

二维液相-离子阱-飞行时间质谱法对咪达唑仑注射液中有关物质的初探与结构解析

黄朝瑜¹, 陈民辉¹, 蔡梅¹, 郝红元², 蔡美明¹

(1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008; 2. 岛津企业管理(中国)有限公司, 上海 200052)

摘要 **目的:** 应用在线脱盐-高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(2D-LC-IT-TOF/MS)对咪达唑仑注射液在药典条件下检出的杂质进行了解析鉴定, 并推断了咪达唑仑的降解途径。**方法:** 分离液相色谱条件: 采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-磷酸盐缓冲液(取同体积的 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸溶液与 0.03 mol · L⁻¹ 三乙胺溶液混合, 用 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 3.5) (65:35) 为流动相等度洗脱; 捕集成分脱盐液相色谱条件: 采用 InertsustainTM C₁₈ (2.0 mm × 50 mm, 2.1 μm) 色谱柱, 以甲酸溶液(甲酸调节 pH 为 3.5)为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 进行梯度洗脱。质谱条件: 采用 ESI 正离子, 雾化气为氮气 (1.5 L · min⁻¹), 干燥气为氮气 (10 L · min⁻¹), 脱溶剂管温度 200 °C。根据多级质谱信息来推定检出的有关物质结构。**结果:** 在咪达唑仑注射液中共检出 3 个有关物质, 推定分别为咪达唑仑同分异构体、英国药典杂质 D 和杂质 G, 其中咪达唑仑同分异构体目前未见国内外文献报道, 实验证明其为咪达唑仑在酸性条件下产生的降解产物。**结论:** 建立的方法可用于咪达唑仑注射液有关物质检查, 并为咪达唑仑注射液进一步的质量控制与工艺优化研究提供可靠分析手段。

关键词: 咪达唑仑注射液; 中枢神经系统镇静剂; 有关物质; 杂质结构; 咪达唑仑同分异构体; 降解途径; 在线脱盐-高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 04-0688-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.04.20

Preliminary exploration and structure identification of related substances of midazolam injection by 2D-LC-IT-TOF/MS

HUANG Chao-yu¹, CHEN Min-hui¹, CAI Mei¹, HAO Hong-yuan², CAI Mei-ming¹

(1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China;

2. SHIMADZU Enterprise Management (China) Co., Ltd, Shanghai 200052, China)

Abstract Objective: To establish a 2-dimensional HPLC/ion trap/time-of-flight mass spectrometric method (2D-LC-IT-TOF/MS) for the detection and identification of the related substances described in the Pharmacopoeias, and to discuss the possible degradation pathways of midazolam. **Methods:** The separation was carried out on ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column using a mixture of 65 volumes of methanol and 35 volumes of phosphate buffer solution (equal volumes of 0.1 mol · L⁻¹ orthophosphoric acid and 0.03

第一作者 Tel: (025) 83307598; E-mail: hcy100@hotmail.com

mol · L⁻¹ triethylamine. pH was adjusted to 3.5 with 0.1 mol · L⁻¹ NaOH) as the mobile phase with a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The related substances of interest were trapped on an InertsustainTM C₁₈ (2.0 mm × 50 mm, 2.1 μm) column separately and then desalted by using formic acid solution (adjust the pH with formic acid solution to 3.5) as mobile A and methanol as mobile B in a gradient elution. IT-TOF/MS was conducted by electrospray positive ionization with the nebulized gas of 1.5 L · min⁻¹, dry gas N₂ of 10.0 L · min⁻¹, desolvation tube temperature at 200 °C. The related substances detected were then characterized according to their multi-level product MS behaviors.

Results: Three related substances were detected in midazolam injection and their structures were identified to be midazolam's isomer, and the impurity D and G described in BP. The isomer, not reported before, was the degradation product of midazolam under acidic stress. **Conclusion:** The established method is suitable for the identification of impurities in midazolam injection and useful for quality control and process optimization of midazolam injection.

