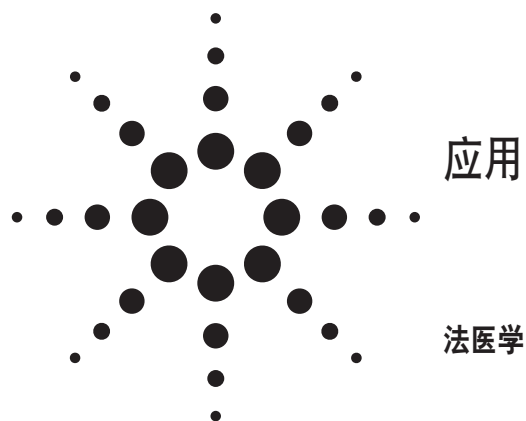


LC/MS/MS 测定唾液中苯二氮草类成分



作者

Christine Moore, Cynthia Coulter, and Katherine Crompton
Immunalysis Corporation
829 Towne Center Drive
Pomona, CA 91767
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112
USA

摘要

本文介绍一种采用 Agilent 6410 三重串联四极杆质谱 (QQQ) 在电喷雾离子化模式下快速、简便且高灵敏地同时分析唾液中苯二氮草类组分的方法。样品制备包括固相萃取、洗脱液的蒸干和流动相复溶定容，然后注入 LC/MS/MS 系统进行分析。据我们所知，本方法首次包括同时监测确认离子且要求所含确认离子与初级离子之比应在一特定比值之内以获得可靠的鉴定结果。Agilent 软件独有的性能可以监测转变并自动计算成比值，该比值必须落在校正标准范围之内才可以认为结果正确。尽管监测确认离子必然会降低监测的灵敏度，但增加结果的可信度对法医学分析而言是更为关键的因素。

引言

在美国苯二氮草类化合物是最常使用的处方药，用于治疗焦虑症和失眠症，特别是老年人群[1]。它们还被用作肌肉松弛剂和抗惊厥剂。由于这类药物经常与其它治疗药物配合使用，在服药后驾驶引起的事故中通常要监测这类成分[2, 3]。在法医学和临床应用的许多领域，越来越多地将唾液用作样品，包括在交通堵塞期间进行路边样品采集。易于采集、难于掺假和适用于常规监测，促使其成为有效的检测样品。然而，由于大多数类别的药物唾液/血浆比值低，专门测定唾液中苯二氮草类成分并不容易。

定量测定唾液中药物的一个主要问题是难于确定采集样品的体积。当前可供使用的许多设备都不能给出采集的唾液的体积，因此，如果不进行进一步的实验室处理，就会使任何定量结果变得没有意义[4,5]。更进一步讲，配备收集垫或材料用于唾液收集的装置在分析之前不能指出每种药物有多少能从垫上回收出来，这也使任何定量结果成为问题。所报道的药物浓度依赖于所使用的样品采集方法[6]。



Agilent Technologies

本文采用 Quantisal 唾液收集器用于收集已知量的纯唾液。为了提高定量结果的可信度，测定了苯二氮草类成分从收集衬垫回收至转运缓冲液中的回收率。

已有几篇文献报道于唾液中苯二氮草类成分的分析结果。Quintela 等[7]采用 LC/MS 法测定了纯唾液中九种苯二氮草类成分。他们测定了本文工作未涉及的氯甲西泮和四氢西泮，但未涉及氯硝西泮、甲氨二氮草、去甲西泮、替马西泮、奥沙西泮、氟西泮和硝西泮。

Oiestad 等的最新文章报道了使用串联 LC 质谱筛选唾液中包括苯二氮草类成分在内的几种药物[8]。他们分析了我们未检测的芬纳西泮和一些苯二氮草代谢物，但他们的研究中未包括常见处方药三唑仑、替马西泮、咪达唑仑、氟西泮或甲氨二氮草。Smink 等[9]采用 LC/MS/MS 分析了尿和唾液中的 33 种苯二氮草类成分。除地西泮的定量限 (LOQ) 报道为 0 ng/mL 外，其它被测物的最低定量限均显著高于本法。在他们的研究中，五种唾液样品检测为阳性；其中两个样品为奥沙西泮（浓度为 18 和 1659 ng/mL），三个样品为阿普唑仑（浓度为 5, 6 和 9 ng/mL）。

