

液相色谱/质谱/质谱 (LC/MS/MS) 法分析血液中的苯二氮草类药物

应用

临床和法医毒理学

作者

Hazel Rivera and G. Stewart Walker
Flinders University
Adelaide, South Australia
Australia

Peter Stockham and D. Noel Sims
Forensic Science South Australia
Adelaide, South Australia
Australia

John M. Hughes
Agilent Technologies, Inc.
Pleasanton, CA
USA

摘要

本文报导了一个用安捷伦公司的液相色谱/离子阱质谱仪 (Agilent LC/MSD Trap) 同时扫描和鉴定人血中13种苯二氮草类药物及其5种代谢物的高灵敏及高选择性的方法。该方法先使用液-液萃取, 然后, 采用反相LC/MS/MS (液相色谱/串联质谱法)。该技术适用于筛查分析, 仅仅需要500 μ L的血液, 使用安捷伦的原有型号 (“经典的”) LC/MSD离子阱质谱仪, 就可以对所报道的最低治疗浓度的分析物进行鉴定, 并具有高置信度。该方法已成功地应用于低浓度苯二氮草类药物分析的法医分析案例。

引言

苯二氮草类是一类重要的药物, 具有广泛的治疗效果, 包括镇痛催眠、抗焦虑、肌肉松弛和抗惊厥[1]。由于它们的广泛用途, 苯二氮草类药物有可能与其它中枢神经系统镇静剂相互作用, 后者可危及生命或损害健康。苯二氮草类药物现在是最常用的处方药, 这增加了成瘾和滥用的可能性, 并且在药物相关的死亡事件或药物驱动性暴力案例中, 经常可以发现它们与其它药物相结合[2]。由于这些原因, 法医分析和临床毒理学家对苯二氮草类药物的检测具有很大的兴趣。

免疫测定通常特异性不够强, 或者对于低剂量的苯二氮草类药物不够灵敏, 特别在血液里, 所以对这些化合物的检测还有一些问题。苯二氮草类药物使用过气相色谱/氮磷检测器 (GC/NPD) [3]、气相色谱/电子捕获检测器 (GC/ECD) [3] 和气相色谱/质谱仪 (GC/MS) [4, 5] 进行检测。许多苯二氮草类药物都是极性和热不稳定的, 这使得它们不可能或难于不经过衍生就用GC或GC/MS分析。某些化合物不能通过衍生来改善其色谱行为。

苯二氮草类药物的筛查也可以用HPLC和UV检测来完成[6], 但该技术缺乏法医分析应用所需的灵敏度和特异性。而且, 一些新的苯二氮草类药物, 如氟硝西



Agilent Technologies

泮，有很低的治疗范围和较快的清除率，因此需要在更低水平鉴定。

液相色谱/质谱（LC/MS）是用于分析这个系列的化合物的理想技术，该技术不需要衍生，因此，节省时间、费用，并降低了实验难度。该类化合物不论采用电喷雾电离（ESI），还是大气压化学电离（APCI）模式，都能很好地被电离。因此，可以容易地测定 $\mu\text{g/mL}$ 含量及更低含量。大量的苯二氮草类药物及相关物质也已用安捷伦的单四极杆液相色谱/质谱仪（LC/MSD），以APCI和选择离子检测（SIM）模式进行了测定[7]。安捷伦LC/MSD离子阱的全扫描灵敏度允许在一次分析中同时鉴定/确认和定量，并且多反应监测（MRM）模式能进行复杂基体（如，血液）中更具特异性的检测。

本项研究在一次分析中测定了13种苯二氮草类药物及5种代谢物[表1]，大约需要20分钟。本文源自澳大利亚实验室中进行的工作及以前出版的参考文献8。

表1. 分析的化合物

苯二氮草类	代谢物
阿普唑仑	—
溴西洋	—
氯巴占	—
氯硝安定	7-氨基-氯硝安定
安定	去甲西洋
氟硝西洋	7-氨基-氟硝西洋
氟胺安定	N-desalkylflurazepam
劳拉西洋	—
米达唑仑	—
硝基安定	7-氨基-硝基安定
去甲羟基安定	—
羟基安定	—
三唑仑	—
普拉安定（内标）	

实验

样品制备

将每一种分析物的参考溶液进行混合，用水稀释并加入到不含药物的血液中，加入内标，来制备每一种药物低、中和高治疗浓度的校准溶液。典型的低治疗浓度和高治疗浓度列于表2。萃取方法与GC/ECD和GC/MS对这些药物进行筛分时所用的方法一样，省略了衍生步骤，最后残渣溶于初始流动相而不是一种典型的GC溶剂。

表2. 分析物的浓度范围（mg/L或 $\mu\text{g/mL}$ ）

苯二氮草/代谢物	低治疗浓度	高治疗浓度
阿普唑仑	0.01	0.1
溴西洋	0.08	0.2
氯巴占	0.1	1
氯硝安定	0.03	0.08
7-氨基-氯硝安定	0.03	0.14
安定	0.05	2
去甲西洋	0.05	2
氟硝西洋	0.005	0.02
7-氨基-氟硝西洋	0.002	0.02
氟胺安定	0.0005	0.028
N-desalkylflurazepam	0.04	0.15
劳拉西洋	0.02	0.3
米达唑仑	0.08	0.25
硝基安定	0.03	0.2
7-氨基-硝基安定	0.03	0.2
去甲羟基安定	0.15	2
羟基安定	0.3	1
三唑仑	0.002	0.02

在一个装有0.5 mL血液的玻璃螺旋口试管中，加入50 μL 新制备的内标工作溶液（5 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液）。在该试管中再加入1.75 mL 4.5%的氨水溶液和10 mL的1-氯丁烷，然后将试管中溶液在一个机械混合器中滚动10分钟。离心分离后，取出溶剂，转移到一个干净的玻璃管中并在Jouan离心蒸发器中蒸发至干。残渣用100 μL 流动相溶解。

LC/MS/MS仪器

本研究使用的LC/MS/MS系统包括Agilent 1100系列真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、带微量流通池的二极管阵列检测器（DAD）、LC/MSD离

子阱“经典型”(G2445A型,与目前VL型性能相当)、以及G1947A APCI源。全部系统控制和数据分析由Agilent LC/MS ChemStation提供。

LC/MS方法细则

LC 条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 150 ↔ 4.6 mm, 5 μm (p/n 993967-906)
流动相:	A = 20 mM 甲酸铵, pH 9 水溶液 B = 甲醇
流速:	0.7 mL/min
梯度:	15分钟60% B 16分钟开始100% B 到21分钟100% B 柱后-时间(色谱柱再平衡): 5分钟 (足以使保留时间重复)

进样量: 5 μL

MS 条件

离子源:	Positive APCI
雾化器:	60 psig
汽化温度:	400 °C
干燥气流速:	5 L/min
干燥气温度:	350 °C
毛细管电压:	3000 V
电晕针电流:	4 μA
扫描:	<i>m/z</i> 150–400
平均数:	2
SPS设置:	目标质量 <i>m/z</i> 300 化合物稳定性60% (Skim 1: 24 V, 毛细管出口补偿电压: 69 V) 离子阱驱动100% (结果值27)
母离子分离 宽度:	2.5 u
阈值:	45% (对这些化合物为113–175 <i>m/z</i>)
MRM:	八个时间片段列于表3

