

同位素稀释 – UPLC – MS 检测血清和尿液中的 14 种镇静催眠药及代谢物

Determination of 14 sedative hypnotics and their metabolites in serum and urine by ultra – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with isotope dilution

孟春杨, 吴玉田, 周贻兵,
林 野, 钟 雪

(贵州省疾病预防控制中心, 贵州 贵阳 550004)

MENG Chun – yang, WU Yu – tian,
ZHOU Yi – bing, LIN Ye,
ZHONG Xue

(Guizhou Provincial Center for Disease
Control and Prevention, Guiyang 550004,
Guizhou Province, China)

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金资助项目(gzwbj2024 – 225); 贵州省疾病预防控制中心新技术基金资助项目(2024 – E – 4 技)

作者简介: 孟春杨(1987 –), 女, 副主任技师, 主要从事食品药品检验方面的工作和研究

通信作者: 钟雪, 主管技师

Tel: (0851) 86827187

E – mail: zhongxue1213@126.com

摘要:目的 建立超高效液相色谱串联质谱(UPLC – MS)检测血清和尿液中14种镇静催眠药及代谢物的方法。方法 用乙腈沉淀蛋白法处理血清或尿液样品, 用Agilent EclipsePlus C₁₈ RRHD色谱柱进行色谱分离, 流动相为0.1%甲酸水和甲醇, 流速为0.30 mL · min⁻¹, 柱温为35℃, 以同位素内标法定量, 用电喷雾电离(ESI⁺) (正离子采集模式) 进行多反应监测(MRM)。考察该方法的专属性、标准曲线与定量下限、精密度与回收率、基质效应、稳定性。检测2023年全国中毒医疗应急毒物检测实验室比对样品, 血清中镇静催眠药应急中毒考核的定性定量检测样品。结果 方法的专属性结果良好, 各镇静催眠药之间相互无干扰, 14种镇静催眠药及代谢物的线性范围在1.00 ~ 45.00 μg · L⁻¹, 相关系数r均>0.998 2, 血清和尿液中检出限(LOD)为0.30 μg · L⁻¹, 定量限(LOQ)为1.00 μg · L⁻¹。3个加标水平下(10.00、50.00和200.00 μg · L⁻¹) 血清中14种镇静催眠药及代谢物的回收率在85.60% ~ 105.20%之间, 相对标准偏差(RSD)为0.73% ~ 4.45%; 尿液中14种镇静催眠药及代谢物的回收率在88.93% ~ 108.12%之间, RSD为0.50% ~ 6.92%。检出盐酸氟奋乃静和氯氮平, 盐酸氟奋乃静结果检出实测定量分别为339.00 μg · L⁻¹和349.00 μg · L⁻¹, 平均值为344.00 μg · L⁻¹, 偏差为2.90%; 氯氮平结果检出实测定量分别为1 668.00 μg · L⁻¹和1 707.00 μg · L⁻¹, 平均值为1 688.00 μg · L⁻¹, 偏差为2.30%。结论 本方法快速准确, 适用于镇静催眠药的应急中毒检测, 应用此方法对应急中毒盲样检测, 考核结果满意。

关键词: 镇静催眠药; 同位素内标; 超高效液相色谱串联质谱; 血清; 尿液

DOI: 10.13699/j.cnki.1001 – 6821.2026.07.013

中图分类号: R969 **文献标志码:** A

文章编号: 1001 – 6821(2026)07 – 0982 – 08

Abstract: Objective To establish an ultra – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the determination of 14 sedative hypnotics and their metabolites in serum and urine.

Methods Serum or urine samples were treated with acetonitrile to precipitate proteins. Separated on an Agilent EclipsePlus C₁₈ RRHD column, the liquid was eluted with 0.1% formic acid in water and methanol, at a flow rate of 0.30 mL · min⁻¹ and column temperature of 35℃. Quantified by the internal standard method, and multiple reaction monitoring (MRM) was performed by electrospray ionization (ESI⁺). The method was evaluated for specificity, standard curves and limits of quantification, precision and recovery, matrix effects, and stability. This

method was applied to test the proficiency testing samples from the 2023 National Medical Emergency Toxicant Detection Laboratory Comparison Program, including qualitative and quantitative test samples for emergency poisoning assessment of sedative – hypnotic drugs in serum. **Results** The method demonstrated good specificity, with no cross – interference between the various sedative hypnotics and their metabolites. The linear range of 14 sedative hypnotics and metabolites were $1.00 - 45.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, with a correlation coefficient greater than 0.998 2, the detection limit in serum and urine was $0.30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, and the quantification limit was $1.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. In serum, recovery rates at three spiked levels (10.00 , 50.00 and $200.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ranged from 85.60% to 105.20%, with relative standard deviations (RSD) between 0.73% and 4.45%. In urine, recovery rates ranged from 88.93% to 108.12%, with relative standard deviations between 0.50% and 6.92%. Fluphenazine hydrochloride and clozapine were identified by this method. The two determined quantitative concentrations of fluphenazine hydrochloride were $339.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $349.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, with an average value of $344.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and a deviation of 2.90%. The two determined quantitative concentrations of clozapine were $1\ 668.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1\ 707.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, with an average value of $1\ 688.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and a deviation of 2.30%. The final feedback result was satisfactory. **Conclusion** This method is rapid and accurate, making it suitable for emergency poisoning detection of sedative hypnotics. Its application to the blind sample detection of emergency poisoning cases is satisfactory.

