

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.01.014

超高效液相色谱-串联质谱法检测抗癫痫类中成药及保健食品中15种非法添加化学药物*

王超众^{1,2}, 南俊伶¹, 王萌萌^{1,3}, 刘信奎², 刘春峰², 于百青², 初红涛^{4△}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省齐齐哈尔市药品检验中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 3. 黑龙江省齐齐哈尔市第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 4. 齐齐哈尔大学, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 建立测定抗癫痫类中成药及保健食品中15种非法添加化学药物含量的超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)法。方法 供试品经甲醇提取, 超声处理。色谱柱为 ACES C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 10 mmol/L 乙酸铵(0.1% 甲酸)-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min; 电喷雾电离正、负离子同时扫描, 并在选择反应监测模式下测定, 通过比较分子离子峰、二级碎片离子峰、色谱保留时间等确定添加的化学药物; 并根据外标法以质谱峰面积计算添加药物的含量。结果 15种非法添加化学药物分别为三唑仑、咪达唑仑、劳拉西泮、氯硝西泮、阿普唑仑、扎来普隆、氯氮卓、艾司唑仑、奥沙西泮、地西泮、硝西泮、司可巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥、巴比妥, 质量浓度均在 50~2 000 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 1, n=7$); 检测限为 0.34~9.33 ng/g, 定量限为 1.13~31.11 ng/g; 平均加样回收率为 96.77%~100.36%, RSD 为 1.07%~3.37%; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 4.00%。16 批样品中, 1 批检出非法添加地西泮, 含量为 23.21 mg/g; 2 批检出非法添加苯巴比妥, 含量分别为 15.35 mg/g, 17.89 mg/g。结论 该方法操作简便, 结果准确, 灵敏度高, 可用于快速检测抗癫痫类中成药及保健食品中非法添加的化学药物。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 抗癫痫药物; 中成药; 保健食品; 非法添加; 化学药物

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)01-0055-05

Determination of 15 Chemical Drugs Illegally Added in Anti-Epilepsy Chinese Patent Medicines and Health Foods by UHPLC-MS/MS

WANG Chaozhong^{1,2}, NAN Junling¹, WANG Mengmeng^{1,3}, LIU Xinkui², LIU Chunfeng², YU Baiqing², CHU Hongtao⁴

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, China 150040; 2. Qiqihar Institute for Drug Control, Qiqihar, Heilongjiang, China 161005; 3. The First Hospital of Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang, China 161005; 4. Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang, China 161006)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the determination of 15 chemical drugs illegally added in anti-epilepsy Chinese patent medicines and health foods.

Methods The samples were extracted with methanol by ultrasonic processing and separated on an ACES C₁₈ column(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid in 10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile solution with gradient elution, and flow rate was 0.3 mL/min. The positive and negative ions were simultaneously scanned by electrospray ionization, and determined in the selective reaction monitoring mode. The chemical drugs were determined by comparing the molecular ion peaks, the second-order fragment ion peaks, the chromatographic retention time, and the content of the added drugs was calculated by the external standard method based on the peak area of the mass spectrum. **Results** The 15 kinds of illegally added chemical drugs were triazolam, midazolam, lorazepam, clonazepam, alprazolam, zaleplon, chlordiazepoxide, estazolam, oxazepam, diazepam, nitrazepam, secobarbital, phenobarbital, amobarbital and barbital, which showed good linearity in the range of 50-2 000 ng/mL($r \geq 0.999 1, n=7$). The limit of detection(LOD) was in the range of 0.34-9.33 ng/g, the limit of quantitation(LOQ) was in the range of 1.13-31.11 ng/g, and the average recoveries were in the range of 96.77%-100.36% with RSDs of 1.07%-3.37%. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 4.00%. Among the sixteen batches of samples, diazepam illegally added in one batch was detected, and the content was 23.21 mg/g, phenobarbital illegally added in two batches was detected, and the contents were 15.35 mg/g and 17.89 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate with high sensitivity, which can be used for rapid determination of illegally added chemical drugs in anti-epilepsy Chinese patent medicines and health foods.