结果和讨论

讨论

对用ESI和APCI分析这些化合物进行了评价。通常,两者对于该方法需要的低治疗水平都给出了良好的灵敏度。然而,氟硝西洋和劳拉西洋两者在ESI中响应较低,尽管流动相在合理的时间内给出了最好的色谱分离。由于业已证明APCI比ESI较少受到基质抑制的影响,而且氟硝西洋和劳拉西洋都显示出对APCI具有较好的灵敏度,所以它被选择为更适合的离子化方法。

对各种流动相进行了评价,目的是在简单的LC方法、合理的短运行时间以及分析物的色谱分辨率的最大化之间选择最好的折中条件。条件选择包括等梯度法和梯度洗脱法,使用20 mM 甲酸铵在pH 3或pH 9,或使用0.1%甲酸。一旦将APCI选作更喜欢的离子化方法,甲醇将是比乙腈更有利的有机组分选项,因为在APCI中它具有更好的灵敏度并且不会在APCI电晕针上沉积碳。乙腈比甲醇的气相碱性高;因为在APCI里离子化发生在气相(而不是象ESI发生在液相),乙腈可同分析物分子竞争可利用的质子化“工作”。

本项研究发现用甲醇碱性水相作为有机相,可以获得最好的分离、色谱峰形和灵敏度。ZORBAX Eclipse C8柱在这个流动相的有效pH上是长期稳定的。C8固定相被证实有充分的保留能力,甚至对极性代谢物也一样;C18会需要更长的运行时间。

重组初始流动相中样品的提取物,发现一个可推荐用于HPLC的实例,它比使用简单的甲醇/水给出更好的峰形,并由此带来更好的灵敏度。这对早洗脱出来的极性分析物尤为重要。

选择普拉西洋为合适的内标,因为它与其他分析物的结构相似,而且它在澳大利亚是非处方药。

向MS/MS注入5 μg/mL的单一化合物溶液,来确定每个分析物的最佳碎片幅度,增加碎片幅度直到母离子强度减少到其主要子离子响应的10%-20%。结果值被用于数据采集方法,如表3所示。

表3. 用于MRM的数据采集参数

组号	苯二氮草/代谢物	保留时间 (min)	母离子 [M+H] ⁺	主要子离子 (<i>m/z</i>)	碎片电压 (V)	碎片宽度 (<i>m/z</i>)
1 [1.00–4.00]	7-氨基-硝基安定	2.6	252	224	2.00	10
	7-氨基-氯硝安定	2.8	286	250	2.50	10
	7-氨基-氯硝西洋	3.1	284	264	1.88	10
2 [4.00–5.70]	溴西洋	5.3	316	288	1.92	10
3 [5.70–6.70]	氯硝安定	6.1	316	270	2.00	10
	硝基安定	6.2	282	236	1.86	10
	氯硝西洋	6.3	314	268	1.90	10
4 [6.70–8.80]	氯巴占	7.3	301	259	3.37	40
	氟胺安定	7.6	388	315	2.60	40
	三唑仑	7.8	343	308	3.57	40
	阿普唑仑	8.3	309	281	4.67	40
	劳拉西洋	8.3	321	275	2.98	40
	去甲羟安定	8.6	287	241	3.32	40
5 [8.80–11.10]	N-desalkylflurazepam	9.2	289	261	4.57	40
	羟基安定	9.6	301	255	3.72	40
6 [11.10–13.00]	去甲西洋	12.1	271	243	1.88	10
7 [13.00–17.00]	安定	13.9	285	257	1.90	10
	米达唑仑	14.9	326	291	2.05	10
8 [17.00–21.00]	普拉安定	19.4	325	271	1.90	10

尽管Agilent LC/MSD离子阱具有极快的扫描速度（目前型号可为26,000 u/s），但是，要设定MRM方法使其重复步骤通过所有的母离子和所有18种分析物以及内标，也会导致不能接受的长循环时间，以及用以确定和定量每种分析物的每秒数据点不充分。因此分析按时间段设定，在这些时间段内，在一个色谱图给定部分少数几个分析物进行多反应监测，如表3所示。

如果使用手动碎片裂解阈值，在监测大量分析物的组与组之间的切换会出现时间延迟。该时间延迟可以通过下面方法避免，即在所有的组中将阈值选择（可以在离子阱控制窗口的MS/MS部分中的裂解（Frag-

mentation）下面找到）设置到一个母离子质量的合适百分值，或缺省值（Default），而不是对每一个分析物设立一个手动值。该方法的原版是对每一MRM使用150 *m/z*手动阈值，这样的值导致了延迟。将阈值设定为45%而不是缺省值27%，这些分析物的灵敏度得到改善。这主要是因为离子阱集中在出现分析物的主要子离子的*m/z*区，而不捕获那些对鉴定和定量基本没有用的低质量离子。

