

血浆和尿中苯并二氮杂䓬类药物及其代谢物的 电子捕获气相色谱筛选分析法

姚丽娟* 谭家镒 姜兆林 邢丽梅

(中国刑警学院法医系, 沈阳 110035)

摘要 建立了血浆和尿中 11 种苯并二氮杂䓬类药物及其 9 种代谢物的电子捕获检测气相色谱分析方法。血浆及加 γ -葡萄糖醛酸酶水解后的尿在碱性条件下用苯-异戊醇 (98:51:5) 提取, 提取物非衍生化或三甲硅烷基衍生化后进行色谱分析。分析采用两根极性不同的色谱柱。检材中分析物的检出限大多数低于 $10 \mu\text{g/L}$, 本方法还可用于定量分析。自愿者口服治疗量药物, 其血浆、尿中药物和代谢物的分析结果表明: 本方法实用于麻醉抢劫案中的药物分析。

关键词 苯并二氮杂䓬类药物, 气相色谱法, 血浆, 尿

1 引言

苯并二氮杂䓬类药物, 常见于成瘾滥用和麻醉后犯罪以及过量服用自杀, 尤以三唑仑、阿普唑仑、氟硝西泮、氯硝西泮和地西泮等在麻醉抢劫案中使用较多。血、尿等生物检材中, 该类物质及其代谢物的分析在司法鉴定中具有重要的意义。

已报道的该类物质的分析方法有免疫分析法^[1]、薄层色谱法^[2]、气相色谱法^[3~5]、气-质联用法^[6]和高效液相色谱法^[7]等。本实验建立了血浆和尿中的 11 种该类物质及其 9 种代谢物的非衍生化和三甲硅烷基 (TMS) 衍生化的电子捕获检测气相色谱分析方法。

2 实验部分

2.1 色谱仪及色谱条件

HP-6890 气相色谱仪 (美国惠普公司), 配置 μ -ECD 检测器和 HP-化学工作站。

HP-5 柱: $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm i. d.}$ (膜厚 $0.25 \mu\text{m}$); 柱温 $200 \text{ } (1 \text{ min}) \xrightarrow{20 / \text{min}} 280 \text{ } (15 \text{ min})$, 气化温度 250 , 检测器温度 300 ; 不分流进样 (阀关闭时间 0.7 min), 载气高纯氮 (恒压, 压力 116.7 kPa), 尾吹高纯氮 (60 mL/min)。HP-50⁺ 柱: $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm i. d.}$ (膜厚 $0.1 \mu\text{m}$), 柱温 $200 \text{ } (1 \text{ min}) \xrightarrow{20 / \text{min}} 280 \text{ } (15 \text{ min})$, 载气高纯氮 (恒压, 压力 121.1 kPa), 其余条件同 HP-5 柱。

2.2 试剂和材料

地西泮、硝西泮、奥沙西泮、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、氯硝西泮、利眠宁、氟西泮 (国家麻醉品实验中心)、氟硝西泮、劳拉西泮 (美国新泽西州司法鉴定研究所)、1-羟基三唑仑、1-羟基阿普唑仑和去甲西泮 (美国 Sigma 公司), 7-氨基氟硝西泮、7-氨基氯硝西泮、去甲氟硝西泮、羟乙基氟西泮、去羟基氟西泮和去甲氧西泮 (瑞士 Hoffman La Roche 公司)。以上试剂分别用甲醇配制成 100 mg/L 标准储备液, 临用时稀释成 10 及 1 mg/L 标准工作液, 并根据在所用色谱条件下的 t_R 分布, 配制成各分析物浓度均为 10 mg/L 的混合标准液数种。

