

GC-MS/MS 测定人血浆中依替唑仑的浓度及其临床应用

王玲¹, 牛明¹, 周青¹, 孙世芃², 孙成文^{1*} (1.中国人民解放军总医院第五医学中心毒检室, 北京 100071; 2.北京博睿检测实验室, 北京 100021)

摘要: 目的 建立人血浆中依替唑仑的 GC-MS/MS 检测方法, 为临床药物分析提供依据。方法 血浆样品以甲苯提取后, 采用色谱柱 BR-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)程序升温, 以多反应监测模式进行离子检测。利用保留时间和离子对比比例定性, 外标法和标准曲线定量, 建立人血浆中依替唑仑的 GC-MS/MS 检测方法。结果 依替唑仑在 0.5~600.0 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好, 相关系数 $r=0.995$, 定量下限为 0.5 ng·mL⁻¹, 三水平的萃取回收率和方法回收率为 70%~110%, 日内、日间精密度 RSD 均<10%, 方法的稳定性良好, 符合生物样品测定要求。结论 该方法灵敏准确, 简便快速, 适用于依替唑仑血药浓度检测。

关键词: 依替唑仑; 气相色谱-串联质谱法; 血药浓度

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)14-1699-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.14.006

引用本文: 王玲, 周青, 徐水英, 等. GC-MS/MS 测定人血浆中依替唑仑的浓度及其临床应用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(14): 1699-1703.

Concentration Determination of Etizolam in Human Plasma by GC-MS/MS and Its Clinic Application

WANG Ling¹, NIU Ming¹, ZHOU Qing¹, SUN Shipeng², SUN Chengwen^{1*} (1.Lab of Toxicant Analysis, Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100071, China; 2.Lab of Beijing Borui Detection, Beijing 100021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a GC-MS/MS method for the detection of etizolam in human plasma and provide the basis for clinical drug analysis. **METHODS** After extraction with toluene, plasma samples were subjected to column BR-5MS capillary column(30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with temperature programming and ion detection in multiple reaction monitoring mode. The GC-MS/MS quantitative determination of etizolam was based on retention time and ratio of ions. The quantitative analysis was based on external standard method and calibration curve. **RESULTS** The linear range of etizolam was 0.5~600.0 ng·mL⁻¹, the coefficient of correlation r was 0.995, the lower limit of quantification was 0.5 ng·mL⁻¹, the recoveries ranged from 70% to 110% at three spiked levels, the RSD of inter-and intra-day was <10%, the stability of method was good, which met the requirements of biological sample determination. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, simple and rapid, and suitable for the detection of etizolam plasma concentration.

KEYWORDS: etizolam; GC-MS/MS; plasma drug concentration

依替唑仑为噻吩并二氮杂草类镇静催眠药, 其药理学特征与苯二氮杂类药物类似, 与γ-氨基丁酸 A 型(γ-aminobutyric acid type A, GABA-A)受体有较高的亲和力^[1]。它通过与 GABA-A 受体上的特定识别位点相互作用, 促进 GABA-A 受体介导的配体门控氯离子通道开放, 从而产生镇静、催眠和抗焦虑等药理作用^[1-2]。治疗剂量下使用依替唑仑具有良好的耐受性, 急性毒性较小, 不良反应发生率较低, 临床上主要用于治疗各种原因引起的焦虑、紧张、抑郁、失眠等症状^[3-4]。但由于该药具有快速催眠作用, 且高剂量使用时产生欣快效应, 因此利用其实施麻醉抢劫、强奸及凶杀的刑事案件或误服

该药物中毒、自杀的现象时有发生^[3-7]。据文献报道, 当大剂量滥用该药物或其他精神药物同时使用时, 它可作为一种新型的精神活性物质, 具有娱乐性滥用的特征^[8-9]。2015 年, 世界卫生组织(WHO)将依替唑仑列为新型精神活性物质^[9]。所以, 如何快速准确地检测出人血浆中依替唑仑, 对公安机关侦察办案具有重要意义, 也能为临床针对性治疗此类患者提供重要的参考作用。

依替唑仑, 分子式为 C₁₇H₁₅ClN₄S, 相对分子质量为 342.07, CAS 号: 40054-69-1。目前关于血浆中依替唑仑浓度的检测国内外有采用 HPLC 和 LC-MS/MS^[10-11], 但其样品前处理过程复杂, 对于

基金项目: 解放军总医院医疗大数据与人工智能研发项目(2019MBD-045)