MS/MS获取的最优化的结果可以从图1的色谱图看

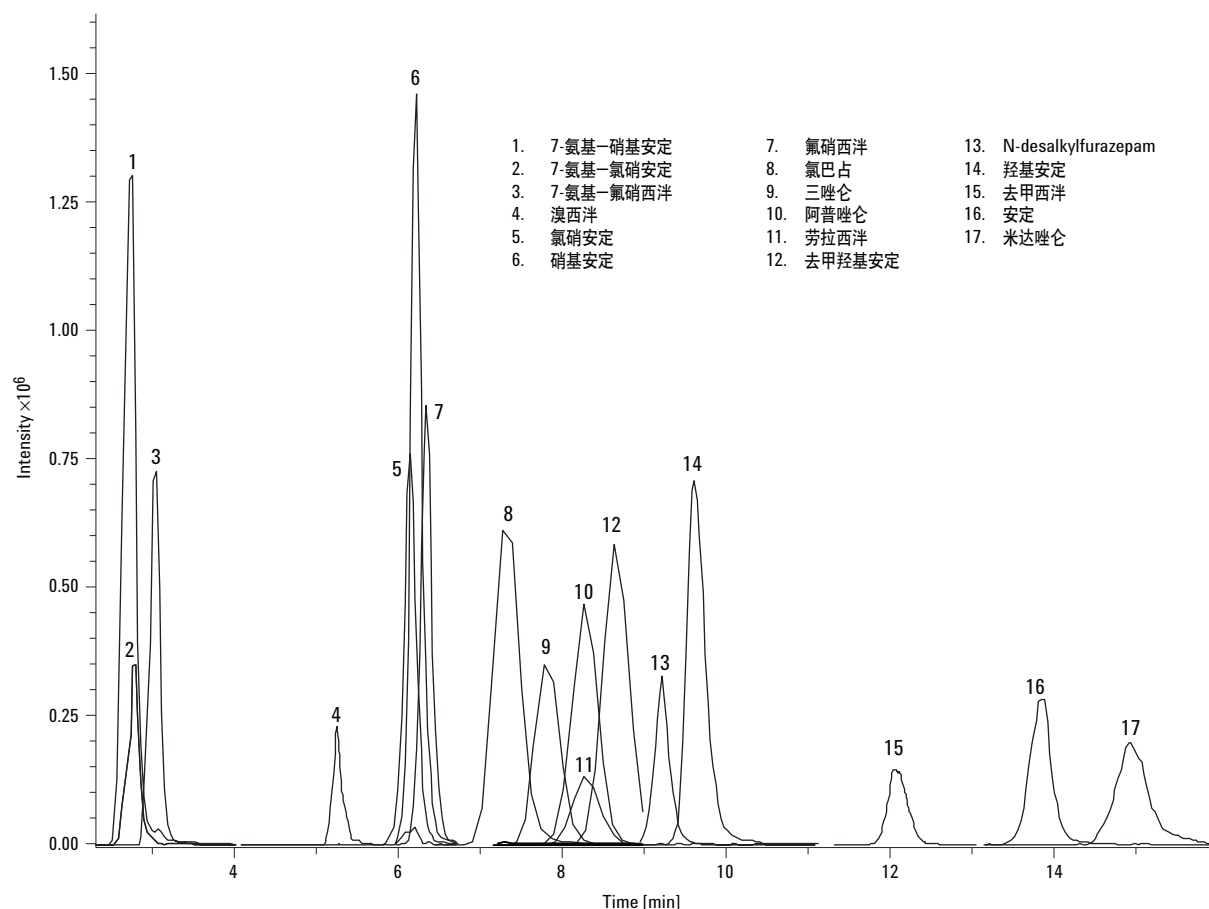


图1. 主要子离子色谱叠加图

出，它显示了本分析中所有分析物的主产物离子色谱叠加图。

第一组，从1.0到4.0分钟，包括了三个化合物的MRM分析，它们几乎是同时洗脱的。第二组仅包含一个化合物，第三组包含另外三个化合物。第四组包含六个化合物，它降低了分析每一化合物的循环效率。不论化合物是否洗脱，MRM都要通过六个不同的母离子循环。不过，色谱峰足够宽，保证对每一分析物产生足够的数据点。

子离子谱以全扫描模式获取，全扫描允许MS/MS质谱自动地添加到用户谱图库中，以备筛查和化合物鉴定。这样的谱图库已在本实验室以及其他毒理学领域的实验室得到使用。对于大量药物的筛查，AutoMSⁿ分析模式可以得到MS和MS/MS（甚至MS/MS/MS，

或MS³）谱图，这些谱图可以从由使用权威标准的相同MSⁿ参数建立的谱图库里检索。

打开SmartFrag选项，可提供一些定性分析的优点，主要是谱图重现性和子离子的丰度。关闭SmartFrag选项，以使少数子离子的强度最大化，会有助于低含量定量分析。

图2-8是分析物的结构和在本方法条件下分析被测物的MS/MS谱图。谱图说明一些共同丢失和在结构发生较小变化时，裂解行为中发生相应的有趣变化。

图2是含米达唑仑和三唑仑的MS/MS谱图，它们在这些条件下失去氯。三唑仑的五元含氮环也显示主要碎片离子来自于开环和氮原子的丢失。

图3显示三个苯二氮草类药物，它们在MS/MS谱中的

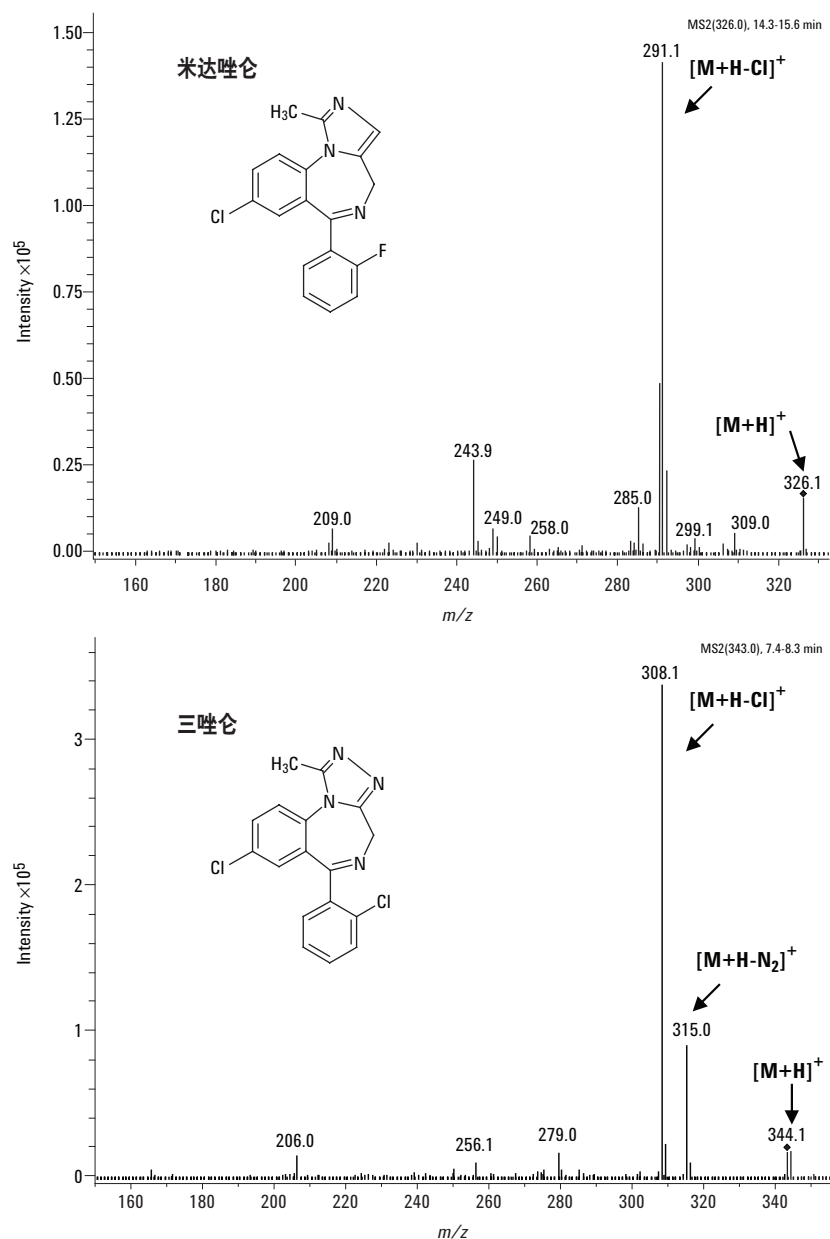


图2. 米达唑仑和三唑仑结构和MS/MS谱图

基峰相当于失去 NO_2 。此图还显示每个母体药物的代谢物谱图，其中的硝基被还原为氨基。在每种情况下，结构变化给出不同的碎片：7-氨基-氯硝安定失去HCl；7-氨基-硝基安定失去CO，明显地经过打开七-