Key words: sedative hypnotics; isotope internal standard; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; serum; urine

当前生活节奏加快、压力加剧,越来越多的人产生焦虑障碍,从而对身心健康造成影响^[1]。镇静催眠药是直接作用于中枢神经系统的抑制剂,适量服用可改善患者焦虑障碍症状和生活质量,过量服用时则可出现麻醉、抑制呼吸,甚至致死^[2-3]。近年来因服用过量镇静催眠药引起的中毒事件发生率很高,中毒程度与药物种类、血药浓度密切相关,快速定性、定量中毒患者的血药浓度对临床抢救和治疗具有重大意义^[4-5]。目前国内外检测镇静催眠类药物的方法主要有气相色谱法(gas chromatography, GC)^[6]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[7]、气相色谱 – 质谱法(gas chromatography – mass spectrometry, GC – MS)^[8]、液相色谱 – 串联质谱法(liquid chromatography – tandem mass spectrometry, LC – MS)^[9-11]。其中 LC – MS 具有定量准确、高灵敏度、检测快速、选择性好的优点,已被广泛应用于血液和尿液样品的中毒检测^[12]。本文建立乙腈沉淀蛋白,同位素稀释 – UPLC – MS 法同时测定人血清和尿液中 14 种镇静催眠类药物及代谢物的方法,为检测中毒患者血药浓度、临床抢救和临床治疗提供技术支持。

材料与方法

1 材料

样本 人血清样本,来自贵州省疾病预防控制中心

心门诊;人尿液样本,来自本实验室人员。本研究经贵州省疾病预防控制中心伦理委员会批准(伦理批号:Q2026 – 03)。

药品与试剂 氯氮平,规格:每支 50 mg,纯度:99.99%,批号:E0026402、氟奋乃静,规格:每支 100 mg,纯度:99.32%,批号:23Z329 – K1、丙米嗪,规格:每支 100 mg,纯度:99.74%,批号:23Z329 – K2、盐酸去甲替林,规格:每支 50 mg,纯度:99.93%,批号:22Z056 – B1、盐酸去甲米嗪,规格:每支 100 mg,纯度:99.68%,批号:25W010 – T1、7 – 羟基氟哌啶醇,规格:每支 1 mg,纯度:95.85%,批号:25H069 – R1、N – 去甲基去甲替林,规格:每支 1 mg,纯度:99.86%,批号:25W010 – D1、10 – 羟基去甲替林,规格:每支 1 mg,纯度:99.66%,批号:23W062 – D2、N – 去甲基氯氮平,规格:每支 5 mg,纯度:98.45%,批号:22Z108 – T1、氮氧氯氮平,规格:每支 1 mg,纯度:99.66%,批号:25W010 – T2、²H₄ – 氯氮平,规格:每支 1 mg,纯度:98.00%,批号:23Z306 – L2、²H₈ – 氟苯那嗪,规格:每支 1.04 mg,纯度:98.0%,批号:22T057 – W1、²H₄ – 氟哌啶醇,规格:每支 2.65 mg,纯度:95.0%,批号:22T052 – Y2、²H₃ – 丙咪嗪,规格:每支 1 mg,纯度:98.0%,批号:23Z325 – T1,均为上海甄准生物科技有限公司生产;氟哌啶醇,规格:每支 25 mg,纯度:99.99%,批号:E0027320、阿米替林 – d₆,规格:每支 1 mg,纯度:99.0%,批号:F0061357、盐酸去甲替林 – d₃,规格:每支 1 mg,纯度:99.0%,批号:G0063492,均为

北京曼哈格生物科技有限公司产品生产;盐酸阿米替林,规格:每支 10 mg,纯度:99.99%,批号:23040650,广东深圳斯坦德标准物质研发有限公司生产;地西洋,规格:1000 mg · L⁻¹,批号:23050450、地西洋 - d₅,规格:100 mg · L⁻¹,批号:23050810,均为江苏坛墨质检科技股份有限公司生产;奥沙西洋,规格:1 000 mg · L⁻¹,批号:2252312,上海安谱瑾世标准技术服务有限公司生产;奥沙西洋 - d₅,规格:100 mg · L⁻¹,批号:S150091,天津阿尔塔科技有限公司生产。甲醇、乙腈,美国 Thermo 公司生产;甲酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产。