作者简介: 王玲, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (010)66947270 E-mail: yx_wangling@126.com *通信作者: 孙成文, 男, 高级实验师 Tel: (010)66947378 E-mail: suncw163@163.com

临床毒物盲筛也有一定的局限性。本研究建立依替唑仑的气相色谱-串联质谱联用仪(GC-MS/MS)检测方法,样品前处理过程简单方便,根据目标化合物母离子裂解的子离子特征信息,可有效消除复杂基质产生的干扰从而净化背景,提高了分析灵敏度,可有效应用于临床毒物盲筛工作中,具有重要的实践意义,希望为临床及刑事技术工作者提供参考。

1 仪器与试剂

Scion 456-GC-TQ 气相色谱-质谱/质谱联用仪(德国 Bruker);MX-S 微型旋涡混合器(美国 Scilogex);BY-G20 型高速离心机(北京白洋医疗器械有限公司);XE-100A 分析天平(美国 Denver Instrument Company)。

依替唑仑对照品(美国 Sigma 公司, $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甲醇溶液,批号:FN04171802;纯度:99.9%);环己烷、甲苯、三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯均为色谱纯,均购自美国 Fisher chemicals 公司;空白血浆由解放军总院第五医学中心血库提供。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

对照品系列工作液配制:移取 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑对照品 $400\text{ }\mu\text{L}$ 置于 20 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成 $20.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的依替唑仑储备液,摇匀,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储藏。分别吸取 $20.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑储备液 $2.5, 25.0, 250.0, 750.0, 1\ 500.0, 2\ 250.0, 3\ 000.0\text{ }\mu\text{L}$, 加甲醇定容至 10 mL , 配制成质量浓度分别为 $5.0, 50.0, 500.0, 1\ 500.0, 3\ 000.0, 4\ 500.0, 6\ 000.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的依替唑仑系列工作液,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

$150.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑对照品溶液配制:临用前取 $20.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑储备液 $75\text{ }\mu\text{L}$ 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得 $150.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑对照品溶液,摇匀,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

血浆样品及质控样品的制备:取 $20.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑储备液 $7.5\text{ }\mu\text{L}$ 置于 $992.5\text{ }\mu\text{L}$ 空白血浆中,配制成 $150.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人血浆依替唑仑对照品溶液。分别取空白血浆 $450\text{ }\mu\text{L}$, 依次加入依替唑仑系列工作液 $50\text{ }\mu\text{L}$, 配置成标准曲线血浆样品,浓度分别为 $0.5, 5.0, 50.0, 150.0, 300.0, 450.0, 600.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取依替唑仑系列工作液中

的 $50.0, 1\ 500.0, 4\ 500.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种浓度各 $100\text{ }\mu\text{L}$, 分别加入 $900\text{ }\mu\text{L}$ 空白血浆,配制成 $5.0, 150.0, 450.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 种浓度的依替唑仑人血浆质控样品溶液,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 样品处理

取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 样品于 1.5 mL EP 管中,加入甲苯 $500\text{ }\mu\text{L}$ 进行萃取,旋涡混匀 1 min ,离心 $5\text{ min}(18\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1})$,离心半径 5.7 cm ,分离上层有机相并取上层有机相 $1\text{ }\mu\text{L}$ 进样。

2.3 GC-MS/MS 方法优化

选取 $150.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑对照品溶液,进行依替唑仑的 GC-MS/MS 方法优化。

2.3.1 分离条件 色谱条件:色谱柱 BR-5MS 毛细管柱($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$);自动进样器:CP-8400;柱温采用程序升温:起始温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 2 min ,以速率 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 20 min 。载气:高纯氦气(纯度:99.999%);柱流速: $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。进样量: $1\text{ }\mu\text{L}$,分流比为 $20:1$ 。质谱条件:EI 离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$,传输线温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,电离电压 70 eV 。质谱数据运用 NIST2017 质谱数据库进行图谱检索。

2.3.2 全扫描测定条件 选择 Full Scan 模式,离子扫描范围 $50\sim 360\text{ amu}$;扫描时间: 300 ms ;正离子扫描;确定保留时间以及依替唑仑的特征离子。由总离子流图得出依替唑仑色谱峰的保留时间为 21.2 min 。依替唑仑的一级质谱图见图 1,得到依替唑仑的特征离子为 $m/z\ 342.1$ 。

