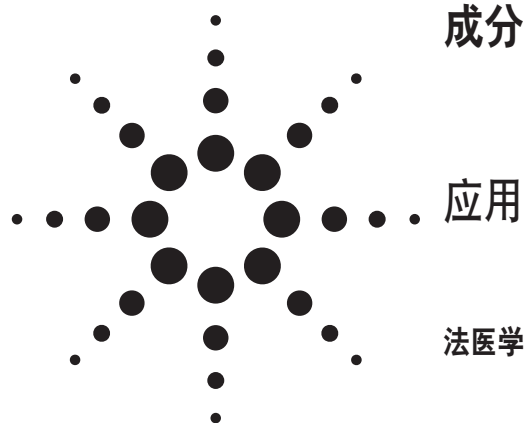


RRHT LC/MS/MS 分析人发中的苯二氮革类成分



作者

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

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

摘要

本文建立并验证了人发中苯二氮革类成分及其代谢物的定量分析方法。人发样品经清洗和消化处理，其中存在的所有药物成分采用混合模式固相萃取和液相色谱-串联质谱 (LC/MS/MS) 在电喷雾正离子化模式下进行检测。液相色谱分离采用粒径为 1.8 μm 的 ZORBAX 快速分离高通量 C18 色谱柱 (RRHT)。

方法验证采用监测两种离子转变和测定其离子比值的方法，该比值应在已知校正标准的 20% 之内。每种化合物测定的浓度范围是 50 ~ 1000 pg/mg 人发。在 100 pg/mg ($n = 5$) 浓度下的日内精密度最低为测定 7-氨基硝西泮时的 1.75%，最高为测定 α -羟基阿普唑仑的 11.8%。日间精密度（每天一次，连续五天）最低为测定地西泮的 2.55%，最高为测定 7-氨基硝西泮的 13.4%。

据我们所知，本方法首次包括了同时监测确认离子，且要求所含确认离子与初级离子的比值应在一个特定的比值之内以获得可靠的鉴定结果。Agilent 软件独有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认为是正确的结果，确认离子在监测时必然抑制测定的灵敏度，但增加结果的可信度对法医学分析而言是一个更为关键的因素。

引言

苯二氮革类化合物是频繁使用的处方药物，用作镇静、抗焦虑、催眠和肌肉松弛剂。当与乙醇或其它药物结合使用时会产生强化效果，因此，常被滥用并表现出潜在的成瘾性。特别是保健从业人员对苯二氮革类药物和鸦片制剂的滥用率比其它药物更高[1]。采用人发作为生物标本，依靠被测人发的长度并与血样或尿样对比可以更好地监控个体的药物使用历史。对于医疗从业人员寻求重获许可或对于那些不得不频繁检测的人员将人发样品纳入检测可能是很有用的。

Scott 和 Nakahara 于 2003 年报道了鼠毛中检测八种苯二氮革类成分能够结合进入人发[2]，而其他文献仅对单一药物进行了报道，如与药物有关的性侵害案中的检测[3]。最近，Miller 等报道了采用免疫检测和 LC/MS/MS 方法对人发中九种苯二氮革成分的测定方法并应用于真实样品的测定。在人发样品中测得的药物浓度范围对地西泮而言从 30 pg/mg 至 200 pg/mg[4] 以上。



Agilent Technologies

本文报道人发中 14 种苯二氮䓬类成分和 5 种代谢物的测定。测定过程包括同时监测确认离子，所含确认离子与初级离子的比值应在一个特定的比值之内以获得可靠的鉴定结果。Agilent 软件的性能使转变可以被监测并自动计算成比值，该比值必须落在校正标准范围之内才可确定为可靠的结果。在一些情况下，监测确认离子转变可能降低检测的灵敏度，但对于法医分析而言，增加结果的可信度是一个更为关键的因素。该方法的定量限为 50 pg/mg 人发；日内精密度 ($n = 5$) 范围从测定 7-氨基氯硝西泮的 1.75% 至测定 α -羟基阿普唑仑的 11.78%，日间精密度 ($n = 5$) 范围从测定地西泮的 2.55% 至测定 7-氨基氯硝西泮的 13.37%。

在另一篇 Agilent 应用报告 (5989-7072 EN) 中已报道血样和尿样中这类化合物的分析方法，读者可参考该报告中给出的这些化合物的结构图。

实验部分

样品制备

溶剂和试剂

所有溶剂均为 HPLC 级或更高纯度的溶剂；所有试剂均为 ACS 级并购自 Spectrum Chemical (Gardena, CA)。

标样 (购自 Cerilliant, Round Rock, TX)

