

# LCMS-QTOF 对尿液中 21 种苯二氮草类成分定性定量分析

## LCMS-QTOF-099

**摘要：** 本文利用岛津 LCMS-9050 液相色谱 - 四极杆飞行时间串联质谱仪结合《法医毒物 QTOF 高分辨质谱库》，参考 GA/T 2069-2023《法庭科学 生物检材中 2'- 氯地西洋等 5 种氯代地西洋类物质检验液相色谱 - 质谱法》，建立尿液样品中 21 种苯二氮草类成分定性定量分析。结果显示：利用《法医毒物 QTOF 高分辨质谱库》进行检索，其结果显示目标化合物均可检出。连续 120 次进样分析，质荷比偏差均小于 4 ppm，2~200 ng/mL 各成分曲线相关系数均大于 0.99，线性良好，加标平均回收率分别为 88.8%-118.9%，回收率良好。使用该方法，可通过一针进样，快速完成目标物的定性定量分析，结果准确可靠。

**关键词：** 四极杆飞行时间串联质谱仪 尿液 苯二氮草

### 技术特点：

- ❖ 采用 DDA 采集模式，连续 120 针分析，质量数偏差小于 4 ppm，仪器准确度良好；
- ❖ QTOF 结合《法医毒物 QTOF 高分辨质谱库》，实现苯二氮草类筛查定性到定量全流程分析。

在法医检验工作中，毒药物检验是一项重要的工作内容。随着科学技术的不断进步与发展，毒药物种类的不断增多，特别是具有相近结构的药物成分越来越多，对于检验的效率和准确性需要进一步的提升。因此，一种快速便捷、准确的检测方法尤为重要。

苯二氮草类药物是 1, 4- 苯二氮草的衍生物。主要作用于脑干网状结构和大脑边缘系统（包括杏仁核、海马等）。本类药物对中枢神经系统有着广泛的抑制作用，产生镇静、催眠和抗惊厥等作用。本类药物长期使用，几乎都可以产生耐受性和依赖性，突然停药可产生戒断症状，故该类物质基本为管制类药物。

生物检材中药物检测技术是了解体内药物摄入情况的重要手段。飞行时间质谱不仅能够快速定性定量体内摄入的已知药物成分，更能够在分析时提供未知药物的有效信息，有助于掌握体内药物摄入趋势。区别与三重四极杆质谱的分析模式，飞行时间质谱具有分析目标物广泛、质荷比检测准确度高、二级谱图准确度高等特点，非常适合做定性分析。

本文使用岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间串联质谱仪，建立了一种对尿液中 21 种苯二氮草类成分分析方法。该方法可快速筛查出样品中的毒药物成分，准确可靠。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪，具体配置为：

输 液 泵：	LC-40D XS×2	系 统 控 制 器：	SCL-40
自动进样器：	SIL-40C XS	柱 温 箱：	CTO-40C
在线脱气机：	DGU-405	飞行时间质谱仪：	LCMS-9050
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118; LabSolutions Insight Ver. 4.0SP2		

### 1.2 分析条件

色谱条件

色 谱 柱： Shim-pack Scepter HD-C18-80 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm,  
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N:227-31026-05)

流动相：A相 -0.1% 甲酸水溶液；B相 - 乙腈  
流速：0.4 mL/min  
柱温：40°C  
进样量：2  $\mu$ L  
洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 10%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc	10
7.00	泵	B.Conc	95
7.10	泵	B.Conc	10
10.00	控制器	Stop	

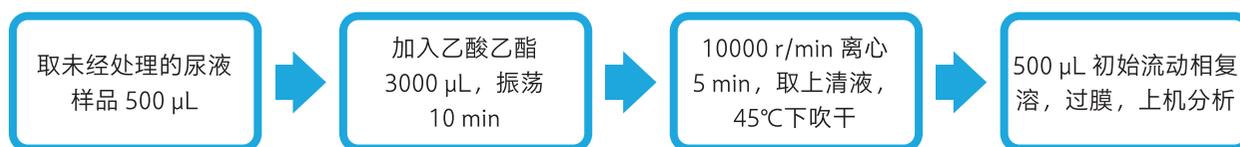
#### 质谱条件

离子源：ESI(+)  
雾化气流速：3.0 L/min  
加热气流速：10.0 L/min  
干燥气流速：10.0 L/min  
扫描模式：MS Scan(m/z 50 - 400); DDA MS/MS (m/z 50 - 400)