在我们的研究中，没有涉及诸如 7-氨基氯硝西泮、7-氨基硝西泮、 α -羟基阿普唑仑、 α -羟基三唑仑或去羟氟西泮等代谢物，因为在唾液中这些药物的原型比代谢物更常处于较高的浓度。然而，我们的研究涉及了诸如去甲地西泮、替马西泮、劳拉西泮和奥沙西泮，因为这些成分都能作为独立的处方药物。

实验部分

材料和方法

唾液收集装置

用于唾液样品收集的 Quantisal 装置由 Immunalysis 公司 (Pomona, CA) 制造。该装置具有一个带体积足量指示物的收集垫，当收集到 1 mL 唾液 ($\pm 10\%$) 时该指示物变成兰色。然后将收集垫放入转运缓冲液 (3 mL) 中，使用于分析的样品总体积为 4 mL (3 mL 缓冲液 + 1 mL 唾液)。这在样品中多种药物呈阳性而可用于分析的样品体积可能成为问题的情况下特别有利。采用 Quantisal 收集装置时，唾液浓度稀释成 1:3，检测出的药物浓度应进行相应调整。

标样和试剂

氘代内标：地西泮-d5、替马西泮-d5、阿普唑仑-d5 和氯硝西泮-d4，以及未标记药物标样：溴西泮、氯硝西泮、硝西泮、三唑仑、阿普唑仑、氟硝西泮、氟西泮、劳拉西泮、咪达唑仑、甲氨二氮草、地西泮、奥沙西泮、去甲地西泮、替马西泮购自 Cerilliant (Round Rock, TX)。混合型固相萃取柱 (CSDAU020) 购自 United Chemical Technologies (Bristol, PA)。

所有溶剂均为液相色谱级或更纯；所有试剂均为 ACS 级，购自 Spectrum Chemical (Gardena, 加拿大)。

校正标样和对照样

校正标样和对照样采用合成唾液制备并用 Quantisal 转运缓冲液稀释。在检测方法建立过程中，从不同批号中选用了多种 Quantisal 收集装置。在本实验中，对于所有校正标样和对照样而言，加入合成唾液中的药物浓度根据稀释倍数进行重新计算。每批样品分析均采用四点校正曲线 (1, 10, 20 和 40 ng/mL) 进行校正，内标浓度为 100 ng/mL。

提取方法

量取 Quantisal 缓冲液 (1 mL)，校正曲线按下列浓度制备：

阴性：	100 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL)
0.5 ng/mL：	100 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL) 12.5 μ L 10 ng/mL 氘代储备液
1 ng/mL：	100 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL) 5 μ L 10 ng/mL 氘代储备液
10 ng/mL：	100 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL) 25 μ L 100 ng/mL 氘代储备液
20 ng/mL：	100 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL) 50 μ L 100 ng/mL 氘代储备液
40 ng/mL：	100 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL) 100 μ L 100 ng/mL 氘代储备液

将磷酸钠缓冲液 (0.1 M, pH 6.0, 1 mL) 加入到缓冲液中，混匀。将萃取柱放在固相萃取装置上，依次采用如下溶剂进行预处理：甲醇 (3 mL)，去离子水 (3 mL) 和 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 6.0, 2 mL)。柱床不要放干。将每个样品倒入萃取柱中，放干，然后用去离子水 (3 mL) 和 1 M 磷酸缓冲液 pH 6.0：乙腈 (80：20；2 mL) 冲洗并放干。再用己烷 (1 mL) 冲洗萃取柱。最后，被测药物采用乙酸乙酯 + 2% 氨水 (2 mL) 洗脱。洗脱液氮气吹干 (20 psi/37 °C) 后重新定容于 50 μ L 水中用于分析。

药物自收集垫上的回收

本文测定了收集系统对苯二氮䓬的提取效率。唾液中加入所有药物的浓度均为 10 ng/mL ($n = 6$)。收集衬垫放入唾液中直到体积足量指示物变蓝，表明已经吸收了 1 mL ($\pm 10\%$) 的唾液。然后将衬垫放入 Quantisal 缓冲液 (3 mL)，盖好并在室温下放置过夜以模拟运送到实验室的过程。次日除去衬垫并根据所述方法取一定量 (1 mL) 试样进行分析。