混合内标：7-氨基氟硝西泮-d7，阿普唑仑-d5，氯硝西泮-d4，替马西泮-d5，奥沙西泮-d5，去甲地西泮-d5，地西泮-d5 (100ng/mL)。

未标记物：7-氨基氟硝西泮，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，去羟氟西泮，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，氯氮䓬，地西泮，奥沙西泮，去甲地西泮，替马西泮。

提取方法

对于每一级定量校正水平，人发试样 (10 mg) 采用二氯甲烷 (1.5 mL) 直接冲洗以除去人发上的护发成分，如摩丝、喷发胶、发胶等，晾干。将人发试样剪成小段，按下列要求加入被测物和氘代内标物。

校正曲线：

阴性：	50 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL)
50 pg/mg:	50 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL), 5 μ L 100 ng/mL 储备液
100 pg/mg:	50 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL) 10 μ L 100 ng/mL 储备液
500 pg/mg:	50 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL), 50 μ L 100 ng/mL 储备液
1 ng/mg:	50 μ L 氘代储备液 (100 ng/mL), 100 μ L 100 ng/mL 储备液

在方法验证研究中使用的能力实验样品也要加入氘代内标物 (50 μ L)

加入人发提取缓冲液 (0.025 M 磷酸缓冲液，pH 2.7, 1.5 mL)；混合

超声振荡 (2 小时，75 °C)；

倾泻出液体，加入 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0, 1 mL)；涡旋，

将固相萃取柱 (CSDAU020) 放在固相萃取装置上。

柱预处理：

甲醇 (3 mL)

去离子水 (3 mL)

0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 6.0, 2 mL)。

重要提示：不要使柱床放干。

将样品通过萃取柱，放干。

按下列顺序冲洗萃取柱：

去离子水（3 mL）
0.1 M 磷酸缓冲液 pH 6.0：
乙腈（80 : 20；2 mL）
放干萃取柱；用己烷冲洗（1 mL）

药物洗脱：乙酸乙酯 + 2% 氨水（2 mL）

氮气吹干（20 psi/37 °C）

重新溶于水（50 µL），转至自动进样瓶，盖好。

分析方法

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

LC 条件：

色谱柱：ZORBAX RRHT Eclipse XDB C18，
4.6 mm × 50 mm × 1.8 µm
（部件号：922975-902），

即使流速为 0.2 mL/min，氟硝西泮、硝西泮和氯硝西泮的 7-氨基代谢物也能从分析柱上快速洗脱下来。对这三个代谢物进行梯度和流速优化也未得到满意的色谱分离。随后建立了一个持续仅 3.5 分钟的单独方法，仅用于监测这三个代谢物。通过建立两种方法，大大改进了色谱分离并提高了灵敏度。尽管作者（CM）使用 4.6 mm 直径色谱柱也获得了良好的结果，但 Agilent 还是将填料为 1.8 µm 的 2.1 mm 内径色谱柱作为正常推荐产品，以便在所采用的流速下提高灵敏度。

仅用于 7-氨基代谢物：

柱温：45 °C
溶剂流速：0.6 mL/min
流动相：A = 20 mM 甲酸铵，pH 8.6
B = 乙腈等度洗脱，35% B
Stop time: 3.5 min
Post time: Off

苯二氮草类（除 7-氨基代谢物）：

柱温：35 °C
溶剂流速：0.2 mL/min

流动相：A = 20 mM 甲酸铵，pH 8.6
B = 乙腈等度洗脱，50% B

时间（分）流速（mL/min）
0 0.2
6.5 0.2
8 1
10 0.2

Stop time = 10 min; Post time = 5 min

MS 条件

操作模式：电喷雾 ESI 正离子化模式
7-氨基代谢物 其它苯二氮草成分
气体温度：350 °C 300 °C
气体流速 (N₂)：6 L/min 6 L/min
喷雾器压力：20 psi 50 psi
毛细管电压：4000 V 4500 V

多反应监测（MRM）示于图 1。对于所有化合物，第一级四极杆用于母离子的分离，在低分辨率下操作，即半峰宽（FWHM）等于 2.5 amu。最后一级四极杆用于子离子在单位分辨率下操作，即 FWHM = 0.7 amu。