2.3.3 特征离子的选择和优化 选择 Product 模式,扫描时间: 300 ms ;选取离子 $m/z\ 342.1$ 为母离子,正离子扫描;扫描范围 $200\sim 360\text{ amu}$ 。以氩气为碰撞气,在 EI 电离方式下进行 MS/MS 分析,选择确定最佳碰撞电压(collision energy, CID)和子离子。经不同的 CID 电压碰撞裂解最终选择 2 个离子对及其对应的最优 CID 进入下一步 MRM 监测。这 2 个离子对及 CID 分别为 $342.1\rightarrow 312.9/10.0\text{ eV}$ 、 $342.1\rightarrow 271.9/20.0\text{ eV}$ 。由 MS/MS 分析得到 $m/z\ 342.1$ 为母离子的依替唑仑二级质谱图,见图 2。

2.3.4 多反应监测条件 选择 MRM 模式,扫描时间: 300 ms ;正离子扫描。选取 2 个离子对及其不同的碰撞电压: $342.1\rightarrow 312.9/10.0\text{ eV}$ 、 $342.1\rightarrow$

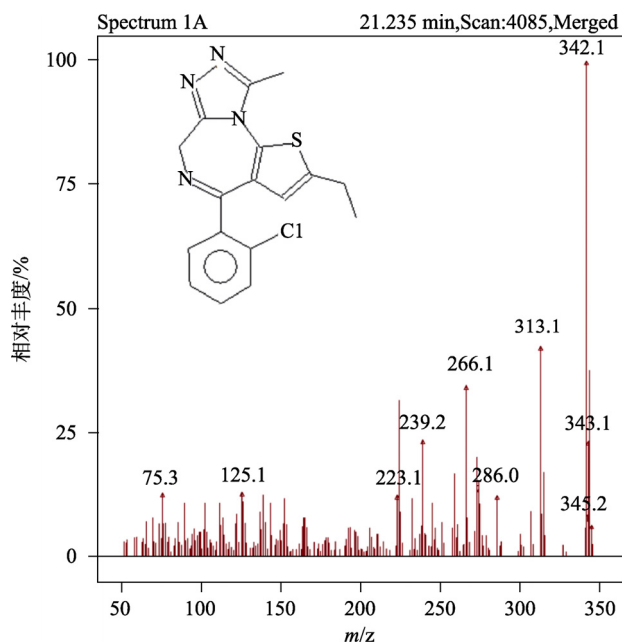


图1 依替唑仑对照品($150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 GC/MS 质谱图
Fig. 1 GC-MS mass spectra of etizolam reference ($150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

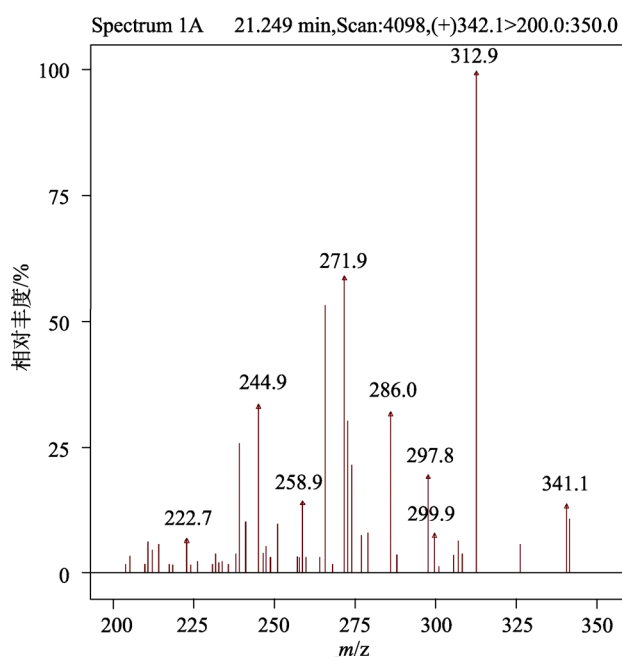


图2 依替唑仑对照品($150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 GC-MS/MS 质谱图
Fig. 2 GC-MS/MS mass spectra of etizolam reference ($150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

271.9/20.0 eV 作为依替唑仑的 MRM 测定条件。以响应值最大的离子对 342.1→312.9 作为定量离子对,以 342.1→271.9 作为定性离子对,并将建立的 MRM 方法保存于自建谱库 User Library 里。

2.4 方法学验证

2.4.1 方法专属性 同时取空白血浆和 $150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆对照品溶液,按“2.2”项下

