

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.05.04

QuEChERS – 超高效液相色谱 – 质谱联用法测定 熊胆粉中 9 种苯二氮革类药物残留量

王小乔¹, 许晓辉^{1*}, 张虹艳¹, 冯 翀^{1,2}, 吴福祥¹, 潘秀丽¹, 李 赞¹

(1. 兰州市食品药品检验检测研究院, 兰州 730050; 2. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

[收稿日期] 2022-01-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 05-0027-08 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 建立了超高效液相色谱 – 质谱联用法 (UPLC – MS/MS) 快速测定中药材熊胆粉中 9 种苯二氮革类药物残留的方法。样品以乙腈为提取溶剂, 经萃取盐包除杂提取, 采用分散式固相萃取管 (EMR – Lipid dSPE) 净化, ACQUITY BEH C18 色谱柱 (1.7 μm , 2.1 $\times$ 100 mm) 分离, 多反应监测模式 (MRM) 采集数据, 外标法定量。在优化的条件下, 虽 9 种药物存在不同程度的基质效应, 但不影响检测结果的准确性。方法学考察结果显示, 9 种苯二氮革类药物在对应的浓度范围内线性关系良好, 决定系数 (R^2) ≥ 0.9961 , 方法检出限 (LOD, $S/N = 3$) 在 0.06 ~ 0.71 $\mu\text{g/kg}$ 范围内, 定量限 (LOQ, $S/N = 10$) 在 0.20 ~ 2.60 $\mu\text{g/kg}$ 范围内, 3 个加标水平的平均回收率在 69.1% ~ 108.0% 范围内, 日内 RSD 为 1.8% ~ 9.0%, 日间 RSD 为 2.6% ~ 9.3%。该方法前处理操作简便、重现性好, 准确度高, 为熊胆粉中苯二氮革类药物残留的风险监控提供了一种有效的检测技术。

[关键词] 超高效液相色谱 – 质谱联用法; 熊胆粉; 苯二氮革类药物; 残留量

Simultaneous Determination of Nine of Benzodiazepine Residues in Bear Bile Powder by QuEChERS – UPLC – MS/MS

WANG Xiao – qiao¹, XU Xiao – hui^{1*}, ZHANG Hong – yan¹, FENG Chong^{1,2},

WU Fu – xiang¹, PAN Xiu – li¹, LI Yun¹

(1. Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China;

2. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: XU Xiao – hui, E – mail: aiwosuo2uo@163.com

Abstract: An method of ultra – performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC – MS/MS) was developed for the rapid determination of nine benzodiazepines in Chinese traditional medicine of bear bile powder. The samples were extracted by acetonitrile, impurities was removed

基金项目: 甘肃省药品监督管理局科学技术类项目 (2020GSMPA032)

作者简介: 王小乔, 本科, 高级工程师, 从事兽药残留的检测与研究。

通讯作者: 许晓辉。E – mail: aiwosuo2uo@163.com

under the role of salt package, cleaned up by enhanced matrix removal lipid – dispersed solid phase extraction (EMR – Lipid dSPE). The separation was performed on an ACQUITY BEH C18 column ($1.7\ \mu\text{m}$, $2.1 \times 100\ \text{mm}$), the data were collected in multiple reaction monitoring mode (MRM), and quantified by external standard method. Under the optimized conditions, the accuracy of the detection results was not affected by the matrix effect of 9 drugs. Methodological investigation results show that there are good linear relationships for the 9 analytes in the corresponding concentration ranges with their coefficient of determination (R^2) not less than 0.9961, the limits of detection (LOD, $S/N = 3$) of the method were in the range of $0.06 \sim 0.71\ \mu\text{g/kg}$, the limits of quantification (LOQ, $S/N = 10$) were in the range of $0.20 \sim 2.60\ \mu\text{g/kg}$, the average recoveries of the three spiked levels were in the range of $69.1\% \sim 108.0\%$, the relative standard deviations (RSD) of intra – day and inter – day were in the range of $1.8\% \sim 9.0\%$ and $2.6\% \sim 9.3\%$, respectively. The method was simple, reproducible and sensitive, and providing an effective detection technology for the monitoring and risk control of nine of benzodiazepine residues in bear bile powder.

