

代谢分析

实时直接分析串联质谱法检验血液和尿液中 12 个苯二氮䓬类药物*

刘富邦^{1,2}, 张瑛^{2**}, 王继芬^{1**}, 周沛龙³, 侯晓龙¹

(1. 中国人民公安大学侦查学院, 北京 100038; 2. 北京市公安司法鉴定中心, 法庭毒物分析公安部重点实验室, 北京 100192; 3. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 优化并建立一种快速检验血液和尿液中 12 个苯二氮䓬类药物的实时直接分析串联质谱(direct analysis of real time, DART-MS/MS)方法, 使其能够用于法医毒物检验工作。方法: 使用 DART 离子源与 API4000 Q Trap 质谱仪联用; 装载 DART 12Dip-It™ 自动进样模块, 模块移动速度为 $0.6 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 进样量为 $5 \mu\text{L}$, 栅极电压为 200 V; 质谱部分在正离子模式下使用多反应监测(MRM)模式扫描监测。进一步优化 DART-MS/MS 条件后建立的方法经过方法学验证, 并应用于实际案例检材。结果: 选用乙酸乙酯为萃取剂进行液液萃取, 优化载气加热器温度; 该方法选择性良好, 无延迟效应; 线性关系良好, 血液和尿液中目标物检测限分别在 $0.5 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.2 \sim 2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限分别在 $1 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.5 \sim 5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 回收率在 78.8%~119.0%, 基质效应在 -17.5%~18.5%; 高、中浓度的日内、日间精密度与重复性不大于 14.4%, 定量限不大于 18.1%。结论: 该方法快速简便, 灵敏度良好, 可应用于毒物快速检验研究与工作, 提高检验效率。
关键词: 实时直接分析; 血液; 尿液; 苯二氮䓬类药物; 快速检验

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)06-0960-12
doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.06.06

Determination of 12 benzodiazepines in blood and urine by DART-MS/MS method*

LIU Fu-bang^{1,2}, ZHANG Ying^{2**}, WANG Ji-fen^{1**},
ZHOU Pei-long³, HOU Xiao-long¹

(1. Forensic Science Service of Beijing Public Security Bureau, Key Laboratory of Forensic Toxicol, Ministry of Public Security, Beijing 100192, China; 2. School of Criminal Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China; 3. Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish and optimize a rapid direct analysis of real time tandem mass spectrometry (DART-MS/MS) method for the rapid detection of 12 benzodiazepines in blood and urine that can be used in forensic toxicology work. **Methods:** A DART ion source was used in conjunction with an API4000 Q Trap mass spectrometer. A DART 12Dip-It™ autosampling module with a module travel speed of $0.6 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, a sample volume of $5 \mu\text{L}$, and a gate voltage of 200 V were applied. The mass spectrometry section scans in positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) mode. After further optimization, the DART-MS/MS method

* 公安部科技强警基础工作专项项目(2021JC32)资助

** 通信作者 张瑛 Tel:13910513989; E-mail:13910513989@139.com

王继芬 Tel:13691409863; E-mail:wangjifen58@126.com

第一作者 Tel:13468037657; E-mail:ppsuc17d155@126.com

was validated and applied to real case samples. **Results:** Ethyl acetate was selected as the extractant for liquid-liquid extraction and the temperature of the carrier gas heater was optimized. The method has good selectivity and does not interfere with delayed effects. The linearity was good, and the limits of detection (LODs) for the targets in blood and urine were in the ranges of $0.5 - 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.2 - 2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. And the limits of quantification (LOQs) were in the ranges of $1 - 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.5 - 5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The recoveries ranged from 78.8% to 119%, and the matrix effects ranged from -17.5% to 18.5%. The intra- and inter-day precisions were not greater than 14.4% for the high and intermediate concentrations, and not greater than 18.1% at the limits of quantification. This method enables fast and accurate examination of case samples.

Conclusion: The method is fast and convenient, with good sensitivity, and can be applied to the research and work of rapid detection of toxicants to improve the efficiency of detection.

Keywords: direct analysis of real time; blood; urine; benzodiazepines; rapid detection

苯二氮草类药物是一类与 GABA-A 受体相互作用产生安眠镇静效果的中枢神经系统抑制剂^[1-2], 该类药物的副作用相对较小且种类繁多, 在患有失眠、焦虑等神经系统症状的患者群体中流传甚广。但苯二氮草类药物的快速安眠镇静功效与一定的成瘾性, 使得其易出现在自杀、抢劫、迷奸、药驾等各类案件中^[3-5]。

在摄入苯二氮草类药物后, 原药会经人体的吸收出现在服药者的血液和尿液中, 原药经肝脏代谢后也会产生代谢物, 有些代谢物可以比原药在人体中保存时间更长, 因此可作为代谢标志物同时进行检测^[6]。如地西洋经代谢可能产生的去甲西洋同少量的替马西洋与奥沙西洋是具有精神活性的苯二氮草类药物^[7]。同时检测几种相关的苯二氮草类药物也可以更准确地推断服用药物的种类与时间。

目前检验苯二氮草类药物的生物基质主要是血液和尿液, 生物基质中苯二氮草类药物的检验方法主要是气相色谱-质谱联用法^[8-9]与液相色谱-质谱联用法^[10-12]。Banaszkiewicz 等^[8]使用液液萃取前处理后, 结合气相色谱-串联质谱法建立了血液中 28 个苯二氮草类物质的检验方法, 检测限 (limit of detection, LOD) 与定量限 (limit of quantification, LOQ) 分别为 $0.09 \sim 0.66 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Szabolcs 等^[10]使用固相萃取法处理样品后采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法检验血液和尿液中 40 个苯二氮草类物质与 3 个其他安眠药物, 所建立的方法经过了充分验证并对 300 多个样本进行了常规分析, 分析效果令人满意。

实时直接分析串联质谱法 (direct analysis of real time-tandem mass spectrometry, DART-MS/MS) 是

将实时直接分析 (direct analysis of real time, DART) 电离源与串联质谱联用, 实现分析物的实时、快速、准确分析, 目前在药毒物分析领域已经有一些应用^[13-17]。Ji 等^[13]使用沉淀蛋白法与 DART-MS/MS 相结合建立了血液中 23 个合成大麻素的快速、简便、有效的检验方法。而 Liu 等^[14]在固相萃取法处理血浆后使用 DART-MS/MS 检测地西洋, 实现了仅需 $25 \mu\text{L}$ 血浆的定量检验。

本文以血液和尿液中 12 个苯二氮草类药物为检验目标, 利用 DART-MS/MS 法, 实现了较为快速、简便、绿色的分析检验。建立的方法得到了充分验证与实践应用, 可用于提高公安实战中案件的检验效率。