方法处理后,调用“2.3.4”项下建立的依替唑仑 MRM 方法,依次进行检测,所得色谱图见图 3。结果表明,血样中的内源性杂质不干扰依替唑仑的测定。

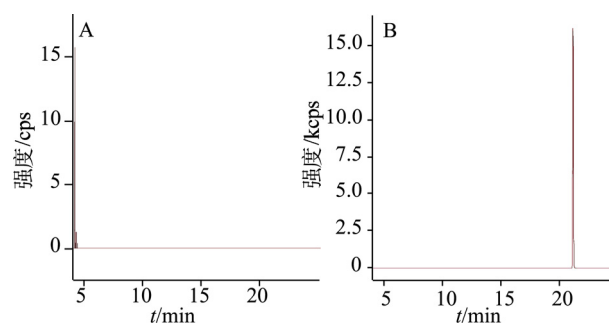


图3 空白血浆(A)和依替唑仑人血浆对照品($150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B)的 MRM 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of blank (A) and etizolam in human plasma($150.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B) by MRM scan mode

2.4.2 标准曲线与定量下限考察 取“2.1”项下标准曲线血浆样品,按“2.2”项下方法处理后,调用“2.3.4”项下建立的依替唑仑 MRM 方法,依次进行检测。以依替唑仑血浆浓度($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),用最小二乘法进行回归,求得回归线方程为 $Y=304.3X+1534$ ($r=0.995$),线性范围为 $0.5\sim600.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性关系良好。取已知浓度的血浆样品,按“2.2”项下方法处理后,调用“2.3.4”项下建立的依替唑仑 MRM 方法,平行测定 3 次,以信噪比(S/N)=10 测得此条件下依替唑仑的定量下限为 $0.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 回收率和精密度试验 取“2.1”项下配制的低、中、高 3 种不同浓度的依替唑仑人血浆质控样品,按“2.2”项下方法处理后,调用“2.3.4”项下建立的依替唑仑 MRM 方法,3 种浓度的样品每种质量浓度 5 份,每日平行测定 5 次,连续测定 5 d,用标准曲线计算实测浓度,并与配制浓度比较,计算各浓度的方法回收率、准确度及日内、日间精密度。结果表明,3 种浓度的质控样品测定的精密度 RSD 均 $<10\%$,方法回收率均在 $90\%\sim110\%$,符合生物样品分析要求。结果见表 1。

取“2.1”项下配制低、中、高 3 种浓度的质控样品,按“2.2”项下方法处理后,调用“2.3.4”项下建立的依替唑仑 MRM 方法,分析测得提取后各质控样品峰面积;另取 3 份空白血浆,按“2.2”项下方法处理,分别取上层有机相 $450 \mu\text{L}$,各加入“2.1”项下系列工作液中的 50.0 , 1500.0 , $4500.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 依替唑仑对照品溶液 $50 \mu\text{L}$,得

5.0, 150.0, 450.0 ng·mL⁻¹ 依替唑仑对照品溶液, 按“2.2”项下方法处理后, 调用“2.3.4”项下建立的依替唑仑 MRM 方法, 分析测得 3 种浓度的峰面积。每个浓度测定 5 个样本, 将提取后各质控峰面积与依替唑仑对照品溶液的峰面积相比, 计算萃取回收率。低、中、高 3 种浓度的质控样品萃取回收率为 70%~80%, 见表 1。

2.4.4 稳定性试验 取“2.1”项下配制的低、中、高 3 种浓度的质控样品, 每种质量浓度 5 份。分别考察样品于-20℃冷冻保存 14 d 的长期稳定性和反复冻融 3 次(-20℃~20℃)的稳定性, 结果见表 2。结果显示, 样品在上述条件下稳定性良好, RSD 均<10%。

2.5 临床应用

某患者, 女, 28 岁, 与异性朋友约会时喝少

量酒后昏迷不醒, 公安机关相关人员送检患者血液于解放军总医院检查。先通过 GC-MS 的 full scan 方法结合 NIST(2017)谱库检索, 初步筛选出患者可能是依替唑仑中毒, 然后再通过与对照品比对, 采用本研究建立的依替唑仑 GC-MS/MS 的 MRM 方法进行测定, 色谱分析时间为 21.2 min, 色谱峰离子对比例和子离子碎片与依替唑仑对照品信息一致, 得出血液中含有依替唑仑的结论, 并计算出患者血液中依替唑仑的药物浓度为 196.8 ng·mL⁻¹。患者血样色谱图和质谱图见图 4。本方法针对中毒患者血浆标本, 采用甲苯提取, 操作简单。利用 GC-MS/MS 检测, 为临床依替唑仑急、慢性中毒患者的快速诊断和抢救提供了科学依据。