Key words: ultra – performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC – MS/MS); bear bile powder; benzodiazepine drug; residues

熊胆汁干燥品为熊胆粉,熊胆粉是一种传统名贵的动物源性中药材,具有清热解毒、平肝明目等功效^[1],其主要化学成分是熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、胆酸及去氧胆酸等,其他成分还包括少量脂肪和蛋白质等^[2]。而苯二氮草类药物是一类镇静安眠药^[3-4],用以改善焦虑、睡眠障碍等症状,在黑熊养殖过程中,不良养殖户为了让黑熊少活动、多睡觉,以达到胆囊多产胆汁的目的,同时防止引流胆汁时熊注意力集中而咬伤到采集人员,因此,在饲料中违规违法添加使用苯二氮草类药物,造成药物在熊胆汁中大量累积,其不良后果是患者在服用中药熊胆粉或其制剂后,通过食物链传递,药物转移至人体内,给人体健康带来潜在的风险,这种风险包括依赖或滥用潜力、过度镇静、认知损害及跌倒、产生包括焦虑、不安、震颤、泌汗、失眠及惊厥等停药症状^[5]。因此,保障熊胆粉质量安全,很有必要去监测中药材熊胆粉中苯二氮草类药物残留。目前,针对苯二氮草类药物检测,国家监管部门已颁布了相关标准,该类标准主要适用于保健食品和动物源性食品,如 SN/T 3847 – 2019《出口食品中苯二氮草类药物残留量的测定 液相色谱 – 质谱/质谱法》^[6]。而动物源性中药材中苯二氮草类药物残

留检测的相关研究报道较少^[7],目前,没有熊胆粉中苯二氮草类药物残留监测方面的应用报道。

QuEChERS (quick、easy、cheap、effective、rugged and safe) 是一种在动物源性产品兽药残留检测应用中展现极大前景的前处理技术,其优势是前处理步骤简单、快速,能够提高效率并降低成本^[8-15]。传统的 QuEChERS 方法多采用吸附剂 PSA 或 C18 等,以乙腈为提取溶液,其净化能力有限,只能处理基质较为简单的样品,对一些特殊的动物源性样品净化不理想,而革新的 QuEChERS 方法多采用混合吸附剂,在加入提取溶剂之前在样品中加入缓冲液来调节 pH 以提高回收率,其优势是净化效果进一步提高。本文采用在样品中先加入缓冲液,然后以乙腈为提取溶剂,以萃取盐包法沉淀蛋白及水溶性杂质,其次采用分散式固相萃取管 (EMR – Lipid dSPE) 细净化提取液,建立一种超高效液相色谱 – 质谱联用法 (UPLC – MS/MS) 同时测定中药材熊胆粉中 9 种苯二氮草类药物残留的方法,旨在为熊胆粉中苯二氮草类药物的监测和风险监控提供一种有效的检测技术。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1290 UPLC/6460C 超高效液相色谱 – 串联三重四极杆质谱联用仪,配有电喷雾离

子源(美国安捷伦科技有限公司);Vortex - genie2 涡旋混合器(美国 Scientific);H1850 离心机(湖南湘仪);MS105DU 分析天平(梅特勒 - 托利多);Milli - Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);SBL - 10DT 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为 300 W);GENO2010 组织研磨仪(美国 SPEX)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈、乙酸乙酯(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸、乙酸铵(色谱纯,东京化成工业株式会社);EMR - Lipid dSPE 净化管(美国安捷伦科技有限公司);硫酸钠、氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。对照品:马来酸咪达唑仑(批号:171250 - 201002;纯度:99.9%)、艾司唑仑(批号:171219 - 201003;纯度:99.7%)、奥沙西泮(批号:171229 - 201505;纯度:99.8%)、硝西泮(批号:171217 - 201403;纯度:99.9%)、劳拉西泮(批号:171253 - 201102;纯度:99.2%)、阿普唑仑(批号:171218 - 201305;纯度:99.5%)、氯硝西泮(批号:171227 - 201404;纯度:99.9%)、三唑仑(批号:171230 - 201203;纯度:99.6%)、地西泮(批号:171225 - 200903;纯度:99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;熊胆粉样品购自中药材市场。