分析方法

仪器：Agilent 1200 系列 RRLC；6410 LC 三重串联四极杆质谱仪

LC 条件

色谱柱：ZORBAX Eclipse XDB C18 4.6 $\times$ 50 mm $\times$ 1.8 μ m (部件号：922795-902)
直径为 2.1 mm 色谱柱优化流速为 0.2 mL/min，但测定后采用 1 mL/min 流速冲洗。

柱温：35°C

进样体积：5 μ L

溶剂流速：0.2 mL/min

等度洗脱程序：A = 20 mM 甲酸氨 (pH = 8.6)
B = 乙腈
50:50 v/v

时间 (min) 流速 (mL/min)

0 0.2

6.5 0.2

8 1

10 0.2

Post time: 4.5 min

质谱条件

操作模式：电喷雾离子化 (ESI) 正离子模式，使用 Agilent G1948B ESI 源

气体温度：300 °C

气体流速 (N₂): 6 L/min

喷雾器压力：15 psi (推荐压力在 30-40 psi 范围)

毛细管电压：4500 V

在优化的裂解电压和碰撞能量 (CE) 电压下，产生的离子和子离子示于表 1。相应定性离子的值列于括号中。

表 1. 苯二氮䓬类成分数据采集参数

化合物	母离子	子离子	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)
区段 1 (时间 = 0 min)				
溴西洋	316	288 (209)	160	20 (30)
区段 2 (时间 = 4.1 min)				
氯硝西洋-d4	320	274	120	25
氯硝西洋	316	270 (214)	120	25 (35)
劳拉西洋	321	275 (229)	140	25 (35)
硝西洋	282	236 (180)	160	25 (35)
阿普唑仑-d5	314	286	160	25
阿普唑仑	309	281 (274)	160	25 (30)
甲氨二氮䓬	300	283 (227)	120	15 (30)
奥沙西洋-d5	292	246	120	20
奥沙西洋	287	241 (269)	120	20 (20)
三唑仑	343	308 (239)	120	35 (35)

表 1 苯二氮草类成分数据采集参数 (续)

化合物	母离子	子离子	裂解电压 (V)	碰撞能量
区段 3 (时间 = 5.4 min)				
氟硝西洋	314	268 (239)	160	30 (35)
咪达唑仑	326	291 (249)	200	30 (40)
替马西洋-d5	306	260	120	25
替马西洋	301	255 (177)	120	35 (40)
去甲地西洋-d5	276	140	120	30
去甲地西洋	271	140 (165)	160	30 (30)
区段 4 (时间 = 7.2 min)				
地西洋-d5	290	262	160	25
地西洋	285	257 (222)	160	25 (25)
氟西洋	388	315 (288)	160	25 (25)

LC/MS/MS 方法验证

根据标准方案对分析方法进行验证，由此在 5 天内经多次重复实验测定了定量限、线性范围、相关性和日内及日间精密度。验证结果列于表 2。校正曲线斜率不强制通过原点。检测精密度极好，所有药物的日内及日间变异系数 (CV) 均小于 7%。所有药物的定量限为 0.5 ng/mL 纯唾液，等同于 0.125 ng/mL 缓冲溶液。

表 2A. 校正曲线方程和相关系数

药物	线性方程	相关系数 (R ²)
阿普唑仑	$Y = 0.0298x + 0.0114$	0.9995
溴西洋	$Y = 0.0096x - 0.0129$	0.9909
甲氨二氮革	$Y = 0.0146x - 0.0032$	0.9998
氯硝西洋	$Y = 0.0278x - 0.0108$	0.9991
地西洋	$Y = 0.0305x - 0.0004$	0.9996
氟硝西洋	$Y = 0.007x - 0.0002$	0.9999
氟西洋	$Y = 0.2984x - 0.0024$	0.9993
劳拉西洋	$Y = 0.0189x - 0.008$	0.9986
咪达唑仑	$Y = 0.0156x - 0.0143$	0.9960
硝西洋	$Y = 0.0551x + 0.018$	0.9987
去甲地西洋	$Y = 0.011x - 0.0013$	0.9999
奥沙西洋	$Y = 0.0228x - 0.0065$	0.9996
替马西洋	$Y = 0.0149x - 0.0034$	0.9998
三唑仑	$Y = 0.0225x + 0.0073$	0.9995