表 1 人血浆中依替唑仑的回收率、准确度和精密度($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 1 Recovery rate, accuracy and precision of etizolam in humam plasma($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

质量浓度/ ng·mL ⁻¹	萃取回收率/ %	方法回收率/ %	日内($n=5$)			日间($n=5$)		
			测定浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%	测定浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%
5.0	82.45±3.16	97.62±4.05	4.72±0.31	6.58	94.40	4.65±0.32	6.94	93.00
150.0	76.02±4.95	98.15±3.68	148.17±7.20	4.86	98.78	147.14±7.90	5.37	98.09
450.0	72.94±5.82	101.94±4.72	441.06±7.19	1.63	98.01	437.02±9.40	2.15	97.12

表 2 人血浆中依替唑仑在不同条件下的稳定性($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 2 Stability of etizolam in humam plasma under different conditions($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

质量浓度/ ng·mL ⁻¹	血浆-20℃冻存 14 d			血浆-20℃反复冻融 3 次(-20℃~20℃)		
	测定浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%	测定浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%
5.0	4.58±0.33	7.26	91.60	5.37±0.42	7.85	107.40
150.0	145.92±7.41	5.08	97.28	146.85±6.05	4.12	97.90
450.0	430.82±8.79	2.04	95.74	434.82±8.52	1.96	96.63

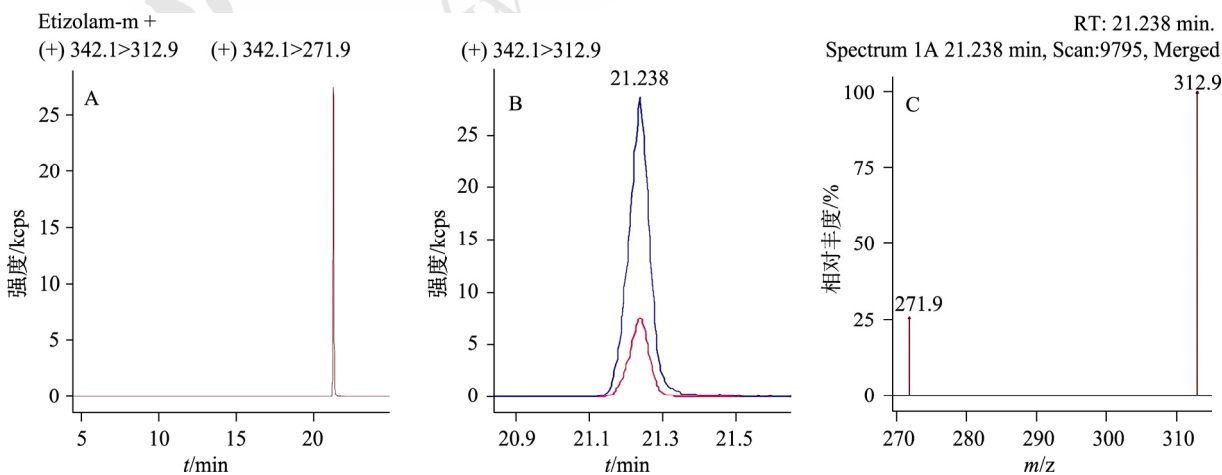


图 4 患者血浆样品中依替唑仑的 MRM 色谱图和质谱图

A-总离子流图; B-4 个离子对在总离子流图中所占比率图; C-MRM 质谱图。

Fig. 4 Chromatogram and mass spectra of etizolam in plasma sample of patient by MRM scan mode

A-total ion chromatogram; B-ratio of four ion pairs in the total ion chromatogram; C-the mass spectra.