Keywords: midazolam injection; central nervous system depressant; related substance; impurity structure; midazolam's isomer; degradation pathway; 2D-LC-IT-TOF/MS

咪达唑仑(1-甲基-8-氯-6-(2-氟苯基)-4H-咪唑并[1,5-a][1,4]苯并二氮杂卓)为苯并二氮杂卓类衍生物,是一种短效的中枢神经系统(CNS)镇静剂,具有临床起效快^[1-4],血浆清除快^[5-6],作用时间短,强效,并发症少,副作用小等特点。主要用于麻醉前给药、全麻醉诱导和维持、椎管内麻醉及局部麻醉时辅助用药、诊断或治疗性操作时病人的镇静、ICU病人的镇静等^[7-9]。

咪达唑仑多以N-脱烷基氟西洋为起始原料,经甲胺化、亚硝化、置换、氢化、环合、氧化等单元反应制备而得。中国药典自2010年版开始收载咪达唑仑原料及咪达唑仑注射液,注射液有关物质限度为单个杂质不得过0.5%,总量不得过1.0%^[10]。中国药典中咪达唑仑有关物质的液相色谱检查方法与英国药典^[11]相同,能有效地分离英国药典和美国药典^[12]收载的11个已知杂质,本文采用该方法对咪达唑仑注射液有关物质进行考察。

咪达唑仑注射液为咪达唑仑含盐酸的溶液,由于咪达唑仑在盐酸溶液中,其结构在4,5双键位间发生开环可逆性水解,形成相应的开环性化合物(在本色谱条件下相对保留时间约为0.42),当pH升高后,开环物又重新环合。英国药典和美国药典中均规定有详细的样品处理方法使得开环物转化为闭合物(即咪达唑仑),中国药典方法为采用加碱的方法来完成转化。试验中发现注射液经英国药典、美国药典及中国药典的3种方法经转化后相对保留时间为0.42的位置均能检出色谱峰,且为咪达唑仑注射液中最大单杂。国内企业认为该物质为开环物,在体内可以全

部闭环转化为咪达唑仑,不应将其计为杂质^[13-14],故该物质结构确认极为重要。

用LC-MSⁿ法可以实现对检出杂质结构的快速推定,但中国药典2015年版中的有关物质测定方法(HPLC-UV)的流动相中含有较高浓度的磷酸及三乙胺,与质谱检测的要求不匹配,通常的做法是,重新建立适合LC-MS检测的色谱系统,该方法可对检出杂质结构进行推定,但无法实现对三国药典条件下色谱图中各杂质峰的准确指认,为此,本研究采用在线脱盐-高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(2D-LC-IT-TOF/MS)方法,即通常所说的在线脱盐技术,该方法基于共用一组分收集环(fraction loop)的二维液相色谱-质谱联用系统建立,其中一维液相色谱对三国药典条件下含有磷酸盐和三乙胺等试剂的液相条件进行分析,通过实践程序对分离过程中的目标杂质进行捕集,1stD-LC分析结束后,批处理自动执行二维液相色谱分析,收集环中的杂质组分分批依次注入二维液相色谱柱中,对目标峰快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程^[15]。该方法在不改变原流动相条件的基础上,实现了液相色谱联用分析目标杂质,可在准确推定检出杂质结构的同时,实现对三国药典条件下色谱图中各杂质的准确定位。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦公司 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶)色谱柱,岛津公司 Inertsustain C₁₈ (2.0 mm × 50 mm, 2.1 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶)色谱柱,高效液

相色谱-离子阱-飞行时间质谱仪(日本岛津公司)包括 LC-20AD $\times$ 4(输液泵), SIL-20AC(自动进样器), CTO-20AC(柱温箱), CBM-20A(系统控制器), DGU-20A5(在线脱气机), SPD-M20A(二极管阵列检测器), SPD-20A(UV 检测器), FCV-12AH $\times$ 3(高压流路选择阀), FCV-14AH $\times$ 2(色谱柱切换阀), 离子阱-飞行时间质谱仪(LC/MS-IT-TOF 仪)和 LC MSsolution Ver.3.70(工作站)。