仪器 SCIEX 6500 超高效液相色谱串联质谱仪,美国 AB SCIEX 公司产品;DMV - 16 涡旋混匀仪,广东科寅设备有限公司产品;MPW - 352R 高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司产品。

2 检测条件、溶液配制与样本处理

色谱条件 色谱柱:Agilent EclipsePlus C₁₈ RRHD (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);柱温:35 ℃;进样量:5 μL;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B 为甲醇;流速:0.3 mL · min⁻¹;梯度洗脱条件:0 ~ 2.5 min 60% A,2.5 ~ 12.0 min 60% 的 A 线性变化为 40%,12.0 ~ 13.0 min 40% 的 A,13.00 ~ 13.1 min 40% 的 A

表 1 化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of sedative hypnotics

Sedative hypnotics	t _R /min	Precursor ion/ (m/z)	Product ion/ (m/z)	DP/(V)	CE/(eV)	Internal standard
Imipramine	8.41	281.20	86.20* 208.20	25 28	23 32	² H ₃ - Imipramine
Clozapine	4.56	327.20	270.20* 192.10	65 65	30 57	² H ₄ - Clozapine
Fluphenazine	13.68	438.20	171.30* 143.30	60 69	35 39	² H ₈ - Fluorophenazine
Haloperidol	6.57	376.20	165.20* 123.00	44 32	30 53	² H ₄ - Haloperidol
Amitriptyline	9.29	278.30	191.10* 203.10	24 27	34 48	Amitriptyline - d ₆
Diazepam	13.42	285.20	154.10* 193.10	135 135	37 48	Diazepam - d ₅
Oxazepam	10.70	287.10	241.10* 269.00	130 130	29 22	Oxazepam - d ₅
N - demethylated clozapine	4.00	313.10	270.10* 192.10	50 38	35 54	² H ₄ - Clozapine
Nitroxychlorpromazine	6.07	343.20	243.10* 256.20	50 58	26 28	² H ₄ - Clozapine
7 - Hydroxy Haloperidol	9.84	454.20	171.20* 143.10	52 53	35 39	² H ₄ - Haloperidol
N - demethylated demethylamine	9.18	250.10	91.10* 105.10	38 38	27 25	Dexmedetomidine - d ₃
Dexmedetomidine	9.70	264.00	191.10* 117.10	51 46	30 26	Dexmedetomidine - d ₃
10 - hydroxydemethylamine	2.89	280.00	231.10* 216.10	42 33	24 33	Dexmedetomidine - d ₃
Dexmedetomidine	8.85	267.10	72.10* 193.20	37 35	19 50	² H ₃ - Imipramine
² H ₄ - Haloperidol	6.52	380.10	169.30	23	31	/
² H ₄ - Clozapine	4.43	331.30	272.10	101	34	/
² H ₃ - Imipramine	8.41	284.30	89.20	31	22	/
² H ₈ - Fluorophenazine	13.59	446.20	179.40	31	34	/
Amitriptyline - d ₆	9.29	284.30	91.20	27	65	/
Diazepam - d ₅	13.29	289.90	198.30	140	45	/
Oxazepam - d ₅	10.57	292.00	246.00	114	36	/
Dexmedetomidine - d ₃	9.71	267.10	91.10	36	28	/

* denotes quantitative ions

线性变化为 60%, 13.1 ~ 16.0 min 60%。

质谱条件 电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI⁺) (正离子采集模式); 离子化电压: 4 500 V; 气帘气压强: 241 Kpa; 喷雾气压强: 345 Kpa; 辅助加热气压强: 345 Kpa; 碰撞器: Medium。质谱参数见表 1。

对照品储备液及工作溶液配制 取适量的氯氮平、氟奋乃静、氟哌啶醇、阿米替林、丙咪嗪、氮氧氯氮平、去甲米嗪、去甲替林、N-去甲基氯氮平、7-羟基氟哌啶醇、N-去甲基去甲替林、10-羟基去甲替林、地西洋和奥沙西洋标准品, 甲醇配成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准储备液。临用前初始流动相稀释成 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准使用液。

内标溶液配制 取适量的²H₄-氯氮平、²H₈-氟苯那嗪、²H₄-氟哌啶醇、²H₃-丙咪嗪、阿米替林-d₆、去甲替林-d₃、地西洋-d₅和奥沙西洋-d₅标准品, 甲醇配成浓度为 $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合内标储备液。临用前初始流动相稀释成 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合同位素内标使用液。

标准曲线样品与质控样品配制 准确移取 14 种镇静催眠药使用液 20.00、50.00、100.00、200.00、400.00、600.00 及 900.00 μL , 分别加入初始流动相 880.00、850.00、800.00、700.00、500.00、300.00 及 0.00 μL , 分别加入同位素内标使用液 100.00 μL , 混匀, 得到 14 种镇静催眠药浓度分别为 1.00、2.50、5.00、10.00、20.00、30.00 及 45.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准系列, 其中内标浓度为 $5.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。准确取 200 μL 血清或尿液于 15 mL 离心管中, 加入 10.00 μL $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镇静催眠药混合标准储备液, 加入 100.00 μL $50.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合同位素内标使用液, 混匀, 加乙腈至 1.00 mL, 涡旋 2 min 混匀, 在 $7\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, 过 0.22 μm 的微孔滤膜后上机检测。血清和尿液各做 3 份平行样。