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器

API4000 Q Trap 四极杆-线性离子阱质谱与电喷雾离子源 (AB Sciex 公司); 实时直接分析离子源 (Ion Sense 公司); 漩涡混合器 (Talboys 公司); SIGMA 3-30K 高速冷冻离心机 (Sigma 公司)。

1.2 试剂与样品

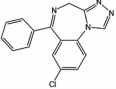
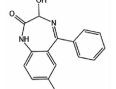
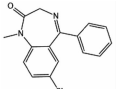
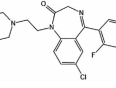
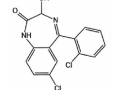
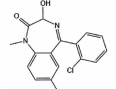
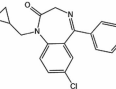
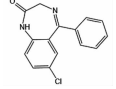
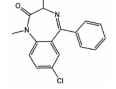
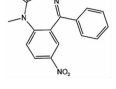
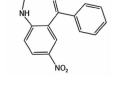
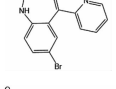
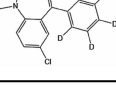
对照品普拉西洋、地西洋、去甲西洋、硝西洋、艾司唑仑、劳拉西洋、氟西洋、奥沙西洋、硝甲西洋、溴西洋、替马西洋、氯甲西洋和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地西洋-D₅ 内标溶液购自上海原思标物科技有限公司, 纯度 $\geq 99\%$ 。表 1 为苯二氮草类药物与内标物的相关信息。

乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、正己烷、无水乙醚 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇 (色谱纯, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司)。

血液: 北京市公安司法鉴定中心提供; 尿液: 健康志愿者提供。

表 1 内标物与 12 个苯二氮䓬类药物的化学信息与质谱参数

Tab. 1 Chemical information and mass spectrometric parameters of internal standard and 12 benzodiazepines

序号 (No.)	化合物 (compound)	CAS 号 (CAS number)	分子式 (molecular formula)	结构式 (structural formula)	母离子 (parent ion) m/z	子离子 (daughter ions) m/z	去簇电压 (declustering potential)/V	碰撞能量 (collision energy)/eV
1	艾司唑仑 (estazolam)	29975-16-4	$C_{16}H_{11}ClN_4$		295.1	205.1/267.0*	109	56/35
2	奥沙西洋 (oxazepam)	604-75-1	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$		287.2	104.0*/241.3	91	49/31
3	地西洋 (diazepam)	439-14-5	$C_{16}H_{13}ClN_2O$		285.1	154.1/193.1*	104	37/45
4	氟西洋 (flurazepam)	17617-23-1	$C_{21}H_{23}ClFN_3O$		388.2	315.1*/317.1	83	33/27
5	劳拉西洋 (lorazepam)	846-49-1	$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$		321.2	228.9/275.1*	89	42/31
6	氯甲西洋 (lormetazepam)	848-75-9	$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$		335.1	177.2/289.1*	90	63/30
7	普拉西洋 (prazepam)	2955-38-6	$C_{19}H_{17}ClN_2O$		325.2	140.0/271.0*	100	54/32
8	去甲西洋 (nordazepam)	1088-11-5	$C_{15}H_{11}ClN_2O$		271.1	140.1*/165.1	110	40/39
9	替马西洋 (temazepam)	846-50-4	$C_{16}H_{13}ClN_2O$		301.2	177.1/255.2*	80	55/30
10	硝甲西洋 (nimetazepam)	2011-67-8	$C_{16}H_{13}N_3O_3$		296.2	221.2/250.1*	101	48/35
11	硝西洋 (nitrazepam)	146-22-5	$C_{15}H_{11}N_3O_3$		282.1	180.1/236.1*	102	53/35
12	溴西洋 (bromazepam)	1812-30-2	$C_{14}H_{10}BrN_3O$		316.0	182.2*/209.1	93	46/38
13	地西洋-D ₅ (内标) [diazepam-D ₅ (internal standard)]	65854-76-4	$C_{16}H_8D_5ClN_2O$		290.2	154.1/198.3*	111	39/44

注 (note): *. 定量离子 (quantitative ions)

2 方法与结果

2.1 离子源条件与质谱条件

该方法使用 DART 离子源, 通过 VAPUR 接口

与质谱联用, 离子源载气出口与质谱接口入口的距离为 1.6 cm。使用 DART 12Dip-It™ 自动进样模块, 进样时使用移液器移取待测样品溶液 5 μL

至玻璃棒底端,模块移动速度为 $0.6 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。DART 电离模式为正离子模式,进样检测时使用氦气作为载气,待机时使用氮气作为载气。DART 的气体流速默认为 $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,放电时栅极电压为 200 V 。经优化将载气加热器温度确定为 $400 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

质谱使用 API4000 Q Trap 四极杆-线性离子阱

质谱仪。扫描模式为正离子模式,电喷雾电压为 5 kV ,入口电压为 10 V ,碰撞出口电压为 14 V 。使用多反应监测(MRM)模式,每个离子的驻留时间(dwel time)为 50 ms ,其他参数默认。各目标物离子质荷比、去簇电压和碰撞能量等优化后的参数如表 1 所示。典型谱图如图 1 所示,可见本法具有同时检测该 13 个物质的能力。