Key words: UHPLC-MS/MS; anti-epilepsy drugs; Chinese patent medicine; health foods; illegal addition; chemical drugs

癫痫是由多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电的临床综合征, 俗称羊癫疯或羊角风, 其临床表现具有发作性、短暂性、重复性和刻板性的特点^[1-4]。

抗癫痫药物的临床风险极大, 属精神类药品, 副作用大, 治疗窗窄, 是一类需要严格管控的化学药物^[5-9], 极易发生不良反应和中毒事件, 使用时必须监测血药浓

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金[YQ2019H034]; 黑龙江省中医药科研项目[ZHY2020-009]; 黑龙江省齐齐哈尔市科技计划创新激励项目[CSFGG-2020220]。

第一作者: 王超众, 男, 在读博士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药成分分析, (电子信箱)19845209666@163.com。

△通信作者: 初红涛, 男, 博士, 副教授, 研究方向为分析化学, (电话)0452-2738190。

度并及时调整用药^[10-11]。近年来,有非法商家向所谓“纯中药”“保健食品”中非法添加抗癫痫类化学药物现象,由于在处方中未标明含有化学药物成分,造成患者大量长期服用,存在较大安全隐患,有必要建立检测抗癫痫类化学药物的方法。目前通过检测患者抗癫痫药物的血药浓度间接检测^[12-13],或采用酶联免疫法^[14]和高效液相色谱法^[15]直接检测,但专属性均不强,灵敏度不高,检验结果不准确。超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)法^[16]是检验非法添加药物的主流方法,但本研究中涉及的非法添加药物仅2种,覆盖面太小。根据原国家食品药品监督管理局批复的药品检验补充检验方法和检验项目批准件(编号分别为2009024, 2012004, 2013002)可检测21种非法添加药物,覆盖的药物较全面,但检测方法用时较长、专属性和灵敏度均较差。为此,本研究中以临床较常用的15种抗癫痫药物为分析目标,建立了测定此类非法添加化学药物的UHPLC-MS/MS法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Vanquish H型高效液相色谱仪(配有Xcalibur 3.0.63工作站), Thermo TSQ Quantum Access型质谱仪(配有Chromeleon 7.2.10工作站),均购自美国Thermo公司; Sartorius BP211D型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg); Rotina 380R型高速冷冻离心机(美国Hettich公司); KQ-500VDV型台式三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为45 kHz)。

1.2 试剂

三唑仑对照品(批号为171230-201804,含量为99.9%),咪达唑仑对照品(批号为171265-201402,含量为99.8%),劳拉西泮对照品(批号为171253-201803,含量为99.9%),氯硝西泮对照品(批号为171227-201404,含量为99.7%),阿普唑仑对照品(批号为171218-201305,含量为99.5%),扎来普隆对照品(批号为100670-201602,含量为99.8%),氯氮卓对照品(批号为171248-201403,含量为99.8%),艾司唑仑对照品(批号为171219-201604,含量为99.9%),奥沙西泮对照品(批号为171229-201505,含量为99.8%),地西泮对照品(批号为171225-201304,含量为99.9%),硝西泮对照品(批号为171217-201403,含量为99.9%),苯巴比妥对照品(批号为171222-201206,含量为99.7%),异戊巴比妥对照品(批号为171221-201203,含量为99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;司可巴比妥对照品(US Pharmacopeial Convention,批号为USP-1611004,含量为95.6%);巴比妥对照品(国家麻醉品实验室,批号为1220-9201,

含量为99.0%);实测样品来自市场抽检;乙腈、甲酸、乙酸铵(色谱纯,美国Fisher试剂公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: ACES C₁₈柱(150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A为10 mmol/L乙酸铵-0.1%甲酸, B为乙腈, 梯度洗脱(0~2.0 min时90%A, 2.0~4.0 min时65%A, 4.0~6.5 min时60%A, 6.5~9.0 min时20%A, 9.0~12.0 min时10%A); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40℃; 进样量: 2 μL。

2.1.2 质谱条件

电离方式: 电喷雾电离正负离子模式(ESI⁺, ESI⁻); 检测方式: 选择反应监测(SRM); 雾化气: 氮气; 鞘气流速: 30 bar; 辅助气流速: 10 bar; 源电压: 4 000 V(+), 3 500 V(-); 毛细管温度: 270℃; 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和离子化模式见表1。

表1 非法添加化学药物的主要质谱参数

Tab. 1 Main mass spectrum parameters of illegally added chemical drugs

序号	化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 (eV)	离子化 模式
1	三唑仑	343.1	314.9/308.0*	28/24	+/+
2	咪达唑仑	326.1	291.0*/243.9	24/28	+/+
3	劳拉西泮	321.1	302.9/275.0*	12/20	+/+
4	氯硝西泮	316.0	240.9/213.8*	30/40	+/+
5	阿普唑仑	309.1	281.0*/274.1	24/24	+/+
6	扎来普隆	306.1	264.0/236.0*	20/20	+/+
7	氯氮卓	300.1	283.0*/241.0	12/12	+/+
8	艾司唑仑	295.1	267.0*/192.0	24/20	+/+
9	奥沙西泮	287.0	241.0*/162.9	20/30	+/+
10	地西泮	285.1	257.1/222.1*	20/28	+/+
11	硝西泮	282.1	254.0/236.0*	20/24	+/+
12	司可巴比妥	237.0	194.0*/85.0	8/20	-/-
13	苯巴比妥	231.0	188.0*/85.0	4/20	-/-
14	异戊巴比妥	225.1	182.0*/85.0	4/20	-/-
15	巴比妥	183.1	140.1*/85.0	4/20	-/-