血清或尿液样品处理 准确取 200.00 μL 血清或尿液于 15 mL 离心管中, 加入 100 μL $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合同位素内标使用液, 混匀, 加入 700.00 μL 乙腈 (或加乙腈至 1 mL), 涡旋 2 min 混匀, 在 $7\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, 过 0.22 μm 的微孔滤膜后上机检测。

3 方法学考察

专属性 分别取空白血清、空白尿液、含镇静催眠药血清和尿液样品、含镇静催眠药定量限血清和尿液样品, 按“血清或尿液样品处理”后检测。

标准曲线与定量下限 (lower limit of quantification, LLOQ) 准确移取适量 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 14 种镇静催眠药混合标准使用液, 8 种 $50.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合同位

素内标使用液, 配制成标准系列 (见 2 标准曲线样品配制), 其中混合同位素内标的含量为 $5.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以系列标准溶液中待测物的浓度与内标含量比与待测物的峰面积与内标峰面积比的比值绘制校正曲线, 按内标法计算样品中 14 种镇静催眠药的含量。以 3 倍信噪比计算方法的检出限 (3S/N), 以 10 倍信噪比计算方法的定量限 (10S/N)。

精密度与回收率 分别在 200.00 μL 血清和尿液阴性样品中加入 10.00、50.00 和 200.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3 个不同浓度水平的 14 种镇静催眠药混合标准溶液, 每种样品的三个浓度均做 6 个平行样, 计算回收率及相对标准偏差 (relative standard deviations, RSD)。

基质效应 基质影响分析结果的准确性, 也会干扰分析过程。本文采用 $10.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 基质溶液峰面积 (A1) 与 $10.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液峰面积 (A2) 比较, 根据基质效应 (ME) = A1/A2, 进行评估, 平行测定 3 组数据。

稳定性 对加标量 $50.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的空白血清和尿液进行稳定性实验, 比较 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存, 3 h、6 h、12 h 和 24 h 的降解率, 每组平行样品 3 个。

提取溶剂 常用有机溶剂作为蛋白沉淀剂, 由于本实验是样本加入内标, 加入提取溶液离心后直接上机检测, 分别比较了甲醇、乙腈、60% 甲酸水-甲醇溶液 (初始流动相, 一般作为定溶液) 作为提取液, 对加标量 $50.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的空白血清和尿液进行提取检测, 比较提取效率 (回收率), 每种提取溶剂做平行样品 3 个。

4 方法学应用

经过方法学验证后, 用本方法检测 2023 年全国中毒医疗应急毒物检测实验室比对样品, 血清中镇静催眠药应急中毒考核的定性定量检测样品。

结 果

1 方法学评价

专属性 14 种镇静催眠药及代谢物的保留时间见表 1, 血清和尿液中未发现内源性物质干扰镇静催眠药及代谢物和内标的测定, $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 14 种镇静催眠药标准溶液的总离子色谱图 (total ion chromatogram, TIC), 见图 1。

标准曲线与定量下限 线性方程、检出限、定量限等结果表明在线性范围 $1.00 \sim 45.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 14 种镇静催眠药的相关系数 $r > 0.998\,2$, 镇静催眠药在血清和尿液中检出限均为 $0.30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量限均为 $1.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。14 种镇静催眠药物的线性方程, 见表 2。

精密度与回收率 血清中镇静催眠药的回收率在 85.60% ~ 105.20% 之间, RSD 在 0.73% ~ 4.45%

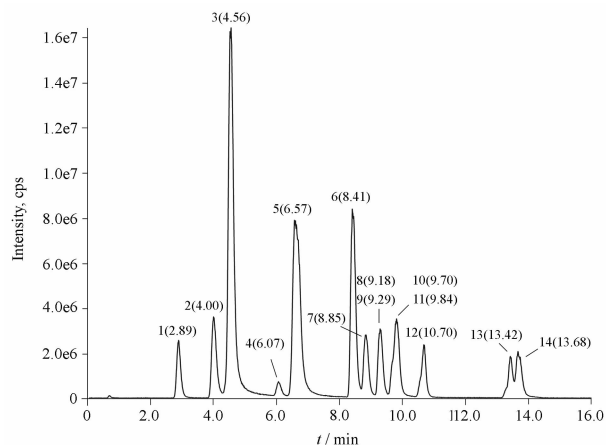


图1 镇静催眠药的总离子色谱图(TIC)图

Figure 1 Total ion chromatogram (TIC) diagram of sedative hypnotics

1: 10 - hydroxydemethylamine(2.89 min); 2: N - demethylated clozapine (4.00 min); 3: Clozapine (4.56 min); 4: Nitroxychlorpromazine (6.07 min); 5: Haloperidol (6.57 min); 6: Imipramine (8.41 min); 7: Dexmedetomidine (8.85 min); 8: N - demethylated demethylamine (9.18 min); 9: Amitriptyline (9.29 min); 10: Dexmedetomidine (9.70 min); 11: 7 - Hydroxy Haloperidol (9.84 min); 12: Oxazepam (10.70 min); 13: Diazepam(13.42 min); 14: Fluphenazine(14.68 min).