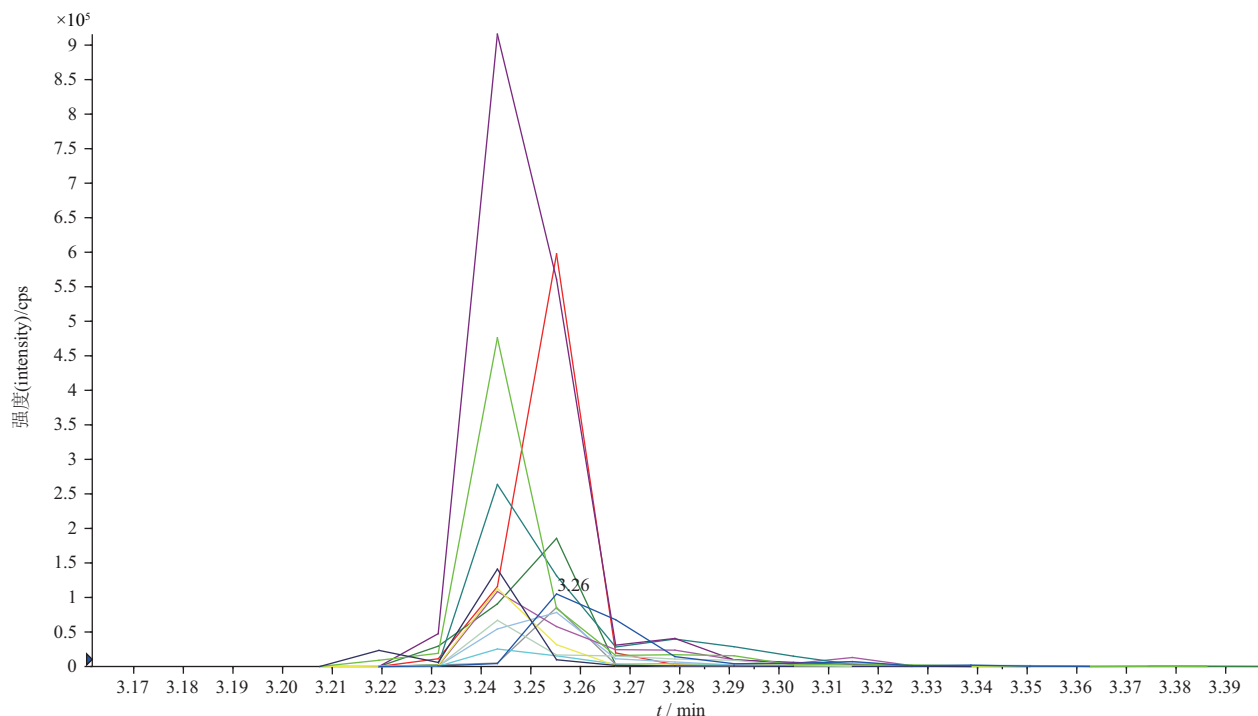


图 1 12 个苯二氮䓬类药物的同时检测质谱图

Fig. 1 Simultaneous detection of 12 benzodiazepines by mass spectrometry

2.2 溶液配制与样品处理

分别称取苯二氮䓬类对照品 5 mg 置于 5 mL 量瓶中,使用甲醇稀释并定容成为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准储备液。根据实验需要使用甲醇稀释配制成其他浓度标准溶液。取 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地西洋-D₅内标溶液使用甲醇稀释 10 倍,制备成 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地西洋-D₅内标溶液备用。

方法学验证中的各浓度添加样品通过将混合标准溶液与空白基质(血液或尿液)以 1:4 的比例混合并振荡混匀制备。

向离心管中加入血液或尿液样品 $300 \text{ } \mu\text{L}$ 和 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地西洋-D₅溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$,涡旋振荡 30 s ,再加入蛋白沉淀剂或萃取剂 $690 \text{ } \mu\text{L}$,涡旋振荡 30 s 后超声(频率 40 kHz ,功率 1 000 W) 5 min ,以 $14 \text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心 5 min 后提取上清液供仪

器分析。通过考察基质效应和回收率确定乙酸乙酯为最佳萃取溶剂。

2.3 数据分析

数据使用 Analysis 1.5.2 (AB SCIEX 公司)软件查询并输出,主要使用 Microsoft Excel (Microsoft 公司,美国)软件处理。使用 SPSS Statistics 26.0 (IBM 公司,美国)软件进行方差齐性检验和线性回归。

2.4 方法学评价

2.4.1 选择性与延迟效应 使用该方法检测空白血液和尿液样品与加入内标的空白样品溶液,未发现明显待测物信号。检测 $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 血液和尿液标准溶液后紧接着检测空白血液和尿液样品,未发现存在待测物信号。因此该方法选择性良好,不存在延迟效应干扰。选择性与延迟效应实验中空白基质样品的代表性谱图如图 2 所示。

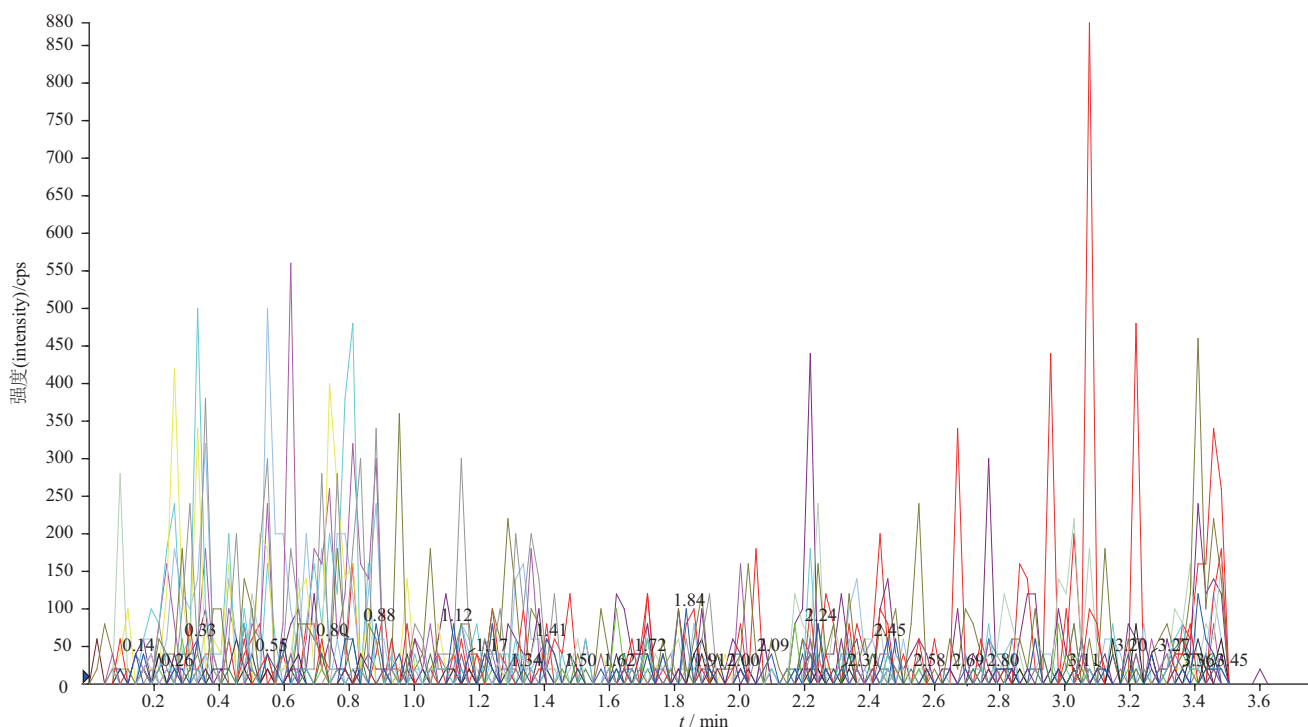


图2 空白基质样品的代表性谱图

Fig. 2 Representative spectra of blank matrix samples

2.4.2 线性关系、LOD 与 LOQ 按照“2.2”项方法制备 1 000、500、200、100、50、20、10、5、2、1、0.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度血液和尿液标准样品,每个浓度制备 6 个样品并按照“2.1”项方法进行检测,待测物与内标峰面积之比的平均值,用 $1/X$ 作为权重系数进行加权线性回归,得回归方程与相关系数 (r),结果见表 2。