表 2B. 日间精密度 (10 ng/mL 对照样品; n = 5)

药物	平均回收率 (ng/mL)	SD	精密度 (%)	准确度 (%)
阿普唑仑	9.48	0.19	2.03	105.49
溴西洋	9.72	0.66	6.8	102.88
甲氨二氮革	10.08	0.23	2.26	99.21
氯硝西洋	9.44	0.3	3.14	105.93
地西洋	9.84	0.59	6.04	101.63
氟硝西洋	9.84	0.5	5.11	101.63
氟西洋	9.84	0.49	5.01	101.63
劳拉西洋	8.88	0.33	3.68	112.61
咪达唑仑	9.18	0.54	5.94	108.93
硝西洋	10.48	0.115	1.42	95.42
去甲地西洋	9.9	0.32	3.27	101.01
奥沙西洋	9.94	0.3	3.07	100.6
替马西洋	10	0.3	3	100
三唑仑	9.86	0.25	2.55	101.42

表 2C. 日内精密度 (n = 5)

药物	平均回收率 (ng/mL)	SD	精密度 (%)
阿普唑仑	9.64	0.27	2.80
溴西洋	10.08	0.62	6.13
甲氯二氮草	10.14	0.68	6.71
氯硝西洋	9.18	0.39	4.25
地西洋	9.48	0.69	7.29
氟硝西洋	9.94	0.46	4.64
氟西洋	9.74	0.68	6.95
劳拉西洋	9.24	0.34	3.64
咪达唑仑	9.26	0.30	3.29
硝西洋	10.40	0.46	4.41
去甲地西洋	9.84	0.36	3.71
奥沙西洋	9.58	0.40	4.20
替马西洋	10.12	0.39	3.85

通过对常见药物进行提取和分析研究，发现高浓度不影响本测定方法。图 1 表明阿普唑仑的典型校正曲线，相关系数为 0.9995。各种苯二氮草类成分从收集系统中提取的回收率示于表 3。

表 3. 从唾液收集系统收集并在室温下放置过夜后苯二氮草类成分的回收百分率
(加入 10 ng/mL, n = 6)

药物	平均回收率 (%)	CV (%)
阿普唑仑	86.76	8.85
溴西洋	88.42	14.01
甲氯二氮草	89.41	6.33
氯硝西洋	88.10	2.97
地西洋	82.82	4.42
氟硝西洋	85.10	4.46
氟西洋	81.57	2.85
劳拉西洋	83.44	2.52
咪达唑仑	81.48	5.32
硝西洋	90.17	3.64
去甲地西洋	83.28	3.80
奥沙西洋	84.65	2.82
替马西洋	84.19	2.96
三唑仑	85.45	8.71

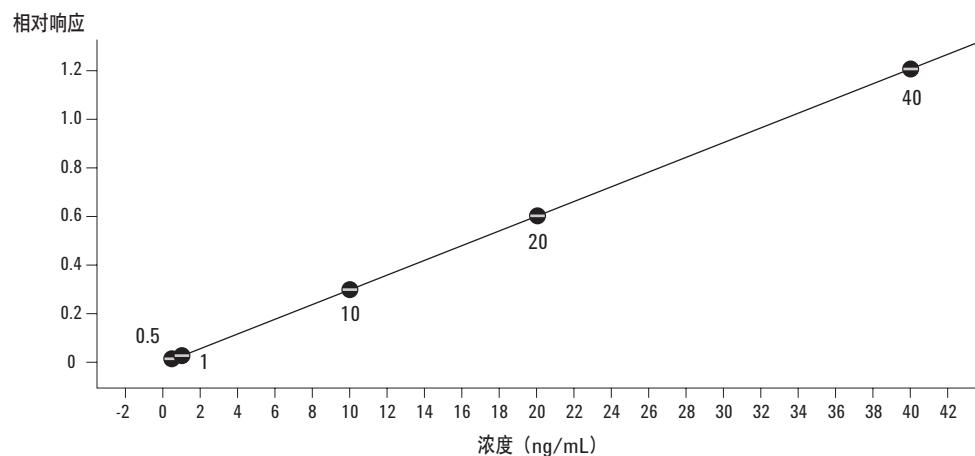


图 1. 测定唾液中阿普唑仑的校正曲线 (0.5, 1, 10, 20 和 40 ng/mL)