元环；以及7-氨基-氟硝西泮失去HF。注意，这些分析物失去HCl和HF的结构相似性。

氟胺安定和普拉安定失去碱性基团见图4，并且

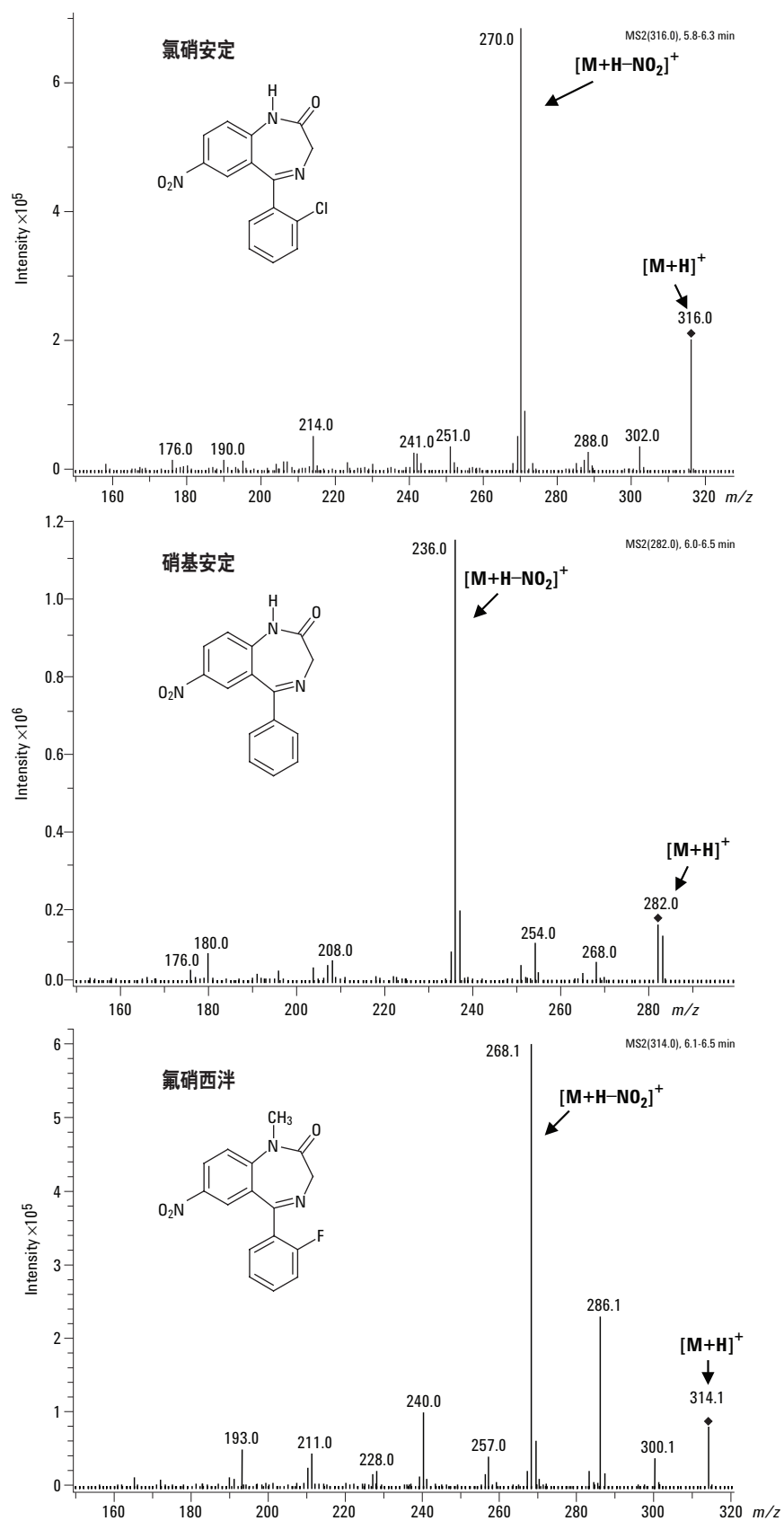


图3. 氯硝安定、硝基安定、氟硝西洋、7-氨基氯硝安定、7-氨基硝基安定和7-氨基氟硝安定的结构和MS/MS谱图

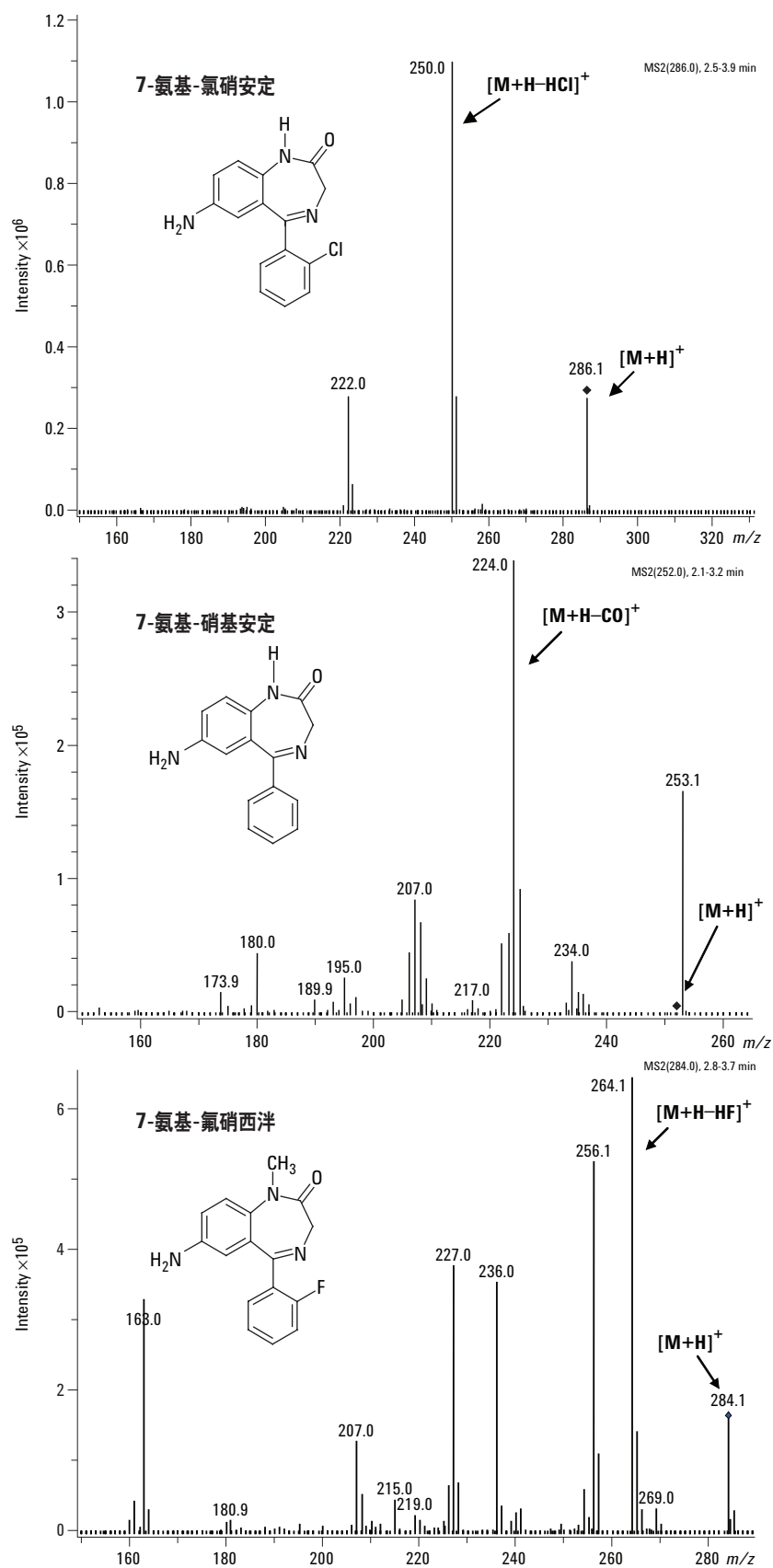


图3 (续). 氯硝安定、硝基安定、氯硝安定、7-氨基硝基安定和7-氨基氯硝安定的结构和MS/MS谱图

desalkylflurazepam代谢物失去整个碱性氮取代基，产生与相应失去CO的主要离子不同的裂解行为。

图5显示在这些条件下阿普唑仑失去N₂。它的结构与三唑仑（图2）的结构非常相似，后者也失去N₂，大

