

好溶解性的 DMSO 这种高极性的有机溶剂。

### 3.3 色谱柱的选择

不同的企业生产工艺不同,由此引入的残留溶剂也不尽相同,建立的气相色谱方法应能尽量满足检测所有涉及的有机溶剂。本实验中涉及的 6 中待测溶剂,极性差异较大,既有极性较小的甲苯,也有极性较大的 DMF。因此选用中等极性的色谱柱 DB-624 能够有效分离各待测溶剂,峰形良好。在标准执行时,各企业可根据自身的情况测定相关的残留溶剂。

### REFERENCES

[1] 孟凤华,李国兰,冷树东.枸橼酸坦度螺酮治疗焦虑症状的

临床分析[J].中国民康医学,2010(3):302.

[2] 胡昌勤.药物残留溶剂分析[M].北京:化学工业出版社,2008:8,145.

[3] 中国药典.二部[S].2010 附录 VIII.

[4] ZHENG J Q, CHEN Y X, FU L L, et al. Determination of residual organic solvents in lomefentanyl by headspace capillary gas chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(12): 1500-1502.

[5] MA I, YAO T W. Determination of Residual Solvents in Fasudil Hydrochloride by Headspace GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(12): 1122-1124.

[6] WANG C, JU H. Determination of residual organic solvents in febuxostat bulk drug by headspace gas chromatography [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2014, 29(1): 48-51.

[7] 中华人民共和国国家药典委员会.国家药品标准 YBH34662005[S]. 2005.

收稿日期: 2014-12-16

## 睡眠宝胶囊中非法掺入化学药品的检测方法研究

申兰慧<sup>1</sup>, 彭耀文<sup>1,2</sup>, 杨敏智<sup>1</sup> (1.江苏省无锡药品检验所, 江苏 无锡 214028; 2.江南大学药学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 目的 建立薄层色谱结合超高压液相色谱-质谱联用法快速筛查及鉴定睡眠宝胶囊中非法掺加的氯氮平、地西泮、艾司唑仑。方法 采用硅胶 GF<sub>254</sub> 板, 乙酸乙酯-无水乙醇-氨水(50:2:0.5)为展开剂, 在 254 nm 下检视。色谱条件为: Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相 20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液-甲醇(50:50), 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 225 nm, 柱温 35 °C, 正离子扫描检测。结果 睡眠宝胶囊非法掺入氯氮平、地西泮、艾司唑仑在 254 nm 下明显的斑点, 通过 UPLC-PDA-Q TOF MS 可进一步快速确证。结论 本方法操作简便, 结果可靠, 可用于快速筛查及确证睡眠宝胶囊中非法掺入氯氮平、地西泮及艾司唑仑。

**关键词:** 氯氮平; 地西泮; 艾司唑仑; 睡眠宝胶囊; 超高压液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)06-0724-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.021

### Study on Detection Method of Chemical Drugs Illegally Added in Shuimianbao Capsules

SHEN Lanhui<sup>1</sup>, PENG Yaowen<sup>1,2</sup>, YANG Minzhi<sup>1</sup> (1.Jiangsu Wuxi Institute for Drug Control, Wuxi 214028, China; 2.School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for detection of diazepam, estazolam and clozapine illegally added in Shuimianbao capsules by TLC combined with UPLC-MS. **METHODS** Silica gel(GF<sub>254</sub>) TLC was used, a mixture of ethyl acetate-ethanol-ammonium hydroxide(50:2:0.5) as developer, detection under 254 nm. Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used, and the mobile phase consisted of 20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate solution-methanol(50:50), flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; detection wavelength was 225 nm; column temperature was 35 °C, ESI<sup>+</sup>. **RESULTS** The diazepam, estazolam and clozapine illegally added in Shuimianbao capsules were displayed obvious dots under 254 nm. Then they were verified by UPLC-MS. **CONCLUSION** The method is simple and accurate. It can be used for rapid screening and rapid identification of diazepam, estazolam and clozapine illegally added in Shuimianbao capsules.