1.3 溶液制备

1.3.1 EDTA - McIlvaine 缓冲液 称取柠檬酸 8.4 g,Na₂EDTA 19.5 g,磷酸氢二钠 7.1 g,溶于 650 mL 水中,超声溶解。

1.3.2 对照品溶液的配制 分别精密称取 9 种苯二氮䓬类对照品约 10 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,混匀,配制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品储备液,置 4 ℃ 冷藏备用;使用时,分别精密移取上述各对照品储备溶液适量,用乙腈稀释配制相应浓度的混合对照品中间溶液、混合对照品使用溶液以及标准曲线溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 提取:取熊胆粉样品适量,研细,混匀;精密称取熊胆粉约 1 g 置于 50 mL 离心管中,加入 3 mL EDTA - McIlvaine 缓冲液,加入 1 粒陶瓷均质子,振荡摇匀,再加入乙腈 10.00 mL,在组织研磨仪上振荡涡旋 5 min,在

300 W 功率下超声提取 5 min,加入含 4 g 硫酸钠和 1 g 氯化钠的萃取盐包,再涡旋 2 min,在 4 ℃ 下以 4000 r/min 速率离心 15 min,取上清液待净化。

净化:精密移取上述上清液 2.00 mL 于 EMR - Lipid dSPE 净化管中,涡旋 1 min,在 4 ℃ 下以 4000 r/min 离心 15 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱 - 质谱联用仪测定。

1.4 色谱 - 质谱条件

1.4.1 色谱条件 ACQUITY BEH C18 色谱柱(1.7 μm,2.1 × 100 mm);流动相:以含 0.1 % 甲酸 - 2 mmol/L 乙酸铵的水溶液为流动相 A,以含 0.1 % 甲酸的乙腈溶液为流动相 B,梯度洗脱程序:0 ~ 3.0 min,10% ~ 30% B;3.0 ~ 5.0 min,30% ~ 90% B;5.0 ~ 7.0 min,90% B;7.0 ~ 8.0 min,90% ~ 10% B;8.0 ~ 9.0 min,10% B。柱温:35 ℃;进样量:2 μL;流速:0.3 mL/min;分析时间:9 min。

1.4.2 质谱条件 电离源:喷射流电喷雾离子源(AJS ESI);离子源模式:正离子模式;采集方式:多反应监测模式(MRM);干燥气:N₂;干燥气流量:8 L/min;干燥气温度:325 ℃;雾化气压力:45 psi;毛细管电压:4000 V;鞘流气流量:12 L/min;鞘流气温度:350 ℃,相关质谱采集参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

2.1.1 提取溶剂的选择 本实验分别选择甲醇、乙腈、乙酸乙酯为提取溶剂,以相同水平浓度的 9 种目标分析物加标对应回收率为依据,按照 1.3.3 和 1.4 项下条件进行前处理和上机分析,考察提取溶剂的提取效果。结果表明,以甲醇为提取溶剂时,回收率处于 15% ~ 56% 之间,且大多数目标分析物的回收率小于 40%;以乙酸乙酯为提取溶剂时,回收率处于 51% ~ 180% 之间,且除硝西泮之外,其余目标分析物回收率普遍偏高;以乙腈为提取溶剂时,目标分析物的回收率整体较好,这可能是乙腈对目标分析物具有较好的溶解性,同时能很好地沉淀蛋白质,去除杂质比较充分,整体上降低了基质的干扰(图 1)。因此,最终选择乙腈为提取溶剂。