γ -葡萄糖醛酸酶 (美国 Sigma 公司): 临用时加水配制成 10000 单位/mL 溶液; N,O-双三甲硅烷基三氟乙酰胺 (BSTFA, 美国 Supelco 公司): 含 1% 三甲基氯硅烷 (TMCS); 苯、异戊醇、二氯甲烷、正己烷、甲醇等溶剂: 分析纯试剂, 蒸馏后使用; 衍生化用无水乙酸乙酯: 分析纯试剂, 按文献^[8]方法处理。pH 4.8 缓冲溶液: 乙酸钠 (不含结晶水) 41.0 g , 加 36% 乙酸 83.3 mL , 加水至 500 mL ; pH 10.8 缓冲溶液: 碳酸钠 (不

2003-01-27 收稿; 2003-09-10 接受

本文系国家“九五”重点科技攻关项目资助课题 (No. 96-919-01-05-4)

含结晶水) 53.0 g, 碳酸氢钠 42.0 g, 加水溶解至 500 mL。实验用水为二次蒸馏水; 空白血浆购自沈阳市中心血站, 含柠檬酸钠抗凝剂, 新鲜; 空白尿: 近期未服药物健康人体排泄, 新鲜。

2.3 样品处理

取待检尿 1 mL 放入试管中, 加 pH 4.8 缓冲溶液 50 μ L, 加 α -葡萄糖醛酸酶溶液 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴中水解 14 h (过夜), 放冷, 加 pH 10.8 缓冲溶液 0.5 mL, 或取待检血浆 1 mL 放入试管中, 加 pH 10.8 缓冲溶液 0.5 mL, 加苯-异戊醇 (98.51.5) 5 mL, 涡旋 2 min, 3000 r/min 离心 6 min, 分取有机相置于带 1 mL 刻度尾管的 20 mL 鸡心瓶中, 置 100~110 $^{\circ}$ C 甘油浴中挥干, 加无水乙酸乙酯 50 μ L 溶解剩余物, 抽取 1 μ L 进样, 直接进行分析。剩余溶液中加入 BSTFA 20 μ L, 加塞密闭, 尾管插入 60 $^{\circ}$ C 甘油浴中进行衍生化反应 30 min, 然后在缓慢的氮气流下 60 $^{\circ}$ C 挥干 (除去剩余 BSTFA), 加无水乙酸乙酯 50 μ L 溶解剩余物, 抽取 1 μ L 进样, 进行衍生化而后的分析。

3 结果和讨论

3.1 色谱分离

非衍生化及 TMS 衍生化 HP-5 柱分析空白尿及添加标准对照品尿的色谱图如图 1 和图 2 所示。用 HP-50⁺ 柱分析尿的色谱图及用两支柱分析血浆的色谱图略。

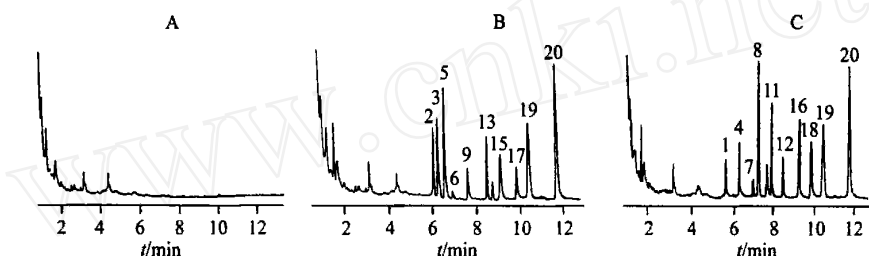


图 1 尿液提取物色谱图(非衍生化分析, HP-5 色谱柱)

Fig. 1 Chromatograms of urine extracts (underivatized analysis on HP-5 column)