**KEY WORDS:** clozapine; diazepam; estazolam; Shuimianbao capsules; UPLC-MS

作者简介: 申兰慧, 硕士, 副主任药师

Tel: 13814236982

E-mail: slh205906@sina.com

睡眠宝胶囊为保健食品，主要原料为五味子，主要功效为安神睡眠。据了解，睡眠宝胶囊安神镇静效果奇佳，但有一定的头脑昏沉的不良反应。笔者对此产品添加物进行了快速筛查，结果发现睡眠宝胶囊掺入了安神类药物地西洋、艾司唑仑及精神类药品氯氮平。本实验建立了用 TLC 结合 UPLC-MS 快速筛查及鉴定睡眠宝胶囊中非法掺入的化学药品地西洋、艾司唑仑、氯氮平的方法，操作简便，结果准确可靠，可为药监部门打假提供技术支持。

## 1 仪器及试剂

Agilent 1290 UPLC-6530A Q-TOF-MS 仪(美国 Agilent 公司); GF<sub>254</sub> 薄层板(5 cm×10 cm, 天津博大有限公司); 双波长紫外观察箱(卡玛公司); 纯水机(美国 Millipore)。

对照品: 氯氮平(批号: 100323-201002, 纯度: 99.8%)、地西洋(批号: 171225-201304, 纯度: 99.9%)、艾司唑仑(批号: 171219-201003, 纯度: 100.0%)、阿普唑仑(批号: 171218-201104, 纯度: 99.1%)均购自中国食品药品检定研究院; 睡眠宝胶囊(河南某生物科技有限公司, 批号: 130305; 规格: 每粒 0.2 g); 甲醇为质谱纯, 醋酸铵、乙酸乙酯、氨水为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 TLC 快速筛查化学镇静安神药

**2.1.1 溶液的制备** 供试品溶液的制备: 取本品 2 粒内容物, 加甲醇-氯仿(1:1)10 mL, 超声(功率 250 W, 频率 33 kHz)15 min, 滤过, 即得。

对照品溶液的制备: 分别取氯氮平、地西洋、艾司唑仑、阿普唑仑对照品适量, 加甲醇-氯仿(1:1)制成 1 mL 含 1 mg 的溶液, 即得。

**2.1.2 方法和结果** 精密吸取氯氮平、地西洋、艾司唑仑、阿普唑仑及供试品溶液各 2  $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上, 以乙酸乙酯-无水乙醇-氨水(50:2:0.5)为展开剂, 展开后, 取出, 晾干, 置紫外灯箱(254 nm)下检视, 供试品溶液在与地西洋、艾司唑仑、氯氮平对照品相应的位置上显相同颜色的斑点, 结果见图 1。

### 2.2 UPLC-MS 快速确证

**2.2.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱: Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8  $\mu$ m)。流动相: 甲醇-20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液(5:5), 检测波长: 225 nm, 流速: 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,

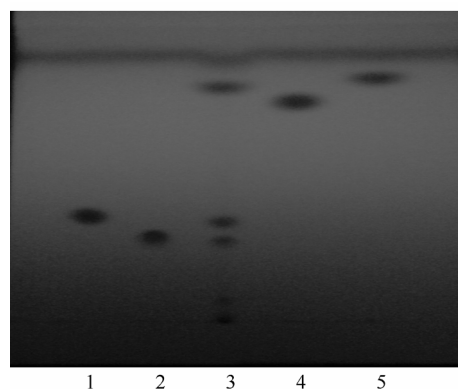


图 1 4 种化学镇静安神药的薄层色谱图

1-地西洋; 2-氯氮平; 3-供试品溶液; 4-阿普唑仑; 5-艾司唑仑。

Fig. 1 TLC chromatogram of four sedative drugs

1-diazepam; 2-clozapine; 3-sample; 4-alprazolam; 5-eszolam.