给出的保留时间与用于定量方法的相同。对于每个化合物需要优化两个参数，包括裂解（Frag）电压和碰撞能量（CE），以电压为单位表示。裂解器是离子传输光学系统的组成部分，位于离子源和质量分析器之间，负责传输特定质量的化合物母离子。对于每一个化合物都要采用相应标准物质的流动注射分析进行该参数的优化，通过改变裂解电压，确定最佳裂解电压值。

裂解电压一经优化完成，就要确定碰撞能量电压以保证定量离子和定性离子得到最佳响应。定量离子就是所有子离子中信号响应最强的离子。定性离子即为次强响应的子离子，依据其与定量离子峰面积比值用于确证化合物。

表 1. 本文中用于苯二氮草类成分分析的多反应检测 (MRM)

化合物	RT (min)	MRM 转变	Frag (V)	CE (V)
仅为 7-氨基代谢物				
7-氨基氟硝西洋-d7	1.102	291 > 263	120	25
7-氨基氟硝西洋	0.94	286 > 222 (121)	200	25 (25)
7-氨基硝西洋	0.95	252 > 121 (208)	120	30 (35)
7-氨基氟硝西洋	1.104	284 > 226 (256)	160	30 (25)
其它苯二氮草类成分:				
区段 1 (0.0 min)				
α-羟基三唑仑	3.71	359 > 331 (176)	120	25 (25)
α-羟基阿普唑仑	3.72	325 > 297 (216)	120	30 (35)
溴西洋	3.85	316 > 288 (209)	160	20 (30)
区段 2 (4.1 min)				
奥沙西洋-d5	4.40	292 > 246	120	20
奥沙西洋	4.44	287 > 241 (269)	120	20 (20)
阿普唑仑-d5	4.57	314 > 286	160	25
阿普唑仑	4.63	309 > 281 (274)	160	25 (30)
劳拉西洋	4.67	321 > 275 (229)	140	25 (35)
三唑仑	4.79	343 > 308 (239)	120	35 (35)
硝西洋	4.85	282 > 236 (180)	160	25 (35)
氯氮草	5.07	300 > 283 (227)	120	15 (30)
氯硝西洋-d4	5.07	320 > 274	120	25
氯硝西洋	5.12	316 > 270 (214)	120	25 (35)
区段 3 (5.6 min)				
替马西洋-d5	6.34	306 > 260	120	25
替马西洋	6.43	301 > 255 (177)	120	35 (40)
氟硝西洋	6.44	314 > 268 (239)	160	30 (35)
去甲地西洋	6.46	271 > 140 (165)	160	30 (30)
咪达唑仑	7.05	326 > 291 (249)	200	30 (40)
区段 4 (7.4 min)				
地西洋-d5	7.78	290 > 262	160	25
地西洋	7.83	285 > 257 (222)	160	25 (25)
氟西洋	8.08	388 > 315 (288)	160	25 (25)

* () 定性离子; 定性离子比值必须小于校正点的 20%

LC/MS/MS 方法学验证

分析方法通过标准方案进行验证, 包括线性范围、相关性和五天内多次重复 (n = 5) 测定得到的日内精密度和日间精密度。校正曲线必须通过原点。校正曲线的典型方程和相关系数 (R²) 示于表 2; 检测的日间精密度和准确度示于表 3。此外, 检测的日内精密度和准确度示于表 4。本检测方法在选择的

100 pg/mg 含量水平上适应性好, 精密且准确; 线性范围为 50 ~ 1000 pg/mg。所有药物的日内和日间精密度均小于 20%, 而大多数苯二氮草类成分的变异系数小于 10%。