结果与讨论

Agilent 的仪器性能使唾液中 14 种苯二氮草类成分在极低浓度下就能被快速测定，满足了测定这些药物的要求。小颗粒分析柱具有的色谱分离能力使四个区段中的每组分成分都得到分离 (图 2)。

另外，Agilent 软件具有独特的能力，可检测母离子的次级转变并自动计算与初级离子的比值。如果该比值不在校正标准的 20% 之内，则鉴定结果被否定。这是 QQQ 质谱仪附加的特性，对于法医学分析极为重要，在这一领域经常要面对法庭对实验室数据提出

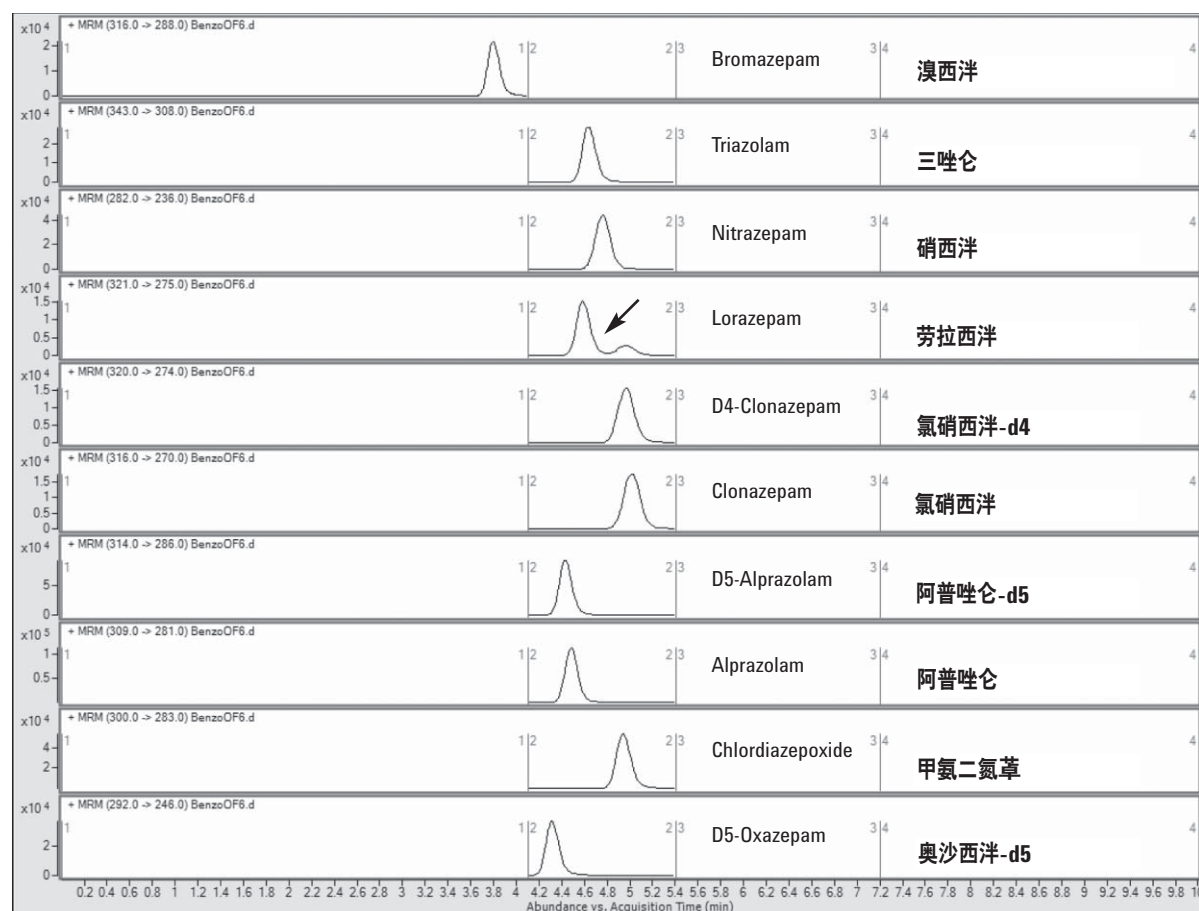


图 2. 唾液中苯二氮草类成分的初步转变

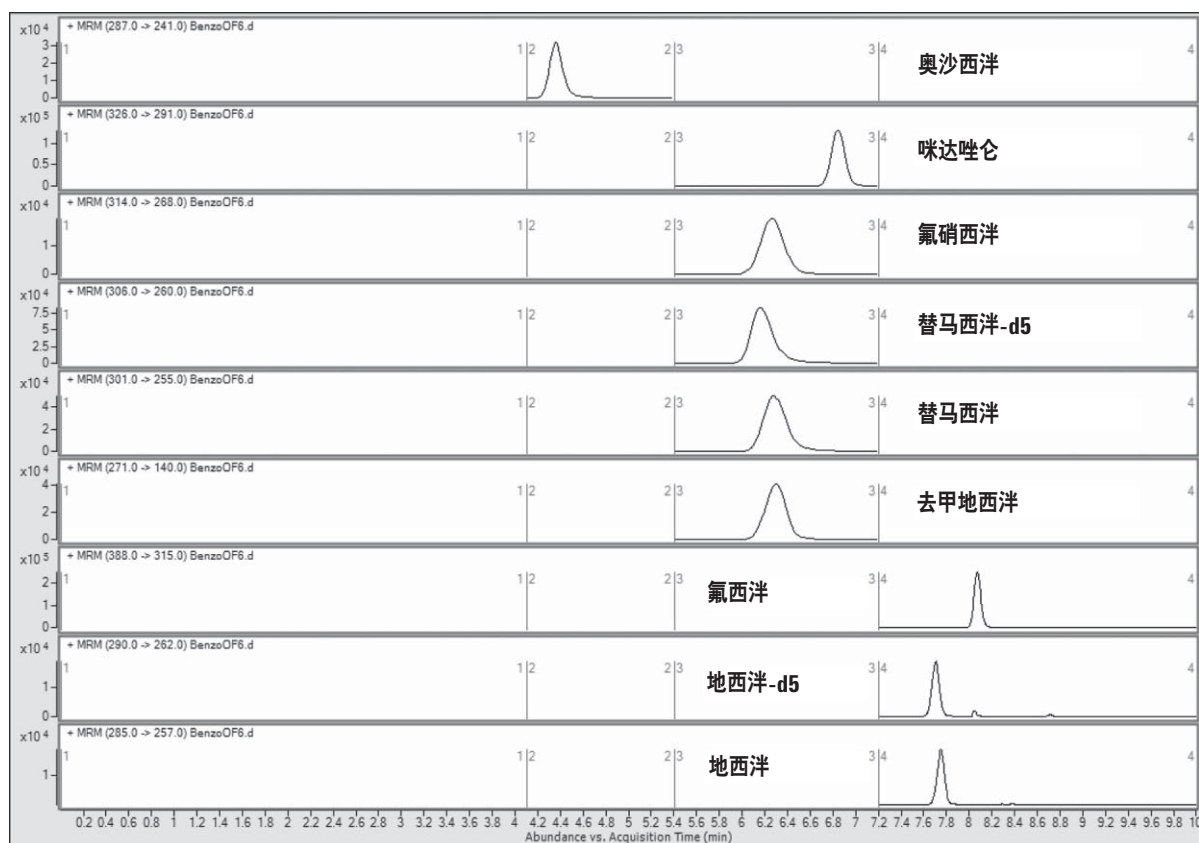


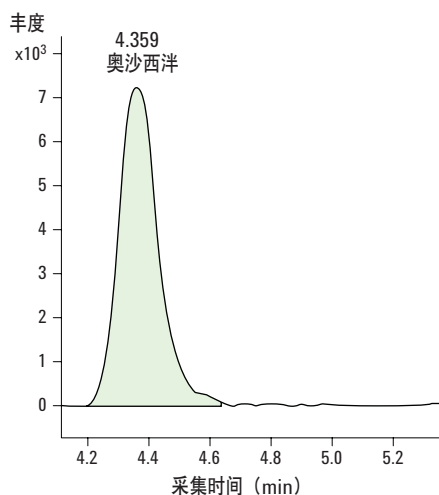
图 2. 唾液中苯二氮草类成分的初步转变 (续)