之间;尿液中镇静催眠药的回收率在 88.93% ~ 108.12%之间,RSD 在 0.50% ~ 6.92% 之间,表明方法具有良好的回收率和精密度,见表3。

表2 14种镇静催眠药物的线性方程

Table 2 Linear equations of 14 sedative hypnotics

Sedative hypnotics	Linear equation	Correlation
		coefficient (r)
Imipramine	$y = 2.06 \times 10^{-1}x + 1.68 \times 10^{-2}$	0.999 9
Clozapine	$y = 9.23 \times 10^{-1}x + 1.07$	0.999 3
Fluphenazine	$y = 2.81 \times 10^{-1}x + 1.26 \times 10^{-1}$	0.999 6
Haloperidol	$y = 2.68 \times 10^{-1}x + 1.41 \times 10^{-2}$	1.000 0
Amitriptyline	$y = 2.92 \times 10^{-1}x - 8.63 \times 10^{-3}$	0.999 8
Diazepam	$y = 2.04 \times 10^{-1}x - 1.60 \times 10^{-3}$	0.999 9
Oxazepam	$y = 1.83 \times 10^{-1}x - 9.59 \times 10^{-3}$	1.000 0
N - demethylated clozapine	$y = 1.58 \times 10^{-1}x + 2.43 \times 10^{-2}$	0.999 9
Nitroxychlorpromazine	$y = 2.84 \times 10^{-2}x + 9.67 \times 10^{-3}$	0.999 6
7 - Hydroxy Haloperidol	$y = 9.25 \times 10^{-2}x - 1.46 \times 10^{-1}$	0.998 2
Dexmedetomidine	$y = 3.96 \times 10^{-1}x + 1.85 \times 10^{-1}$	0.999 7
N - demethylated demethylamine	$y = 3.01 \times 10^{-1}x + 9.67 \times 10^{-2}$	0.999 7
10 - hydroxydemethylamine	$y = 6.30 \times 10^{-1}x + 1.50 \times 10^{-1}$	0.999 8
Dexmedetomidine	$y = 8.36 \times 10^{-2}x - 8.77 \times 10^{-3}$	1.000 0

表3 UPLC - MS 法检测血清和尿液中镇静催眠药的回收率与精密度

Table 3 Recovery rate and precision of sedative hypnotics in serum and urine by UPLC - MS

Sedative hypnotics	Added ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Serum		Urine	
		Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
Imipramine	10.00	97.49	2.10	98.49	5.09
	50.00	99.63	1.29	97.87	1.16
	200.00	95.13	1.81	94.31	1.38
Clozapine	10.00	92.76	4.10	91.26	3.85
	50.00	105.20	2.16	98.10	1.83
	200.00	99.16	1.67	92.58	1.36
Fluphenazine	10.00	85.60	3.84	91.86	6.92
	50.00	93.28	0.86	93.56	0.88
	200.00	92.77	1.70	93.11	1.73
Haloperidol	10.00	99.21	1.32	101.39	4.91
	50.00	101.46	2.72	100.74	1.54
	200.00	95.27	2.38	97.21	0.97
Amitriptyline	10.00	100.85	1.91	104.25	5.01
	50.00	99.56	0.87	99.80	1.42
	200.00	95.01	1.62	95.83	0.80
Diazepam	10.00	103.84	3.18	106.95	3.56
	50.00	102.01	0.87	103.37	1.94
	200.00	97.34	1.77	100.09	0.99
Oxazepam	10.00	103.46	0.73	96.38	1.15
	50.00	101.64	1.54	98.88	1.58
	200.00	98.04	1.28	99.33	1.77
N - demethylated clozapine	10.00	90.75	4.45	97.15	6.48
	50.00	90.37	1.03	101.01	1.18
	200.00	99.01	2.23	101.53	1.32
Nitroxychlorpromazine	10.00	87.76	1.82	90.77	3.70
	50.00	89.89	2.20	94.75	1.37

续表 3(Continued tablet 3)