图 1 表明测定尿中奥沙西洋的典型校正曲线 (R² > 0.9996)。

表 2. 测定人发中苯二氮革类成分的线型、相关系数和允许的定性比值

被测物	线性方程	相关系 (R ²)	定性比值 (20% 范围)
7-氨基氯硝西洋	$y = 0.0013x$	0.9984	69.4 (55.5–83.3)
7-氨基硝西洋	$y = 0.0112x$	0.9678	8.6 (6.9–10.3)
7-氨基氯硝西洋	$y = 0.0027x$	0.9978	84.5 (67.6–101.4)
α -羟基阿普唑仑	$y = 0.0001x$	0.9992	51.7 (41.4–62.0)
α -羟基三唑仑	$y = 0.000073x$	0.9964	95.5 (76.4–114.6)
阿普唑仑	$y = 0.001x$	0.9999	15.6 (12.5–18.7)
溴西洋	$y = 0.00035x$	0.9974	61.3 (49.0–73.6)
氯氮革	$y = 0.0004x$	0.9996	91.3 (73.0–109.6)
氯硝西洋	$y = 0.0015x$	0.9999	30.1 (24.1–36.1)
地西洋	$y = 0.0012x$	0.9987	76.0 (60.8–91.2)
氟硝西洋	$y = 0.00038x$	0.9946	56.5 (45.2–67.8)
氟西洋	$y = 0.0011x$	0.9998	11.9 (9.5–14.3)
劳拉西洋	$y = 0.00005x$	0.9832	34.5 (27.6–41.4)
咪达唑仑	$y = 0.00064x$	0.9994	31.2 (25.0–37.4)
硝西洋	$y = 0.00026x$	0.997	47.7 (38.1–57.2)
去甲地西洋	$y = 0.00036x$	0.9955	59.6 (47.7–71.5)
奥沙西洋	$y = 0.001x$	0.9996	26.0 (20.8–31.2)
替马西洋	$y = 0.00045x$	0.9987	39.1 (31.3–46.9)
三唑仑	$y = 0.00036x$	0.9998	75.2 (60.2–90.2)

表 3. 测定人发中苯二氮革类成分的日间精密度平均值、标准偏差 (SD) 精密度 (CV) 和准确度 (100 pg/mg 标准试样, n = 5)

被测物	平均值	SD	CV (%)	准确度 (%)
7-氨基氯硝西洋	103.38	13.80	13.35	96.73
7-氨基硝西洋	93.72	11.54	12.31	106.70
7-氨基氯硝西洋	101.50	13.57	13.37	98.52
α -羟基阿普唑仑	105.56	3.23	3.06	94.73
α -羟基三唑仑	106.38	3.91	3.67	94.00
阿普唑仑	97.70	6.77	6.93	102.35
溴西洋	98.78	5.42	5.49	101.24
氯氮革	95.24	9.07	9.52	105.00
氯硝西洋	101.66	5.59	5.50	98.37
地西洋	100.38	2.56	2.55	99.62
氟硝西洋	100.52	12.24	12.18	99.48
氟西洋	96.98	11.44	11.80	103.11
劳拉西洋	107.72	12.38	11.50	92.83
咪达唑仑	97.18	6.38	6.57	102.90
硝西洋	107.90	7.03	6.51	92.68
去甲地西洋	106.14	5.25	4.95	94.22
奥沙西洋	100.28	11.33	11.30	99.72
替马西洋	97.56	4.66	4.78	102.50
三唑仑	103.52	10.82	10.45	96.60

表 4. 测定人发中苯二氮草类成分的日内精密度平均值、标准偏差、精密度和准确度
(100pg/mg 标准试样, n = 5)

被测物	平均值	SD	CV (%)	准确度 (%)
7-氨基氯硝西洋	99.78	5.43	5.44	100.22
7-氨基硝西洋	107.73	12.28	11.40	92.83
7-氨基氯硝西洋	110.58	1.94	1.75	90.43
α -羟基阿普唑仑	93.24	10.99	11.78	107.25
α -羟基三唑仑	97.00	5.13	5.29	103.09
阿普唑仑	97.72	4.28	4.38	102.33
溴西洋	93.00	7.13	7.66	107.53
氯氮革	91.36	7.00	7.66	109.46
氯硝西洋	92.98	5.32	5.72	107.55
地西洋	102.32	3.70	3.62	97.73
氟硝西洋	106.24	4.87	4.59	94.13
氟西洋	87.98	4.98	5.66	113.66
劳拉西洋	99.86	5.39	5.40	100.14
咪达唑仑	94.52	6.79	7.18	105.80
硝西洋	104.48	6.63	6.35	95.71
去甲地西洋	107.38	5.32	4.96	93.13
奥沙西洋	91.62	9.29	10.14	109.15
替马西洋	93.66	3.12	3.33	106.77
三唑仑	107.80	5.05	4.68	92.76