注: *m/z* 为质荷比, * 为定量离子。

Note: *m/z* is the mass-to-charge ratio, and * is the quantitative ion.

2.2 溶液制备与测定

分别取三唑仑、咪达唑仑、劳拉西泮、氯硝西泮、阿普唑仑、扎来普隆、氯氮卓、艾司唑仑、奥沙西泮、地西泮、硝西泮、司可巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥、巴比妥对照品适量,精密称定,用甲醇超声处理,制成质量浓度为100 μg/mL的混合对照品贮备液。精密量取上

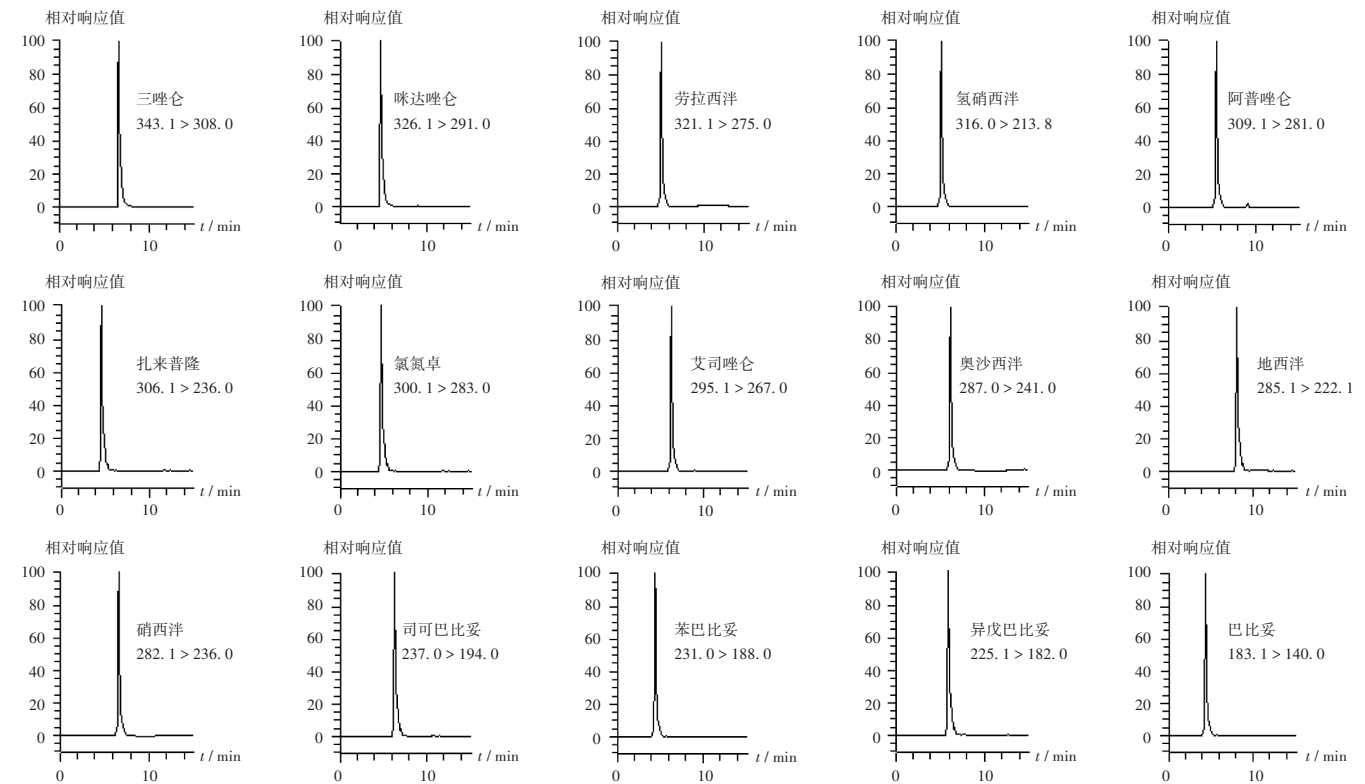


图1 混合对照品溶液的SRM色谱图

Fig. 1 SRM chromatograms of mixed reference solution

述溶液,用初始流动相稀释成含上述物质质量浓度均为5 00 ng / mL的混合对照品溶液。按2.1项下色谱-质谱条件进样分析,记录SRM色谱图,见图1。

供试品溶液:取样品1 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声提取15 min,放冷至室温,用甲醇定容至刻度,5 000 r / min离心5 min,上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤;若样品中含有油脂,将样品提取液置-20℃条件下放置24~48 h,放置时间可视样品是否澄清而定;再离心处理,过滤,取续滤液,作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取混合对照品贮备液适量,用初始流动相稀释成质量浓度分别为50, 100, 200, 500, 1 000, 1 500, 2 000 ng / mL的系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱-质谱条件进样分析,记录SRM色谱图,以质量浓度(X, ng / mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。表明各化合物质量浓度在50~2 000 ng / mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限确定:吸取线性关系考察项下最低质量浓度溶液,用初始流动相稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,记录SRM色谱图,分别以信噪比为3:1和10:1时的含量为检测限和定量限。结果见表2,表明方法的灵敏度完全能满足非法添加化学药物的检测要求。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱-质谱条件连续进样测定6次,记录SRM

表2 15种化合物含量测定方法学考察结果

Tab. 2 Methodological investigation of content determination of 15 compounds

序号	化合物	回归方程	r	检测限 (ng / g)	定量限 (ng / g)	加样回收试验(%)	
						$\bar{X}$	RSD
