

LC-MS/MS 法定性检测保健品中非法添加的镇静催眠药

张建丽, 王占良, 张亦农

(国家体育总局反兴奋剂中心, 北京 100029)

摘要:建立了同时检测保健品中非法添加的 8 种镇静催眠药的分析方法。用甲醇直接提取, 以 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵 (pH 3.5) 和乙腈为流动相, 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ (100 mm × 2.1 mm × 3.5 μm) 色谱柱进行分离, 电喷雾离子源, 正离子多反应监测扫描方式分析检测。8 种镇静催眠药的检测限均不高于 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 回收率为 73.3%~99.0%。

关键词:保健品; 镇静催眠药; LC-MS/MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)05-0275-03

Detection of Sedative Hypnotic Drugs in Health Products by LC-MS/MS

ZHANG Jian-li, WANG Zhan-liang, ZHANG Yi-nong

(China Anti-Doping Agency, The State Sport General Administration, Beijing 100029, China)

Abstract: Total of 8 sedative hypnotic drugs illegally mixed into health products were simultaneously detected by LC-MS/MS. Methanol was used as the extraction solution. Mobile phase was included $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium formate (pH 3.5) and acetonitrile. Agilent Zorbax SB C₁₈ (100 mm × 2.1 mm × 3.5 μm) column was used to separate the compounds, and mass data were acquired with the ESI(+) MRM mode. The LODs of sedative hypnotic drugs are no more than $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Recoveries of the eight drugs are 73.3%-99.0%.

Key words: health products; sedative hypnotic drugs; LC-MS/MS

随着现代生活压力的逐渐加大, 失眠已经成为一种常见的现象, 随之而来的镇静催眠药 (sedative-hypnotic drug) 也就越来越被人们熟知。镇静催眠药种类繁多 (迄今已合成 2 000 余种), 历史悠久, 早在 20 世纪人们就使用安眠药。安眠药也叫镇静催眠药, 小剂量使用时, 它具有镇静作用, 当剂量增加到一定量时, 具有催眠作用^[1]。

镇静催眠药的作用较广, 它有较好的抗焦虑

作用, 可以改善紧张、焦虑、恐惧等不良情绪, 因此也被称为抗焦虑药。另外, 安眠药有较强的抗惊厥作用, 临床上把它作为抗癫痫药物之一, 如硝基安定、氯硝安定、安定等。目前, 有不法分子在镇静安神类保健品中非法添加镇静催眠药来提高及改善睡眠功效。但镇静催眠药也不可避免的存在某些副作用, 如出现困倦、嗜睡、乏力、头晕。大剂量使用时可引起共济失调, 暂时性的遗忘和意识障碍; 严重时还可能导致昏迷, 呼吸

抑制。除此之外,安眠药还具有易产生耐受性和依赖性的特点^[1]。因此,长期服用含有镇静催眠类药物的保健品会严重影响人们的身体健康。目前,该类药物的检测方法主要有 HPLC 法^[2]、气相色谱氮磷检测法^[3]和 GC/MS 法^[4],但这些方法均为检测尿样或血样中的镇静催眠药。本工作采用 LC-MS/MS 法检测保健品中非法添加的镇静催眠类药物。该方法快速、准确、可靠,可作为控制保健品中非法添加镇静催眠类药物的常规检测方法。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

Agilent 1200HPLC-6410MS/MS;美国 Agilent 公司产品;配有电喷雾离子源;AB135-S 型十万分之一电子天平;瑞士 Mettler 公司产品;PM200 型电子天平;瑞士 Mettler 公司产品;LD5-10B 低速离心机;北京医用离心机厂产品;超纯水机;美国 Millipore 公司产品;振荡器;德国 GmbH & Co. KG 公司产品;涡旋混合器;美国 Barnstead 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

佐匹克隆、咪达唑仑、氯硝安定、阿普唑仑、唑吡坦、艾司唑仑、地西洋、硝基安定;均由制剂提取获得;甲酸铵(色谱纯);Sigma-Aldrich 公司产品;甲醇、乙腈和甲酸(色谱纯);迪马公司产品。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm × 3.5 μm);流动相为 10 mmol · L⁻¹甲酸铵(pH 3.5)和乙腈;洗脱梯度:0 min 时乙腈 15%,2 min 时乙腈 50%,6 min 时乙腈 75%,12 min 时乙腈 75%;流速 0.3 mL · min⁻¹;进样量 10 μL;柱温 30 °C。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子电离,离子源温度 320 °C,干燥气流速 10 L · min⁻¹,雾化气压力 2.76 × 10⁵ Pa,扫描方式为多反应监测(MRM)。

1.4 对照品溶液的制备

按照各制剂的标示量不同,研磨后分别加入适量甲醇,制备成相当于 1 g · L⁻¹对照品储备液。量取 1 mL 对照品储备液置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释,并定容至刻度,作为对照品工作液。

