

测定生物样品中的戊巴比妥

应用简报

法医学与毒理学

作者

Joe Crifasi
圣路易斯大学
法医毒理学实验室
美国密苏里州圣路易斯市

Ron Honnold
安捷伦科技公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

Robert Kubas,
安捷伦科技公司
美国伊利诺斯州伍德戴尔市

摘要

在 Agilent 220 四极杆离子阱系统上采用 CI-MS 模式开发了一种鉴定及定量生物样品中戊巴比妥的方法。戊巴比妥的工作线性范围为 2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对于戊巴比妥的分析，在减少样品基质干扰、提高信噪比同时兼具高选择性和灵敏度方面，气相色谱四极杆离子阱质谱联用仪的优势不可低估。

前言

戊巴比妥是一种短效巴比妥类药物，可供口服、肌注或直肠给药，有游离酸和钠盐两种形式。人用范围包括癫痫治疗、术前镇静、短期催眠、降低颅内压和诱导昏迷。

本应用简报介绍血清、全血、玻璃体液、尿液或组织匀浆中戊巴比妥的分析方法。分析最少需要 1.0 mL 样品。

每等份样品加入戊巴比妥 d-5 作为内标。采用氯仿/异丙醇对 pH 6.8 的样品溶液进行提取。浓缩提取溶剂然后采用 CI-四极杆离子阱质谱仪进行分析。



Agilent Technologies

实验部分

标准品与试剂

试剂 – 氯仿/异丙醇 (9:1 混合物), 甲醇 – HPLC 级。磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 磷酸盐缓冲液 (100 mM, pH 6.8) (用 1 L 去离子水溶解 7.1 g Na_2HPO_4 和 3.4 g KH_2PO_4 , 再用磷酸调 pH 至 6.8)

标准储备液 – 戊巴比妥 (1 mg/mL) 和戊巴比妥 d-5 (1 mg/mL) 购自 Cerilliant 公司。

质控储备液 – 戊巴比妥 (1 mg/mL) 购自 Alltech/Grace 公司。

工作校准标准液 – 50 $\mu\text{g/mL}$ 戊巴比妥溶液 (将 0.5 mL 1 mg/mL 的 Cerilliant 标准储备液加 9.5 mL 去离子水稀释)。

工作内标溶液 – 30 $\mu\text{g/mL}$ 的戊巴比妥 d-5 溶液 (将 300 μL 的 Cerilliant 标准储备液加 9.7 mL 去离子水稀释)。

工作质控标准溶液 – 50 $\mu\text{g/mL}$ 的戊巴比妥质控溶液, 采用 1 mg/mL 的 Alltech/Grace 标准储备液 0.5 mL 加 9.5 mL 去离子水稀释而得。

于 4–8 °C 下贮存, 1 年内稳定。

对照和校准标准溶液

阴性对照 – 不含药的全血得自美国红十字会, 用生理盐水 (0.9%) 1:1 稀释, 于 -20 °C 下贮存, 1 年内稳定。

低浓度对照 – (5 $\mu\text{g/mL}$) 在 16 × 100 mm 带标记的萃取管中, 将 50 μL 工作戊巴比妥质控标准储备液加入 450 μL 空白血液。

高浓度质控 – (15 $\mu\text{g/mL}$) 在 16 × 100 mm 带标记的萃取管中, 将 150 μL 工作戊巴比妥质控标准储备液加入 350 μL 空白血液。

在带标记的 16 × 100 mm 萃取管中, 采用工作标准液和无药血液制备校准曲线用系列溶液, 具体如下:

2 $\mu\text{g/mL}$ -20 μL 标准液和 480 μL 无药血液,

5 $\mu\text{g/mL}$ -50 μL 标准液和 450 μL 无药血液,

10 $\mu\text{g/mL}$ -100 μL 标准液和 400 μL 无药血液,

20 $\mu\text{g/mL}$ -200 μL 标准液和 300 μL 无药血液。

样品前处理

1. 移取 500 μL 各样品和阴性对照加到带标记的 16 x 100 mm 萃取管中
2. 向样品、配制好的校准溶液和对照中加入 100 μL 工作内标溶液
3. 向各管内加入 500 μL 100 mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 以及 10 mL 氯仿:异丙醇 (9:1)
4. 加盖
5. 涡旋混合 10 min, 然后以 3000 rpm 的转速离心至少 10 min
6. 去除上层水相, 过滤氯仿 (有机) 层至洁净的 16 x 100 mm 一次性试管中, 40 °C 下氮气吹干
7. 用 200 μL 甲醇复溶各干燥的提取物
8. 转移至带内插管的自动进样瓶中, 加盖, 转到 GC-MS 分析

