

75 份市售黄酒样品中检出 DMP、DIBP 和 DBP 3 种 PAEs 单体, 检出率 58.67%, DBP 超标率 22.67%。

目前, 职业暴露人群接触 PAEs 浓度远高于生活接触的环境浓度。我国现行的职业卫生标准中 PAEs 类化合物除了邻苯二甲酸二丁酯外, 尚无其他化合物卫生标准^[13], 本研究旨在全面掌握深圳市职业接触 PAEs 化合物常见类别、体内母体化合物及其主要代谢产物水平, 为其职业暴露毒理研究提供基础实验数据。

参考文献

- [1] 赵岩, 薛丽君, 黄婧, 等. 邻苯二甲酸酯健康影响流行病学研究进展 [J]. 首都公共卫生, 2020, 14 (1): 9-12.
- [2] Serrano SE, Karr CJ, Seixas NS, *et al.* Dietary phthalate exposure in pregnant women and the impact of consumer practices [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11 (6): 6193-6215.
- [3] 高旭, 于霞, 李信薇, 等. 邻苯二甲酸单甲酯对大鼠血液生化指标的影响及毒理研究 [J]. 生态毒理学报, 2022, 17 (6): 389-399.
- [4] 孙静, 张励倩, 顾磊, 等. 子宫肌瘤和卵巢囊肿与血清中 PAEs 暴露水平关系 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31 (6): 829-832.
- [5] 陈甘讷, 黄伟雯, 李洪庆, 等. 广州孕妇孕期邻苯二甲酸酯暴露水平及其与妊娠结局的关系 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38

(6): 573-579.

- [6] 张梅如, 邱章逸, 王蕾, 等. 上海市 152 对乳母婴儿尿中邻苯二甲酸酯累积暴露的风险评估 [J]. 卫生研究, 2017, 46 (2): 237-243.
- [7] 高崇婧, 贾璐璐, 吴鹏冉, 等. 中国居民对邻苯二甲酸酯类增塑剂暴露的现状分析 [J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2017, 38 (2): 93-103.
- [8] 胡红美, 李铁军, 朱颖杰, 等. 邻苯二甲酸酯类化合物的污染现状及检测方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12 (21): 8573-8581.
- [9] 黄超因, 李云, 彭俊钰, 等. 人体邻苯二甲酸酯暴露的尿液生物标志物分析方法 [J]. 色谱, 2019, 37 (8): 815-823.
- [10] 高慧, 许媛媛, 孙丽, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定人尿液中 7 种邻苯二甲酸酯代谢物 [J]. 色谱, 2015, 33 (6): 622-627.
- [11] 宋韶芳, 周金华, 李琴, 等. 广州市成年居民邻苯二甲酸酯内暴露水平及影响因素研究 [J]. 实用预防医学, 2023, 30 (2): 156-160.
- [12] 王芳, 杨风华, 杨中荣, 等. 湖州市市售黄酒邻苯二甲酸酯污染健康风险评价 [J]. 预防医学, 2023, 35 (5): 421-424.
- [13] 王小逸, 林兴桃, 客慧明, 等. 北京地区家庭中邻苯二甲酸酯类环境污染物的调查 [J]. 环境与健康杂志, 2007, 24 (10): 820-821.

(收稿日期: 2023-07-21; 修回日期: 2023-08-03)

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

Rapid determination of 14 sedative and hypnotic drugs in blood by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

张晓梅, 孟祥娟, 胡越, 荣利, 刘晓东

(北京市化工职业病防治院中心实验室, 北京 100093)

摘要: 取血样沉淀蛋白后离心, 上清液用流动相稀释过膜上机, 经 Waters BEH C18 色谱柱分离, 以多反应监测模式, 外标法定量, 建立血液样本中 14 种镇静催眠类药物的超高效液相色谱串联质谱分析方法。结果显示, 血中 14 种镇静催眠类药物测定方法的线性关系良好, $r>0.999$, 检出限 3.0~18.8 ng/ml, 定量限 10.0~62.7 ng/ml; 样本加标后平均回收率 80.47%~121.39%, 批内和批间精密度分别为 0.43%~3.69% 和 0.86%~8.42%。本方法中样本经沉淀蛋白、稀释等简单处理后直接上机分析, 简单快速, 准确度和精密度可满足日常测定需求, 可为血中镇静催眠类药物的残留分析提供参考。