A. 空白尿 (blank urine); B、C. 空白尿添加 200 μ g/L 各分析物 (blank urine spiked with analytes each at level of 200 μ g/L)。色谱峰 (chromatographic peaks): 1. 奥沙西洋 (oxazepam); 2. 劳拉西洋 (lorazepam); 3. 地西洋 (diazepam); 4. 去羟氟西洋 (desalkylflurazepam); 5. 去甲西洋 (nordiazepam); 6. 利眠宁 (chlordiazepoxide); 7. 7-氨基氟硝西洋 (7-aminoflunitrazepam); 8. 氟硝西洋 (flunitrazepam); 9. 羟乙基氟西洋 (hydroxyethylflurazepam); 10. 去甲氧西洋 (demoxepam); 11. 去甲氟硝西洋 (desmethylflunitrazepam); 12. 氟西洋 (flurazepam); 13. 硝西洋 (nitrazepam); 14. 1-羟基阿普唑仑 (1-hydroxyalprazolam); 15. 7-氨基氯硝西洋 (7-aminoclonazepam); 16. 氯硝西洋 (clonazepam); 17. 1-羟基三唑仑 (1-hydroxytriazolam); 18. 艾司唑仑 (estazolam); 19. 阿普唑仑 (alprazolam); 20. 三唑仑 (triazolam)。

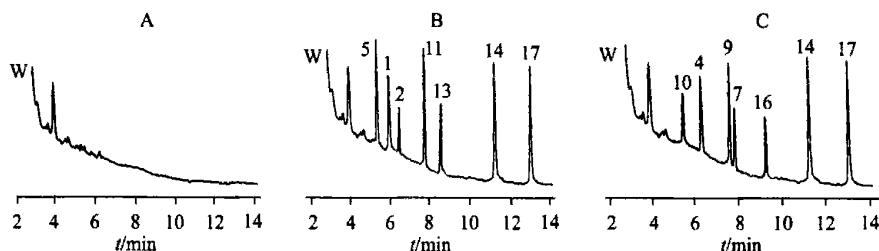


图 2 尿液提取物色谱图(TMS 衍生化分析, HP-5 色谱柱)

Fig. 2 Chromatograms of urine extracts (trimethylsilyl (TMS) derivatized analysis on HP-5 column)

A、B、C 和峰 1~20 同图 1 (A、B、C 和 peak 1 to 20 are the same as in Fig. 1)。

从表 1 和表 2 所列分析物 t_R 数据及空白检材和添加标准对照品检材分析所得色谱图可知, 在所用色谱条件下, 分析物可以很好的分离, 未发现杂质色谱峰干扰, 国内常用巴比妥类、吩噻嗪类等安眠镇静

药物标准品分析也未发现对本类药物及代谢物分析的干扰。

3.2 检出限

以检材中分析物色谱峰高相当于基线噪音强度 3 倍 ($S/N = 3$) 的检材分析物浓度为分析物的检出限 (limit of detection 或 LOD), 如表 1 和表 2 所示。

表 1 非衍生化分析测得的提取率、保留时间和检出限

Table 1 The extraction efficiency, retention time and limit of detection of underivatized analysis