加热模块温度：400°C  
DL 温度：200°C  
接口温度：300°C  
碰撞能量：35 $\pm$ 15 V

### 1.4 样品前处理

#### 1.4.1 样品前处理



## ■ 结果与讨论

### 2.1 库筛查分析及定量方法建立流程

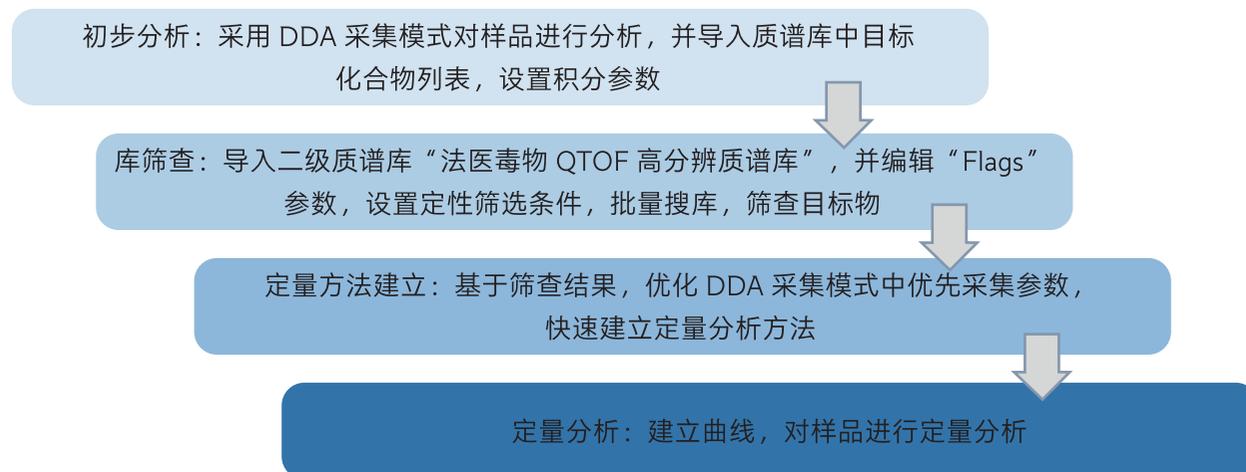


图 2 库筛查分析及定量方法建立流程

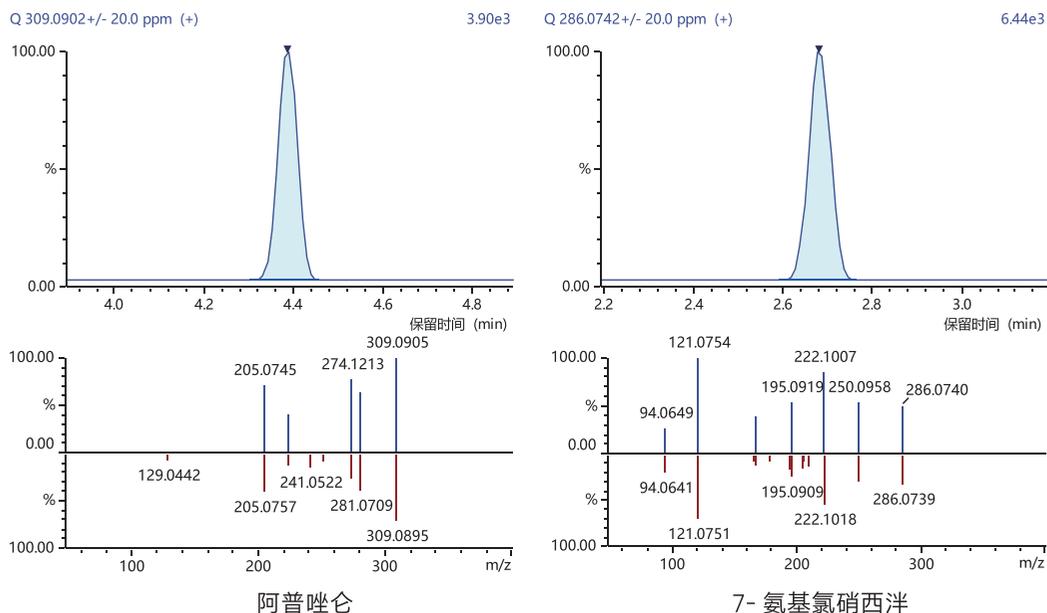
## 2.2 筛查分析

### 2.2.1 库筛查结果

制备浓度为 10 ng/mL 的 21 种苯二氮草类成分加标样品，经前处理后，上机分析。结合《法医毒物 QTOF 高分辨质谱库》对样品中苯二氮草类成分进行筛查分析，结果显示，21 种苯二氮草类成分均有检出，筛查结果如图 3 所示，部分结果色谱图及 MS2 质谱图如图 4 所示：