按照“2.2”项方法制备 0.2、0.1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低浓度添加供试溶液各 3 份,使信噪比 $S/N \geq 10$ 为 LOQ, $S/N \geq 3$ 为 LOD, LOD 和 LOQ 结果见表 2,该方法检测血液和尿液中 12 个苯二氮草类药物的质量浓度在 0.5 ~ 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.3 基质效应与回收率 准备 6 个不同来源的空白血液和尿液,一组配制高、低 2 种浓度的添加样品,前处理后检测;第二组先对空白血液和尿液进行前处理,再添加相同量对照品后检测;第三组配制同浓度的标准溶液并进样检测。 A 为对照品的峰面积与内标峰面积的比值, a 为第一组, b 为第二组, c 为第三组,回收率 = $A_a/A_b \times 100\%$,基质效应 = $(A_b/A_c - 1) \times 100\%$ 。按照上述方法计算后得该方法检测血液与尿液中 12 个苯二氮草类药物的基质效应与回收率及 RSD,见表 3。由表 3 可得,用该方法检测

血液中 12 个苯二氮草类药物时回收率为 78.8% ~ 119%,基质效应为 -17.5% ~ 18.5%;而检测尿液中 12 个苯二氮草类药物时回收率为 82.2% ~ 107%,基质效应为 -13.9% ~ 13%,基质效应与回收率的 RSD 均不大于 13.9%,显然回收率和基质效应均符合定量的方法学验证要求。

2.4.4 精密度与重复性 采用 LOQ、中、高 3 种浓度的添加样品,在早、中、晚分别进样检测,同样的操作连续进行 5 d。使用同一天早、中、晚 3 个时间段的样品检测结果计算 RSD,考察日内精密度;使用连续 5 d 的样品检测结果计算 RSD,考察日间精密度;使用同批次的 6 个样品数据计算 RSD 考察重复性。血液与尿液中 12 个苯二氮草类药物的精密度及重复性信息如表 4 所示。

由表 4 可得血液和尿液中高、中浓度的 12 个苯二氮草类药物的日内、日间精密度与重复性均小于等于 14.4%,LOQ 处的日内、日间精密度与重复性均小于等于 18.1%,符合定量分析的稳定性要求。

2.5 案例应用

使用 DART-MS/MS 分析了疑似摄入苯二氮草类药物的 64 个真实案件检材,其中在 18 个案件检材中检出艾司唑仑等苯二氮草类药物。典型案例阳性

表 2 血液和尿液中 12 个苯二氮草类药物的线性关系、LOD 和 LOQ

Tab. 2 Linear relationships, LODs and LOQs of 12 benzodiazepines in blood and urine

基质 (matrix)	药物 (drug)	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	LOD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
血液 (blood)	艾司唑仑 (estazolam)	0.01 ~ 1	$Y = 7.102X + 0.0161$	0.9980	5	10
	奥沙西洋 (oxazepam)	0.02 ~ 1	$Y = 0.471X + 0.0092$	0.9904	10	20
	地西洋 (diazepam)	0.005 ~ 1	$Y = 9.582X + 0.0329$	0.9933	2	5
	氟西洋 (flurazepam)	0.001 ~ 0.5	$Y = 69.76X + 0.02040$	0.9965	0.5	1
	劳拉西洋 (lorazepam)	0.01 ~ 1	$Y = 2.961X + 0.03820$	0.9906	5	10
	氯甲西洋 (lormetazepam)	0.01 ~ 1	$Y = 9.509X + 0.04470$	0.9955	5	10
	普拉西洋 (prazepam)	0.01 ~ 1	$Y = 16.22X + 0.1009$	0.9916	5	10
	去甲西洋 (nordazepam)	0.05 ~ 1	$Y = 2.398X - 0.003200$	0.9994	10	50
	替马西洋 (temazepam)	0.005 ~ 1	$Y = 16.74X + 0.01510$	0.9949	2	5
	硝甲西洋 (nimetazepam)	0.005 ~ 1	$Y = 5.858X + 0.005100$	0.9970	2	5
	硝西洋 (nitrazepam)	0.02 ~ 1	$Y = 2.969X + 0.008300$	0.9963	10	20
	溴西洋 (bromazepam)	0.01 ~ 1	$Y = 2.268X - 0.008900$	0.9940	2	10
尿液 (urine)	艾司唑仑 (estazolam)	0.002 ~ 1	$Y = 11.74X + 0.009300$	0.9939	0.5	2
	奥沙西洋 (oxazepam)	0.005 ~ 1	$Y = 1.137X - 0.003000$	0.9909	2	5
	地西洋 (diazepam)	0.002 ~ 1	$Y = 9.842X + 0.006900$	0.9940	0.5	2
	氟西洋 (flurazepam)	0.0005 ~ 0.5	$Y = 25.28X + 0.002800$	0.9945	0.2	0.5
	劳拉西洋 (lorazepam)	0.005 ~ 0.5	$Y = 11.38X + 0.002300$	0.9918	2	5
	氯甲西洋 (lormetazepam)	0.001 ~ 0.5	$Y = 10.63X + 0.02050$	0.9933	0.5	1
	普拉西洋 (prazepam)	0.001 ~ 1	$Y = 19.78X + 0.01400$	0.9958	0.5	1
	去甲西洋 (nordazepam)	0.005 ~ 1	$Y = 2.940X + 0.003200$	0.9922	1	5
	替马西洋 (temazepam)	0.002 ~ 1	$Y = 18.21X - 0.002900$	0.9943	0.5	2
	硝甲西洋 (nimetazepam)	0.001 ~ 1	$Y = 6.599X + 0.005600$	0.9952	0.2	1
	硝西洋 (nitrazepam)	0.002 ~ 1	$Y = 6.938X + 0.01370$	0.9954	1	2
	溴西洋 (bromazepam)	0.002 ~ 1	$Y = 2.658X + 0.003000$	0.9964	0.5	2

表 3 12 个苯二氮草类药物在血液与尿液中的基质效应与回收率及 RSD

Tab. 3 Matrix effects, recoveries and RSDs of 12 benzodiazepines in blood and urine

基质 (matrix)	药物 (drug)	浓度 (concentration)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均回收率 (mean recovery)/ %	平均基质效应 (mean matrix effect)/%	回收率 RSD (RSD of recovery)/%	基质效应 RSD (RSD of matrix effect)/%
血液 (blood)	艾司唑仑 (estazolam)	500	96.4	-9.1	10.9	11.4
		50	82.8	-3.1	6.1	11.7
	奥沙西洋 (oxazepam)	500	84.7	-10.9	10.7	6.0
		50	80.7	-12.2	4.3	7.7
	地西洋 (diazepam)	500	102.7	3.6	11.4	4.9
		50	97.1	-3.9	13.0	12.3
	氟西洋 (flurazepam)	500	119.0	18.5	7.8	4.6
		50	103.3	8.1	12.6	10.3
	劳拉西洋 (lorazepam)	500	83.1	-6.3	10.0	11.2
		50	81.5	-13.4	9.7	7.3
	氯甲西洋 (lormetazepam)	500	93.8	-4.2	12.3	8.4
		50	84.3	-9.7	9.2	11.9