分析物 Analyte	提取率 (%) Extraction efficiency		保留时间 (min) Retention time		检出限 Limit of detection ($\mu\text{g/L}$)			
	尿 Urine	血浆 Plasma	HP-5	HP-50 ⁺	尿 Urine		血浆 Plasma	
					HP-5	HP-50 ⁺	HP-5	HP-50 ⁺
奥沙西洋 Oxazepam	83.3	80.6	5.65	5.46	5	100	4	36
劳拉西洋 Lorazepam	87.7	82.1	6.12	6.12	7	42	6	24
地西洋 Diazepam	86.6	79.8	6.26	6.35	6	20	7	18
去炔氟西洋 Desalkylflurazepam	87.2	84.4	6.31	6.78	3	20	2	20
去甲西洋 Nordiazepam	89.3	81.0	6.64	7.37	4	25	3	12
利眠宁 Chlordiazepoxide	87.7	80.0	6.70	7.55	85	280	60	160
7-氨基氟硝西洋 7-Aminoflunitrazepam	80.3	77.4	7.09	7.35	66	94	45	80
氟硝西洋 Flunitrazepam	89.3	82.1	7.35	8.28	2	4	1	4
羟乙基氟西洋 Hydroxyethylflurazepam	90.4	86.6	7.71	9.00	8	8	6	6
去甲氧西洋 Demoxepam	86.1	87.1	7.72	7.41	9	50	4	40
去甲氟硝西洋 Desmethylflunitrazepam	84.6	83.2	7.96	10.41	4	10	4	7
氟西洋 Flurazepam	83.3	78.6	8.52	8.70	6	10	6	13
硝西洋 Nitrazepam	85.5	76.6	8.55	11.90	3	5	2	5
1-羟基阿普唑仑 1-Hydroxyalprazolam	83.3	84.1	8.74	11.86	14	14	12	12
7-氨基氯硝西洋 7-Aminoclonazepam	83.3	77.6	9.22	15.47	8	7	6	7
氯硝西洋 Clonazepam	83.6	85.1	9.31	13.79	6	7	6	7
1-羟基三唑仑 1-Hydroxytriazolam	81.1	82.1	9.86	18.31	11	16	12	15
艾司唑仑 Estazolam	89.0	90.3	9.90	15.71	5	3	3	2
阿普唑仑 Alprazolam	87.7	91.1	10.41	16.35	3	3	3	3
三唑仑 Triazolam	90.0	90.6	11.70	19.69	2	8	2	2

表 2 TMS 衍生化分析的保留时间和检出限

Table 2 The retention time and limit of detection of TMS derivatized analysis

分析物 Analyte	保留时间 (min) Retention time		检出限 Limit of detection ($\mu\text{g/L}$)			
	HP-5	HP-50 ⁺	尿 Urine		血浆 Plasma	
			HP-5	HP-50 ⁺	HP-5	HP-50 ⁺
去甲西洋 Nordiazepam	5.26	4.47	5	8	5	8
去甲氧西洋 Demoxepam	5.49	4.34	9	12	6	8
奥沙西洋 Oxazepam	5.79	4.49	6	10	4	6
去炔氟西洋 Desalkylflurazepam	6.26	4.39	6	12	5	12
劳拉西洋 Lorazepam	6.42	5.10	8	14	4	12
羟乙基氟西洋 Hydroxyethylflurazepam	7.59	7.03	4	8	4	6
去甲氟硝西洋 Desmethylflunitrazepam	7.62	5.74	4	10	2	6
7-氨基氯硝西洋 7-Aminoclonazepam	7.85	6.20	10	10	8	4
硝西洋 Nitrazepam	8.52	5.95	6	7	5	7
氯硝西洋 Clonazepam	9.28	7.04	8	10	6	4
1-羟基阿普唑仑 1-Hydroxyalprazolam	11.26	14.35	2	2	3	2
1-羟基三唑仑 1-Hydroxytriazolam	13.05	17.77	2	2	1	2

含有羟基 (如 1-羟基三唑仑)、氨基 (如 7-氨基氯硝西洋) 和二氮杂䓬环 1 位氮原子上有氢原子 (如去甲西洋、硝西洋) 的分析物可以非衍生化分析, 也可以 TMS 衍生化分析, 其中 1-羟基三唑仑和 1-羟基阿

普唑仑衍生化后分析灵敏度显著提高。奥沙西洋和劳拉西洋是两种含羟基的分析物,衍生化分析灵敏度未见提高,其原因可能是由于它们的非衍生化分析中在气化室中分解成为不含羟基的物质,形成单一的不拖尾色谱峰,也具有较高的灵敏度^[3]。