GC/MS 离子阱分析

色谱柱	DB-5MS 或同等色谱柱, 25 m x 200 mm, 0.33 μm
进样量	1 μL
进样模式	不分流
进样口温度	250 °C
载气	氦气
柱流速	1.3 mL/min
柱箱程序	70 °C, 保持 1 min 以 25 °C/min 的速度升至 310 °C, 保持 4.4 min

四极杆离子阱 MS 条件

调谐	自动调谐
采集	CI-Scan 40-450 da
CI 试剂	甲醇
溶剂延迟	4.0 min
MS 温度	离子阱 210 °C, 支管 50 °C, 传输管线 310 °C
靶标	5,000
灯丝电流	10 μA

化合物	保留时间 (min)	定量离子	定性离子
戊巴比妥	7.99	227	157/228
戊巴比妥 d-5	8.02	232	162/233

结果与讨论

使用以下标准确定戊巴比妥的存在和含量：

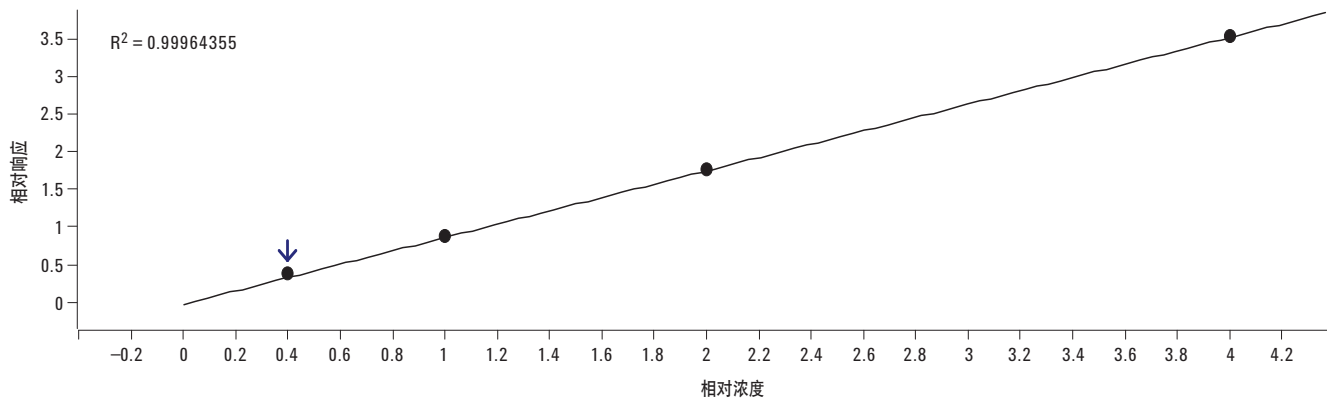
- 可接受的色谱分析结果（峰分离度、峰对称性、无残留污染）
- 存在选择的定量和定性离子
- 离子比在相应校准值的 $\pm 20\%$ 以内
- 与最近一次校准的保留时间相比，测试样本中可能存在的戊巴比妥的保留时间应在其 $\pm 2\%$ 以内
- 使用戊巴比妥和内标定量离子的峰面积进行定量分析

- 根据用每个校准溶液浓度对其相对响应回归得到的校准曲线，通过比较未知样品和对照样品的相对响应来实现定量分析
- 阳性对照的测定结果必须在目标范围内，阴性对照中不得检出戊巴比妥

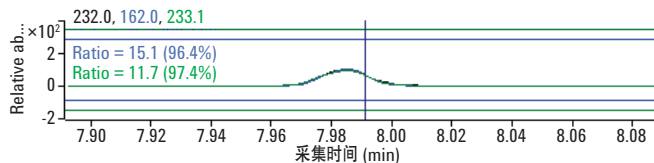
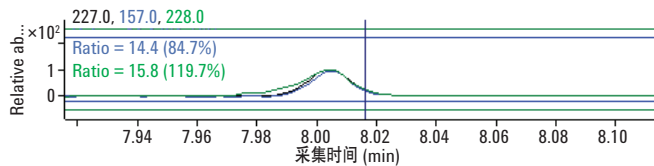
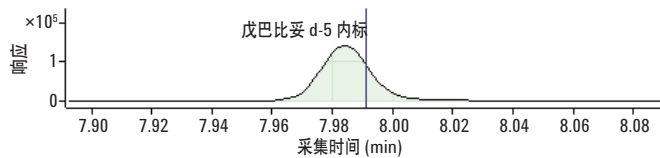
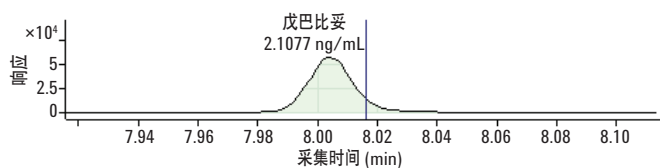
方法限