1.2 试药

咪达唑仑注射液(甲厂, 批号 20150506; 乙厂, 批号 1150602 A3; 丙厂, 批号 20150506); 咪达唑仑对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 171265-201402); 英国药典杂质 D、G 对照品(杂质 D: 8-氯-6-(2-氟苯基)-1-甲基-4H-咪唑并[1,5-a][1,4]-苯并二氮杂-5-氧化胺; 杂质 G: 8-氯-6-苯基-1-甲基-4H-咪唑并[1,5-a][1,4]-苯并二氮杂)(恩华药业股份公司, 批号 0142、0136); 乙腈为色谱纯, 醋酸铵、依地酸二钠、三乙胺、甲酸均为分析纯, 水为 Millipore 纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

1stD-LC 色谱条件: 采用 Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以磷酸盐缓冲液 (0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸溶液-0.03 mol $\cdot$ L⁻¹ 三乙胺溶液 (1:1) 混合, 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 3.5)- 甲醇 (35:65) 为流动相, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样体积 10 μ L, 检测波长 220 nm。

2ndD-LC 色谱条件: 采用 Inertsustain C₁₈ (2.0 mm $\times$ 50 mm, 2.1 μ m) 色谱柱, 以 pH 3.5 甲酸溶液 (A)- 为甲醇 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~1 min, 10%B; 1~5 min, 80%B; 5~6 min, 80%B; 6~7 min, 10%B; 10 min, 10%B) (梯度开始 1 min 后阀切换流路进质谱仪), 流速 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 检测波长: 220 nm, 进样体积 20 μ L (Loop 环体积)。

2.1.2 质谱条件

离子源: ESI 正离子; 离子源电压: ESI⁺, 4.5 kV; 扫描范围: 一级质谱 m/z 150~500; 多级质谱 m/z 100~500; 雾化气: 氮气 1.5 L $\cdot$ min⁻¹; 干燥气: 氮气 10 L $\cdot$ min⁻¹; 碰撞气: 氩气; 脱溶剂管温度: 200 $^{\circ}$ C; 加热模块温度: 200 $^{\circ}$ C; 检测器电压: 1.6 kV; 校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

称取英国药典杂质 G 对照品 25.16 mg, 英国药典杂质 D 对照品 25.36 mg, 依地酸二钠 450.06 mg, 分置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀; 再分别精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 中国药典供试品溶液

取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 避光放置 1 h, 用流动相稀释至刻度, 避光放置 3 h, 即得。

2.2.3 英国药典供试品溶液

取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 避光放置 2 h, 即得。

2.2.4 美国药典供试品溶液

取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 将溶液转移至适宜容器中, 40 $^{\circ}$ C 加热 1 h, 即得。

2.2.5 强制性破坏溶液的制备

2.2.5.1 酸破坏供试品溶液 取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加 2 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL, 放置 24 h, 加 2 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠 2 mL 中和后, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.5.2 碱破坏供试品溶液 取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加 2 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 放置 24 h, 加 2 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 中和后, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.5.3 氧化破坏供试品溶液 取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加 1.5% 双氧水溶液 2 mL, 放置 0.5 h, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

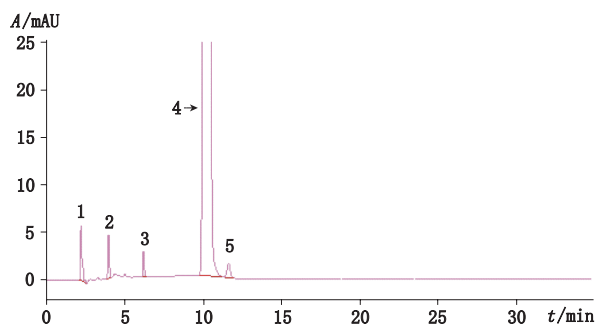
2.2.5.4 高温破坏供试品溶液 取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 105 $^{\circ}$ C 加热 12 h 后放冷后, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.5.5 光照破坏供试品溶液 取本品适量 (约相当于咪达唑仑 5 mg), 置 4 500 lx 光照 24 h 后置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 咪达唑仑注射液有关物质的结构解析