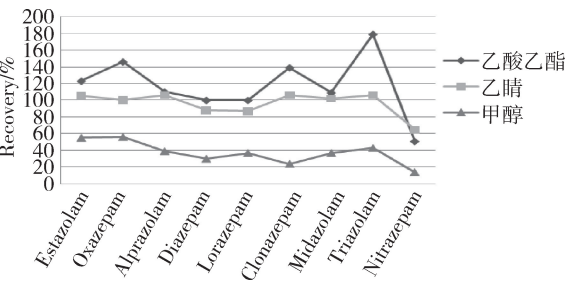


图 1 不同提取溶剂对 9 种苯二氮草类药物提取效率的影响

Fig 1 Influence of different extraction solvents on the extraction efficiency of nine benzodiazepine drugs

2.1.2 净化方法的选择 由于熊胆粉样品基质中含有较多熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、胆酸、去氧胆酸及少量脂肪和蛋白质,这些类别的杂质会在提取过程中进入提取液,在分析目标化合物时会产生基质效应,对检测结果造成干扰,这些杂质大部分是脂溶性的,因此需要采用高脂类净化方式来除杂,而增强型脂质去除分散固相萃取净化管(EMR-Lipid dSPE)是专门为多脂样品中脂质性杂质的选择性净化而设计,因此,本实验选择 EMR-Lipid dSPE 方式进行净化。

2.2 色谱质谱条件优化

2.2.1 色谱条件优化 苯二氮草类药物为中等极

性化合物,因此,本实验选择了适用于大部分化合物通用的 ACQUITY BEH C18 分离色谱柱。为了寻找最佳分离条件,在正离子电喷雾模式下设计了 4 种流动相组分洗脱方案,分别为甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.1% 甲酸水溶液,0.1% 甲酸乙腈-含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸铵的水溶液。结果发现,以前三种流动相组分洗脱时,9 种药物都出现不同程度的响应值弱、分离度差的现象;而以 0.1% 甲酸乙腈-含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸铵为流动相,9 种苯二氮草类药物的离子化效果、分离度及灵敏度都有所提高,尤其是药物峰型的拖尾及尖锐程度有所改善。因此,最终选择 0.1% 甲酸乙腈-含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸铵,作为流动相。

2.2.2 质谱条件优化 本实验中选择电喷雾正离子扫描模式,对影响离子化效率的干燥气温度、鞘气温度、鞘气流量、雾化气压力、毛细管电压、碰撞能量等条件进行了优化,选择丰度较高且基质干扰小的 2 个特征离子分别作为定性离子和定量离子,运用 MRM 模式对目标分析物进行定性和定量,最终获得的质谱参数保证每个峰有足够的采集点数,确保被检测物的灵敏度和选择性达到要求,最终获得的 9 种苯二氮草类药物检测离子对相关参数见表 1。

表 1 9 种苯二氮草类药物检测离子对相关参数

Tab 1 Ion pairs and related parameters for nine benzodiazepine drugs				
化合物 Compounds	母离子/(<i>m/z</i>) Parent ion/(<i>m/z</i>)	子离子/(<i>m/z</i>) Daughter ion/(<i>m/z</i>)	碎裂电压/V Fragment/V	碰撞能量/eV Collision energy/eV
咪达唑仑(Midazolam)	326.1	291.0 [*] /243.9	135	24/28
艾司唑仑(Estazolam)	295.1	267.0 [*] /192.0	135	24/20
奥沙西洋(Oxazepam)	287.0	241.0 [*] /162.9	135	20/30
硝西洋(Nitrazepam)	282.1	254.0/236.0 [*]	135	20/24
劳拉西洋(Lorazepam)	321.1	302.9/275.0 [*]	135	12/20
阿普唑仑(Alprazolam)	309.1	281.0 [*] /274.1	135	24/24
氯硝西洋(Clonazepam)	316.0	240.9/213.8 [*]	135	30/40
三唑仑(Triazolam)	343.1	308.0/314.9 [*]	135	44/28
地西洋(Diazepam)	285.1	257.1 [*] /222.1	135	20/28