线性	2–20 $\mu\text{g/mL}$
检测限 (LOD)	1 $\mu\text{g/mL}$
定量限 (LOQ)	2 $\mu\text{g/mL}$
低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 的样品测定结果将被报告为阴性。	
介于 1 - 2 $\mu\text{g/mL}$ 的分析结果将被报告为低于 2 $\mu\text{g/mL}$ 。	
干扰	未知

戊巴比妥校准曲线



低浓度标准溶液 2.0 ng/mL



批结果

Sample							PENTOBARBITAL Method		PENTOBARBITAL Results					Qualifier..		Qualifier..		D5-PENTOBA..		Qualifier..		Qualifier..	
ID	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp.	Ratio	MI	Ratio	MI	
	2STD	2STD 3-12-2012 9-14-59 PM.SMS.D	Cal	1	3/12/2012 7:15 P..	2.0000	8.004	63421		2.1077	2.1077	105.4	14.4		15.8		7.984	169809	15.1		11.7		
	5STD	5STD 3-12-2012 9-36-48 PM.SMS.D	Cal	2	3/12/2012 7:36 P..	5.0000	8.007	172044		4.9543	4.9543	99.1	17.0		12.9		7.985	195971	15.4		11.7		
	10STD	10STD 3-12-2012 9-58-50 PM.SMS.D	Cal	3	3/12/2012 7:58 P..	10.0000	8.010	321674		9.9800	9.9800	99.8	18.5		12.1		7.988	181894	14.9		12.1		
	20STD	20STD 3-12-2012 10-20-37 PM.SMS.D	Cal	4	3/12/2012 8:20 P..	20.0000	8.016	609199		19.9580	19.9580	99.8	20.7		14.0		7.993	172257	15.8		12.6		
	FTC-04	FTC-04 3-12-2012 8-23-30 PM.SMS.D	Sample		3/12/2012 6:23 P..																		
	BLANK	BLANK 3-12-2012 10-42-37 PM.SMS.D	Sample		3/12/2012 8:42 P..																		
	NEG	NEG 3-12-2012 11-04-38 PM.SMS.D	Sample		3/12/2012 9:04 P..												7.982	176543	15.3		12.1		
	LOW	LOW 3-12-2012 11-26-34 PM.SMS.D	Sample		3/12/2012 9:26 P..		8.004	145762		4.6531	4.6531		15.8		13.2		7.982	176783	15.2		11.1		
	HIGH	HIGH 3-12-2012 11-48-21 PM.SMS.D	Sample		3/12/2012 9:48 P..		8.011	440390		13.6238	13.6238		18.7		12.4		7.988	182421	15.6		12.8		

注意异常值和低于校准值的标记

结论

本应用简报采用戊巴比妥 d-5 作为内标建立了一种灵敏度高、选择性好的测定生物样品中戊巴比妥的可靠方法。针对戊巴比妥的分析，气相色谱四极杆离子阱 CI-MS 的优势不可低估。在减少样品基质干扰、改善信噪比以及兼具高选择性和灵敏性方面，气相色谱四极杆离子阱 CI-MS 为戊巴比妥分析提供了可置信度更高的解决方案。气相色谱四极杆离子阱 CI-MS 分析具有减少假阳性和假阴性的潜力，还能在所得的结果中实现更高的可置信度。使用上文所列的优化方法，可为法医实验室提供一种快速且目的性强的 GC/CI-MS 方法去解决当今的戊巴比妥分析难题。阳性对照与阴性对照联合使用，保证了定量分析的准确度，并排除未知生物样品分析的假阴性。多种样品基质中戊巴比妥的分析均获得了低检测限 ($\mu\text{g/mL}$)。

参考文献

1. Baselt, Randall C. Disposition of Toxic Dugs and Chemicals in MAN, Seventh Edition, Biomedical Publications, 2004 pages 860-862.

2. Moffat, A.C. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, Third Edition, Volume 2, pp. 1408-1410. The Pharmaceutical Press, London, 2004.
3. Baselt, Randall C. "Serum Acid and Neutral Drug Screen by Gas Chromatography" (Modified), Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology, Second Edition, PSG Publishing Co. Inc., Littleton, MA 1987 pp. 12-14

致谢

衷心感谢圣路易斯大学法医毒理学实验室为本研究提供数据。

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的 Web 站点 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

中国印刷

2012 年 12 月 4 日

5991-1606CHCN



Agilent Technologies