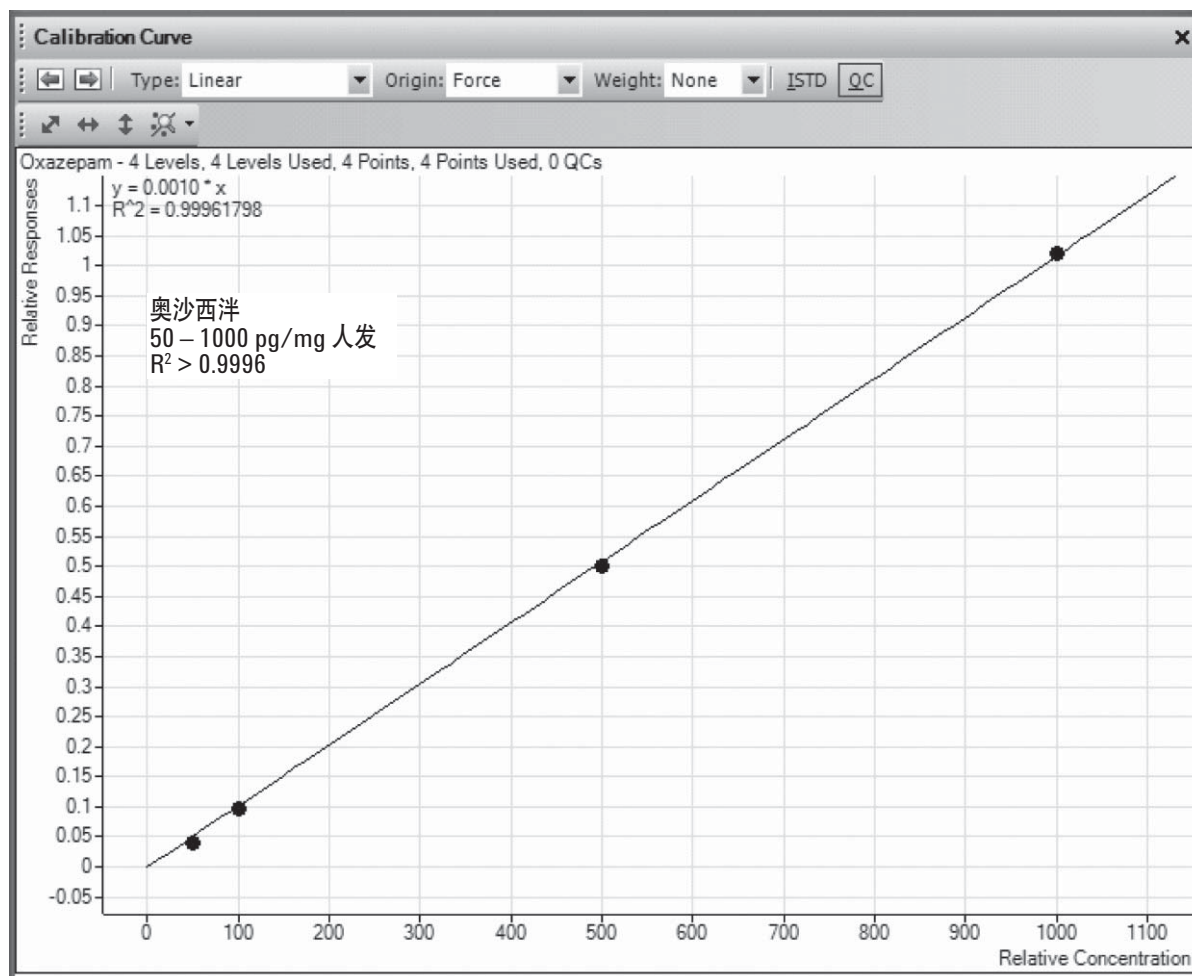


图 1. 采用线性拟合、强制过原点和无权重下奥沙西洋的校正曲线

结果与讨论

Agilent 的仪器性能能够进行人发中 14 种苯二氮草类成分和 5 种代谢物的快速测定。在小粒径分析柱上进行的色谱分离能使每个区域的一组色谱峰分开（图 2）。代谢物 7-氨基硝西泮、7-氨基氟硝西泮和 7-氨基氯硝西泮在此 LC 条件下分离效果差，所以这三种成分在另一个快速测定条件下（3.5 min）进行分析。

图 3 表明人发中确实存在含量为 50 pg/mg 的咪达唑仑。在本工作中用于验证的要求是定量离子与定性离子的峰面积比值必须在预期比值的 $\pm 20\%$ 允许范围内。对于本校正浓度，预期比值为 31%，处于测定的允许范围 35% 之内。