“*”为定量离子

2.3 基质效应 本实验通过取空白样品,按照前处理方法制备成空白样品基质溶液,再分别用空白

样品基质溶液与纯溶剂配制成相同浓度的对照品溶液,以两者同一物质质谱响应值比值的百分数来

评价基质效应 (Matrix Effect, ME), 若 ME 大于 100%, 则存在基质增强效应; 若 ME 小于 100%, 则存在基质抑制效应; 若 ME 接近 100%, 则不存在基质效应, 本实验设计了两个浓度级别 10 ng/mL 和 30 ng/mL, 结果发现, 9 种化合物在 10 ng/mL 的条件下, 除劳拉西泮存在基质效应增强效应外, 其余分析物存在一定程度的基质抑制效应, 其中基质抑制效应最强的是咪达唑仑和硝西泮; 在 30 ng/mL 的浓度下, 艾司唑仑、奥沙西泮、阿普唑仑存在一定程度的基质增强效应, 其余待测物存在不同程度的基质抑制效应。虽然各待测物存在不同程度的基质效应, 但不影响检测结果 (图 2)。

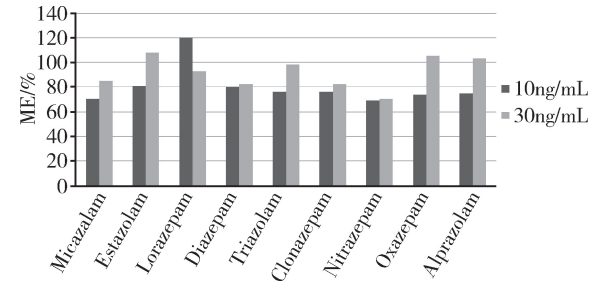


图 2 9 种苯二氮草类药物的基质效应

Fig 2 Matrix effect of nine benzodiazepine drugs

2.4 线性关系、检出限与定量限 取混合对照品使用溶液配制成一系列标准曲线溶液, 在 1.4 项条

件下进行上机分析, 以 9 种苯二氮草类药物的定量离子峰面积为纵坐标 (y), 相应的浓度为横坐标 (x) 进行线性回归, 外标法定量。结果显示, 在 0 ~ 40 ng/mL 的浓度范围内, 各目标分析物呈现良好的线性关系, 决定系数 (R^2) 均大于等于 0.9961。取混合对照品使用溶液适量加至空白样品基质中, 按照 1.3.3 项和 1.4 项下进行前处理和上机测定, 以 3 倍信噪比确定各目标分析物的检出限 (Detection of Limit, LOD), 以 10 倍信噪比确定各目标分析物的定量限 (Limit of Quantitation, LOQ), 结果表明, 9 种苯二氮草类药物检出限在 0.06 ~ 0.71 $\mu\text{g/kg}$ 范围内, 定量限在 0.20 ~ 2.60 $\mu\text{g/kg}$ 范围内 (表 2)。

2.5 回收率及相对标准偏差考察 取空白样品, 分别按 10、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 添加 3 个水平的混合对照品溶液, 考察方法的回收率和日间、日内相对标准偏差 (RSD)。每个添加水平制备平行样 6 份, 在 1.3.3 项和 1.4 项条件下进行前处理和上机分析, 计算相应的回收率与相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD), 结果显示, 在 3 个加标水平下, 9 种目标分析物的加标平均回收率为 69.1% ~ 108.0%, 日内 RSD 为 1.8% ~ 9.0%, 日间 RSD 为 2.6% ~ 9.3% (表 3)。

表 2 9 种苯二氮草类药物的线性关系、检出限和定量限					
Tab 2 Linear relationship, LOD and LOQ of nine benzodiazepine drugs					
化合物 Compounds	线性关系 Linear relationship	决定系数 R^2 Coefficient R^2	线性范围 Linear range / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检出限 LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限 LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Midazolam	$y = 667.6834x + 490.2377$	0.9976	0 ~ 40	0.10	0.36
Estazolam	$y = 679.6279x + 489.6544$	0.9990	0 ~ 40	0.06	0.20
Oxazepam	$y = 352.5314x + 218.7870$	0.9985	0 ~ 40	0.71	2.00
Nitrazepam	$y = 1258.0511x + 1025.2618$	0.9973	0 ~ 40	0.21	0.73
Lorazepam	$y = 153.8832x + 141.2426$	0.9961	0 ~ 40	0.68	2.30
Alprazolam	$y = 703.1048x + 497.6586$	0.9981	0 ~ 40	0.28	1.10
Clonazepam	$y = 89.6834x + 48.8376$	0.9979	0 ~ 40	0.70	2.60
Triazolam	$y = 243.6024x + 253.9757$	0.9985	0 ~ 40	0.45	1.30
Diazepam	$y = 495.9669x + 494.3126$	0.9980	0 ~ 40	0.26	0.86