柱温: 35  $^{\circ}$ C; 进样量: 2  $\mu$ L, 地西洋、氯氮平、艾司唑仑的理论板数分别为 8 000, 10 000, 12 000, 三者的分离度分别为 3.5, 5.2。

质谱条件: 电喷雾电离源(ESI), 毛细管电压 3.5 kV, 脱溶剂温度 350  $^{\circ}$ C, 脱溶剂气体流速 10 L·min<sup>-1</sup>, Fragmentor 电压: 135 V。正离子检测, 扫描方式采用全扫描一级质谱(MS)、全扫描二级质谱(MS/MS), 质量采集范围 50~500。

**2.2.2 溶液的制备** 混合对照品的制备: 精密称取地西洋、艾司唑仑及氯氮平对照品适量, 加甲醇制成含地西洋 2  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 艾司唑仑 2  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 氯氮平 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备: 取供试品 1 次服用剂量(2 粒), 取其内容物置 50 mL 的量瓶中, 加甲醇 30 mL, 超声(功率: 250 W, 频率: 33 kHz)15 min, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22  $\mu$ m 的滤膜, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.3 样品的鉴别** 分别取混合对照品溶液与供试品溶液 2  $\mu$ L 进样, 按“2.2.1”项下色谱条件对混合对照品溶液与供试品溶液进行分析, 结果表明, 供试品溶液同时出现与氯氮平、艾司唑仑、地西洋对照品保留时间一致的色谱峰, 且检测出相应的准分子离子即  $m/z$  327.1, 295.1, 285.1。分别对上述准分子离子进行二级目标全扫描质谱分析, 结果表明一级质谱图和二级质谱图均分别与 3 个对照品一致, 由此进一步证明样品中非法添加了上述 3 种化学成分。各对照品、供试品溶液的 HPLC 色谱图见图 2 和图 3; 各成分的一级质谱图、二级碎片质谱图见图 4 和图 5。

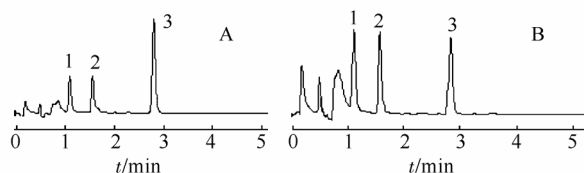


图2 非法添加3个成分的高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 1-氯氮平; 2-艾司唑仑; 3-地西洋。

Fig. 2 HPLC chromatogram of three illegally mixed drugs  
A-mixed control; B-sample; 1-clozapine; 2-estazolam; 3-diazepam.

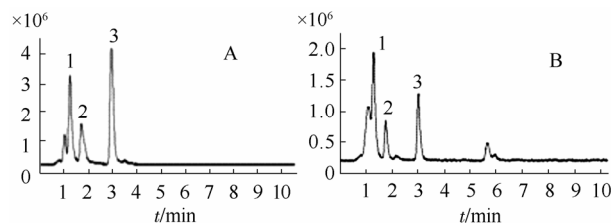


图3 非法添加样品的总离子流图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 1-氯氮平; 2-艾司唑仑; 3-地西洋。

Fig. 3 TIC spectrum of illegally mixed drugs  
A-mixed control; B-sample; 1-clozapine; 2-estazolam; 3-diazepam.

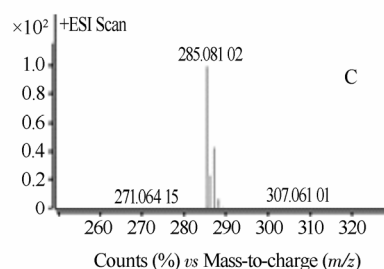
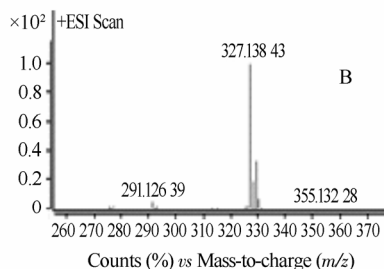
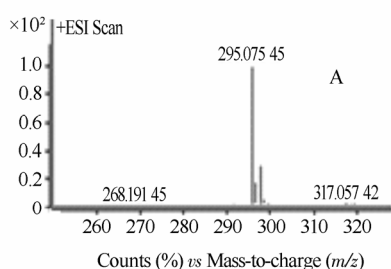


图4 混合对照品的一级质谱图

A-艾司唑仑; B-氯氮平; C-地西洋。

Fig. 4 The full MS spectra of mixed reference substance  
A-estazolam; B-clozapine; C-diazepam.