关键词: 血样; 镇静催眠类药物; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R917 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2023)05-0459-05

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyxx.2023.05.023

镇静催眠类药物是中枢神经系统抑制剂, 可分为苯二氮草类 (benzodiazepines, BZDs), 如氯硝西泮、地西泮等; 非苯二氮草类, 如佐匹克隆、唑吡坦等。镇静催眠类药物的正常适量使用有助于缓解失眠对人体健康的损害, 但一次性大剂量服用可引起急性镇静催眠药中毒, 长期滥用催眠药可因耐药性和依赖性而导致慢性中毒。快速准确测定生物样本中药物浓度对于临床抢救治疗和刑事案件侦破具有重要意义。镇静催眠类药物的检测方法主要有高效液相色谱法^[1]、气

作者简介: 张晓梅 (1991—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事化学与代谢产物分析工作。

相色谱-质谱法^[2]、液相色谱-质谱法^[3]、红外光谱法^[4]等,其中液相色谱-质谱法因具有检出限低、灵敏度高等优势被广泛应用^[5-7]。目前镇静催眠类药物的检测以尿液、血液样本居多,但其前处理多采用液-液萃取^[8-9]、固相萃取^[10]等方式,操作复杂,增加了检测时间和成本。本研究采用超高效液相色谱串联质谱法,将血液样本沉淀蛋白后直接稀释进样,同时检测 14 种镇静催眠类药物,所需样本量小且操作简便快捷,可为血中镇静催眠类药物的测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Acquity UPLC I-Class Xevo TQ-XS 超高效液相色谱串联质谱仪, Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 美国 Waters 公司; SQP 十万分之一天平, 德国 Sartorius 公司; 涡旋振荡器, 美国 Scientific industries 公司; 高速离心机, 中国湘仪公司; Purelab Chorus 超纯水系统, 英国 Elga 公司; 0.22 μm Syring Filters MCM 滤膜, 天津 Agela Technologies 公司。

1.1.2 试剂 硝西泮、氯氮草、阿普唑仑、巴比妥、地西泮 (100 mg/L)、佐匹克隆 (99.8%), 坛墨质检科技股份有限公司; 劳拉西泮、氯硝西泮、司可巴比妥、异戊巴比妥、苯巴比妥、艾司唑仑 (100 mg/L), 天津阿尔塔科技有限公司; 硫喷妥 (99.8%), 中国食品药品检定研究院; 唑吡坦 (99.4%), 佳途科技有限公司; 甲酸 (纯度>98%), 日本 TCI 公司, 甲醇 (质谱级), 北京 Mreda 科技有限公司; 乙腈 (质谱级), 美国赛默飞 Fisher 公司。实验用水 18.2 MΩ 超纯水。空白血样以肝素抗凝血采样管采集健康人静脉血约 5 ml, 置于 4 ℃ 保存。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱, 柱温 45 ℃, 进样量 2 μl, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液、B 为乙腈, 流速 0.3 ml/min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
初始	95.0	5.0
0.50	95.0	5.0
8.00	5.0	95.0
8.50	5.0	95.0
9.00	95.0	5.0
10.00	95.0	5.0

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源; 毛细管电压 3.00 kV; 离子源温度 150 ℃; 脱溶剂气温度 500 ℃; 脱溶剂气流量 1 000 L/h; 锥孔气流量 150 L/h。以多反应监测模式扫描, 目标药物采用正、负两种离子模式进行采集。检测条件参数见表 2。