Sedative hypnotics	Added ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Serum		Urine	
		Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
7 - Hydroxy Haloperidol	200.00	91.47	2.42	91.78	2.72
	10.00	92.06	2.33	97.77	2.74
	50.00	88.78	1.45	88.93	1.19
N - demethylated demethylamine	200.00	92.94	0.85	91.64	0.50
	10.00	96.93	1.41	97.69	3.51
	50.00	103.10	1.11	101.96	1.05
Dexmedetomidine	200.00	98.62	1.55	99.04	1.30
	10.00	87.26	1.50	90.63	6.52
	50.00	103.79	0.76	101.33	0.68
10 - hydroxydemethylamine	200.00	95.13	2.27	95.03	1.59
	10.00	94.66	2.95	102.91	2.52
	50.00	94.17	1.47	103.55	1.66
Dexmedetomidine	200.00	98.20	2.00	98.65	1.36
	10.00	103.24	1.40	108.12	1.63
	50.00	98.95	1.94	101.65	1.55
	200.00	95.61	1.62	100.57	1.49

基质效应 血清和尿液中 14 种镇静催眠药的 ME 值,一般认为:ME > 1 基质增强效应,ME < 1 基质抑制效应,ME 在 0.85 ~ 1.15 基质效应不明显。上表说明氯氮平、氟奋乃静、7-羟基氟哌啶醇在血清和尿液基质效应中的基质效应均增强。氯氮平的基质效应为 1.26 和 1.31,即校正前的回收率(绝对回收率)为 125.93% 和 131.10%,但使用用同位素内标校正后的回收率 100.22% ~ 103.77%。氟奋乃静在尿液和血清基质效应达到了 1.86 和 1.83,即校正前的回收率(绝对回收率)为

186.11% 和 182.07%,但使用用同位素内标校正后的回收率 93.78% ~ 93.19%。7-羟基氟哌啶醇的基质效应为 1.36 和 1.39,即校正前的回收率(绝对回收率)为 126.31% 和 138.69%,但使用用同位素内标校正后的回收率 99.96% ~ 99.99%。总之,同位素内标校正前绝对回收率在 81.10% ~ 186.11%,少数目标物受基质影响较大,校正后回收率在 85.00% ~ 112.99%。本文采用同位素内标校正基质效应,提高了 14 种镇静催眠药的准确性和回收率,消除了基质的干扰,见表 4。

表 4 镇静催眠药的基质效应

Table 4 Matrix effects of sedative hypnotics

Sedative hypnotics	Urine				Serum			
	Matrix effect	RSD/%	Absolute recovery /%	Corrected recovery /%	Matrix effect	RSD/%	Absolute recovery /%	Corrected recovery /%
Imipramine	0.95	1.91	95.32	98.86	1.00	1.20	100.20	98.58
Clozapine	1.26	1.69	125.93	100.22	1.31	1.70	131.10	103.77
Fluphenazine	1.86	1.19	186.11	93.78	1.83	0.81	182.70	93.19
Haloperidol	0.91	1.95	91.21	101.67	0.99	1.85	99.10	98.73
Amitriptyline	0.98	2.47	98.44	99.03	1.02	1.13	102.13	99.37
Diazepam	1.15	1.25	114.96	104.58	1.15	2.85	115.23	103.41
Oxazepam	1.13	1.89	113.37	110.45	1.07	0.65	106.86	101.80
N - demethylated clozapine	1.14	1.99	113.91	85.00	1.09	0.72	109.35	96.46
Nitroxychlorpromazine	1.00	2.49	100.26	94.81	1.12	2.22	112.46	88.61
7 - Hydroxy Haloperidol	1.36	1.32	136.41	99.96	1.39	0.74	138.69	99.99
N - demethylated demethylamine	1.03	2.49	103.43	109.69	1.01	0.43	100.55	107.26
Dexmedetomidine	0.97	1.48	97.45	101.25	0.97	1.81	97.49	102.25
10 - hydroxydemethylamine	1.11	1.56	111.09	112.99	0.81	1.06	81.10	90.72
Dexmedetomidine	0.98	1.58	98.13	104.23	0.97	0.57	97.05	97.98

稳定性 实验表明:尿液中氟奋乃静、*N*-去甲氯氮平、10-羟基去甲替林降解很快,24 h 均超过了20%;丙米嗪、氯氮平、地西泮、奥沙西泮、7-羟基氟哌啶醇降解较快,24 h 均超过了10%。血清中*N*-去甲氯氮平24 h 降解超过了40%;氯氮平24 h 降解超过了30%;氮氧氯氮平24 h 降解超过了20%;丙米

嗪、氟奋乃静、氟哌啶醇、阿米替林、7-羟基氟哌啶醇、去甲替林、10-羟基去甲替林、去甲米嗪24 h 降解均超过了10%。总体上,镇静催眠药在血清中降解的更快些,在血清中降解的快的在尿液中不一定降解的快,在尿液中降解的快的在血清中不一定降解的快,见表5。

表5 14种镇静催眠药的稳定性(%)
Table 5 Stability of 14 sedative hypnotics(%)