1	三唑仑	$Y=70.25X-10.24$	0.9997	0.35	1.17	99.41	1.26
2	咪达唑仑	$Y=162.7X+11.87$	0.9992	0.41	1.37	98.09	2.27
3	劳拉西洋	$Y=16.59X-1.006$	0.9994	0.34	1.13	98.37	2.11
4	氯硝西洋	$Y=11.78X-2.007$	0.9998	0.39	1.30	99.36	1.84
5	阿普唑仑	$Y=78.66X+4.088$	0.9999	0.34	1.14	100.36	2.08
6	扎来普隆	$Y=42.60X+5.224$	0.9997	0.39	1.29	97.63	1.57
7	氯氮卓	$Y=75.91X+15.20$	0.9995	0.35	1.17	98.39	3.37
8	艾司唑仑	$Y=83.10X-3.001$	0.9995	0.41	1.37	96.77	2.68
9	奥沙西洋	$Y=16.23X-1.886$	0.9993	0.37	1.24	98.54	2.63
10	地西洋	$Y=69.34X+2.019$	0.9991	0.41	1.38	99.66	1.07
11	硝西洋	$Y=72.57X+3.334$	0.9997	0.36	1.21	97.91	2.09
12	司可巴比妥	$Y=2.403X-0.1024$	0.9992	3.13	10.42	98.63	2.66
13	苯巴比妥	$Y=1.051X-0.02757$	0.9996	7.23	24.09	98.34	2.37
14	异戊巴比妥	$Y=12.38X-1.057$	0.9995	1.85	6.17	97.05	1.52
15	巴比妥	$Y=1.447X+0.3458$	0.9998	9.33	31.11	99.18	3.06

色谱图。结果15种化学药物定量离子对质谱峰峰面积的RSD为0.45%~1.36%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取阴性样品(已知不含15种非法添加化学药物的样品),加入适量混合对照品贮备液,混匀,

2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱-质谱条件进样测定6次。结果各成分含量的RSD为1.10%~3.21%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10,12 h时进样分析,记录定量离子对SRM色谱图。结果峰面积的RSD为1.54%~3.12%($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

加样回收试验:取阴性样品1 g,精密称定,分别置6个50 mL容量瓶中,分别精密加入混合对照品贮备液0.25 mL,按供试品溶液制备项下“加甲醇适量”起操作,取续滤液进样测定,并计算回收率。结果见表2,表明方法准确度良好。

2.4 样品检测

取16批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,以外标法计算非法添加药物的含量。经测定,16批样品中,1批检出非法添加地西泮,含量为23.21 mg/g;2批检出非法添加苯巴比妥,含量分别为15.35 mg/g,17.89 mg/g,非法添加率为18.75%。