取“2.2.1”~“2.2.4”项下的溶液, 按“2.1”项下

条件测定,测得有关物质结果见表1,拟合 HPLC 色谱图见图1,甲、乙、丙3个厂家样品共检出除咪达唑仑外4个色谱峰,按出峰顺序命名为峰1~5(如图1)。不同企业产品中,仅有乙厂样品中检出了峰1,仅在丙厂样品中检出峰3,峰2、4及峰5为共有色谱峰,其中峰2为最大杂质,相对保留时间约为0.42,为重点关注的杂质。峰1与依地酸二钠在色谱保留行为、紫外光谱行为均一致,两者的一级质谱与多级质谱质谱图一致,故峰1为辅料依地酸二钠。



1. 依地酸二钠(disodium edetate) 2. 杂质1(impurity 1) 3. 杂质2(impurity 2) 4. 咪达唑仑(midazolam) 5. 杂质3(impurity 3)

图1 咪达唑仑注射液拟合全部杂质的一维UV色谱图

Fig. 1 The first dimensional UV chromatogram of midazolam injection

2.3.1 咪达唑仑注射液中杂质2、3的2D-LC-IT-TOF分析结果

杂质2、3的质谱数据见表1。杂质2(峰3)、杂质3(峰5)分别与英国药典杂质D、G的色谱保留行为、紫外光谱行为一致,一级质谱与多级质谱图也均一致。由表1数据可见,杂质2即为英国药典杂质D,杂质3即为英国药典杂质G。

2.3.2 咪达唑仑注射液中杂质1(最大杂质)的2D-LC-IT-TOF分析结果

采用加碱后避光放置(中国药典方法)、避光放置(英国药典方法)及加热放置1 h(美国药典方法)3种方法制备供试品溶液,结果发现在不加碱及加热的供试品溶液中相对保留时间为0.42的色谱峰中检出 m/z 344.093 1 和 m/z 326.082 5 的2种杂质,见图2;而在加碱的供试品溶液中相对保留时间为0.42的色谱峰中只存在 m/z 326.082 5 这1种杂质,见图3。 m/z 326.082 5 的杂质在二维UV色谱图上的出峰时间与咪达唑仑不同,可以推断该物质并非咪达唑仑。该杂质 $[M+H]^+$ m/z 为 326.082 5,二级质谱碎片离子为 m/z 291.114 2、244.030 2、249.005 6,三级质谱碎片离子为 m/z 249.080 5、223.077 1、208.006 0。其一级质谱可以看到明显的Cl的同位素峰,主成分咪达唑仑 $[M+H]^+$ m/z 326.082 8,二级质谱碎片离子为 m/z

表1 杂质2与杂质3质谱数据表

Tab. 1 Mass data of impurities 2 and 3

杂质 (impurity)	1stD 保留 时间(1stD retention time)/min	2ndD 保 留时间 (2ndD retention time)/min	MS m/z	MS/MS m/z	MS/MS/MS m/z	结构 (chemical structure)
2	6.279	5.687	342.077 8	322.068 9	285.086 9, 294.075 0, 258.103 6	
D	6.272	5.685	342.077 8	322.068 2	285.087 5, 294.075 2, 258.103 3	
3	11.641	6.092	308.093 6	273.124 9, 226.039 0, 191.075 1	191.076 4	
G	11.638	6.091	308.093 2	273.124 5, 226.039 0, 191.075 6	191.076 2	

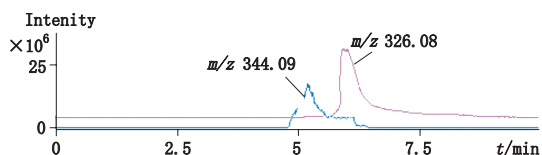


图2 英国药典供试品溶液中杂质1的二维质谱中 m/z 326.08 和 m/z 344.09 提取离子流图

Fig. 2 Extraction chromatograms of m/z 326.08 and m/z 344.09 in 2D-MS of impurity 1 in BP test solution