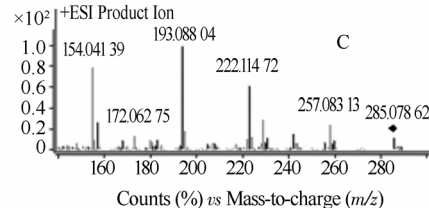
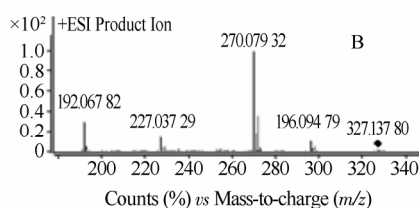
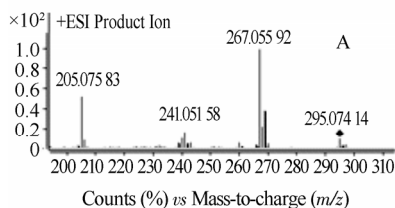


图5 混合对照品二级碎片质谱图

A-艾司唑仑; B-氯氮平; C-地西洋。

Fig. 5 The full MS<sup>2</sup> spectra of mixed reference substance  
A-estazolam; B-clozapine; C-diazepam.

2.2.4 3个成分的质谱碰撞能量及碎片信息 将3个非法添加的化学成分的准分子离子、碎片信息及碰撞能量进行优化筛选, 结果见表1。

表1 3个成分的准分子离子及碎片信息

Tab. 1 Parent ions and daughter ions of three reference substances

| 添加成分 | 分子式                                                | 准分子离子<br>[M+H] <sup>+</sup> | 碎片信息        | 碰撞能量/eV |
|------|----------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|---------|
| 艾司唑仑 | C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>   | 295.08                      | 267,241,205 | 20      |
| 氯氮平  | C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>4</sub>   | 327.14                      | 270,227,192 | 30      |
| 地西洋  | C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O | 285.08                      | 154,193,222 | 25      |

2.2.5 最低检出限 取各组分对照品溶液, 以不同比例稀释后进行测定, 结果地西洋最低检出限为0.5 ng; 氯氮平最低检出限为0.4 ng; 艾司唑仑最低检出限为0.2 ng(S/N=3)。

### 3 讨论

在薄层色谱中, 采用快检专用 GF<sub>254</sub> 薄层板进行化学成分初筛, 考察了展开剂乙酸乙酯-无水乙醇-氨水(50:2:0.5)和甲醇-浓氨(20:0.5)。在这2种条件下, 均能在10 min内完成快速初筛, 方法简便, 快速, 斑点清晰, 各组分分离良好<sup>[1]</sup>。

中药制剂成分复杂, 单纯依靠液相保留时间的方法, 仅可粗略估计样品中可能掺入的化学成分, 结合质谱信息可对部分共出峰及保留时间与对照品相同的成分进行更深入的分析, 可有效避免假阳性结果的出现, 通过质荷比的筛选, 可得到复杂组分中单一成分的色谱图, 不需要实现待测成分与干扰成分地完全分离, 以化合物结构特点为基础, 提取化合物的 TIC 图, 获得相应的色谱质谱图, 根据一级及二级质谱信息, 同时与对

照品在相同试验条件下的质谱行为进行比较, 可确保研究结果的准确、可靠<sup>[2]</sup>。目前笔者已建立降糖类、壮阳类(抗疲劳)、消肿镇痛类、减肥类、降压类、降血脂类、哮喘镇咳类、安神镇静类等 8 大类非法添加化学成分的色谱质谱数据库<sup>[3]</sup>, 有助于提高稽查打假的效率。

UPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 结合了超高效液相色谱与 ESI-Q-TOF-MS 的优势, 在 3 min 内能对 3 种化学药物进行快速鉴定, 在实际应用中特别是药监与公安联防联控需要及时报告检测结果的检测时, 效果很及时。ESI-Q-TOF-MS 作为一种高分辨质谱, 与低分辨质谱相比, 对化合物的定性鉴别具有天然的优势, 保留时间、紫外光谱、一级质谱及二级质谱一致, 从多方面保证了定性的准确性<sup>[4-12]</sup>。

## REFERENCES

- [1] SHEN L H, DING L, YANG M Z. Detection of clozapine illegally added in Naolingsu capsules by HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2009, 12(10): 1410-1412.
- [2] LING X, XU Z M, TAN H J, et al. LC-MS/MS detection of theophylline and glucocorticosteroid in traditional Chinese medicine preparations [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(12): 1920-1923.
- [3] GAO Q, ZHANG Z, CHEN B Q, et al. Identification of antihypertensive by HPLC-MS/MS and its database development [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2007, 42(21): 351-357.
- [4] TAN H P, ZOU Y, TAN F Y, et al. Rapid screening and identification of unknown abused drugs in dietary supplements [J]. China Meas Test Technol(中国测试), 2011, 37(3): 40-43.
- [5] 高秀荣, 刘莉. UPLC-TOF/MS 法检测减肥中药制剂中的盐酸氯胺酮[J]. 华西药理学杂志, 2012, 27(4): 467-468.
- [6] CHENG X L, LI W J, ZHANG X L, et al. Identification of bovine-hide gelatin from glue of tortoise shell and deer-horn gelatin by UPLC-QTOF-MS and principal component analysis [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(6): 931-935.
- [7] GUO J, XU Q S, SHI H L, et al. Determination of 90 kinds of pesticide in unknown samples by QTOF-LC/MS and MS/MS database [J]. Forensic Sci Technol(刑事技术), 2013(4): 41-45.
- [8] GAO Z. High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for a rapid and highly sensitive screening method for 44 drugs [D]. Beijing Sports University Master's Thesis, 2012.
- [9] GUO J, SHI H L, SHANG J L. Establishment of database and rapid detection of 187 kinds of drug by Q-TOF LC/MS [J]. Forensic Sci Technol(刑事技术), 2014, (2): 30-37.
- [10] SUN J, YU H, HU Q, et al. Identification of a new sildenafil analogue based on Q-TOF-MS [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2014, 49(4): 513-516.
- [11] 杨峥嵘. 保健食品中非法添加化学药品检测方法研究进展 [J]. 医药导报, 2013, 32(9): 1190-1194.
- [12] PAN J. Study on LC-MS method for detection of 16 kinds of adrenal cortical hormone illegally added in Chinese medicinal lotions [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(11): 1391-1394.

收稿日期: 2014-10-08

## HPLC 波长转换法同时测定小儿咳喘灵颗粒中(R,S)-告依春、绿原酸和甘草苷的含量

郑娟, 茅纯(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310015)

**摘要:** 目的 建立高效液相色谱波长转换法同时测定小儿咳喘灵颗粒中(R,S)-告依春、绿原酸和甘草苷含量的方法。方法 样品采用 70%甲醇溶液超声提取, 采用 Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离; 流动相: 0.1%磷酸-乙腈, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 0~13 min 为 245 nm, 13~50 min 为 217 nm。结果 (R,S)-告依春、绿原酸和甘草苷分别在 0.700~14.000 μg·mL<sup>-1</sup>、4.780~95.600 μg·mL<sup>-1</sup>、1.050~21.008 μg·mL<sup>-1</sup> 内具有良好的线性关系; 加样回收率分别为 98.8%, 102.8%和 97.7%; RSD 分别为 1.2%, 1.9%和 1.4%(n=9)。结论 该方法简单易行, 准确性和重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

**关键词:** 高效液相色谱; 小儿咳喘灵颗粒; (R,S)-告依春; 绿原酸; 甘草苷

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)06-0727-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.022

作者简介: 郑娟, 女, 主管中药师

Tel: (0571)85463891

E-mail: zhengjuan0@hz.cn