表 3(续)

基质 (matrix)	药物 (drug)	浓度 (concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	平均回收率 (mean recovery)/ %	平均基质效应 mean matrix effect)/%	回收率 RSD (RSD of recovery)/%	基质效应 RSD (RSD of matrix effect)/%
尿液 (urine)	普拉西泮 (prazepam)	500	95.9	14.7	9.3	4.6
		50	86.2	3.7	13.8	9.6
	去甲西泮 (nordazepam)	500	98.2	-6.4	12.2	10.8
		50	81.7	-9.9	5.1	11.4
	替马西泮 (temazepam)	500	89.9	-3.8	8.0	8.8
		50	90.1	-8.9	11.9	12.4
	硝甲西泮 (nimetazepam)	500	97.7	-0.7	13.4	12.3
		50	86.0	-16.9	9.0	9.6
	硝西泮 (nitrazepam)	500	81.4	-14.7	9.5	10.2
		50	79.6	-11.9	4.9	9.7
	溴西泮 (bromazepam)	500	87.4	-17.5	13.1	10.5
		50	78.8	-9.2	5.1	9.9
	艾司唑仑 (estazolam)	500	93.7	-5.0	7.9	11.2
		50	87.5	2.5	7.4	8.7
	奥沙西泮 (oxazepam)	500	95.1	5.9	11.1	12.3
		50	95.2	9.7	11.6	8.8
	地西泮 (diazepam)	500	101.1	-1.8	12.7	12.2
		50	98.1	-1.5	10.6	5.9
	氟西泮 (flurazepam)	500	101.2	-1.0	13.9	12.3
		50	93.9	13.0	13.3	10.0
	劳拉西泮 (lorazepam)	500	107.0	-8.5	11.8	13.3
		50	94.1	5.6	10.1	9.6
	氯甲西泮 (lormetazepam)	500	93.4	-5.8	12.3	9.3
		50	82.2	-0.50	7.2	13.7
	普拉西泮 (prazepam)	500	88.4	0.30	12.9	10.8
		50	95.7	1.4	9.8	11.8
	去甲西泮 (nordazepam)	500	93.9	-13.9	6.3	13.8
		50	92.1	8.7	5.6	12.2
	替马西泮 (temazepam)	500	99.4	-13.5	11.6	12.7
		50	95.1	0.60	11.3	11.7
硝甲西泮 (nimetazepam)	500	86.1	-13.6	11.0	8.7	
	50	86.8	-11.3	11.9	10.0	
硝西泮 (nitrazepam)	500	92.2	-12.5	11.3	13.2	
	50	93.9%	12.0%	13.8%	9.8%	
溴西泮 (bromazepam)	500	95.0%	-5.6%	11.4%	11.1%	
	50	82.9%	3.7%	6.4%	9.4%	

检测结果图如图 3 所示。在使用 DART - MS/MS 法检验后,又使用高效液相色谱 - 高分辨质谱 (HPLC - HRMS) 进行了检验以验证 DART - MS/MS 法的检验结果准确度。结果证明,使用 DART - MS/MS 方法与 HPLC - HRMS 法所得结果相似,以液质联用法为标准方法,DART - MS/MS 法定量结果的偏

差在 -12.1% ~ 17.1%。由 201 及 202 号检材的检验结果可知,HPLC - HRMS 法检测地西泮与去甲西泮的 LOQ 略低,但 DART - MS/MS 法的灵敏度已足够用于日常案件的快速检验,且更加快速、简便、环保。相关阳性案件检材的具体检验结果如表 5 所示。

表 4 12 个苯二氮䓬类药物在血液及尿液中的精密度及重复性
 Tab. 4 Precision and repeatability of 12 benzodiazepines in blood and urine

药物 (drug)	浓度 (concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	血液 (blood)				尿液 (urine)			
		精密度 (precision), RSD/%		重复性 (repeatability)		精密度 (precision), RSD/%		重复性 (repeatability)	
		日内 (intra - day)	日间 (inter - day)	平均浓度 (average concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	RSD/ %	日内 (intra - day)	日间 (inter - day)	平均浓度 (average concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	RSD/ %
艾司唑仑 (estazolam)	500	10.1	12.7	519.25	8.3	9.2	11.1	513.62	7.7
	100	5.0	9.1	105.29	8.8	4.1	11.9	106.68	8.7
	LOQ	9.0	16.5	10.82	10.6	12.7	14.8	2.15	11.2
奥沙西洋 (oxazepam)	500	12.8	12.6	490.47	9.3	7.0	8.5	486.92	8.0
	100	7.9	13.9	101.92	8.1	7.8	9.0	93.00	9.8
	LOQ	15.7	17.4	18.45	14.2	11.5	15.2	4.73	12.4
地西洋 (diazepam)	500	10.1	12.8	522.90	10.6	8.3	10.9	528.02	5.9
	100	6.8	13.0	111.84	6.8	9.5	10.5	105.18	7.3
	LOQ	11.0	7.7	5.37	12.5	9.5	16.7	1.12	12.2
氟西洋 (flurazepam)	500	8.1	12.9	494.94	11.0	8.5	10.9	494.72	6.7
	100	7.0	8.3	96.91	8.8	6.5	14.4	95.95	11.8
	LOQ	13.1	17.3	0.86	11.6	14.2	15.0	0.57	16.5
劳拉西洋 (lorazepam)	500	6.2	13.6	477.15	7.8	11.0	12.8	523.74	7.6
	100	9.2	11.6	90.72	8.6	11.0	7.9	108.59	8.9
	LOQ	13.5	16.3	9.76	13.0	1.0	17.8	5.26	13.6
氯甲西洋 (lormetazepam)	500	8.6	11.8	498.58	10.1	10.3	9.8	528.64	10.1
	100	9.0	11.5	104.82	7.4	6.0	8.7	108.84	7.3
	LOQ	13.8	14.9	11.30	13.7	12.9	18.1	1.17	13.5
普拉西洋 (prazepam)	500	7.8	11.7	508.72	7.9	10.1	11.7	515.54	10.9
	100	10.9	12.2	108.85	11.3	7.8	12.5	102.09	9.9
	LOQ	12.7	13.1	11.05	8.9	4.6	12.4	1.06	9.8
去甲西洋 (nordazepam)	500	9.2	8.6	482.82	9.5	9.3	8.6	522.60	10.0
	100	10.6	13.0	96.73	11.6	8.2	8.6	102.22	6.4
	LOQ	3.5	13.3	49.53	12.9	9.1	13.1	5.39	12.1
替马西洋 (temazepam)	500	7.2	8.4	518.59	9.1	11.9	11.2	474.54	9.7
	100	7.9	12.0	98.05	7.9	9.3	13.3	98.59	7.4
	LOQ	7.9	13.3	4.79	9.7	12.1	11.9	2.25	11.4
硝甲西洋 (nimetazepam)	500	8.0	12.0	519.27	9.2	9.5	9.8	505.24	7.5
	100	10.1	9.5	102.74	7.1	11.5	11.2	104.40	11.1
	LOQ	13.1	10.4	5.18	13.8	10.9	15.5	1.10	9.2
硝西洋 (nitrazepam)	500	7.7	12.9	499.58	7.1	3.2	10.2	526.06	4.0
	100	12.0	13.7	107.03	11.5	10.6	12.3	107.32	9.2
	LOQ	9.2	18.0	21.52	14.3	16.4	16.5	2.25	14.5
溴西洋 (bromazepam)	500	4.9	11.6	517.95	9.5	10.2	12.8	504.28	12.4
	100	7.0	9.4	103.47	10.1	7.1	13.6	101.84	7.7
	LOQ	13.3	11.6	9.82	9.8	7.5	9.8	1.96	13.7