表 2 14 种目标药物的质谱采集参数和保留时间

药物	母离子	子离子	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)	保留时间 (min)
氯硝西泮	316.0 [M+H] ⁺	270.1 [*] 214.0	4	22 28	4.99
地西泮	285.1 [M+H] ⁺	154.0 [*] 193.1	2	26 32	5.72
硝西泮	282.1 [M+H] ⁺	180.1 [*] 207.1	2	36 32	4.78
阿普唑仑	309.1 [M+H] ⁺	281.1 [*] 274.2	2	32 34	4.99
艾司唑仑	295.0 [M+H] ⁺	267.1 [*] 205.1	2	24 40	4.85
劳拉西泮	321.2 [M+H] ⁺	275.1 [*] 83.7	2	14 22	4.95
氯氮草	300.1 [M+H] ⁺	227.0 [*] 165.0	2	24 48	3.72
佐匹克隆	389.0 [M+H] ⁺	245.1 [*] 352.3	20	20 10	3.11
唑吡坦	308.2 [M+H] ⁺	235.2 [*] 92.1	2	32 50	3.53
苯巴比妥	231.0 [M-H] ⁻	42.0 [*] 128.9	32	12 20	3.94
异戊巴比妥	225.0 [M-H] ⁻	42.0 [*] 181.5	30	16 8	4.70
司可巴比妥	237.0 [M-H] ⁻	194.0 [*] 146.8	2	12 8	4.91
巴比妥	182.9 [M-H] ⁻	140.0 [*] 42.1	16	12 12	2.99
硫喷妥	241.1 [M-H] ⁻	101.0 [*] 181.1	28	20 18	5.32

注: *, 表示定量离子。

1.3 方法 取 200 μl 样本, 加入 800 μl 乙腈-甲醇 (体积比 3 : 1), 涡旋混匀 5 min 沉淀蛋白后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用流动相 (A : B = 1 : 1) 稀释 1 倍, 过膜后上机检测。移取 14 种药物单标用甲醇配制成 5 mg/L 混标储备液, 于 -20 ℃ 保存。以流动相 (A : B = 1 : 1) 逐级稀释成浓度为 20 ~ 500 ng/ml 的标准系列, 以浓度和定量离子峰面积拟合得到各目标药物的标准曲线方程。

1.4 统计分析 以 Excel 对采集数据进行统计处理, 采用 Origin 9.8 软件绘图。

2 结果

2.1 色谱条件优化 以目标药物的峰型、响应强度、

出峰时间为参考,优化色谱柱类型、流动相配比、流速等液相条件。HSS T3 与 BEH C18 色谱柱均可实现 14 种目标药物的有效分离,但有 6 种药物在 C18 色谱柱的响应强度远高于 T3 色谱柱,且 C18 色谱柱的出峰时间比 T3 色谱柱早约 0.4 min。乙腈为流动相时,阿普唑仑的峰型优于甲醇,药物出峰时间比甲醇早 1.2 min,同时加入 0.1%甲酸可有效改善目标药物峰型。随着流速增大,柱压和系统压力升高,出峰时间缩短。流速 ≥ 0.3 ml/min 时,可在 6.0 min 内完全出峰。优化后液相条件: C18 色谱柱,流动相为 0.1%甲酸水溶液和乙腈,流速 0.3 ml/min。加标样本色谱图见图 1(封三)。

2.2 质谱条件优化 根据化合物单同位素质量数,以 100 ng/ml 混合标准溶液通过质谱直接进样,观察母离子信号,调节毛细管电压、脱溶剂气等仪器参数,以仪器自动优化碰撞能和锥孔电压,选出信号最强的碎片离子作为定量离子,优化后的质谱参数见表 2。

2.3 样品前处理优化

2.3.1 沉淀蛋白试剂种类 以加标回收率评价纯乙腈、纯甲醇、不同配比乙腈-甲醇(3:1、3:2、1:1)作为沉淀蛋白试剂对目标药物测定的影响。图 2(封三)可见,随试剂中甲醇比例的增大,回收率

呈先升后降趋势,以乙腈-甲醇(3:2)沉淀蛋白时,地西洋的加标回收率下降至 71.23%;以纯乙腈和乙腈-甲醇(3:1)沉淀蛋白时,14 种药物的加标回收率 87.05%~105.58%。因纯乙腈会使血样形成大颗粒块状固体,影响回收率及其稳定性,而乙腈-甲醇(3:1)沉淀蛋白时形成的样本颗粒小且均匀,所以选取乙腈-甲醇(3:1)作为沉淀蛋白试剂。