化合物名称	保留时间	库化合物...	质量误差 (ppm)	库相似度	m/z	实测m/z
7-氨基氯硝西洋	2.693	7-氨基氯...	-3.426	93	286.0742	286.07322
7-氨基氟硝西洋	3.047	7-氨基氟...	-2.675	97	284.1194	284.11864
唑吡坦	3.118	唑吡坦	-2.596	98	308.1757	308.17490
a-羟基咪唑唑仑	3.496	a-羟基咪...	-2.953	99	342.0804	342.07939
咪唑唑仑	3.567	咪唑唑仑	-2.729	99	326.0855	326.08461
咪唑唑仑	3.567	咪唑唑仑	-2.729	99	326.0855	326.08461
溴西洋	3.756	溴西洋	-2.658	94	316.0080	316.00716
地莫西洋	3.968	Demoxep...	-2.717	100	287.0582	287.05742
去甲基氟西洋	4.275	去甲基氟...	-3.732	100	300.0779	300.07678
硝西洋	4.299	硝西洋	-3.261	95	282.0873	282.08638
奥沙西洋	4.299	Oxazepam	-2.613	100	287.0582	287.05745
艾司唑仑	4.299	舒乐安定(...)	-2.982	98	295.0745	295.07362
氟阿普唑仑	4.299	氟阿普唑仑	-3.118	100	327.0807	327.07968
阿普唑仑	4.393	阿普唑仑	-3.203	98	309.0902	309.08921
劳拉西洋	4.393	劳拉西洋	-3.146	98	321.0192	321.01819
氯硝西洋	4.464	Clonazep...	-3.354	100	316.0484	316.04734
三唑仑	4.488	三唑仑	-3.994	98	343.0512	343.04983
去甲西洋	4.629	去甲西洋	-3.173	99	271.0633	271.06244
氟硝西洋	4.748	氟硝西洋	-2.865	99	314.0936	314.09270
硝甲西洋 (尼...)	4.795	硝甲西洋	-2.837	99	296.1030	296.10216
替马西洋	4.801	替马西洋	-3.288	100	301.0738	301.07281
地西洋	5.291	地西洋	-3.332	96	285.0789	285.07795