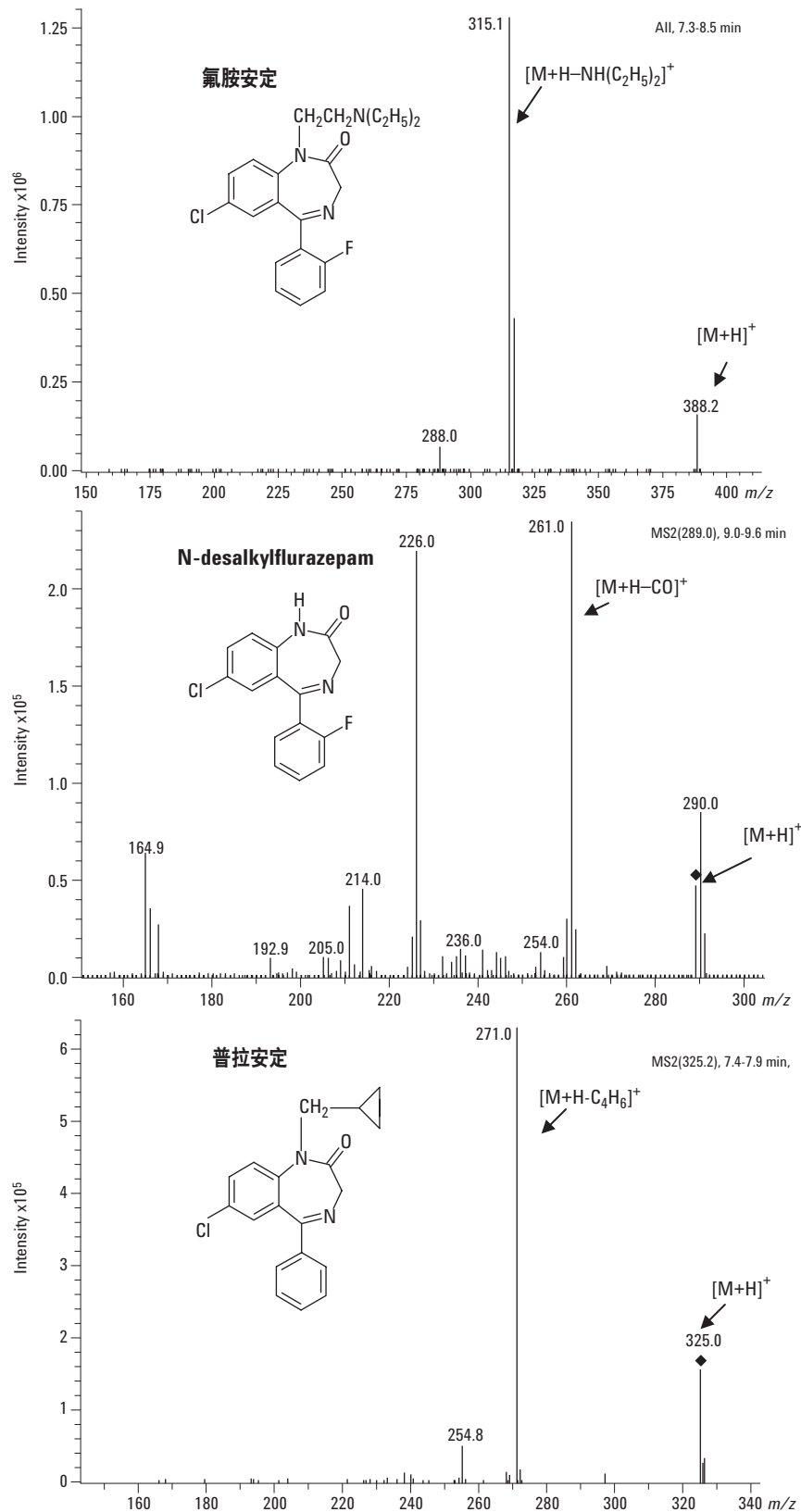


图4. 氟胺安定、N-desalkylflurazepam和普拉安定的结构和MS/MS谱图

概也是从五元环上丢失的。

图6显示另外几个苯二氮䓬类药物，它们失去CO，象图4中N-desalkyl氟胺安定。有意思的是它们三者都

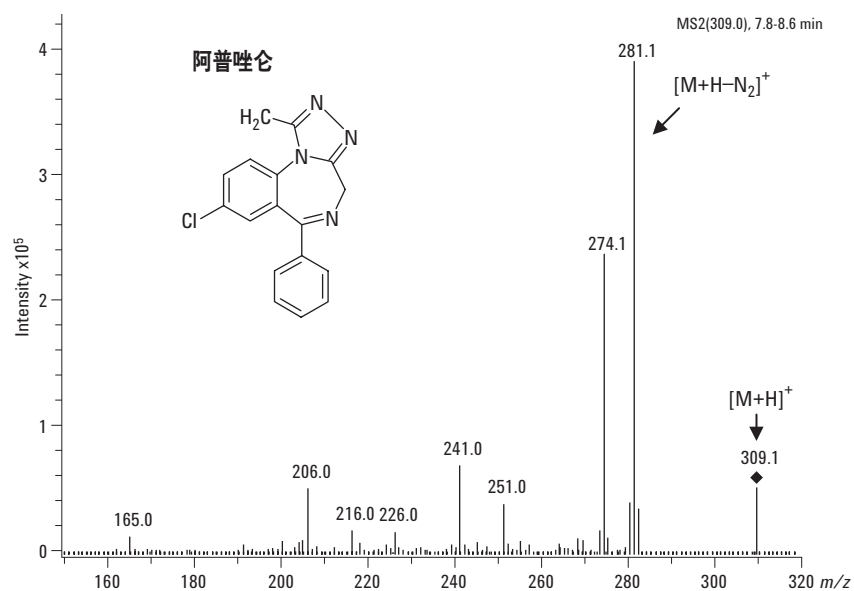


图5. 阿普唑仑的结构和MS/MS谱图

从7-环失去CO，尽管它们在苯并环的7-位上都有一个卤素。注意从7-氨基氯硝安定和7-氨基氟胺安定(图3)上失去HX，卤素是在非苯并环的2'-位。

氯硝安定显示一个简单的MS/MS谱图及独特的 CH_2CO 丢失，见图7。

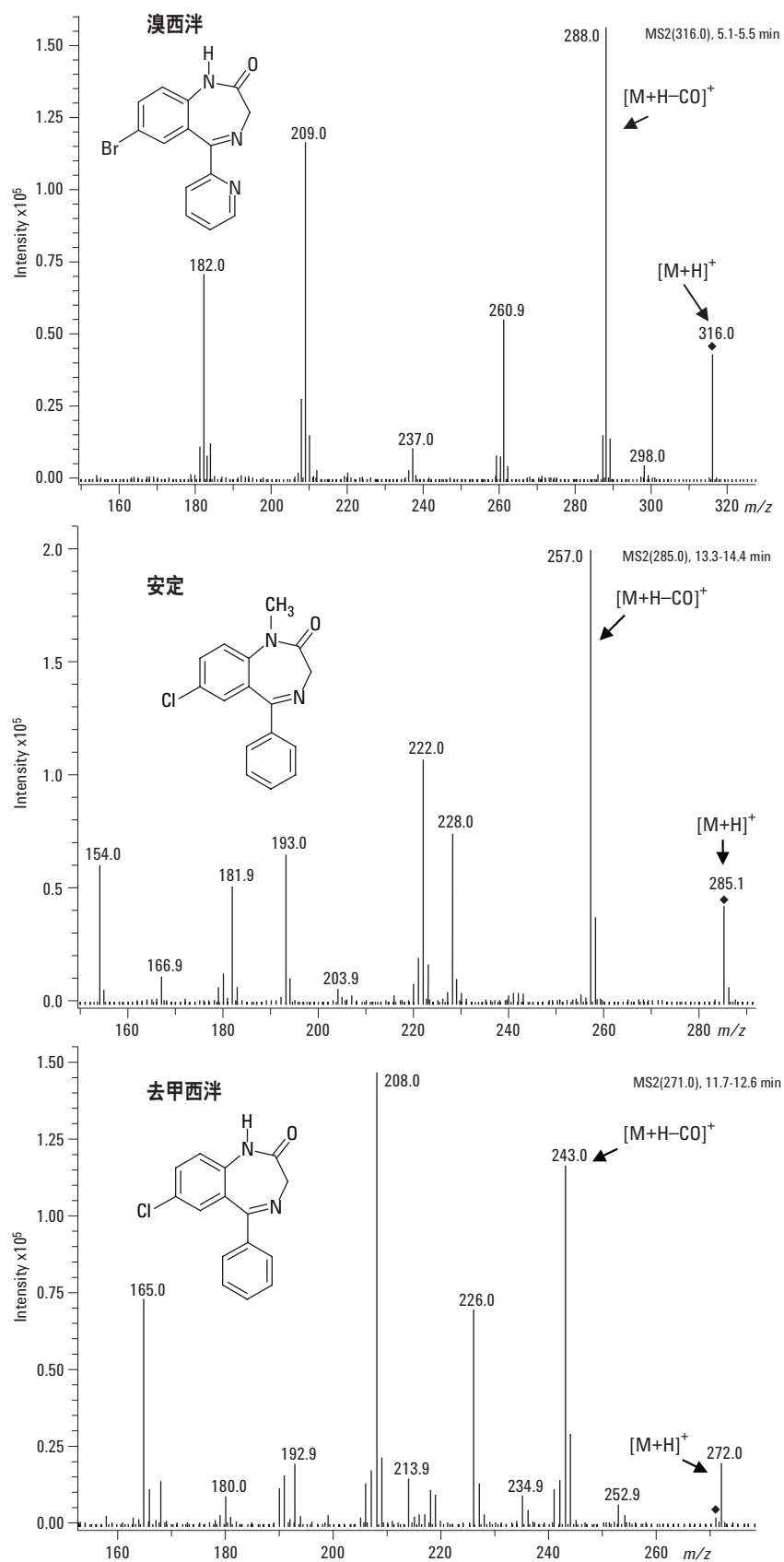