3.3 定量分析

用所建立的方法进行了定量分析,结果表明:该筛选分析方法也可用于定量分析(见表 3)。

表 3 线性关系和回收率

Table 3 Linearity and recovery

色谱柱 Column	分析物 Analyte	检材 Specimen	方法 Method	内标物 Internal standard	线性关系 Linearity		回收率 (%) Recovery
					线性范围 Linearity range ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 Correlation coefficient	
HP-5	地西洋 Diazepam	血浆 Plasma	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	20 ~ 2000	0.999	88.9 ~ 105.3
HP-5	奥沙西洋 Oxazepam	尿 Urine	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	20 ~ 2000	0.999	94.4 ~ 107.6
HP-5	劳拉西洋 Lorazepam	尿 Urine	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	25 ~ 2000	0.997	91.2 ~ 108.2
HP-5	氟硝西洋 Flunitrazepam	血浆 Plasma	非衍生化 Underivatization	地西洋 Diazepam	5 ~ 1000	1.000	94.3 ~ 106.5
HP-5	羟乙基氟西洋 Hydroxyethylflurazepam	尿 Urine	衍生化 Underivatization	劳拉西洋 Lorazepam	10 ~ 1000	0.994	89.1 ~ 107.3
HP-5	硝西洋 Nitrazepam	血浆 Plasma	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	10 ~ 1000	0.993	95.5 ~ 103.9
HP-5	去甲西洋 Nordiazepam	尿 Urine	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	10 ~ 1000	0.999	91.1 ~ 104.3
HP-5	氯硝西洋 Clonazepam	血浆 Plasma	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	20 ~ 2000	0.997	94.0 ~ 105.2
HP-5	7-氨基氯硝西洋 7-Aminoclonazepam	尿 Urine	非衍生化 Underivatization	氟硝西洋 Flunitrazepam	25 ~ 2000	0.994	88.5 ~ 107.7
HP-50 ⁺	艾司唑仑 Estazolam	血浆 Plasma	非衍生化 Underivatization	阿普唑仑 Alprazolam	10 ~ 1000	1.000	94.9 ~ 103.5
HP-5	阿普唑仑 Alprazolam	尿 Urine	非衍生化 Underivatization	艾司唑仑 Estazolam	10 ~ 1000	0.999	93.8 ~ 104.0
HP-5	三唑仑 Triazolam	尿 Urine	非衍生化 Underivatization	艾司唑仑 Estazolam	10 ~ 1000	0.998	93.6 ~ 101.8
HP-5	1-羟基阿普唑仑 1-Hydroxyalprazolam	尿 Urine	衍生化 Underivatization	羟乙基氟西洋 Hydroxyethylflurazepam	10 ~ 1000	0.996	97.3 ~ 109.3
HP-5	1-羟基三唑仑 1-Hydroxytriazolam	尿 Urine	衍生化 Underivatization	羟乙基氟西洋 Hydroxyethylflurazepam	10 ~ 1000	0.999	99.1 ~ 103.7

3.4 服药物自愿者血、尿检测

若干名自愿者口服治疗量药物后取血、尿进行分析,部分结果如表 4 所示,表明了本文方法的实用性。

表 4 口服药物自愿者血、尿中药物或代谢物分析结果

Table 4 The analytical result of plasma and urine collected from volunteers digested drug

药物 Drug	剂量 Ddose (mg)	服药人数 Numbers of volunteer	检材及采集时间(服药后时间) Specimen and its collection time (hours postdose)	分析物 Analyte	检出浓度($\mu\text{g/L}$) Concentration
三唑仑 Triazolam	0.5	3	尿 Urine 20 ~ 24	1-羟基三唑仑 1-Hydroxytriazolam	17.7, 71.4, 36.6
阿普唑仑 Lprazolam	0.8	3	尿 Urine 20 ~ 24	1-羟基阿普唑仑 1-Hydroxyalprazolam	31.0, 24.7, 31.0
艾司唑仑 Estazolam	2.0	2	血浆 Plasma 24	艾司唑仑 Estazolam	20.5, 20.2
氟硝西洋 Flunitrazepam	1.0	2	血浆 Plasma 9	氟硝西洋 Flunitrazepam	1.8, 1.0
劳拉西洋 Lorazepam	2.0	3	尿 Urine 20 ~ 24	劳拉西洋 Lorazepam	221, 204, 149
地西洋 Diazepam	10.0	2	血浆 Plasma 12	地西洋 Diazepam	51, 34
地西洋 Diazepam	10.0	2	尿 Urine 22 ~ 24	奥沙西洋 Oxazepam	21, 17