图 3 21 种苯二氮草类成分加标样品库筛查结果



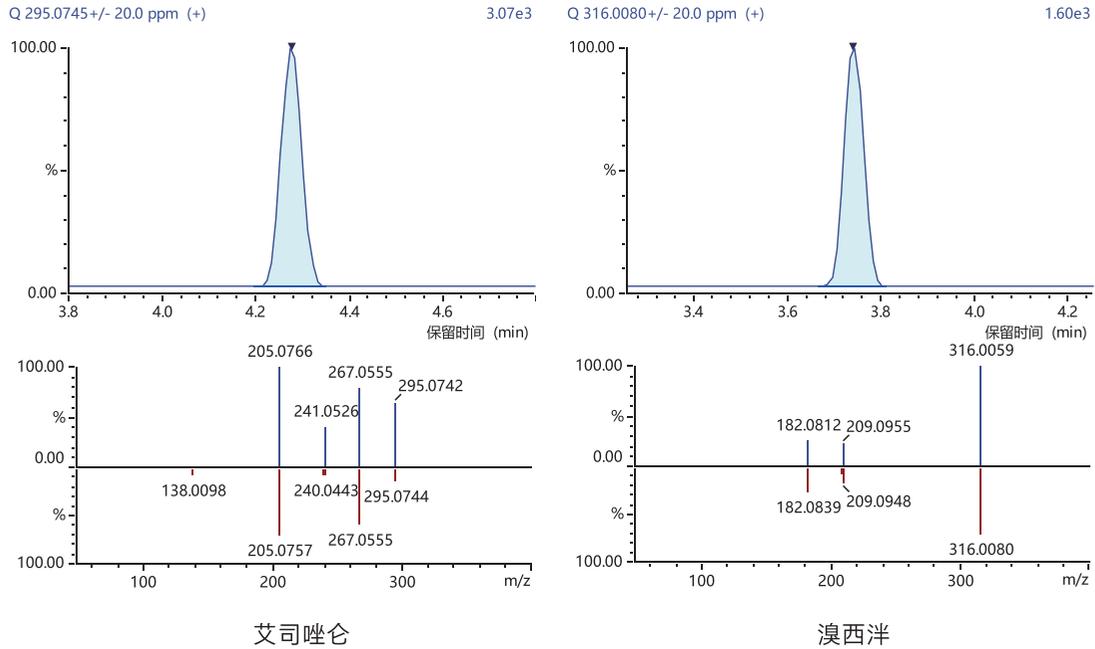


图 4 部分结果色谱图及 MS2 质谱图

### 2.2.2 质量数准确性

制备浓度为 20.0 ng/mL 的 21 种苯二氮卓类成分加标样品，连续 120 次进样分析，目标化合物的质荷比偏差均小于 4 ppm，具体统计情况如图 5 所示：

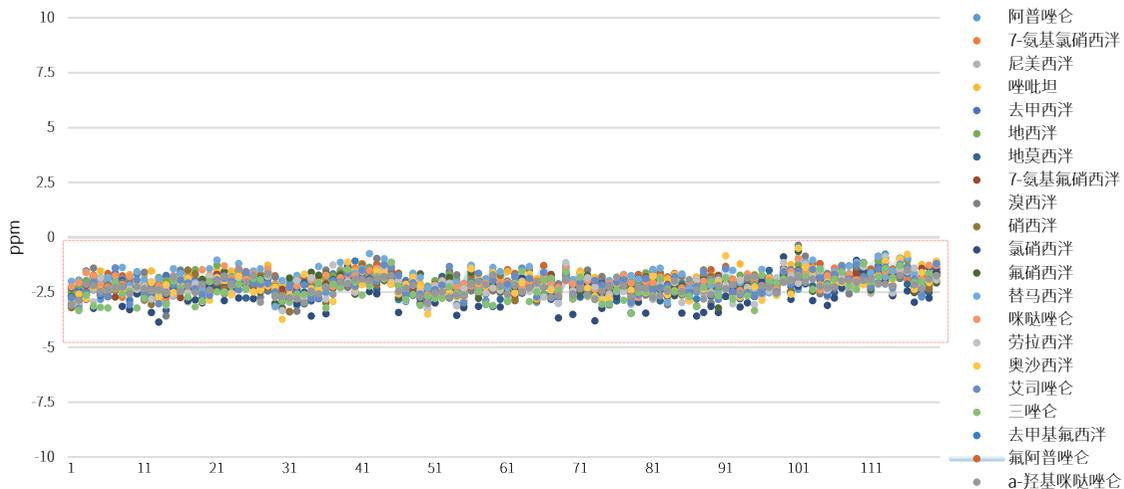


图 5 20.0 ng/mL 加标样品质量偏差准确性结果

## 2.3 定量分析

### 2.3.1 色谱图

针对上述筛查出的目标化合物，采用 MS1 模式建立定量分析方法。21 种苯二氮卓类化合物定性信息如表 2 所示。基质匹配线性低点 2.0 ng/mL 的 21 种苯二氮卓类成分的提取离子流图如图 6 所示。