图6. 溴西泮、安定和去甲西泮的结构和MS/MS谱图

图8显示其余苯二氮草类药物的MS/MS谱图，使用

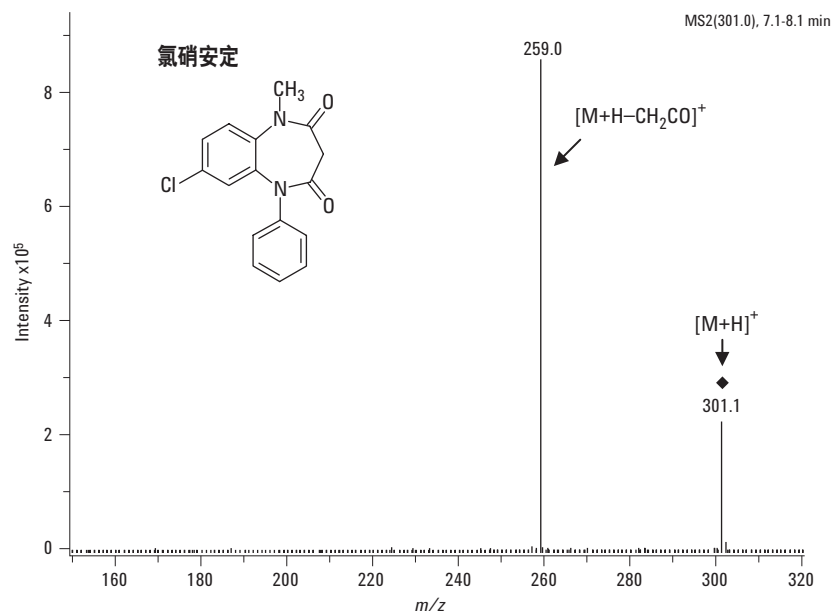


图7. 氯硝安定的结构和MS/MS谱图

Agilent LC/MSD离子阱质谱仪的一个重要功能来获得。在MS/MS质谱方法优化的最初实验中，发现劳拉西泮、去甲羟基安定和羟基安定都有失去水元素的主要子离子。由于这不是可以作为鉴定目的的最特别的丢失，使用下列技术对每个成分获取更信息更丰富的MS/MS谱图。通过加大裂解窗口，从10 u到40 u（以母离子质量为中心 ± 20 u），裂解能量加到 $[M+H]^+$ 和 $[M+H-H_2O]^+$ 离子上，这样的MS/MS谱图极具鉴定特异性。