3 讨论

3.1 分析方法的选择

在临床工作中,经常会遇到中毒原因不明的患者,一般会通过对中毒患者基本的病情分析判断后选择合适的方法进行初步筛选。GC-MS/MS 使用的 NIST 系列数据库是由美国国家标准与技术研究院发布,使用该软件对 GC-MS/MS 的 full scan 模式下获取的谱图与 NIST 数据库中的谱图进行比较,用于化合物鉴定。此外该软件还可以提供谱图解释功能,如计算分子量、估算元素组成以及简单的结构推断。在临床毒物盲筛中具有重要意义。

3.2 萃取溶剂的选择

考察了乙酸乙酯、乙醚、三氯甲烷、甲苯、环己烷这 5 种有机溶剂对依替唑仑的萃取能力。将待测依替唑仑样品用乙酸乙酯、乙醚、三氯甲烷、甲苯、环己烷作萃取剂,恒速涡旋萃取过滤后直接进样,结果表明甲苯和三氯甲烷萃取效果最佳,回收率最高。但由于三氯甲烷的密度比水的密度大,需进行单独分离后进样分析,操作较为繁琐,最终选取甲苯作为萃取溶剂。

3.3 质谱方法的优化

本研究建立的 GC-MS/MS 检测方法,首先通过 full scan 模式确定依替唑仑在色谱图中的保留时间,由一级质谱确定依替唑仑的特征离子为基峰离子和分子离子峰;然后在 product 模式下以特征离子为母离子,选择其相应的子离子并优化最佳的碰撞电压;最后在 MRM 模式下以所选离子对及其最佳碰撞能量进行检测。采用 MRM 模式可以有效消除复杂样品基质干扰(生物样品中的有油类、脂肪类等),净化了本底,提高了检测的灵敏度和准确性。而母离子和 CID 能量的大小是进行 MS/MS 分析的关键因素。CID 能量不足,无子离子生成;能量过高,母离子消失,产生的碎片离子成分复杂。一般而言,当母离子相对丰度占相对丰度为 100% 子离子的 10% 左右时为最佳的能量选择。此外,由于没有 MS/MS 图谱库,二级质谱

图需要实验室自建谱库,所以本实验配制了系列浓度的对照品溶液,通过解析图谱,从而确证特征离子及相应子离子的准确性,建立的依替唑仑 GC-MS/MS 谱库可有效用于临床药物分析。

REFERENCES

- [1] SANNA E, PAU D, TUVERI F, et al. Molecular and neurochemical evaluation of the effects of etizolam on GABAA receptors under normal and stress conditions[J]. *Arzneimittelforschung*, 1999, 49(2): 88-95.
- [2] NIELSEN S, MCAULEY A. Etizolam: A rapid review on pharmacology, non-medical use and harms[J]. *Drug Alcohol Rev*, 2020, 39(4): 330-336.
- [3] TAMAMA K, LYNCH M J. Newly emerging drugs of abuse[M]. *Substance Use Disorders*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 463-502.
- [4] BUSARDÓ F P, DI TRANA A, MONTANARI E, et al. Is etizolam a safe medication? Effects on psychomotor performance at therapeutic dosages of a newly abused psychoactive substance[J]. *Forensic Sci Int*, 2019(301): 137-141.
- [5] MOOSMANN B, BISEL P, AUWÄRTER V. Characterization of the designer benzodiazepine diclazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics[J]. *Drug Test Anal*, 2014, 6(7/8): 757-763.
- [6] MOOSMANN B, HUPPERTZ L M, HUTTER M, et al. Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics[J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48(11): 1150-1159.
- [7] KOLBE V, RENTSCH D, BOY D, et al. The adulterated XANAX pill: A fatal intoxication with etizolam and caffeine[J]. *Int J Legal Med*, 2020, 134(5): 1727-1731.
- [8] JURÁSEK B, ČMELO I, HÁJKOVÁ K, et al. Counterfeit benzodiazepines—A phantom menace[J]. *Int J Clin Pract*, 2020, 74(10): e13575.
- [9] GEVORKYAN J, KINYUA J, PEARRING S, et al. A case series of etizolam in opioid-related deaths[J]. *J Anal Toxicol*, 2021. Doi: 10.1093/jat/bkaa146.
- [10] MONDAL P, SOBHARANI S, RAMAKRISHNA R. A novel simultaneous quantification method for escitalopram and etizolam in human plasma using liquid chromatography-ESI-tandem mass spectrophotometry- application to pharmacokinetic study[J]. *Curr Pharm Anal*, 2017, 13(3): 279-288.
- [11] HIKIDA K, INOUE Y, NOUCHI E, et al. Determination of etizolam in human serum or plasma using automated column-switching high-performance liquid chromatography [J]. *Japan J Clin Chem*, 1990, 19(4): 354-359.

收稿日期: 2020-07-02

(本文责编: 沈倩)