Sedative hypnotics	Urine				Serum			
	Degrade/3 h	Degrade/6 h	Degrade/12 h	Degrade/24 h	Degrade/3 h	Degrade/6 h	Degrade/12 h	Degrade/24 h
Imipramine	4.75	8.73	10.90	12.10	3.36	9.89	12.71	14.61
Clozapine	2.34	10.73	14.24	15.75	3.55	21.27	34.76	35.58
Fluphenazine	8.49	16.88	23.45	23.48	4.72	7.63	16.28	17.06
Haloperidol	3.71	3.55	5.81	6.23	2.11	9.07	11.55	13.07
Amitriptyline	5.65	7.82	7.78	7.62	3.90	7.59	10.64	11.94
Diazepam	7.07	8.84	9.34	10.14	2.87	4.09	7.00	6.51
Oxazepam	2.87	6.58	9.32	10.52	0.64	2.48	4.95	4.82
<i>N</i> -demethylated clozapine	2.30	0.56	26.02	25.01	4.92	32.95	45.51	42.92
Nitroxychlorpromazine	3.33	3.18	1.28	2.85	4.32	14.18	22.27	22.81
7-Hydroxy Haloperidol	2.77	10.46	15.67	17.06	1.79	11.07	17.08	15.41
<i>N</i> -demethylated demethylamine	1.39	2.73	3.44	5.98	1.04	0.64	5.34	6.64
Dexmedetomidine	2.76	4.53	5.76	5.65	2.98	6.64	9.12	10.19
10-hydroxydemethylamine	1.65	21.24	26.63	27.21	4.59	9.18	12.34	14.53
Dexmedetomidine	2.50	4.19	5.85	6.48	3.24	9.36	12.02	13.32

提取溶剂 通过3种提取液对比实验表明:尿液中用甲醇、乙腈、60%甲酸水-甲醇溶液作为提取溶液,提取效率均大于80%,但在血清中甲醇、乙腈作为提取溶液,提取效率均大于80%,60%甲酸水-甲醇溶液作为提取溶液时7-羟基氟哌啶醇的回收率较低。试验观察发现60%甲酸水-甲醇溶液作提取液不能沉淀蛋白,甲醇沉淀蛋白较少,乙腈沉淀蛋白最多、效果最好,尤其是在血清中效果较明显,乙腈沉淀蛋白的提取效率也较好,因此用乙腈作为提取溶剂。

2 方法的应用

本方法检测2023年全国中毒医疗应急毒物检测实验室比对样品,血清中镇静催眠药应急中毒考核的定性定量检测样品,检出盐酸氟奋乃静和氯氮平,盐酸氟奋乃静结果检出实测定量分别为339.00 μg·L⁻¹和349.00 μg·L⁻¹,平均值为344.00 μg·L⁻¹,偏差为2.90%;氯氮平结果检出实测定量分别为1 668.00 μg·L⁻¹和1 707.00 μg·L⁻¹,平均值为1 688.00 μg·L⁻¹,偏差为2.30%;反馈结果为满意。

讨 论

目前大多数镇静催眠类药物的前处理方法采

用固相萃取^[13-14]、液液萃取^[15-16]和乙腈沉淀蛋白^[12]等方式,固相萃取和液液萃取操作繁琐,耗时耗试剂耗样本,无法满足中毒样本快速定性定量的要求,本文采用乙腈沉淀蛋白,效果好,提取效率(回收率)也较好。目前文献报道的检测镇静催眠药基本都使用外标法,使用同位素内标法进行前处理的研究鲜有报道,只有2024年马春玲^[12]等人测定9种镇静催眠药使用了2种对应的同位素内标,但未写明几种目标物采用同位素内标定量,血清和尿液样本基质复杂,本文采用待测物相对应的同位素内标消除基质效应,提高定量分析的准确性和回收率,同位素内标与目标物具有几乎相同的化学结构,与目标物经历几乎完全相同的基质效应,他们的基质抑制或增强效应是完全同步的,因此使用同位素内标法定量(目标物峰面积/同位素内标峰面积与对应的目标物浓度作标准曲线),能够有效消除基质效应、前处理损失和仪器波动对结果的影响,从而提高准确度。

镇静催眠药的稳定性实验发现:镇静催眠药在血清中降解的更快些,在血清中降解的快的在尿液中不一定降解的快,在尿液中降解的快的在血清中不一定降解的快。张晓梅等人^[9]用超高效液相色谱-串联