例如，对羟基安定，在 m/z 283.0裂解导致了丢失水

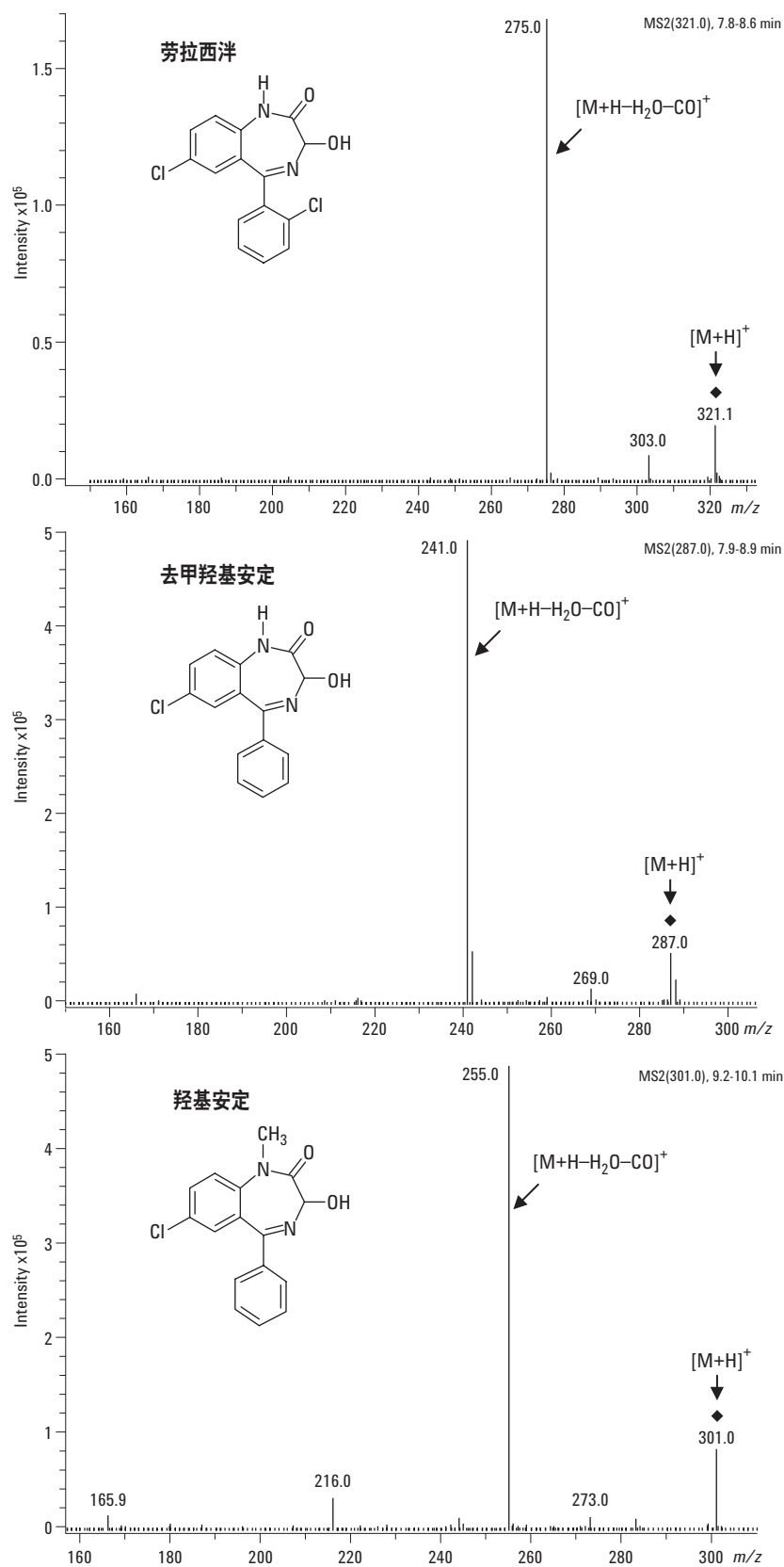


图8. 劳拉西泮、去甲羟基安定和羟基安定的结构和MS/MS谱图

离子，在 m/z 255.0失去水加CO的离子。如果裂解能量不仅加到准分子离子 m/z 301.0，而且通过40 u的裂解窗口加到失去水的离子， m/z 255.0的强度将被增强，从而更有利于测定和鉴定。

应用于法医案例

从各种案例提取的血液样品，包括超剂量复方药物、性暴力受害者和机动车事故受害者，用此LC/MS/MS方法进行分析。许多苯二氮草类药物用此筛查方法被鉴定出，并用后续的GC/ECD或HPLC-UV定量。选择的案例和他们血液药物浓度见表4。

用离子色谱测定案例1中血液样品检测出硝基安定、7-氨基硝基安定、安定、去甲安定和普拉西泮，见图9。

案例中多种药物是不常见的，该方法可以容易地在一

表4. 药物及其在血液中浓度的实例

实例	苯二氮草/代谢物	浓度mg/L
1	硝基安定	0.01
	7-氨基-硝基安定	0.08
	安定	0.33
	去甲西泮	0.32
2	安定	0.06
	氯硝安定	0.009
	7-氨基-氯硝安定	0.02
3	溴西泮	0.40
4	阿普唑仑	0.006
	安定	0.05
	去甲西泮	0.01
5	安定	0.58
	去甲西泮	0.66
	去甲羟基安定	0.04
	羟基安定	0.12
6	氯巴占	0.10

