊、丸剂样品后直接进行 DART-MS 测定。DART 离子源条件与“1.2.1”方法相同, 但轰击角度变为 45 度, 离子源出口与样品垂直距离为 3 mm, 与质谱采样口距离为 10 mm。质谱条件为正离子检测, 一级质谱选择性监测西地那非的 475 分子离子, 二级质谱全扫描 ( $m/z = 475$ ), 相对碰撞能量 40%, 质量数范围 100~500。用 10 孔道快装夹固定样品后直接进行 DART-MS 吹扫检测。

40 批样品的原形态 DART-MS 检验结果与样品溶液的分析结果完全相同。与全扫描相比虽然质谱

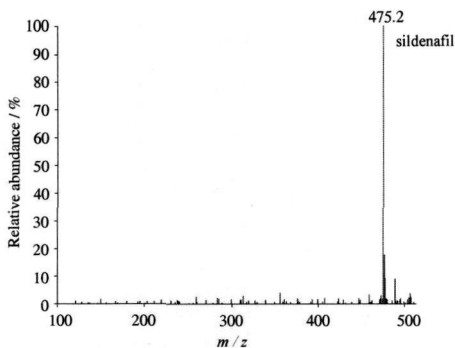


图7 西地那非一级质谱图

Fig. 7 DART-MS spectra of sildenafil

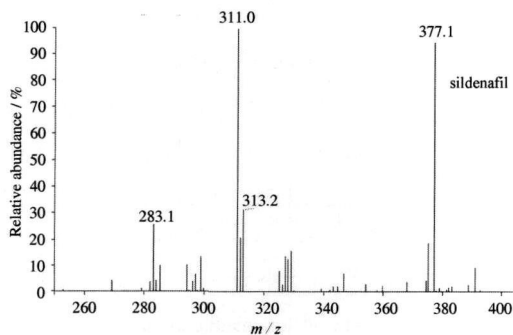


图8 西地那非  $m/z=475$  峰二级质谱图

Fig. 8 Sildenafil DART-MS/MS spectra at  $m/z$  475

响应值降低了约 50 倍,但选择性离子监测的背景噪音也大幅下降了约 20 倍,故分析原形态样品的 DART-MS 法和分析样品溶液的 DART-MS 法具有相似的灵敏度,完全可应用于快速打假。此外,原形态样品 DART-MS 分析法不需溶解样品,从拿到 36 个带包装的样品到完成鉴定仅需 10 min,整体分析速度更快,故而在大批量打假定性筛查中有非常广阔的应用前景,能极大的提高工作效率。

### 1.5 未知物的多级质谱检测方法 with 结果

进行壮阳类非法添加检测时,在一个可疑样品中检测到一个强度很高的  $m/z=505$  的质谱峰,怀疑是羟基豪莫西地那非,但因没有对照品,故采用 DART-MS 对其进行多级质谱研究并确证。

#### 1.5.1 DART-MS 条件

DART 离子源条件与“1.2.1”方法相同。质谱条件为正离子检测,一级质谱扫描全扫描,质量数范围 100~1000 依次选择最强碎片进行多级质谱研究,相对碰撞能量均为 40%,质量数范围 100~600。取玻璃探针直接蘸取样品溶液置于 DART 离子源前进行检测。

#### 1.5.2 多级质谱结果

该可疑物质的一级质谱  $m/z=505$  二级质谱  $m/z=487$  三级质谱  $m/z=377$  四

级质谱  $m/z=331$ 。结合文献<sup>[1]</sup>及质谱碎片,判断该物质为羟基豪莫西地那非。整个多级质谱分析过程仅耗时 4 min,多级质谱图见图 9。

## 2 DART-MS 质谱裂解行为分析

### 2.1 米诺地尔的质谱分析

DART 属于复合型电离,在正离子工作模式下首先由激发态氦气与空气中的水分子发生潘宁电离产生水合物离子与电子<sup>[2]</sup>,质子化的水分子离子再与米诺地尔进行质子交换,形成  $m/z=210$  的  $[M+H]^+$  分子离子峰。该分子离子进行二级质谱轰击时脱去一分子  $NH_3$  裂解生成  $m/z=193$  的离子峰。米诺地尔的质谱裂解图见图 10。

### 2.2 混合脂肪酸甘油酯的质谱解析

脂肪酸甘油酯实际为混合物,其 DART-MS 质谱图相对较复杂,经仔细分析可以发现有多组核比相差 28 或 56 [即  $-(CH_2)_2-$  或  $-(CH_2)_4-$ ] 的离子峰连续出现,如  $m/z=796$ ,  $m/z=768$ ,  $m/z=740$ ,  $m/z=712$ ,  $m/z=656$  这种现象充分的说明了被分析物质为一组相差 2 个或 4 个碳原子的混合同系物,上述峰均为分子离子峰。而质谱图中出现的  $m/z=523$ ,  $m/z=495$ ,  $m/z=439$  峰则分别是上述  $m/z=740$ ,  $m/z=712$ ,  $m/z=656$  峰脱去一个核比为 217 的碎片后对应产生的二级质谱峰。根据上述信息可以推断出  $m/z=656$  峰为三月桂酸甘油酯一水合物,  $m/z=712$  峰为双月桂酸单棕榈酸甘油酯一水合物,  $m/z=740$  峰为双月桂酸单硬脂酸甘油酯一水合物,而核比为 217 的碎片为失去一个活泼氢的月桂酸一水合物,其裂解示意图见图 11。药用的混合脂肪酸甘