2.3.2 沉淀蛋白试剂用量 以 1~5 倍样本体积的沉淀蛋白试剂处理加标样本,观察其对回收率的影响。由图 3(封三)可见,1 倍样本体积沉淀蛋白时过膜后的溶液中仍出现沉淀物,不适合仪器分析;以 2 倍体积试剂沉淀蛋白时,回收率上升后趋于平稳;3 倍体积时回收率明显升高,为方便计算,选取 4 倍样本体积进行后续实验,即样本经前处理后共稀释 10 倍。

2.4 方法验证

2.4.1 线性范围、检出限与定量限 在优化好的条件下测定标准系列,以浓度和定量离子峰面积拟合得到目标药物的线性回归方程,各药物在标准曲线范围内线性关系良好,相关系数 $r > 0.999$ 。连续测定 10 次接近空白浓度的溶液,以标准差法计算检出限和方法定量下限,14 种目标药物的检出限为 3.0~18.8 ng/ml,定量限 10.0~62.7 ng/ml(以样本稀释 10 倍计)。见表 3。

表 3 测定方法的线性范围、检出限和定量限

药物	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 (ng/ml)	检出限 (ng/ml)	定量限 (ng/ml)
氯硝西泮	$Y = 3.582 \times 10^4 X + 7.917 \times 10^5$	0.999 6	0~300	5.6	18.8
地西洋	$Y = 4.758 \times 10^4 X + 8.848 \times 10^5$	0.999 2	0~300	3.6	12.1
硝西泮	$Y = 2.690 \times 10^4 X + 7.587 \times 10^5$	0.999 7	0~500	6.9	23.1
阿普唑仑	$Y = 1.454 \times 10^4 X + 1.996 \times 10^5$	0.999 3	0~500	3.8	12.6
艾司唑仑	$Y = 4.245 \times 10^4 X + 9.337 \times 10^4$	0.999 6	0~500	4.7	15.6
劳拉西泮	$Y = 1.437 \times 10^4 X + 4.733 \times 10^4$	0.999 1	0~500	4.8	16.1
氯氮草	$Y = 6.387 \times 10^4 X + 4.545 \times 10^5$	0.999 1	0~500	4.0	13.4
佐匹克隆	$Y = 1.261 \times 10^4 X + 1.064 \times 10^5$	0.999 4	0~300	5.7	19.1
唑吡坦	$Y = 1.378 \times 10^5 X + 2.850 \times 10^6$	0.999 1	0~300	3.0	10.0
苯巴比妥	$Y = 57.337 \times X - 140.244$	0.999 5	0~500	9.9	32.9
异戊巴比妥	$Y = 64.367 \times X - 709.777$	0.999 1	0~300	18.8	62.7
司可巴比妥	$Y = 196.793 \times X - 736.139$	0.999 6	0~300	17.4	58.0
巴比妥	$Y = 58.841 \times X - 711.878$	0.999 4	0~300	15.6	51.9
硫喷妥	$Y = 46.536 \times X - 224.924$	0.999 4	0~500	15.3	51.0

2.4.2 准确度和精密度 通过样本加标方式评价方法准确度和精密度。根据标准曲线线性范围,在血中添加 3 个浓度的混标,每个浓度平行处理 6 份,测定准确度和批内精密度;同法每个浓度水平处理 3 份,于 3~5 d 内进行 6 次重复测定,测定批间精密度。14 种药物的平均加标回收率 80.47%~121.39%,批内

精密度 0.43%~3.69%,批间精密度 0.86%~8.42%。见表 4。

2.4.3 稳定性 将加标 1.0、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 的血样置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,于当日、第 3、7 天测定并计算样本含量下降率。结果显示,佐匹克隆在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 3、7 d 时样本含量下降率分别为 56.31%、91.14%;