质谱联用快速测定尿样中 14 种镇静催眠类药物,结果表明在 4℃ 存放时下降率小且稳定性优; -20℃ 保存时,样品经反复冻融下降率高且测量值稳定性较差,尿液样品最好存放在 4℃ 冰箱于 3 天内完成检测,这与本文结论稍有不同,可能是镇静催眠药种类不同降解速度不同,本文有些目标物为镇静催眠药的代谢物。马春玲等人^[12]用 HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 9 种镇静催眠类药物浓度,考察了血浆样品分别在室温条件下储存 24 h、经 3 次冷冻-解冻循环(-20℃ 到 20℃)、-20℃ 保存 20 d 低、中、高质量浓度质控样品稳定性,表明各待测物血浆样品在上述条件下稳定,这与本文也不太相同,可能由于镇静催眠药在血浆和血清中的降解速度不同和镇静催眠药种类不同。如果条件允许,应该全面考察常温、冷藏、冷冻条件下样品的稳定性。总之样品到达实验室后应尽快测定。

14 种镇静催眠药及代谢物在血清和尿液中检出限为 0.30 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,定量限为 1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。张晓梅等人^[9]建立超高效液相色谱-串联质谱联用快速测定尿样中 14 种镇静催眠类药物定量限为 0.59~7.74 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,马春玲等人^[12]用 HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 9 种镇静催眠类药物浓度及其临床应用定量限分别为 18、4.5、25、3.5、25、1.5、5.5、35 和 4 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,本文建立的方法检出限定量限更低,能准确测定更低浓度水平的镇静催眠药浓度。

总之,本实验建立同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱检测血清和尿液中 14 种镇静催眠药及代谢物(氯氮平、氟奋乃静、氟哌啶醇、阿米替林、丙咪嗪、氮氧氯氮平、N-去甲基氯氮平、去甲米嗪、7-羟基氟哌啶醇、去甲替林、N-去甲基去甲替林、10-羟基去甲替林、地西泮和奥沙西泮)的方法,乙腈沉淀蛋白,同位素内标消除基质干扰,该方法回收率高、精密度好、操作简便,适合血清和尿液样品中镇静催眠药的快速筛查,可为镇静催眠药的应急中毒检测提供技术支持。

参考文献:

[1] 陈永新,涂荣蓉,韩亚琼,等. 2016~2018 年我院镇静催眠及抗焦虑药物用药分析[J]. 中国现代医药杂志,2020,22(9):

16—20.

- [2] 商娟,李雪娇,顾潇,等. HPLC-MS/MS 法同时测定清心滋肾方中 27 种成分[J]. 中成药,2023,45(6):1774—1780.
- [3] 陈建旭. Q-Orbitrap 高分辨质谱检测生物样品中镇静催眠药含量[D]. 河南 郑州:郑州大学,2017.
- [4] 王莉. 镇静催眠药存在的安全隐患及防治措施的探讨[J]. 中外健康文摘,2011,8(42):454.
- [5] 于浩洋,李颜岩,冯静,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人血清中 4 种镇静催眠类药物[J]. 化学分析计量,2021,30(4):38—41.
- [6] 邢丽梅,谭家镒,赵彦军,等. 尿中甲基安非他明二硝基苯甲酰衍生化 GC-ECD 分析[J]. 中国法医学杂志,2005(1):44—45.
- [7] 徐硕,金鹏飞,邝咏梅,等. HPLC 法检测中成药及保健品中非法添加的 10 种镇静催眠类药物[J]. 西北药学杂志,2019,34(2):181—185.
- [8] 刘金磊. 超分子溶剂萃取-气相色谱-串联质谱法检测尿液和血液中苯二氮草类和唑吡坦药物[D]. 内蒙古 呼和浩特:内蒙古医科大学,2021.
- [9] 张晓梅,胡越,孟祥娟,等. 超高效液相色谱-串联质谱联用快速测定尿样中 14 种镇静催眠类药物[J]. 分析科学学报,2023,39(6):699—704.
- [10] SHI F, GUO C, CONG L, et al. Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements[J]. J Chromatogr A, 2014, 1344(6):91—98.
- [11] 张晓梅,孟祥娟,胡越,等. 超高效液相色谱串联质谱快速测定血中 14 种镇静催眠类药物[J]. 中国工业医学杂志,2023,36(5):459—462.
- [12] 马春玲,陈彬彬,徐象珍,等. 用 HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 9 种镇静催眠类药物浓度及其临床应用[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(8):1208—1212.
- [13] 安静,宋浩静,魏欣,等. SPE-UPLC-MS/MS 法同时检测人血浆中的 9 种镇静催眠药[J]. 华西药理学杂志,2018,33(1):72—76.
- [14] 王小乔,李坚,许晓辉,等. 超滤型高脂基质净化柱结合超高效液相色谱-三重四极杆液质联用法测定鱼肉中七种镇静剂[J]. 食品与发酵工业,2023,49(24):267—274.
- [15] 张建丽,王占良,张亦农. 液相色谱-串联质谱法测定尿样中 11 种苯二氮类药物及其代谢产物[J]. 分析试验室,2014,33(4):479—482.
- [16] 阿力亚·阿西木. 苯丙胺类、安定类等精神类药物在血液和尿液中的定性定量检测方法研究与应用[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2018.

(本文编辑:王珊 收稿日期 2026-02-28)