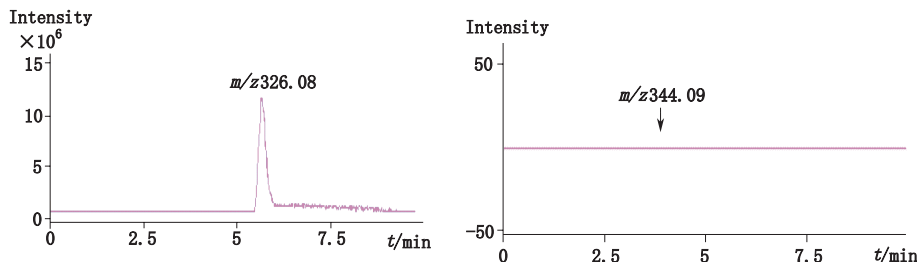


图3 中国药典供试品溶液中杂质1的二维质谱中 m/z 326.082 8 和 m/z 344.093 1 提取离子流图

Fig. 3 Extraction chromatograms of m/z 326.082 8 and m/z 344.093 1 in 2D-MS of impurity 1 in ChP test solution

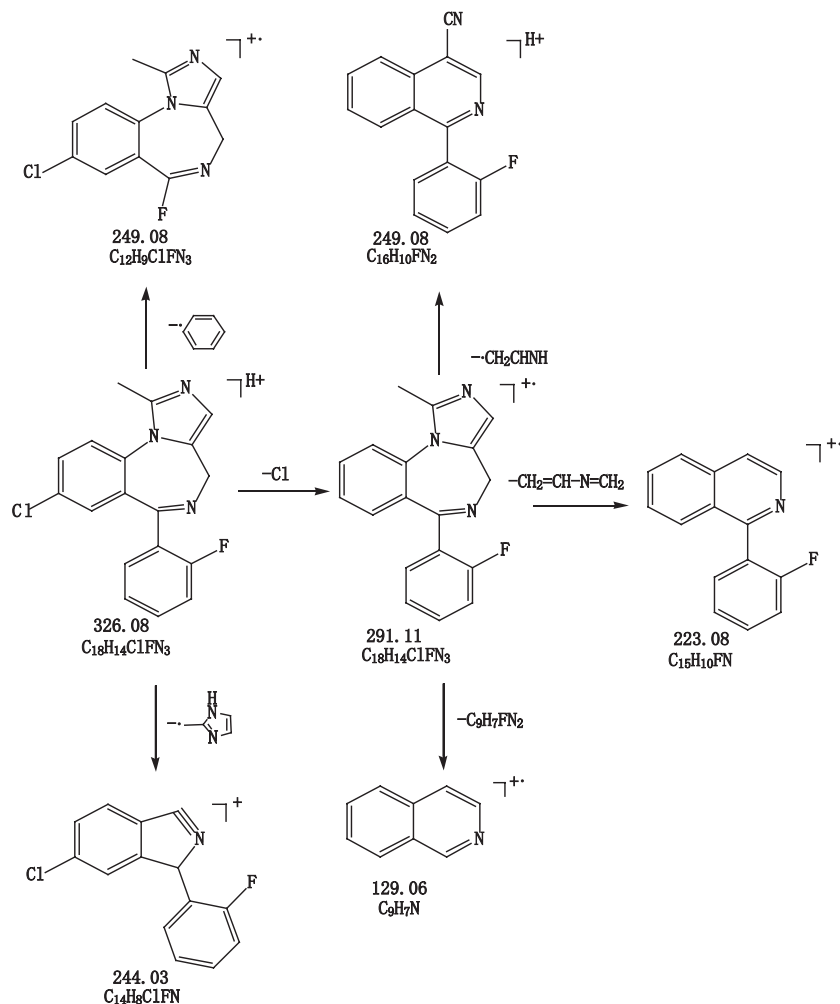
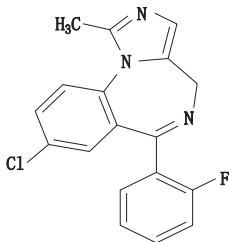
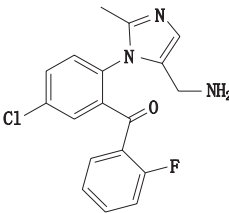