表 4 测定方法的准确度和精密度				
药物	加标量 (μg/ml)	回收率 (%)	批内精密度 (%)	批间精密度 (%)
氯硝西洋	0.5~2.0	94.75~99.45	0.94~1.70	1.71~2.74
地西洋	0.5~2.0	80.47~83.96	0.75~1.00	5.50~8.42
硝西洋	0.5~2.0	96.96~108.28	1.08~1.70	0.86~4.33
阿普唑仑	0.5~2.0	116.61~121.39	0.62~1.41	1.29~6.49
艾司唑仑	0.5~2.0	99.91~104.88	0.43~1.27	1.38~2.87
劳拉西洋	0.5~2.0	97.57~101.93	0.76~1.42	1.19~2.49
氯氮革	0.5~2.0	99.91~102.26	0.75~1.17	1.86~3.29
佐匹克隆	0.5~2.0	83.07~86.81	0.77~1.53	4.51~5.82
唑吡坦	0.5~2.0	97.76~102.89	0.69~1.02	1.41~3.37
苯巴比妥	0.5~2.0	94.62~98.71	1.75~2.56	2.01~2.65
异戊巴比妥	0.5~2.0	92.77~99.54	2.22~3.15	2.14~3.13
司可巴比妥	0.5~2.0	91.60~98.48	1.00~1.69	1.04~1.88
巴比妥	0.5~2.0	85.58~94.46	0.88~3.40	4.27~5.20
硫喷妥	0.5~2.0	96.47~102.89	2.60~3.69	2.18~3.01

在-20℃保存3、7d含量下降率分别为14.87%、21.81%。巴比妥在保存3、7d时样本含量最大下降率分别为8.46%和17.96%。其余12种药物在两种温度下保存至7d时含量最大下降率均<10%，且在-20℃保存的含量下降率普遍低于4℃。对于不含佐匹克隆和巴比妥的样本，可在-20℃保存7d；若含有这两种药物则需在采样当日检测，以提高准确性。

2.5 实际样本测定 因实际人血样本难以涵盖所有目标药物，所以用空白人血样本加标的方式对实际样本进行测定。配制上机浓度为50、100、200 μg/L的加标血样，按照优化的方法进行预处理，分别测定每组样本本底值和加标含量，每个浓度测定6份样本，其中样本本底中均未检出目标药物，3个水平样本中14种目标药物的平均加标回收率分别为（96.87±8.15）%、（97.62±10.10）%及（97.38±8.14）%。

3 小 结

本研究建立了血中14种镇静催眠类药物测定的超高效液相色谱串联质谱分析方法，样本经乙腈-甲

醇（3：1）沉淀蛋白后离心，以流动相稀释1倍后过膜直接上机测定，10 min内可完成分析，操作简便高效；同时取样量仅为200 μl，为医药相关研究中的小样本分析提供了可能性。14种药物在标准曲线范围内线性关系良好，批内和批间精密度均<10%，准确度高，精密度好，可快速、准确测定血中14种镇静催眠类药物含量，为临床中毒救治和案件侦破提供技术支持。

参考文献

[1] 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.

[2] 玛依拉·买买提. 苯丙胺及安定类精神类药物在毛发中的定性定量GC-MS检测方法的研究与应用[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.

[3] 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种苯二氮革类药物[J]. 分析测试学报, 2021, 40(4): 577-582.

[4] 侯伟, 王继芬, 张蕾萍, 等. 药品安全视域下安眠镇静类药物光谱模式识别研究[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(5): 28-35.

[5] 张秋云, 杨洪生, 谭秀慧, 等. 液相色谱-串联质谱测定水产品中15种苯二氮革类镇静剂的药物残留[J]. 食品与机械, 2022, 38(11): 60-67.

[6] 郝敬梅, 刘飞, 胡骏杰, 等. UPLC-MS/MS法快速筛查尿液中30种滥用药物[J]. 分析试验室, 2021, 40(3): 312-317.

[7] 石银涛, 王绘军, 王俊伟, 等. LC-MS/MS快速测定血液中13种安眠镇静类药物及其代谢产物[J]. 法医学杂志, 2020, 36(1): 45-51.

[8] 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.

[9] 张建丽, 王占良, 张亦农. 液相色谱-串联质谱法测定尿样中11种苯二氮革类药物及其代谢产物[J]. 分析试验室, 2014, 33(4): 479-482.

[10] 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.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-02-22)

(上接第454页)

照室周围辐射水平较低,但仍需加强日常安全管理,重视对放射工作人员的安全知识培训,逐步提高工作人员管理和安全使用辐照装置的能力。

参考文献

[1] 沈思林. 钴-60 γ 辐照装置退役处置 β 放射性表面沾污测量[J]. 环境科学导刊, 2011, 30(3): 11-13.