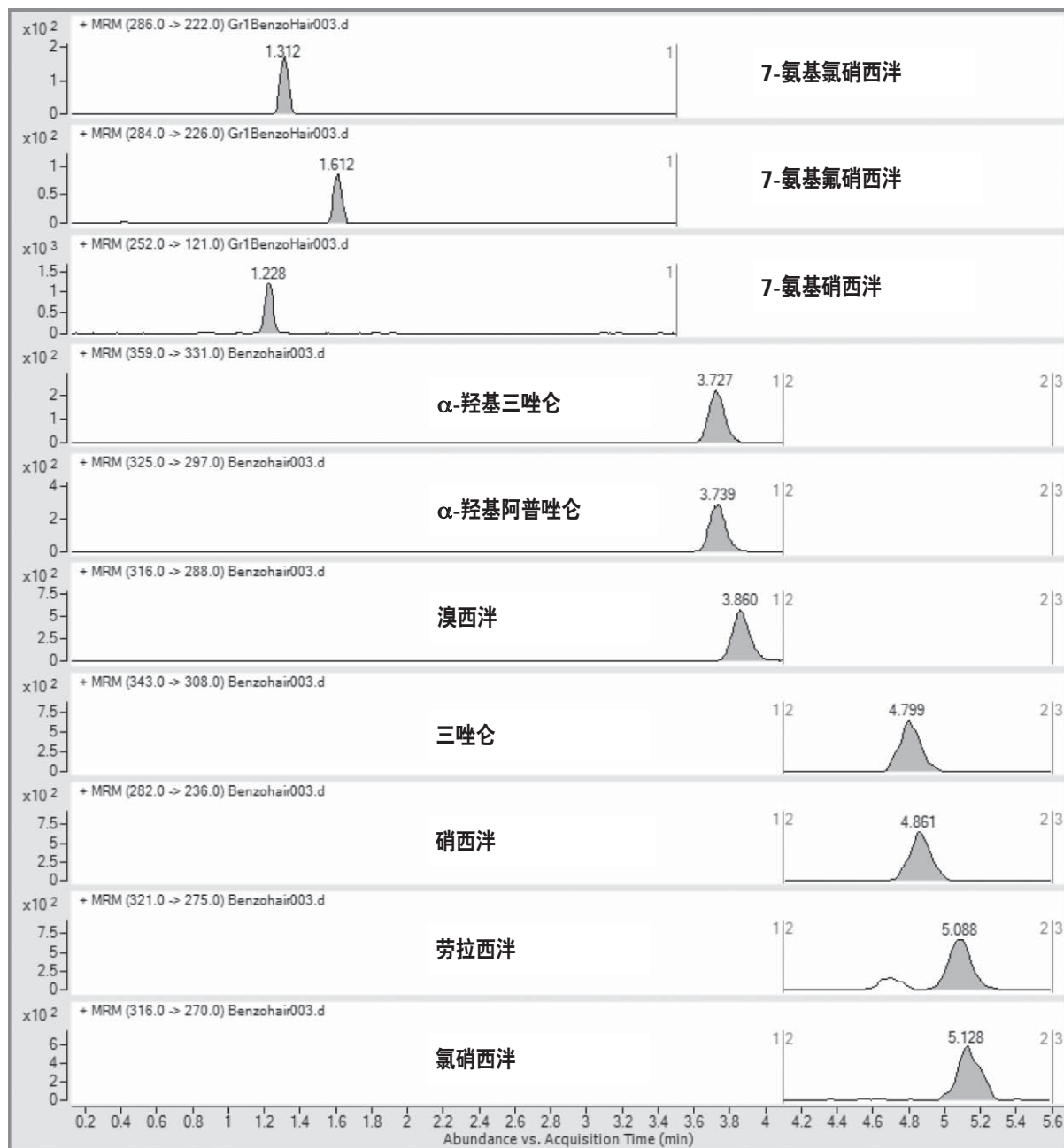


图 2. 从人发中提取的苯二氮草类成分 (100pg/mg): 初级转变 (定量离子)