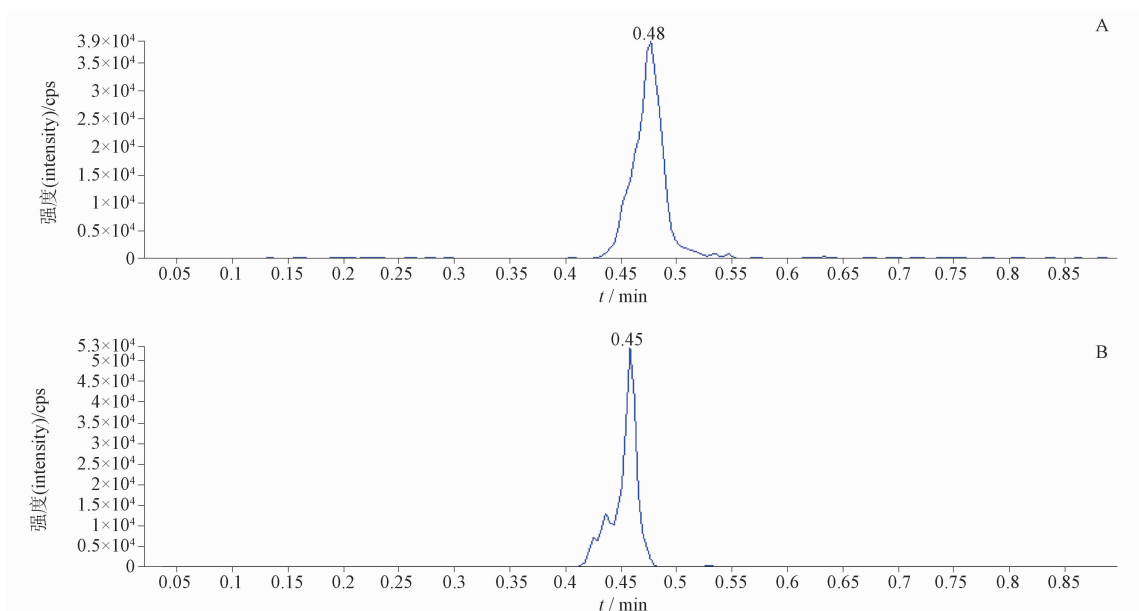


图 3 101 号案例中艾司唑仑(A)与地西洋-D₅(B)的选择离子谱图

Fig. 3 Selected ion spectra of estazolam(A) and diazepam-D₅(B) in case No. 101

表 5 苯二氮草类药物阳性血尿检材的检测结果

Tab. 5 Detection results of blood and urine specimens from authentic positive cases

编号 (No.)	服用药物 (type of medication taken)	检材类型 (type of materia)	检出物质 (the substance detected)	C/(ng · mL ⁻¹)		偏差 (deviation)/%
				DART-MS/MS	HPLC-HRMS	
101	艾司唑仑(estazolam)	血液(blood)	艾司唑仑(estazolam)	85.4	74.2	15.1
102			艾司唑仑(estazolam)	34.0	38.1	-10.8
103			艾司唑仑(estazolam)	47.8	47.8	0.0
104			艾司唑仑(estazolam)	23.4	24.3	-3.7
105			艾司唑仑(estazolam)	33.5	35.3	-5.1
106			艾司唑仑(estazolam)	36.3	37.3	-2.7
107			艾司唑仑(estazolam)	24.1	23.4	3.0
108			艾司唑仑(estazolam)	40.6	37.6	8.0
109			艾司唑仑(estazolam)	487.8	481.4	1.3
110			艾司唑仑(estazolam)	48.1	41.2	16.7
111			艾司唑仑(estazolam)	13.1	14.9	-12.1
112		尿液(urine)	艾司唑仑(estazolam)	3.1	2.9	6.9
113			艾司唑仑(estazolam)	5.2	4.5	15.6
201	地西洋(diazepam)	血液(blood)	地西洋(diazepam)	+	1.9	/
			去甲西洋(nordazepam)	+	8.7	/
202			地西洋(diazepam)	119.1	106.7	11.6
			去甲西洋(nordazepam)	+	7.7	/
			替马西洋(temazepam)	8.2	7.0	17.1
301	劳拉西洋(lorazepam)	血液(blood)	劳拉西洋(lorazepam)	196.7	202.9	-3.1
302		尿液(urine)	劳拉西洋(lorazepam)	27.8	24.8	12.1
401	奥沙西洋(oxazepam)	血液(blood)	奥沙西洋(oxazepam)	226.7	246.1	-7.9

注(note):“+”表示检出阳性结果但未能达到定量标准(indicates that a positive result was detected but failed to meet the quantitative criteria)