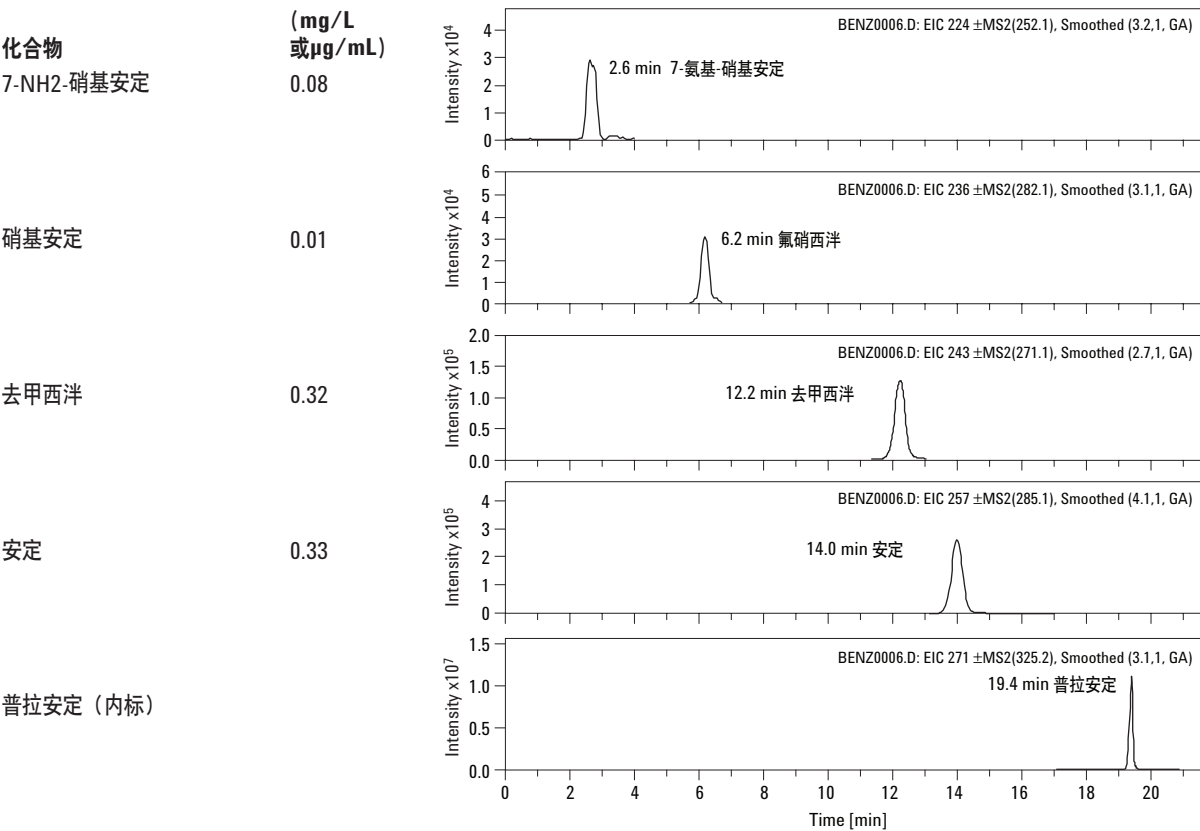


图9. 案例1样品的离子色谱图

次分析中测定、确证和定量多种苯二氮草类药物和代谢物，就象这个案例证实的一样。

典型的空白血样的离子色谱图见图10。注意在案例4（见表4）能够测定0.006 mg/L（6 ng/mL）的阿普西泮，同时可由全扫描MS/MS谱图得到明确鉴定。案例4包括低水平的苯二氮草类药物的测定，阿普西泮在6 µg/L（6 ng/mL）的水平。

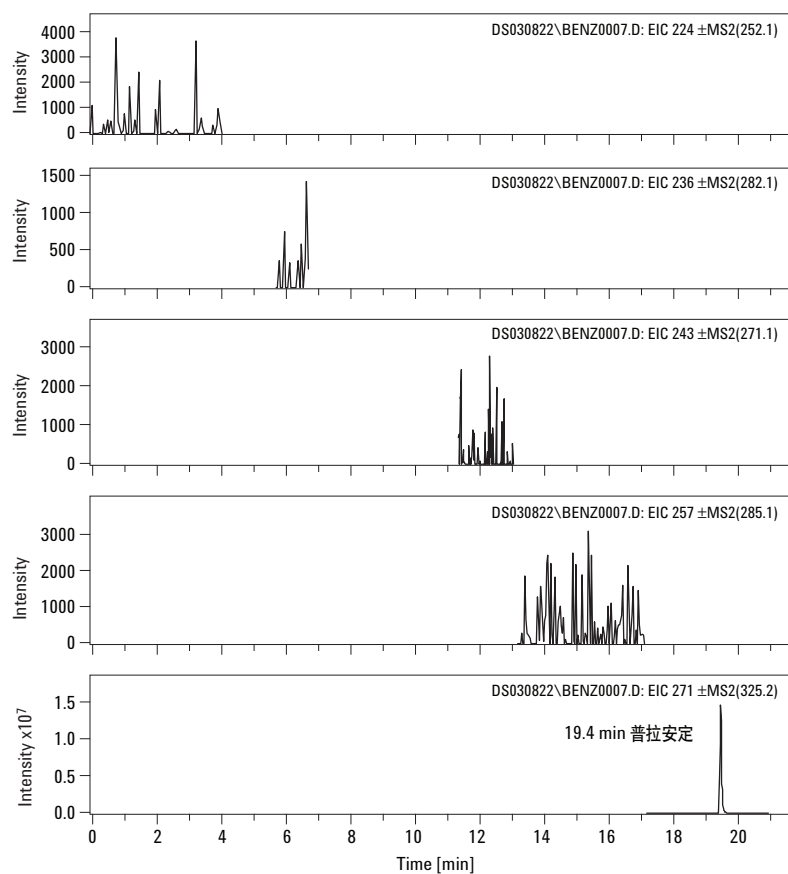


图10. 加入内标的空白血样的离子色谱图

结论

在此介绍的LC/MS/MS方法，为澳大利亚医学广泛使用的苯二氮草类药物及其代谢物的鉴定应用提供了一个分析过程。对现有的GC/MS样品制备过程做了简单改进，并且不需要衍生化。MS/MS谱图为药品提供了高可靠性鉴定技术。该技术适用于筛查分析，仅用500 μ L的血，就能鉴定在最低报道治疗浓度的苯二氮草类药物。表4中的数据和图9说明，该过程能够鉴定实际样品中治疗和亚治疗浓度的苯二氮草类药物。本方法成功用于法医案例中各种低浓度苯二氮草类药物的快速鉴定。

参考文献

1. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, McGraw-Hill, 1996.
2. O. H. Drummer, (2002) *Forensic Sci. Rev.*, **14**, 1.
3. Y. Gaillard, J. Gay-Montchamp and M. Ollagnier, (1993) *J. Chromatogr.* **622**, 197.
4. D. Black, G. Clark, V. Haver, J. Garbin and A. Saxon, (1994) *J. Anal. Toxicol.* **18**, 185.
5. M. Elsohly, S. Feng, S. Salomone and R. Brenneisen, (1999) *J. Anal. Toxicol.* **23**, 486.
6. I. McIntyre, M. Syrjanen, K. Crump, S. Horomidis, A. Peace and O. Drummer, (1993) *J. Anal. Toxicol.* **17**, 202.
7. C. Kratzsch, O. Tenberken, F. T. Peters, A. A. Weber, T. Kraemer and H. H. Maurer, (2004) *J. Mass Spectrom.* **39**, 856–872.
8. H.M. Rivera, G. S. Walker, D. N. Sims, and P. C. Stockham, (2003) *European Journal of Mass Spectrometry*, **9**, 599–607.

关于本文的详细内容，请与安捷伦科技的John Hughes联系。

致谢

特别感谢澳大利亚作者分享他们的方法，并感谢他们在撰写本文的过程中给予的耐心。同时感谢安捷伦同事Michael Zumwalt给予的鼓励和初稿，Jeff Keever给予的审阅和评论。

如需详细信息

如需获得有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明和指标，如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2006

中国印刷
2006年3月
5989-4737CHCN



Agilent Technologies