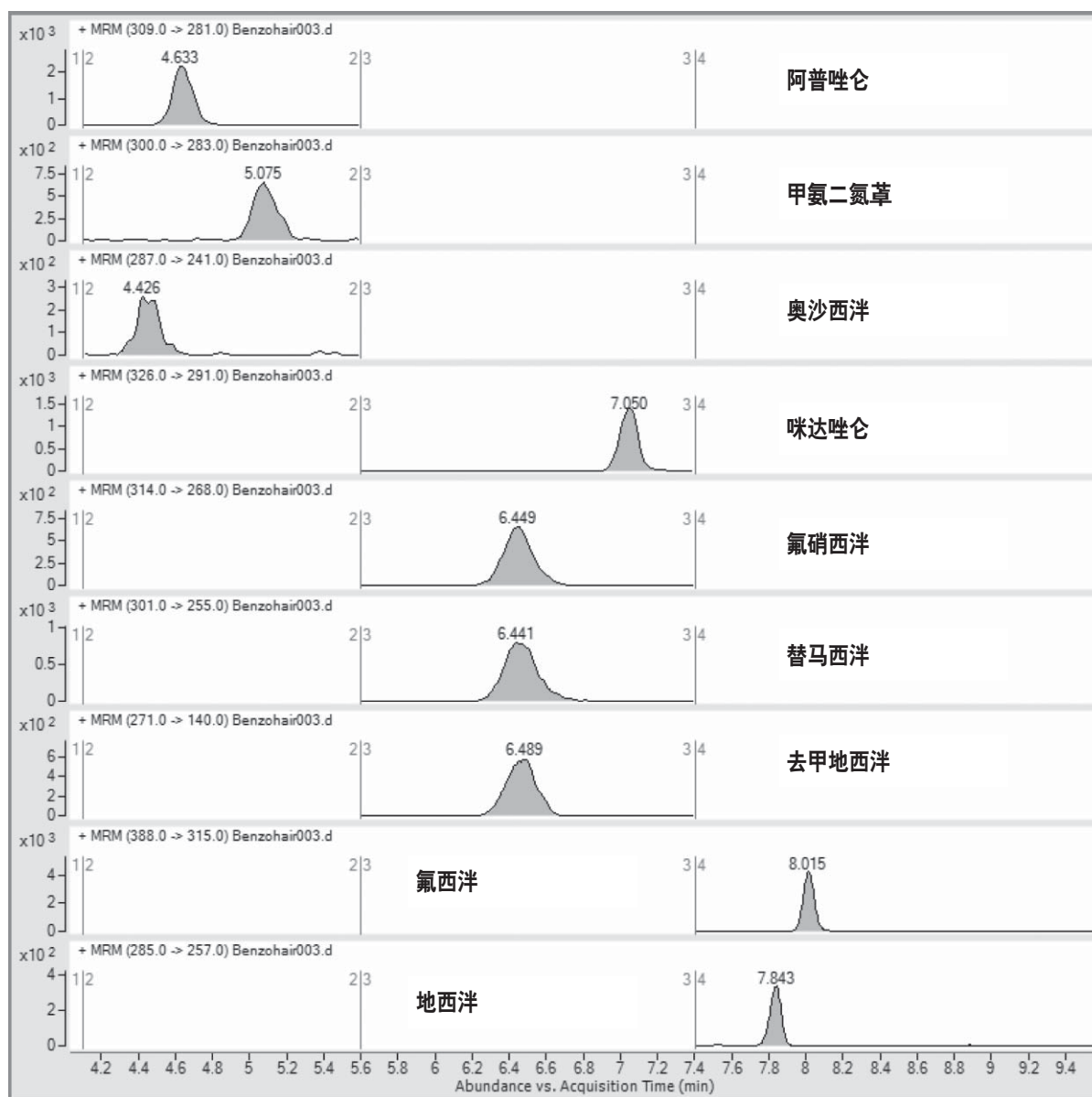


图2. 从人发中提取的苯二氮草类成分 (100pg/mg): 初级转变 (定量离子) (续)