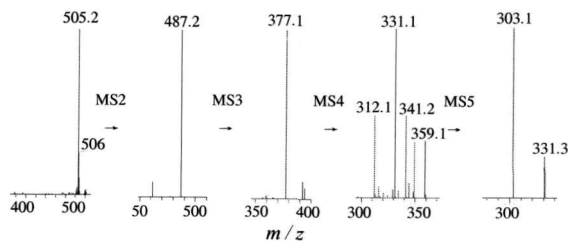


图9  $m/z=505$  可疑物质的多级质谱分析

Fig. 9 Analysis of DART-MSn spectra at  $m/z$  505

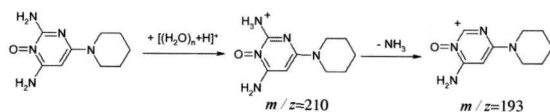


图10 米诺地尔的质谱裂解示意图

Fig. 10 Analysis of MS spectra of minoxidil

油酯可根据熔点分为 34 型 (33 ~ 35 °C), 36 型 (35 ~ 37 °C), 38 型 (37 ~ 39 °C), 40 型 (39 ~ 41 °C), 其熔点随着硬脂酸甘油酯所占比例的提高而增大<sup>[3]</sup>, 其对应的  $m/z = 740$  峰相对强度也会相应改变。经典的高效液相色谱法和高分辨凝胶渗透色谱法只能做到脂肪酸甘油单酯、双酯和三酯的族分离<sup>[4]</sup>, DART-MS 弥补了传统 HPLC 等方法的不足, 不但能检测并得到各厂家辅料混合脂肪酸甘油酯的指纹质谱, 还能够鉴别其组成并提示其相对含量, 在一定程度上展现出 DART-MS 在辅料分析中的广阔应用前景。

### 2.3 西地那非衍生物的质谱解析

该物质在多级质谱分析中出现  $m/z = 377, 331$  和 303 的质谱峰, 虽然与参考文献不同<sup>[11]</sup>, 但与西地那非的 DART-MS 多级质谱完全一致, 故仍可判断为西地那非的衍生物。结合  $m/z = 505, 487$  的质谱峰可判断该物质为羟基豪莫西地那非, 其裂解示意图见图 12。

### 3 讨论

采用 DART-MS 检测方法, 无需制备流动相, 无需进行色谱分离, 交叉污染很小, 且样品处理简单, 分析速度非常快, 每个样品的分析时间均小于 1 min。此外 DART-MS 具有一定的热解析特点, 可以

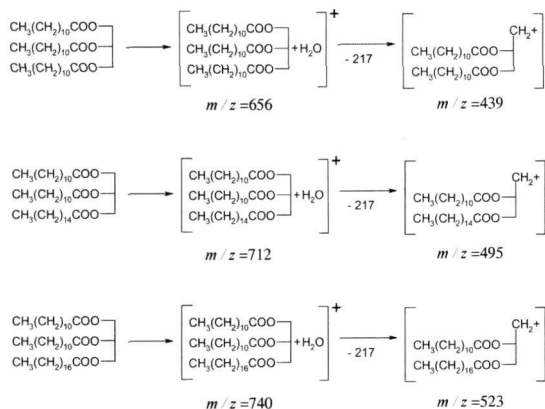


图 11 脂肪酸甘油酯的质谱裂解示意图

Fig 11 Analysis of MS spectra of mixed glycerides

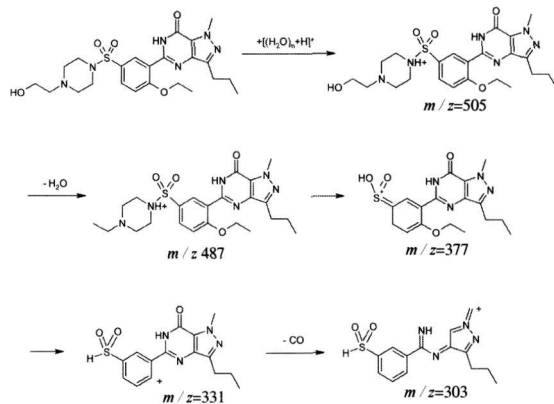


图 12 西地那非衍生物的质谱裂解示意图

Fig 12 Analysis of MS spectra of hydroxyhomosildenafil

通过调节载气温度等进行条件优化, 对药物分子的离子化选择性好。对于已有对照品的物质, 通过比对一级二级质谱定性, 结果准确可靠。对于未知物质, 可以在几分钟内得到其多级质谱供判断结构。因此 DART-MS 可广泛应用于非法添加、药物污染的大样本快速检测。此外 DART-MS 还能解决传统 HPLC 难以准确分析的脂肪酸甘油酯等辅料的检测控制问题, 填补了药品辅料监管的空白。

直接实时分析质谱虽然具有快速、准确、适用范围广等优点, 但还存在进样精度差、定量水平低、灵敏度对质谱仪依赖性强等不足, 如果采用三重四极杆质谱仪进行 MRM 方式检测, 将进一步提高灵敏度和定量能力, 使其有更广泛的应用空间。

### REFERENCES

- [1] GAO Y L, WU X Q, XIAO L H, *et al*. Detection of hydroxyhomosildenafil in food and medicine by HPLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2009, 31(7): 1058-1061
- [2] IONSENSE, HOW DART Works [EB/OL]. [2010. 11. 20] <http://www.antpedia.com/html/2010/11/20/1193320.html>
- [3] W SI-121-83-89 (化学药品及制剂第 1 册) [S]. 1989: 133-134.
- [4] ZHANG B, SIZK, LIS Z, *et al*. Group quantitative analysis of fatty acid glyceride by RP-HPLC and GPC [J]. *Shandong Chemical Industry* (山东化工), 2003, 32(6): 27-28

(收稿日期: 2010-08-21)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告