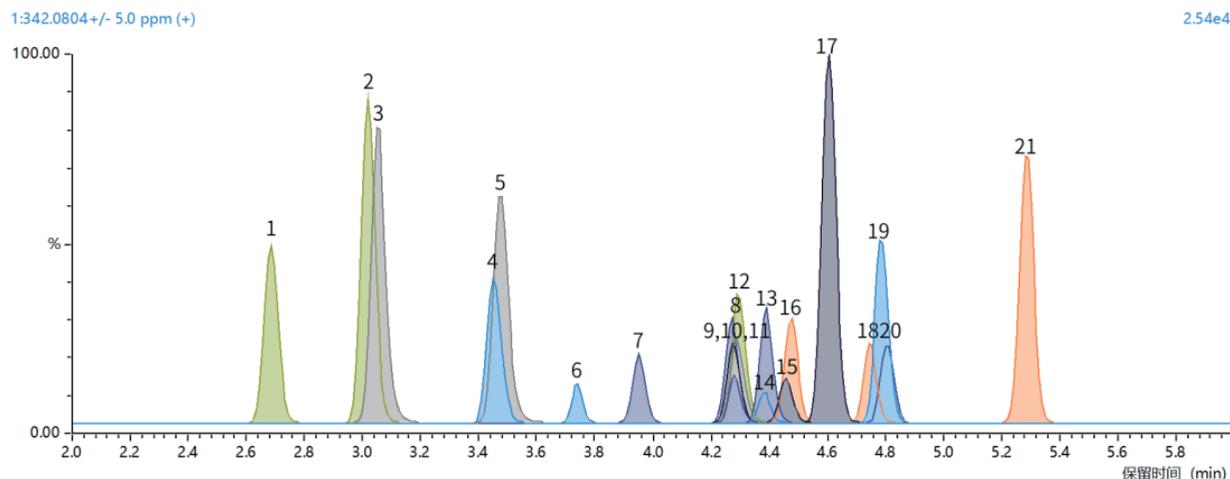


图 6 2.0 ng/mL 的 21 种苯二氮卓类物质的提取离子流图

表 2 21 种苯二氮卓类化合物信息表

ID	化合物名称	化学式	前体离子 (m/z)	二级质谱特征离子 (m/z)	保留时间 (min)	库匹配度
1	7-氨基氯硝西洋	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> O	286.0742	250.0968 222.1018 121.0753	2.693	90
2	7-氨基氟硝西洋	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O	284.1194	256.1237 227.0974 135.0911	3.047	92
3	唑吡坦	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	308.1757	263.1173 236.1303 235.1225	3.118	96
4	a-羟基咪唑唑仑	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	342.0804	324.0698 203.0365 168.0675	3.496	94
5	咪唑唑仑	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub>	326.0855	291.1163 249.0823 209.0632	3.567	98
6	溴西洋	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> O	316.0080	209.0969 182.0829 259.9944	3.756	98
7	地莫西洋	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	287.0582	269.0479 241.0505 207.0667	3.968	100
8	去甲基氟西洋	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	300.0779	198.0714 254.0850 225.0823	4.275	100
9	硝西洋	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	282.0873	236.0936 207.0907 180.0794	4.299	97
10	奥沙西洋	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	287.0582	241.0519 163.0053 104.0486	4.299	97
11	艾司唑仑	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	295.0745	267.0553 241.0519 205.0753	4.299	100
12	氟阿普唑仑	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> ClFN <sub>4</sub>	327.0807	292.1096 237.0948 223.0658	4.299	93
13	阿普唑仑	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	309.0902	281.0709 274.1212 205.0757	4.393	90
14	劳拉西洋	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	321.0192	275.0134 229.0532 163.0058	4.393	88
15	氯硝西洋	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	316.0484	270.0549 214.0415 207.0914	4.464	87
16	三唑仑	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	343.0512	315.0325 308.0823 239.0371	4.488	100
17	去甲西洋	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	271.0633	208.0988 165.0208 140.0256	4.629	100
18	氟硝西洋	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	314.0936	268.1005 239.0984 183.0605	4.748	95
19	尼美西洋	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	296.1030	250.1097 221.1066 165.0692	4.795	94
20	替马西洋	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	301.0738	255.0678 193.0880 177.0208	4.801	98
21	地西洋	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	285.0789	193.0884 154.0414 222.1149	5.291	100

### 2.3.2 校准曲线

分别配制 2、5、10、20、50、100、200 ng/mL 的 21 种苯二氮䓬类成分基质匹配曲线, 经前处理后, 上机分析。针对采集数据, 建立以浓度比为横坐标, 峰面积为纵坐标的校准曲线。结果显示, 各成分曲线相关系数均大于 0.99, 线性良好。部分化合物校准曲线如图 7 所示, 各化合物线性相关系数如表 3 所示:

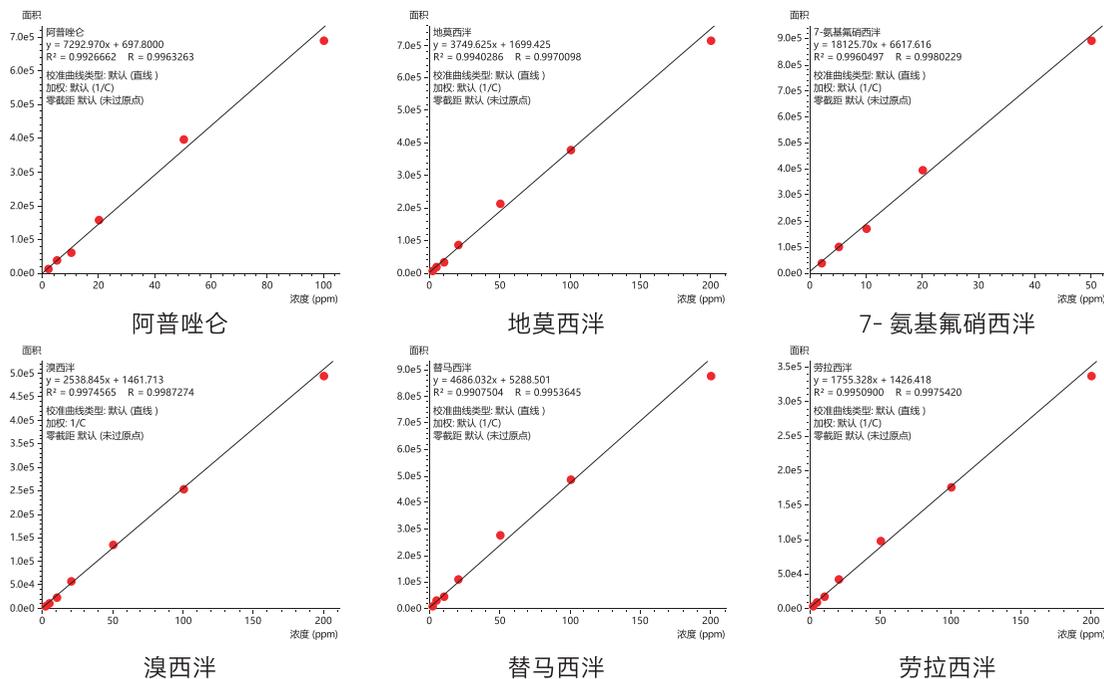


图 7 部分 21 种苯二氮䓬类化合物校准曲线

表 3 21 种苯二氮䓬类化合物曲线结果

序号	组分名称	相关系数 (R)	线性范围 (ng/mL)	精确度 (%)
1	7-氨基氟硝西洋	0.9970	2~50	84.58~114.57
2	7-氨基氟硝西洋	0.9980	2~50	91.57~108.03
3	唑吡坦	0.9991	2~50	94.30~105.01
4	a-羟基咪唑唑仑	0.9902	5~100	85.94~117.71
5	咪唑唑仑	0.9943	2~100	81.89~112.36
6	溴西洋	0.9987	2~200	91.65~114.52
7	地莫西洋	0.9970	2~200	84.61~115.69
8	去甲基氟西洋	0.9919	5~100	88.41~115.15
9	硝西洋	0.9944	5~100	83.35~118.16
10	奥沙西洋	0.9939	5~200	80.51~119.26
11	艾司唑仑	0.9940	5~200	84.54~119.78
12	氟阿普唑仑	0.9957	2~100	89.04~110.84
13	阿普唑仑	0.9963	2~100	85.26~109.45
14	劳拉西洋	0.9975	2~200	80.64~117.22

15	氯硝西洋	0.9941	5~200	84.50~118.52
16	三唑仑	0.9910	5~200	83.10~118.33
17	去甲西洋	0.9921	2~100	80.52~114.06
18	氟硝西洋	0.9937	5~200	82.73~118.78
19	尼美西洋	0.9983	2~50	88.27~112.70
20	替马西洋	0.9954	5~200	80.71~116.25
21	地西洋	0.9983	2~50	91.46~109.80

### 2.3.3 重复性

配置浓度为 5.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 的 21 种苯二氮草类成分加标样品，经前处理后，使用定量分析方法对加标样品进样分析，连续三日，每日连续重复 6 次进样分析，对该方法的日内和日间精密度的进行测试。结果显示，三日共计 18 次结果统计，保留时间相对标准偏差 (RSD%)<0.22% 和峰面积相对标准偏差 (RSD%)<9.8%，具体统计情况如图 8 所示：