表 3 9 种苯二氮草类药物的平均回收率与相对标准偏差 (n = 6)

Tab 3 Average recovery and RSD of nine benzodiazepine drugs (n = 6)												
化合物 Compounds	Spiked 10 μg/kg				Spiked 50 μg/kg				Spiked 100 μg/kg			
	Intra – day		Inter – day		Intra – day		Inter – day		Intra – day		Inter – day	
	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%
Midazolam	70.2	5.6	73.2	6.1	84.6	1.8	82.1	2.6	78.5	6.3	76.5	6.8
Estazolam	78.5	7.2	75.3	6.8	108.0	6.3	103.2	7.1	93.5	4.2	95.1	5.0
Oxazepam	73.6	6.8	70.3	5.3	106.0	4.5	101.2	6.1	98.1	8.3	95.4	8.0
Nitrazepam	69.1	8.5	70.5	8.1	70.1	5.6	71.3	6.0	76.2	8.1	75.2	8.5
Lorazepam	86.1	7.2	85.0	7.0	81.2	5.9	79.8	6.3	80.0	3.2	78.3	3.8
Alprazolam	74.8	3.6	75.1	3.2	103.0	6.2	101.3	5.8	98.2	9.0	97.5	8.7
Clonazepam	76.0	5.9	78.5	6.1	82.1	4.5	80.9	5.3	80.3	5.1	79.1	5.8
Triazolam	76.3	7.8	78.2	7.6	96.2	7.8	93.4	8.1	104.1	7.9	102.3	7.7
Diazepam	79.8	7.3	81.3	7.8	82.5	4.6	80.2	5.2	87.1	8.8	86.1	9.3

2.6 实际样品测定 采用本方法对市售的 10 批次中药材熊胆粉进行测定,结果显示,在 10 批次样品中均未检出上述 9 种苯二氮草类药物,这说明熊胆粉中苯二氮草类安眠药的质量安全风险因子属于低级别。

3 讨论与结论

目前,临床上使用的熊胆粉几乎全部来源于人工饲养的熊,不良养殖户在饲养环节使用苯二氮草类药物,造成熊胆粉存在外源性风险因子,这种外源性药物一旦被长期食用,便会产生依赖性,停药后有戒断症状,因此监测熊胆粉中该类物质残留有重要意义。当前,已有测定动物源性食品^[16]、生物样本(全血、尿液、唾液)^[17]、保健食品等样品苯二氮草类药物的相关文献报道,已报道文献所采用的方法都是液质联用法,扫描模式有多反应监测(MRM) – 条件触发 – 增强子离子扫描;所采用的定性定量方法主要有外标法和同位素内标法;采用的提取溶剂多为乙腈或者酸化乙腈。采用的净化方式,猪肉一般用乙腈提取目标物后用固相萃取柱净化;生物样品由于其成分复杂,杂质多,QuEChERS法是常见净化方法,提取步骤加入纯化水,在盐包存在的条件下,以乙腈作为提取溶剂,在低温高速离心条件下,有机层与水相层分层,提取目标物进