图4 咪达唑仑的结构及质谱裂解途径

Fig. 4 The structure and fragmentation pathway of midazolam

表 2 杂质 1、咪达唑仑和共轭开环物的信息列表

Tab. 2 Information of impurity 1, midazolam and open-ring form

成分 (component)	1stD 保留时间 (1stD retention time)/min	2ndD 保留时间 (2ndD retention time)/min	实测 (measured) [M+H] m/z	理论 (reasoned) [M+H] m/z	结构式 (chemical structure)
峰 2 (peak 2)	4.009	5.710	326.082 8	326.085 4	
咪达唑仑 (midazolam)	10.019	5.855	326.082 7	326.085 4	
咪达唑仑共轭开环物 (conjugate open-ring form of midazolam)	4.009	5.232	344.093 1	344.095 9	

为了探究杂质 1 来源,对咪达唑仑注射液按“2.2.4”方法进行了强制性破坏,结果见图 5。本品在酸、碱、氧化、高温、强光破坏下均不稳定,破坏后均能产生不同程度的主要降解产物咪达唑仑异构体,在氧化和酸破坏条件下,异构体产生的量约为 3% 的咪达唑仑。结果显示,咪达唑仑在注射液酸性条件下不稳定,易产生杂质 1。

3 讨论

3.1 2D-LC-IT-TOF/MS 条件的选择

本实验采用 2D-LC-IT-TOF/MS 法,即在 LC-IT-TOF 的基础上增加了在线脱盐技术,对药典条件下咪达唑仑注射液中色谱图中准确指认的 3 个有关物质进行了定性分析,该方法操作快速、简便,且能与含非挥发性酸、碱的流动相直接匹配。

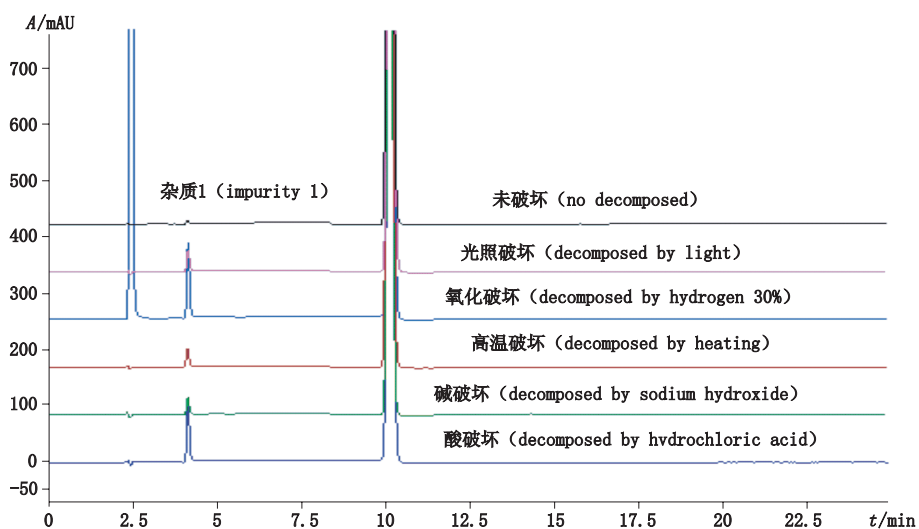


图 5 咪达唑仑注射液破坏性试验色谱图

Fig. 5 Chromatograms of midazolam Injection undergoing decomposition

3.2 加强对辅料的关注

乙厂产品中检出辅料依地酸二钠,其含量约为0.4%的咪达唑仑的含量,因在目前的中国药典标准中未体现,极易在日常检验中误判为杂质。提示有类似辅料干扰时,一要在标准中加以关注,二是检验者应对制剂处方加以了解。

3.3 咪达唑仑注射液中已知杂质的来源

国产咪达唑仑注射液中共检出2种已知杂质,分别为英国药典杂质D及G。杂质G为咪达唑仑起始原料邻氟环合物中的2-氨基-5-氯-二苯甲酮杂质,在后续的反应中会生成,杂质D为反应生成的副产物,在咪达唑仑的合成工艺中氧化反应可生成该杂质。此实验结果提示企业需在原料药生产时加强对这2种杂质的监控。