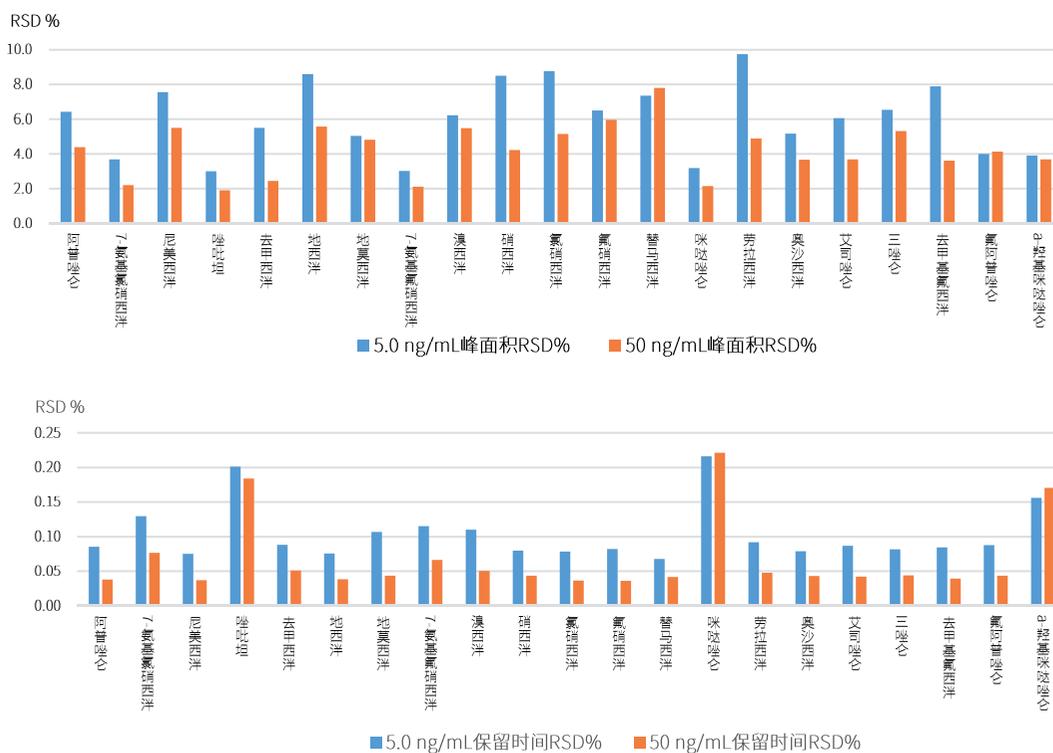


图 8 保留时间和峰面积的相对标准偏差 (n=18)

### 2.3.4 加标回收率

将基质样本进行 5.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 浓度加标，各平行三组，经前处理后，使用定量分析方法对加标样品进样回收率考察。结果显示，5.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL 加标浓度的加标平均回收率分别为 88.8%~114.7% 和 96.3%~118.9%，回收率良好。具体结果如表 4 所示：

表 4 各目标化合物加标回收率结果

序号	组分名称	5.0 ng/mL 回收率 (%)	50.0 ng/mL 回收率 (%)	序号	组分名称	5.0 ng/mL 回收率 (%)	50.0 ng/mL 回收率 (%)
1	7-氨基氯硝西洋	111.0	118.9	12	氟阿普唑仑	117.9	117.6
2	7-氨基氟硝西洋	99.2	105.8	13	阿普唑仑	117.3	118.9
3	唑吡坦	109.8	109.4	14	劳拉西洋	114.1	108.2
4	$\alpha$ -羟基咪唑唑仑	117.3	115.4	15	氯硝西洋	93.6	101.9
5	咪唑唑仑	110.8	108.0	16	三唑仑	84.8	96.3
6	溴西洋	110.0	113.3	17	去甲西洋	102.0	101.6
7	地莫西洋	108.4	115.7	18	氟硝西洋	86.6	99.3
8	去甲基氟西洋	88.4	102.5	19	尼美西洋	84.2	100.5
9	硝西洋	86.8	100.1	20	替马西洋	107.2	109.3
10	奥沙西洋	105.7	109.1	21	地西洋	91.6	107.6
11	艾司唑仑	119.2	117.0				

## ■ 结论

本文利用岛津公司 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪, 结合《法医毒物 QTOF 高分辨质谱库》快速对 21 种苯二氮䓬类成分进行定性定量分析。结果显示, 连续 120 次分析质量偏差小于 4 ppm, 库匹配结果准确, 仪器稳定性良好。2~200 ng/mL 各成分曲线相关系数均大于 0.99, 线性良好。该方案可以实现一针进样, 快速完成目标物的定性定量分析, 具有一定的实际应用价值, 供相关人员参考。

岛津应用云