入有机层、蛋白质磷脂等杂质进入水相层;在净化步骤,多采用 C18、PSA 等吸附剂进一步净化,得到满足液质分析的供试品溶液。最新的苯二氮草类药物检测国家标准是 SN/T 3847 – 2019《出口食品中苯二氮草类药物残留量的测定 液相色谱 – 质谱/质谱法》^[6],同时适用于保健食品和动物源性食品中苯二氮草类药物的检测,相比以前作废的标准 SN/T 2220 – 2008 和 SN/T 3847 – 2014,2019 年新发布标准 SN/T 3847 – 2019 增加了鱼肉、鸡肉、鸡蛋、牛奶、蜂蜜、肠衣等基质。在 SN/T 3847 – 2019 标准中,保健食品试样中的苯二氮草类药物用二氯甲烷 – 乙醚混合溶液提取,提取液经浓缩后,内标法定量,供液质联用仪测定;动物源性试样中的苯二氮草类药物采用 β – 盐酸葡萄糖醛苷酶水解,在碱性条件下用乙酸乙酯 – 异丙醇混合溶液提取,阳离子交换柱净化后,内标法定量,供液质联用仪测定。

虽然,动物源性中药材与动物源性食品有相似的来源,但是动物源性中药材受后期成药炮制加工,与动物源性食品基质有本质上的区别。目前,未见动物源性中药材中的苯二氮草类药物测定的研究报道,因此,本研究瞄准中药材熊胆粉中苯二氮草类药物测定,以期中药材熊胆粉药物残留的

识别与监测提供一种技术支持,保障其质量安全。相比文献报道和现行国家标准的前处理方法,本研究采用 QuEChERS 前处理方法,前处理步骤简单、易于操作,没有繁琐的活化、洗脱固相萃取柱、浓缩旋蒸、水解等步骤,提取净化前采用缓冲液调节 pH,提取步骤采用萃取盐包提取,净化步骤采用增强型脂质去除分散式固相萃取管直接除杂,能够缩短常规净化方式的时间,提高实验的时效性,及时发现有问题样品,使监管前移,同时该方法去除杂质效果良好,灵敏度和准确度能够满足检测要求。

参考文献:

- [1] 闫广利, 孙 晖, 邱丽萍, 等. 熊胆粉产业化关键技术研究[J]. 中医药学报, 2020, 48(1): 1-6.
Yan G L, Sun H, Qiu L P, *et al.* Key technologies of bear bile powder industrialization[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2020, 48(1): 1-6.
- [2] 王 杰, 熊爱珍, 程绒绒, 等. 不同来源引流熊胆粉的化学成分系统分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2326-2332.
Wang J, Xiong A Z, Cheng R R, *et al.* Systematical analysis of multiple components in drainage bear bile powder from different sources[J]. China J Chin Mate Medica, 2018, 43(11): 2326-2332.
- [3] 胡骏杰, 刘 飞, 马文俊, 等. 高效液相色谱-三重四极杆复合线性离子阱质谱法检测血液中 8 种苯二氮卓类药物[J]. 分析测试学报, 2021, 40(4): 577-582.
Hu J J, Liu F, Ma W J, *et al.* Determination of eight benzodiazepines in blood by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2021, 40(4): 577-582.
- [4] 黄伟华, 夏 祥, 胡美华. QuEChERS-在线 GPC-GC/MS 联用法测定尿液中 11 种苯二氮卓类药物[J]. 分析试验室, 2019, 38(1): 43-46.
Huang W H, Xia X, Hu M H. Determination of 11 benzodiazepine drugs in urine with QuEChERS-on line gel permeation chromatography-gas chromatography/mass spectrometry[J]. Chin J Anal Lab, 2019, 38(1): 43-46.
- [5] 王志民. 长期大量使用苯二氮卓类药物引起的不良反应分析[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2021, 27(3): 341-344.
Wang Z M. Analysis of adverse reactions caused by long-term extensive use of benzodiazepines[J]. Chin J Drug Abuse Prevent Treat, 2021, 27(3): 341-344.
- [6] SN/T 3847-2019 出口食品中苯二氮卓类药物残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法[S].
SN/T 3847-2019. Determination of benzodiazepines residues in foodstuffs for export-LC-MS/MS method[S].
- [7] 孙 健, 胡 青, 诸艳蓉, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法定性筛查中药熊胆粉中 169 种兽药残留[J]. 药理学学报, 2020, 55(1): 113-122.
Sun J, Hu Q, Zhe Y R, *et al.* Qualitative screening of 169 veterinary drug residues in bear bile powder by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(1): 113-122.
- [8] 方从容, 高 洁, 王雨昕, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 125 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119-1131.
Fang C R, Gao J, Wang Y X, *et al.* Determination of 125 veterinary drugs residues in eggs by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chrom, 2018, 36(11): 1119-1131.
- [9] 张崇威, 吴志明, 李华岑, 等. Captiva EMR-脂质固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法快速筛查动物源食品中 51 种药物残留[J]. 分析测试学报, 2020, 39(2): 174-181.
Zhang C W, Wu Z M, Li H C, *et al.* Rapid screening of 51 drug residues in animal products by captiva EMR-lipid solid phase extraction/ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2020, 39(2): 174-181.
- [10] 刘家阳, 黄 旭, 贾宏新. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定畜肉中 16 种镇静剂类兽药残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(3): 305-311.
Liu J Y, Huang X, Jia H X. Simultaneous determination of 16 sedative residues in livestock products by solid phase extraction/ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2017, 36(3): 305-311.
- [11] 杨 明, 伊 璠, 陈 丹, 等. 氧化锌 QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 7 种林可酰胺类与大环内酯类兽药残留[J]. 分析测试学报, 2020, 39(8): 974-979.
Yang M, Yi Y, Chen D, *et al.* Determination of seven lincosamides and macrolides residues in honeys by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ZnO QuEChERS[J]. J Instrum Anal, 2020, 39(8): 974-979.
- [12] 邹 游, 邵琳智, 陈思敏, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 3 种镇静剂残留[J]. 色谱, 2017, 35(8): 801-807.
Zou Y, Shao L Z, Chen S M, *et al.* Determination of three tran-