3.4 咪达唑仑注射液中未知杂质的来源的探讨

本文实验结果显示在中国药典有关物质条件下,样品中存在的咪达唑仑开环物已全部转化为咪达唑仑,而相同相对保留时间0.42下的检出物为咪达唑仑异构体,对咪达唑仑注射液制剂所用对应批号原料的有关物质进行检测,未检出该相同物质,制剂的强酸破坏实验显示咪达唑仑异构体的量显著增加,提示咪达唑仑在注射液的酸性条件下,在开环成为4,5-开环物时或有部分结构变化生成异构体。

参考文献

- [1] GHONEIM MM, BLOCK RI. The interaction of midazolam and flumazenil on human memory and cognition[J]. *Anesthesiology*, 1993, 79(6): 1183
- [2] NAGUIB M, SAMARKANDI AH. The comparative dose-response effects of melatonin and midazolam for premedication of adults[J]. *Anesth Analg*, 2000, 91(2): 473
- [3] 孙丽华, 杨桐伟. 咪达唑仑的临床应用进展[J]. *吉林医学*, 2006, 27(12): 1469
SUN LH, YANG TW. Progress in clinical application of midazolam[J]. *Jilin Med J*, 2006, 27(12): 1469
- [4] MINORU W, TOMONORI T, MASAKO A, *et al.* Effects of glucocorticoids on pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam in rats[J]. *Life Sci*, 1998, 63(19): 1685
- [5] 原皓, 邹亮, 孙莉. 全麻术中应用咪达唑仑镇静的安全性及有效性临床分析[J]. *医学综述*, 2015, 21(7): 1337
YUAN H, ZOU L, SUN L. Analysis on the safety and efficacy of midazolam sedation in general anesthesia operation[J]. *Med Recapit*, 2015, 21(7): 1337
- [6] 许涛, 杨涛, 曹好好. 咪达唑仑或丙泊酚联用右美托咪定对颅脑创伤患者镇静作用的比较[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(4): 326
XU T, YANG T, CAO HH. Comparative analysis of sedative effects mediated by dexmedetomidine in combination with propofol or midazolam in traumatic brain injury patients[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2015, 35(4): 326
- [7] 胡春伟. 高效液相色谱法同时测定肝微粒体中咪达唑仑及代谢产物含量[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16(1): 42
HU CW. Determination of content of midazolam and its metabolite in live microsome by HPLC[J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China*, 2016, 16(1): 42
- [8] 郑琴, 郝伟伟, 胡双. 液相色谱-串联质谱法同时测定大鼠血浆中咪达唑仑和非那西丁及其动力学研究[J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 16(1): 42
ZHENG Q, HAO WW, HU S. Simultaneous determination of pharmacokinetics of midazolam and phenacetin in rat plasma by LC-MS/MS[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2016, 16(1): 42
- [9] 刘雅, 路红梅. 老年病人麻醉前肌肉注射咪达唑仑的安全剂量[J]. *中华麻醉学杂志*, 2005, 25(8): 628
LIU Y, LU HM. Safe dosage of midazolam in elderly patients before anesthesia[J]. *Chin J Anesthesiol*, 2005, 25(8): 628
- [10] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 747
ChP 2015. Vol II[S]. 2015: 747
- [11] BP 2015 Vol III[S]. 2015: 843
- [12] USP 38-NF 33[S]. 2015: 4397
- [13] 符义刚, 李莉维. 咪达唑仑共轭体系研究[J]. *化学与生物工程*, 2010, 27(10): 34
FU YG, LI LW. Study on conjugated system of midazolam[J]. *Chem Bioeng*, 2010, 27(10): 34
- [14] PDR Staff. Medical Economics Staff. Physicians' Desk Reference. 66 Edition[M]. London: PDR Network, 2011: 2794
- [15] 高辉, 温学森, 马小军. 二维液相色谱技术在药物分析中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(4): 616
GAO H, WEN XS, MA XJ. The technique of dimensional liquid chromatography and its application in drug[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2007, 27(4): 616

(本文于2016年5月12日收到)