的挑战。监测次级转变增强了结果的可信度，将比值应用于次级转变与初级子离子对比则进一步强化了唾液中药物的鉴定。软件将此比值图示于色谱窗口，使操作者能够直观地进行评价 (图 3)。

结论

本文介绍的方法适用于运用 Agilent 公司 QQQ LC/MS/MS 系统测定唾液中的苯二氮草类成分。与其它方法相比，检测灵敏度得到显著提高。这是第一个包

+ MRM (287.0 → 241.0) Benzo0F4.d



287 → 241.0, 269.0

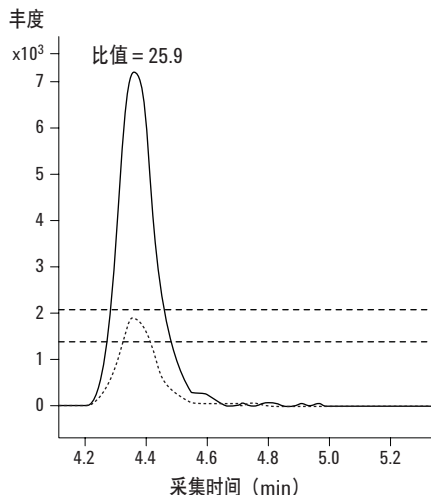


图 3. 从唾液中提取的奥沙西洋(10 ng/mL)

含定性离子的方法，用于唾液中低浓度苯二氮草类成分的鉴定，并成为本实验室常规采用的方法。

作者提示：本文工作已被 *Journal of Analytical toxicology* 接受出版。

参考文献

1. J. M. Cook, R. Marshall, C. Masci, J. C. Coyne, "Physicians' Perspectives on Prescribing Benzodiazepines for Older Adults: A Qualitative Study," *J Gen Intern Med* 22(3): 303–307 (2007)
2. A. W. Jones, A. Holmgren, F. C. Kugelberg, "Concentrations of Scheduled Prescription Drugs in Blood of Impaired Drivers: Considerations for Interpreting the Results," *The Drug Monit* 29(2): 248–260 (2007)
3. E. W. Schwilke, M. I. Sampaio dos Santos, B. K. Logan, "Changing Patterns of Drug and Alcohol Use in Fatally Injured Drivers in Washington State," *J Forens Sci* 51(5): 1191–1198 (2006)
4. C. Moore, D. Lewis, "Comment on Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse: Positive Prevalence Rates by Intercept Immunoassay Screening and GC-MS-MS Confirmation and Suggested Cutoff Concentrations," *J Anal Toxicol* 27(3): 169 (2003)
5. G. F. Kauert, S. Iwersen-Bergmann, S. Toennes, "Assay of Delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC) in Oral Fluid—Evaluation of the OraSure Oral Specimen Collection Device," *J Anal Toxicol* 30(4): 274–277 (2006)
6. P. Kintz, N. Samyn, "Use of Alternative Specimens: Drugs of Abuse in Saliva and Doping Agents in Hair," *Ther Drug Monit* 24(2): 239–246 (2002)
7. O. Quintela, A. Cruz, A. de Castro, M. Concheiro, M. Lopez-Rivadulla, "Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Nine Selected Benzodiazepines in Human Plasma and Oral Fluid," *J Chromatogr* 825: 63–71 (2005)
8. E. L. Oiestad, U. Johnsen, A. S. Christophersen, "Drug Screening of Preserved Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Clin Chem* 53(2): 300–309 (2007)
9. B. E. Smink, M. P. M. Mathijssen, K. J. Lusthof, J. J. de Gier, A. C. G. Egberts, D. R. A. Uges, "Comparison of Urine and Oral Fluid as Matrices for Screening of Thirty-Three Benzodiazepines and Benzodiazepine-Like Substances Using Immunoassay and LC-MS (-MS)," *J Anal Toxicol* 30: 478–485 (2006)

更多信息

欲了解本公司产品和服务的更多信息，请访问本公司网址 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中的错误，及因使用本资料所引发的相关损失不承担责任。

本资料中的信息、说明和性能指标如有更改，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007

中国印刷
2007年8月15日
5989-7201CHCN



Agilent Technologies