[2] GB 18871—2002, 电离辐射防护与辐射源安全基本标准[S].

[3] GBZ 141—2002, γ 射线和电子束辐照装置防护检测规范[S].

[4] 金辉. 钴源辐照装置的安全监控与事故防范[J]. 中国辐射卫生, 2006, 15(1): 67-69.

[5] 侯庆梅, 孙晓博. 1985—1994年 γ 辐照装置放射事故原因浅析[J]. 中国辐射卫生, 1997, 6(1): 16-18.

[6] 刘海生, 许献洪, 顾国兴, 等. ^{60}Co 辐照装置的辐射防护监测[J]. 同位素, 2006, 19(1): 57-62.

(收稿日期: 2023-03-01; 修回日期: 2023-05-17)

WISP1对百草枯诱导肺泡细胞上皮间质转化和基质金属蛋白酶-9表达的影响

(正文见396~400页)

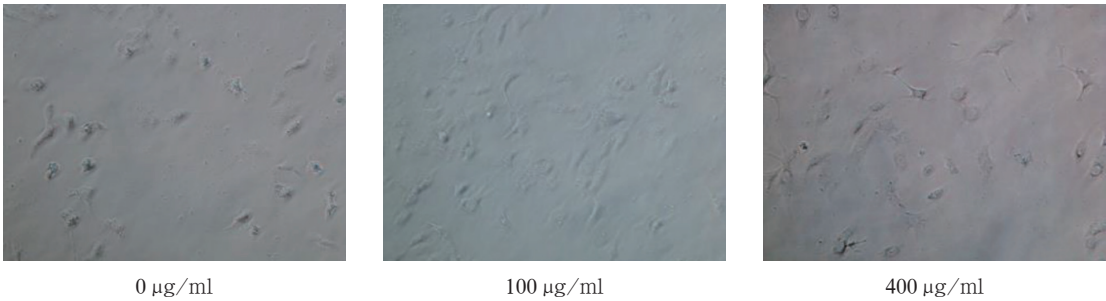


图1 不同浓度PQ对A549细胞形态学的影响 (×20)

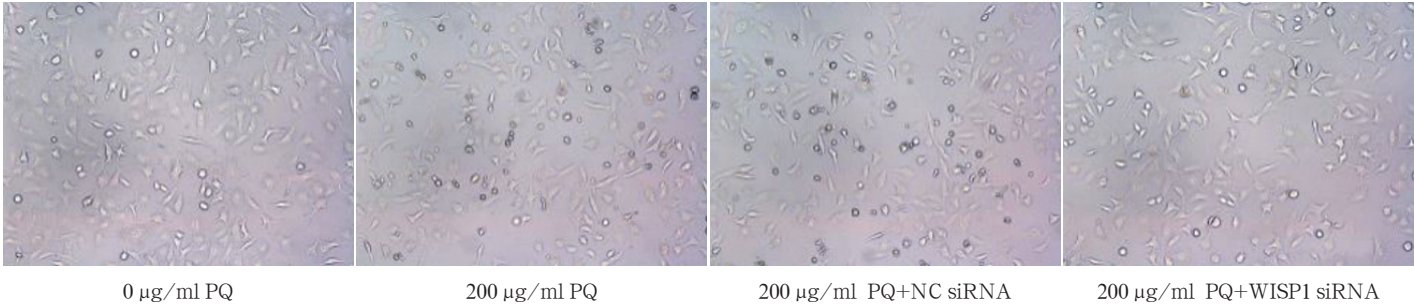


图5 WISP1对PQ诱导A549细胞形态学改变的影响 (×20)

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

(正文见459~462页)