1.5 样品的前处理

称取约 0.5 g 待测样品于 10 mL 带盖玻璃试管中,加入 5 mL 甲醇,往复振荡 20 min,离心后取 1 mL 上清液于另一干净试管中,65 °C 氮气吹干,再用 1 mL 初始比例流动相溶解,经 0.45 μm 针头滤器过滤后,待进样分析。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

通过比较不同碰撞能量下离子对响应强度的变化,对 8 种镇静催眠药的质谱条件进行优化,结果列于表 1。

表 1 8 种镇静催眠药的质谱条件及特征离子

Table 1 Mass spectrometric parameters and diagnostic ions for 8 sedative hypnotic drugs

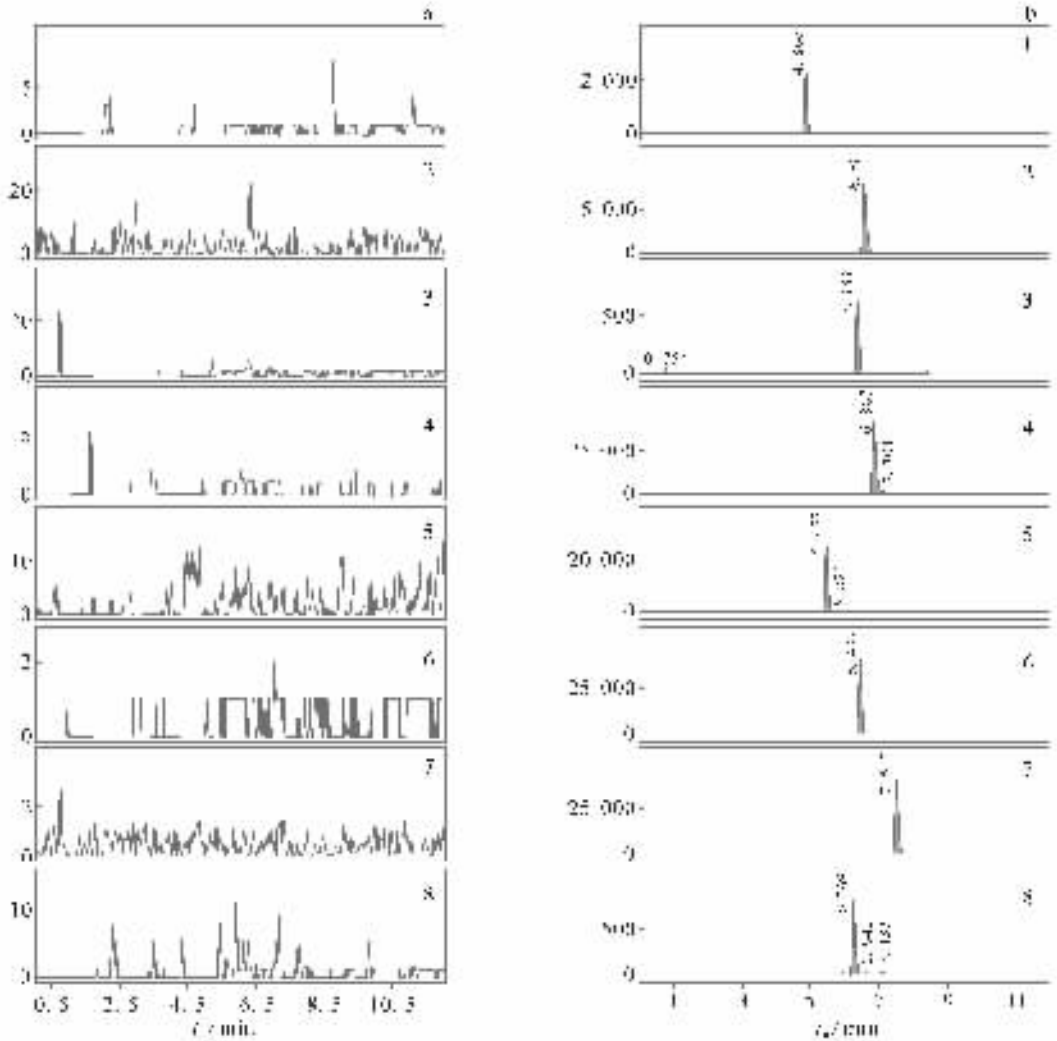
化合物	碎裂电压/V	离子对/(m/z)	碰撞能量/eV
佐匹克隆 Zopiclone	100	389/245 *	10
		389/217	25
咪达唑仑 Midazolam	100	389/345	2
		326/291 *	25
氯硝安定 Clonazepam	100	326/249	35
		326/209	30
阿普唑仑 Alprazolam	100	316/270 *	20
		316/241	35
唑吡坦 Zolpidem	100	316/214	35
		309/281 *	25
艾司唑仑 Estazolam	100	309/205	35
		309/165	25
地西洋 Diazepam	100	308/235 *	30
		308/308	5
硝基安定 Nitrazepam	100	308/263	25
		295/205 *	40
咪达唑仑 Midazolam	100	295/267	25
		295/241	25
地西洋 Diazepam	100	285/193 *	30
		285/222	25
硝基安定 Nitrazepam	100	285/257	20
		282/236 *	20
咪达唑仑 Midazolam	100	282/180	35
		282/207	35