- quillizer residues in animal foods by QuEChERS – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chrom, 2017, 35(8): 801 – 807.
- [13] 刘权辉, 王彤彤, 王敏, 等. QuEChERS 在动物源食品药物残留前处理方法的进展 [J]. 化学试剂, 2020, 42(12): 1424 – 1429.
- Liu Q H, Wang T T, Wang M, *et al.* Progress of QuEChERS in pretreatment method of drug residues in animal – derived foods [J]. Chemical Reagents, 2020, 42(12): 1424 – 1429.
- [14] 黄胜广, 王玉方, 赵卉, 等. QuEChERS/UPLC – MS/MS 法同时测定梅花鹿鹿茸中 36 种兽药残留 [J]. 质谱学报, 2020, 41(6): 648 – 658.
- Huang S G, Wang Y F, Zhao H, *et al.* Determination of 36 veterinary drug residues in antler velvet of cervus nippon temminck by QuEChERS/UPLC – MS/MS [J]. J Chin Mass Spectrom Society, 2020, 41(6): 648 – 658.
- [15] 许晓辉, 王小乔, 党子龙, 等. QuEChERS – dSPE – UPLC – MS/MS 筛查中药材地龙中 41 种兽药残留 [J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(3): 49 – 56.
- Xu X H, Wang X Q, Dang Z L, *et al.* QuEChERS – dSPE – UPLC – MS/MS for rapid determination of 41 kinds of veterinary drug residues in pheretima [J]. Chin J Veterinary Drug, 2021, 55(3): 49 – 56.
- [16] 朱群英, 朱玉玲, 黄伟华, 等. 同位素内标 – 液质联用法检测猪肉中的苯二氮卓类药物残留 [J]. 现代预防医学, 2017, 44(3): 511 – 514 + 541.
- Zhu Q Y, Zhu Y L, Huang W H, *et al.* Benzodiazepine drug residues detection in pork by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry using isotope internal standard [J]. Modern Prevent Med, 2017, 44(3): 511 – 514 + 541.
- [17] 熊周芳, 涂凤莲, 汪元符. 液质联用法检测苯二氮卓类药物的临床应用 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(3): 80 – 86.
- Xiong Z F, Tu F L, Wang Y F, *et al.* Determination of bzds medicines by UPLC – MS/MS for clinical monitor [J]. Journal Jiangxi Univer Tradit Chin Med, 2018, 30(3): 80 – 86.

(编辑: 侯向辉)