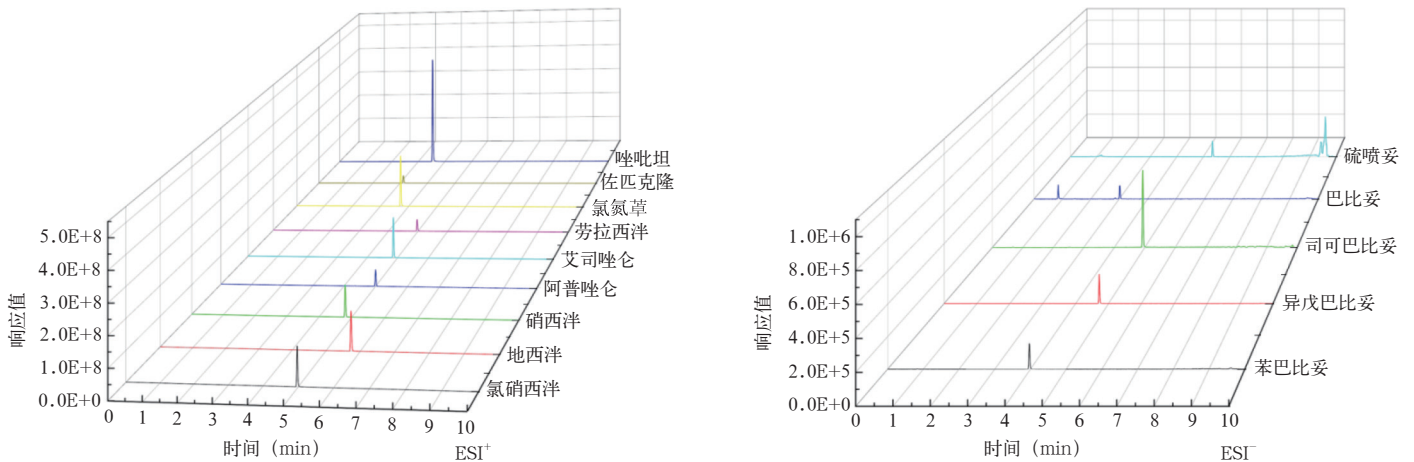


图1 加标样品色谱图

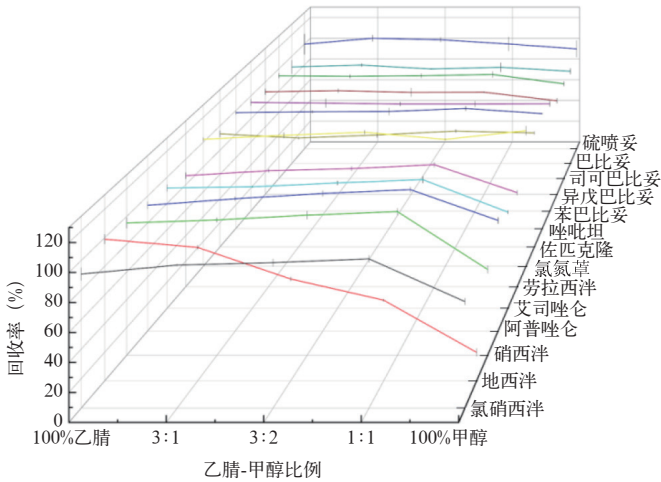


图2 沉淀蛋白试剂种类对药物加标回收率的影响

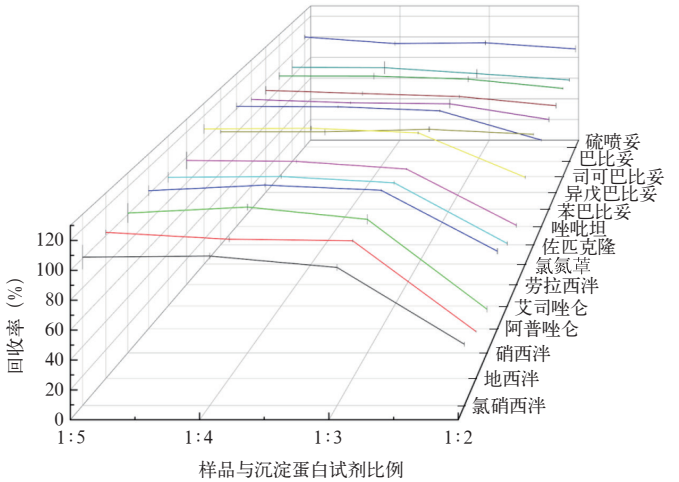


图3 沉淀蛋白试剂用量对药物加标回收率的影响