2.5 与法定方法灵敏度比较

由表3可知,法定方法采用高效液相色谱(HPLC)法对目标化合物进行定量分析,主要靠药物的紫外吸收来检测,灵敏度较低;本研究中新建方法采用UHPLC-MS/MS SRM模式定量分析,用二级定量碎片离子的离子强度来检测,提高了定量限。法定方法采用比对一级、二级全扫描图谱的方法进行鉴别,在本底较高的情况下会影响定性的检测限;新建方法采用SRM扫描模式进行定性鉴别,可提高检测限。

表3 法定方法与新建方法灵敏度比较

Tab. 3 Comparison of sensitivity between the statutory method and the new method

化合物	分析时间(min)		检测限(ng/g)		定量限(ng/g)	
	法定	新建	法定	新建	法定	新建
三唑仑	70	12	5.52	0.35	20.21	1.17
咪达唑仑	70	12	6.03	0.41	20.34	1.37
劳拉西泮	70	12	5.30	0.34	20.04	1.13
氯硝西泮	70	12	5.57	0.39	19.75	1.30
阿普唑仑	70	12	5.46	0.34	21.37	1.14
氯氮卓	70	12	5.48	0.35	21.05	1.17
艾司唑仑	70	12	6.05	0.41	22.50	1.37
奥沙西泮	70	12	5.37	0.37	21.66	1.24
地西泮	70	12	5.51	0.41	23.40	1.38
硝西泮	70	12	5.60	0.36	22.75	1.21
司可巴比妥	40	12	9.48	3.13	39.67	10.42
苯巴比妥	40	12	50.52	7.23	42.03	24.09
异戊巴比妥	40	12	15.03	1.85	40.25	6.17
巴比妥	40	12	70.63	9.33	40.82	31.11
扎来普隆	18	12	4.27	0.39	19.63	1.29

3 讨论

3.1 色谱条件选择

共测定了非法添加的15种化学药物,成分较多且某些化合物化学性质相近,故在UPLC中很难实现较好分离。曾考察乙腈-水、乙腈-乙酸、乙腈-乙酸铵、0.1%甲酸-10 mmol/L乙酸铵-乙腈等流动相体系,因质谱检测要采用正负离子同时扫描,因此还要考虑流动相的pH,经过考察,采用10 mmol/L乙酸铵(0.1%甲酸)-乙腈为流动相时各化合物峰形、出峰时间等参数均较好,因此确定为最终测定条件。

3.2 质谱条件选择

本试验中检测的化合物较多,某些化学性质相近的化合物很难在色谱系统中达到有效分离,只能通过优化质谱条件,发挥串联质谱检测器专属性强的特点来实现对各化合物的准确检测,因此质谱条件的确立尤为重要。本试验中对各组分离子对及碰撞电压进行优化,得到最佳离子响应强度,最终确定了正负离子同时扫描的质谱条件,实现了对15种化合物的同时分析。

3.3 与法定方法的比较

检验成本:法定方法采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法、薄层色谱(TLC)法、HPLC法全扫描相结合的方法鉴别,采用HPLC法定量的方式,共用到3个TLC系统、3个HPLC系统和3个HPLC-MS/MS系统,故此方法检验1批药品要至少重复3次鉴别和3次定量检验,操作烦琐,耗费较多的人力和物力。而本研究中新建立的方法只采用1个UHPLC-MS/MS系统即可对样品进行定性和定量检验,减少了操作步骤,节省了时间和耗材,大大降低了检验成本,更节能环保。

专属性:法定方法主要采用HPLC-MS/MS一级全扫描和二级全扫描模式进行定性鉴别,检验单一的纯品尚可,但样品辅料较多、成分较复杂、多成分分离度较差时专属性会大打折扣,易出现假阴性或假阳性的检验结果。本研究中采用UHPLC-MS/MS SRM模式,以二级碎片离子的相对丰度进行定性鉴别,大大提高了检验的专属性,弥补了法定方法的不足,是目前定性检测药物残留的主流方法。

参考文献

- [1] 辜巧. 癫痫治疗和护理的研究进展[J]. 中国当代医药, 2020,27(3):21-24.
- [2] 王延鹏. 多种抗癫痫药物联合下丙戊酸钠血药浓度对疗效的影响分析[J]. 中国实用医药, 2020,15(28):152-154.
- [3] BEGLEY CE, BEGHI E, BERAN RG, et al. ILAE Commission on the Burden of Epilepsy, Subcommittee on the Economic Burden of Epilepsy: final report 1998-2001[J]. Epilepsia, 2002,43(6):668-673.
- [4] DEVINSKY O. Diagnosis and treatment of temporal lobe epilepsy[J]. Rev Neurol Dis, 2004,1(1):2-9.