3 讨论

3.1 质谱条件优化

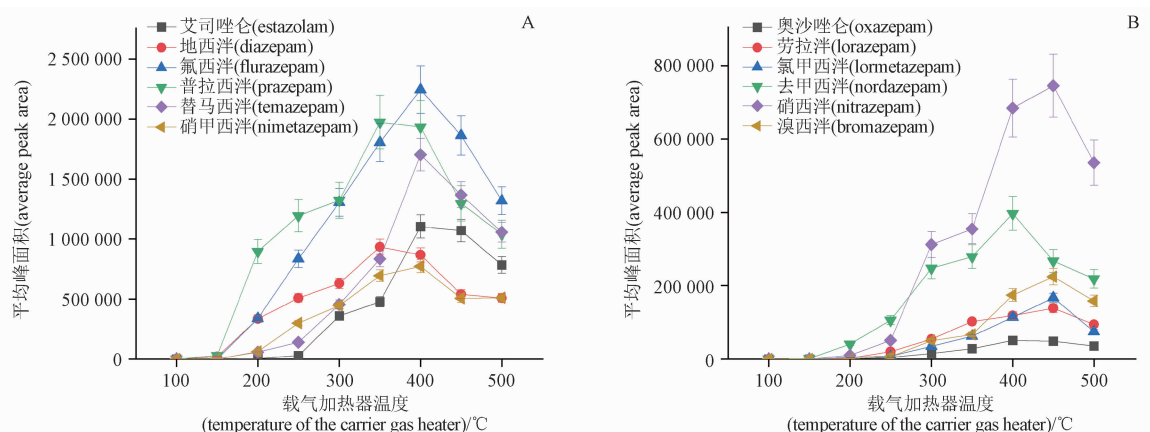
安装电喷雾离子源,将 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液直接输注进样,正离子模式下在 $50 \sim 500 \text{ Da}$ 范围内全扫描采集待测物的质谱信号并根据 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 的质荷比确定母离子,通过二级质谱扫描确定子离子,使用 MRM 模式优化离子对的 DP 和 CE 值。优化得出的质谱参数如表 2 所示。

3.2 载气加热器温度优化

在建立方法时 DART 离子源能够优化的参数

相对较少,如离子源位置、模块移速、栅极电压等参数大都具有普适性,可以沿用默认参数,针对不同化合物需要进行优化的参数主要是载气加热器温度。

根据“2.1”设置仪器参数,分别取 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苯二氮草类药物标准溶液在载气加热器温度在 $100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时分别进样 6 次检测,得出 12 个苯二氮草类药物的平均峰面积随载气加热器温度的变化结果如图 4 所示。



A. 前 6 种 (first 6) B. 后 6 种 (last 6)

图 4 12 个苯二氮草类药物的平均峰面积随载气加热器温度的变化

Fig. 4 Variation of mean peak area with carrier gas heater temperature for 12 benzodiazepines

结果表明,12 个目标物分别在载气加热器温度 $350, 400, 450 \text{ } ^\circ\text{C}$ 时所得的峰面积最高。综合考虑 12 个目标物的检验结果,选择 $400 \text{ } ^\circ\text{C}$ 作为载气加热器温度。

3.3 前处理方法优化

按照“2.2”所述前处理方法分别处理添加样品,通过观察峰形并计算基质效应与回收率考察了乙腈作为蛋白沉淀剂的处理效果并考察了乙酸乙酯、无水乙醚、二氯甲烷、三氯甲烷、正己烷作为萃取剂的萃取效果。当乙腈作为蛋白沉淀剂时基质抑制作用较强且峰形不佳,故不采用乙腈进行处理。5 种液液萃取剂处理血液、尿液后的回收率与基质效应如图 5、6 所示。

结果表明,血液及尿液中 12 个苯二氮草类药物在使用乙酸乙酯作为萃取剂进行液液萃取后检测得出的峰高、峰形良好,回收率与基质效应最佳且均能符合定量要求。因此,本研究选用乙酸乙酯

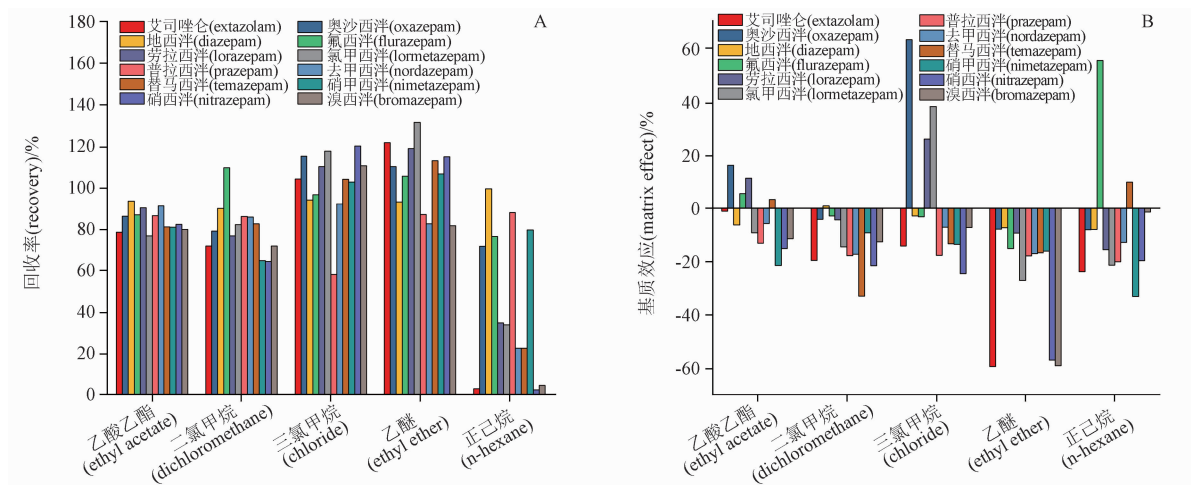
对血液或尿液中的 12 个苯二氮草类药物进行液液萃取。

3.4 LOD 与 LOQ 测试结果讨论

血液中 12 个苯二氮草类药物 LOD 在 $1 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, LOQ 在 $1 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;尿液中 12 个苯二氮草类药物 LOD 在 $0.2 \sim 2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, LOQ 在 $0.5 \sim 5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,与文献中所记载液质联用方法的 LOD、LOQ 相差不大^[8-12],能够满足定性定量要求和实际应用需求。其中尿液中苯二氮草类药物的 LOD 和 LOQ 较低,这可能是由于尿液中有较高浓度的氨,会增强电离强度^[18]。