注: * 表示定量离子对

2.2 方法的专属性

分别取约 0.5 g 空白制剂的粉末和添加了检测限浓度的 8 种镇静催眠药的相同制剂粉末,按照 1.5 方法进行操作。所得到的定量离子对

多反应监测色谱图示于图 1。结果表明,在 8 种镇静催眠药的出峰位置,空白样品中无干扰峰出现,该方法具有较好的专属性。



注:1. 佐匹克隆;2. 咪达唑仑;3. 氯硝安定;4. 阿普唑仑;5. 唑吡坦;6. 艾司唑仑;7. 地西洋;8. 硝基安定

图 1 空白样品的多反应监测图(a)和空白样品中添加了检测限浓度对照品的多反应监测图(b)

Fig. 1 MRM chromatographs of blank samples(a)

and blank samples spike with the mixture of sedative hypnotics standards(b)

2.3 方法的检测限和回收率

8 种镇静催眠药的检测限均不高于 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

佐匹克隆,咪达唑仑,氯硝安定,阿普唑仑,唑吡坦,艾司唑仑,地西洋,硝基安定在低($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)3 种浓度下的回收率分别为 80.3%~92.6%, 73.3%~85.6%, 81.8%~87.1%, 84.7%~99.0%, 78.3%~90.3%, 80.6%~

93.2%, 77.2%~91.3%, 87.9%~96.4%。

3 结论

建立了同时检测保健品中非法添加的 8 种镇静催眠药的定性分析方法。该方法简便、准确、可靠,适合保健品中非法添加该类药物的常规检测。

(下转第 281 页)

2 结果与讨论

从 GC/MS 总离子流图中可以看出,混合标准溶液中的 4 种化合物具有良好的分离度,满足色谱分离要求。他达那非的保留时间是 20.4 min,质谱图的特征离子主要是 m/z 389、262、268、204,其中 m/z 389 为准分子离子峰, m/z 268 与文献[1]报道的一致, m/z 262 则为另一侧支链的断裂产生(图 1)。化合物 2、3、4 的保留时间为 20.7、22.3 和 22.6 min,质谱图显示很多相同的离子,如 m/z 56、404、283、312 这与结构相似有很大关系;结构的不同之处在质谱上也有反映,化合物 2 的氮原子上基团为甲基,而化合物 3、4 是乙基,化合物 2 的质谱基峰为 m/z 99,化合物 3、4 的质谱基峰为 m/z 113。化合物 2、3、4 的谱图均含有 $[M^+ - CH_3]$ 离子。EI 离子源在电离过程中碎片多,结构信息丰富,提供了很多可以选择的定性离子,同样适合于此类化合物的检测。4 种化合物的浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,质谱检测结果满足检测限的要求。

综上所述,采用 GC/MS 联用法分析保健品中的 4 种 PDE-5 抑制剂药物,具有样品前处理

简单、准确可靠的特点,适用于检测保健品的常规定性分析。

参考文献:

[1] PENG Z, SHARON S Y, PEILING H, et al. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006, 1104: 113-122.

[2] STARK S, SACHASE R, STARK A, et al. Erectile response on visual sexual stimulation after 20 mg or 40 mg Bay 38-9456 or placebo[J]. Eur Urol, 2000, 37 (S2): 15-18.

[3] 陈巧云,王楠,姚峰,等. 磷酸二酯酶 5 抑制剂治疗勃起功能障碍的疗效与安全性比较[J]. 中华男科学, 2004, 10: 302-304.

[4] 张杰,杨吉伟,张炜. 伐地那非与勃起功能障碍[J]. 世界临床药物, 2004, 25: 94-98.

=====
(上接第 277 页)

参考文献:

[1] 镇静催眠药[EB/OL]. <http://baike.baidu.com/view/987948.htm>.

[2] 熊建华,毛伟芹,李金龙. 常用精神药物的 HPLC 的定性定量分析[J]. 中国临床药学杂志, 2007, 16(2): 118-121.

[3] 姜兆林,谭家镒,姚丽娟,等. 尿和血浆中苯并二

氮杂卓类药物及其代谢产物的气相色谱氮磷检测分析法[J]. 分析科学学报, 2005, 21(6): 639-642.

[4] 吴惠勤,金永春,蔡明招,等. 气相色谱-质谱法同时检测 10 种常见精神类药物[J]. 分析化学, 2007, 35(4): 500-504.