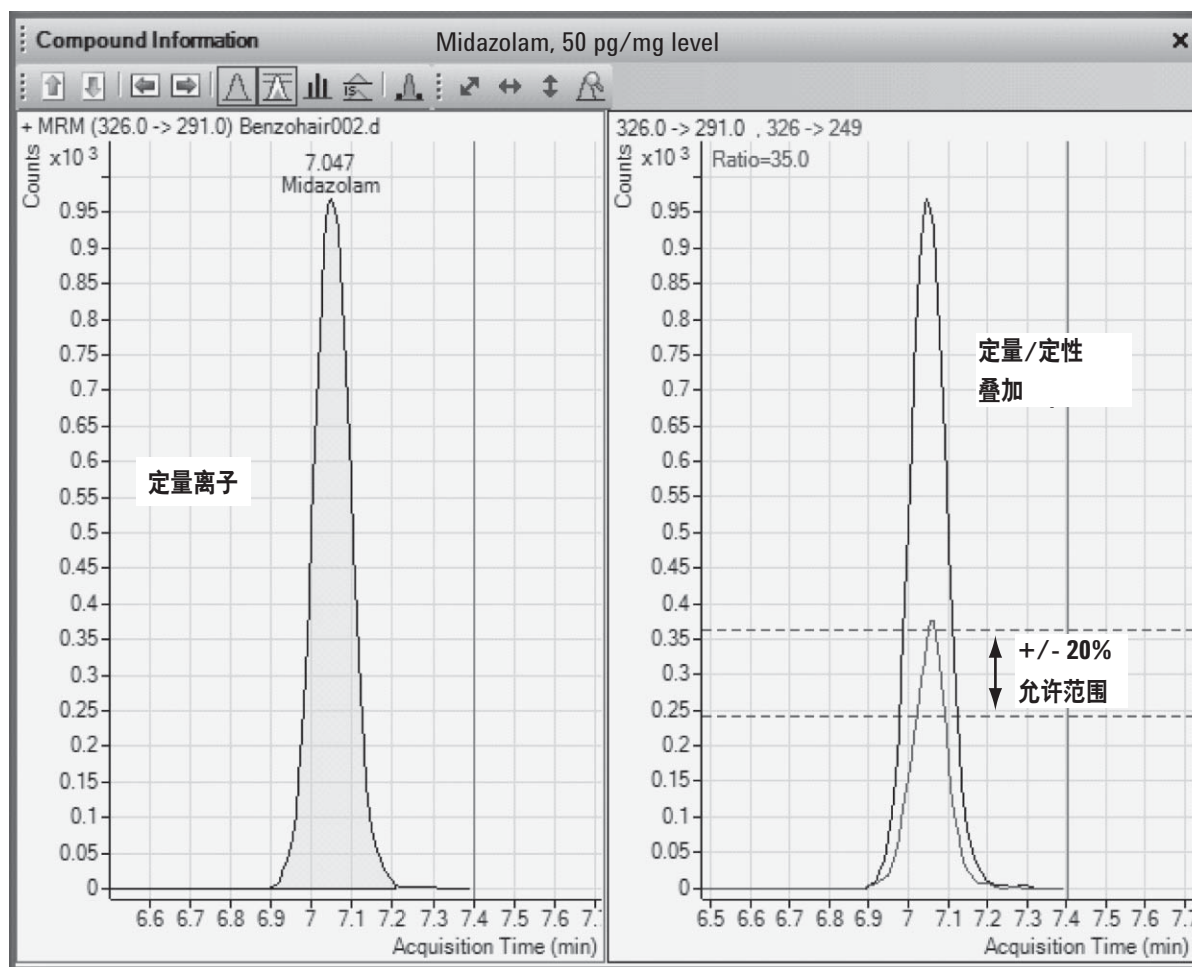


图 3. 证实咪达唑仑存在所使用的定性定量离子峰面积比值

结论

本文所述方法适用于采用 Agilent 科技公司的三重串联四极杆 LC/MS/MS 系统进行人发中苯二氮卓成分的测定。就我们所知，本方法首次要求定性转变强度与初级转变强度之比必须处于一个特定比值之内。

参考文献

1. M. R. Baldisseri, "Impaired Healthcare Professional," *Crit Care Med* 35(2): S106-116 (2007)
2. K. S. Scott and Y. Nakahara, "A Study into the Rate of Incorporation of Eight Benzodiazepines into Rat Hair," *Forens Sci Int* 133: 47-56 (2003)

3. P. Kintz, M. Villain, M. Cheze, and G. Pepin, "Identification of Alprazolam in Hair in Two Cases of Drug-Facilitated Incidents," *Forens Sci Int* 153: 222-226 (2005)
4. E. I. Miller, F. M. Wylie, and J. S. Oliver, "Detection of Benzodiazepines in Hair Using ELISA and LC-ESI-MS-MS," *J Anal Toxicol* 30(7): 441-448 (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 5 月
5989-7270CHCN



Agilent Technologies