References

- 1 Fraser A D. *J. Anal. Toxicol.*, **1987**, 11:263 ~ 266
- 2 Berry D J, Gove J. *J. Chromatogr.*, **1973**, 80:205 ~ 220
- 3 Ljllsunde P, Seppala T. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1990**, 553:97 ~ 100
- 4 Drummer O H, Horomidis S, Kourtis S, Syrjanen M L, Tippett P. *J. Anal. Toxicol.*, **1994**, 18:134 ~ 138
- 5 Rasanen I, Ojanpera I, Vuori E. *J. Anal. Toxicol.*, **2002**, 24:46 ~ 52
- 6 Moore C, Long G, Marr M. *J. Chromatogr. B*, **1994**, 655:132 ~ 137
- 7 McIntyre L M, Syrjanen M L, Crump K, Horomidis S, Peace A W. *J. Anal. Toxicol.*, **1993**, 17:202 ~ 207
- 8 Arthur V. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry Including Qualitative Organic Analysis*. New York:Longman Inc., 4st Ed., **1978**: 276 ~ 277

Screening Analysis of Benzodiazepine Medicines and Selected Metabolites in Plasma and Urine Using Gas Chromatography and Electron Capture Detection

Yao Lijuan^{*}, Tan Jiayi, Jiang Zhaolin, Xing Limei
(Criminal Police College of China, Shenyang 110035)

Abstract A screening analytical method for 11 benzodiazepine medicines and 9 their main metabolites in plasma and urine using electron capture detection gas chromatography was developed. The plasma was extracted at pH 10.8 with benzene-isoamylalcohol (98.51.5) and the urine was hydrolysed with β -glucuronidase firstly then extracted as plasma. Gas chromatography was performed on two columns of different polarity. All benzodiazepines could be analysed in underivatized form. Hydroxylated and N_1 -desalkyl benzodiazepines could also be analysed in trimethylsilyl derivatized form. Most hydroxylated benzodiazepines were more sensitively analysed in derivatized form. The limit of detection of most benzodiazepines in specimens was better than 10 $\mu\text{g/L}$. This method was used to measure the benzodiazepine concentrations of specimens collected from subjects digested therapeutic dose medicine. The measurement result represents that this method can be easily used in drug examination for the case of drug-facilitated robbery.

Key words Benzodiazepines, gas chromatography, plasma, urine

(Received 27 January 2003; accepted 10 September 2003)

《冶金分析》征订启事

《冶金分析》杂志是经国家科委批准,由钢铁研究总院、中国金属学会主办和出版的综合性分析化学专业的科技期刊。《冶金分析》办刊宗旨以实用为主,主要报道分析方面的新技术、新方法、先进经验、研究结果,发表综述文章及介绍国内外冶金分析动态等。适合于冶金、矿山、化工、机械、地质、环保、外贸、国防等部门从事冶金分析的科技人员、生产管理人员及大专院校和中等技术学校有关专业的师生阅读参考。

《冶金分析》1981年创刊,现为中国科技论文统计用期刊、全国中文核心期刊、中国期刊网全文收录期刊、美国工程信息公司 E 数据库收录期刊、美国“CA”千种表我国化学化工类核心期刊。

《冶金分析》在国内外公开发行,每期为大 16 开,84 页,2004 年定价 8 元/本,全年六期为 48 元,国内统一刊号 CN11-2030/TF,本刊由全国各地邮局发行,邮发代号:82-157。

《冶金分析》编辑部地址:北京海淀区学院南路 76 号,邮编 100081,电话 (010) 62182398,传真:(010) 62182398, E-mail: yjfx@analysis.org.cn。