3.5 案例应用讨论

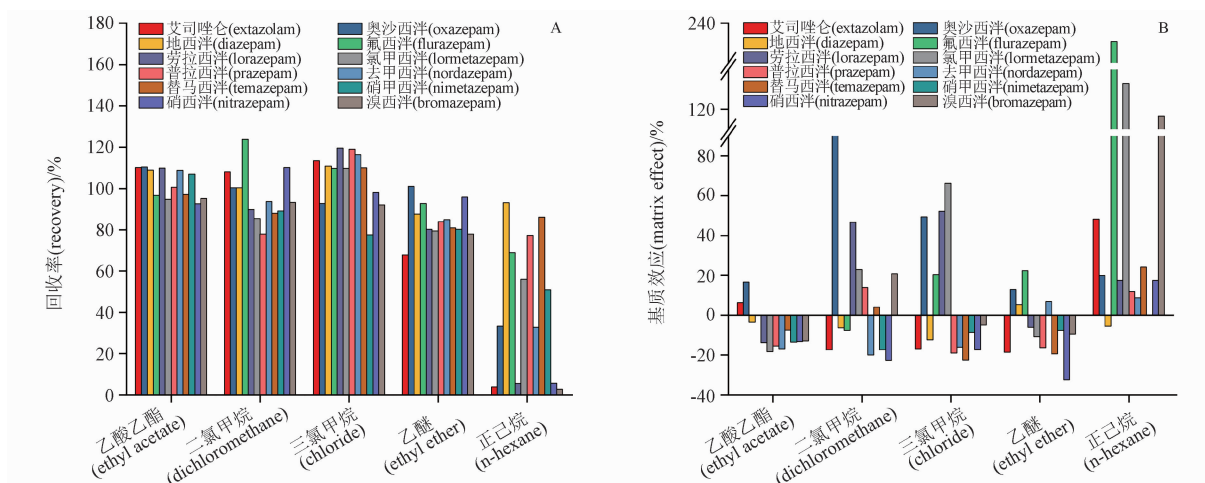
由于这些苯二氮草类药物之间存在代谢母体与产物的关系,在含有地西洋的样品中也检出了去甲西洋和替马西洋,虽未检出奥沙西洋(奥沙西洋需要经过去甲基化与羟基化 2 次代谢反应产生,浓度较低),可以说明服用了地西洋。而 401 号只检出高



A. 回收率 (recovery) B. 基质效应 (matrix effect)

图5 五种液液萃取剂处理后血液中12个苯二氮草类药物的回收率与基质效应

Fig. 5 Recovery and matrix effect of 12 benzodiazepines in blood after treatment with five liquid – liquid extractants



A. 回收率 (recovery) B. 基质效应 (matrix effect)

图6 五种液液萃取剂处理后尿液中12个苯二氮草类药物的回收率与基质效应

Fig. 6 Recovery and matrix effect of 12 benzodiazepines in urine after treatment with five liquid – liquid extractants

浓度奥沙西洋,未检出地西洋,说明是服用了奥沙西洋。104号血液与112号尿液、108号血液与113号尿液、301号血液与302号尿液均系同一案件检材,而血液检材中的苯二氮草类药物浓度均远高于尿液检材,一定程度上说明了艾司唑仑及劳拉西洋血液检材的检验价值较尿液检材高。

4 结论

苯二氮草类药物之间存在互为代谢产物的关系,建立与使用分析方法应当同时分析其药物、代谢物及来源物质,以准确判断服用药物种类。本研究应用DART-MS/MS建立了血液和尿液中12个苯二氮草类药物的快速检验方法,经验证该方法在特

异性、灵敏度、准确性等方面均能满足实战分析要求,且已应用于真实案例样品并与液质联用法进行了充分比较与讨论,可为毒物毒品快速筛查与检验研究与工作提供参考。

参考文献

[1] DOBLE A, CANTON T, PIOT O, *et al.* The pharmacology of cyclopyrrolone derivatives acting at the GABA/benzodiazepine receptor[J]. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 1992, 47: 407

[2] KIM JJ, GHARPURE A, TENG J, *et al.* Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines[J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 303

[3] KONIUSZEWSKI F, VOGEL FD, DAJCI I, *et al.* Navigating the

- complex landscape of benzodiazepine and Z - drug diversity: insights from comprehensive FDA adverse event reporting system analysis and beyond [J]. *Front Mol Psychiatry*, 2023, 14: 1188101
- [4] BRUNETTI P, GIORGETTI R, TAGLIABRACCI A, *et al.* Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(6): 560
- [5] SAÍAS T, GALLARDA T. Paradoxical aggressive reactions to benzodiazepine use: a review[J]. *Léncéphale*, 2007, 34(4): 330
- [6] MANDRIOLI R, MERCOLINI L, RAGGI MA. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective [J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9(8): 827
- [7] YANG TJ, SHOU M, KORZEKWA KR, *et al.* Role of cDNA - expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(6): 889
- [8] BANASZKIEWICZ L, WÓZNIAK MK, KALISZAN M, *et al.* Determination of benzodiazepines and Z - hypnotic drugs in whole blood samples by GC - MS/MS: method development, validation and application[J]. *Microchem J*, 2023, 193: 109115
- [9] LIU JL, WURITA A, WEI XJ, *et al.* Supramolecular solvent (SUPRASs) extraction method for detecting benzodiazepines and zolpidem in human urine and blood using gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Leg Med*, 2021, 48: 101822
- [10] SOFALVI S, LAVINS ES, KASPAR CK, *et al.* Development and validation of an LC - MS - MS method for the detection of 40 benzodiazepines and three Z - drugs in blood and urine by solid - phase extraction[J]. *J Anal Toxicol*, 2020, 44(7): 708
- [11] 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 种苯二氮草类药物[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(4): 577
- HU JJ, LIU F, MA WJ, *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
- [12] 易小翠, 易伟, 雷霖, 等. 液质联用同时测定大鼠尿液中 6 种苯二氮草类药物[J]. *应用化学*, 2022, 39(2): 340
- YI XC, YI W, LEI L, *et al.* Simultaneous determination of six benzodiazepines in rat urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Appl Chem*, 2022, 39(2): 340
- [13] JI JH, WANG JF, ZHANG Y. Rapid screening of 23 synthetic cannabinoids in blood by direct analysis in real time - Tandem mass spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2021, 469: 116667
- [14] LIU Y, SU C, ZHANG Y, *et al.* High - throughput and trace analysis of diazepam in plasma using DART - MS/MS and its pharmacokinetic application[J]. *Anal Biochem*, 2021, 635: 114435
- [15] VASILJEVIC T, CÓMEZ - RÍOS GA, LI F, *et al.* High - throughput quantification of drugs of abuse in biofluids via 96 - solid - phase microextraction - transmission mode and direct analysis in real time mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2019, 33(18): 1423
- [16] 季佳华, 张瑛, 王继芬, 等. 实时直接分析质谱在农药检测中的应用[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(2): 232
- JI JH, ZHANG Y, WANG JF, *et al.* Application of direct analysis in real time - mass spectrometry in pesticide detection [J]. *J Instrum Anal*, 2021, 40(2): 232
- [17] 龚欢, 葛庆华. 敞开式离子化质谱及其在体内药物分析中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(1): 1
- GONG H, GE QH. Ambient mass spectrometry and its application in biopharmaceutical analysis[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(1): 1
- [18] GROSS JH. Direct analysis in real time - a critical review on DART - MS[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 63

(本文于 2023 年 8 月 29 日收到)