·论　　著·

生物检材中苯巴比妥的测定*

解润芳，张秀峰，李慧方洁，王　蕊
（昆明医科大学法医学院，昆明 650500）

摘　要：目的　建立一种简便、快速、准确、可靠的方法检测生物检材中的苯巴比妥。**方法**　丙酮：水(8∶2)对生物检材进行浸泡，然后在 pH 值为 3～4 条件下，采用乙酸乙酯进行提取分离，气相-质谱联用(GC-MS)对样品进行检测，使用总离子流图(TIC 图)中苯巴比妥保留时间及质谱图中苯巴比妥的特征离子碎片定性，应用外标法进行定量。**结果**　该方法简单易操作，背景干扰小，分离效果好，分析速度快，用于苯巴比妥定性的保留时间为 8.385 min，苯巴比妥的特征离子碎片为 m/z 204 和 m/z 232；以 m/z 204 为定量离子碎片，采用外标法进行定量，回收率为 87.35%，相对标准偏差 RSD 为 5.43%，最低检出限(LLOD)为 0.005 mg/mL。**结论**　该方法可用于法医毒物分析生物检材中苯巴比妥的检验，效果良好。

关键词：法医毒物分析；　外标法；　气相-质谱联用；　生物检材；　苯巴比妥
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.004　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2016)20-2813-03

Determination of phenobarbital in biomaterial*

XIE Runfang, ZHANG Xiufeng, LI Huifangjie, WANG Rui
(*School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan* 650500, *China*)

Abstract: Objective　To establish a kind of simple, rapid, accurate and reliable method to determine the phenobarbital in the biomaterial. **Methods**　We pre-treated biomaterial by the method that the reagent of acetone : water (v/v 8 : 2) was firstly used to soak the biomaterial, and then we took use of ethyl acetate as reagent to extract the phenobarbital of the biomaterial in the present of pH=3−4. We finally employed GC-MS to determine these samples. On the one hand, we not only took advantage of the retention time of the phenobarbital in total ion current (TIC) but also took advantage of the characteristic fragment ions of phenobarbital in mass spectrogram as qualitative basis. On the other hand, we took advantage of the external standard method as quantitative basis. **Results**　The method had the characteristics of the simple and easy operation. There was hardly background interference and there was good separation effect in the method. The method also had the characteristics of fast analytical speed such as the retention time of the phenobarbital was 8.385 min. The characteristic fragment ions of phenobarbital was m/z 204 and m/z 232. The characteristic fragment ions of m/z 204 was served as quantitative ion fragments and we employed the external standard method to quantify in the method. In short, the average recovery rate of the method was 87.35%. Relative standard deviation (RSD) was 5.43% in the method. The lowest limit of detection (LLOD) was 0.005 mg/mL. **Conclusion**　The method showes satisfactory result that it could be applied to determine the phenobarbital of the biomaterial of forensic toxicological analysis.

Key words: forensic toxicology analysis;　the external standard method;　GC-MS;　biomaterial;　phenobarbital

苯巴比妥又称鲁米那，在空气中稳定，微溶于水，溶于热水和乙醇，显酸性、易溶于碱性溶液[1-3]。苯巴比妥作为长效巴比妥类药物，具有镇静、催眠、抗惊厥、抗癫痫作用。临床上常用于儿童抗癫痫治疗，随着苯巴比妥的广泛使用，涉及苯巴比妥中毒的案(事)件越来越多，因此建立一种简单、可靠，满足法医毒物分析对生物检材中的苯巴比妥进行检验的方法具有较好的现实意义。现根据苯巴比妥的理化性质及参考文献[4-8]，采用气相-质谱联用(GC-MS)外标法检测生物检材中的苯巴比妥，生物检材经过简单的样品前处理，使用 GC-MS 对样品进行定性定量分析。报道如下。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　GC/MS：Agilent7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪；配有电子轰击离子源(EI)及 Nest11.0 化学图谱库。苯巴比妥标准溶液(1.0 mg/mL)购自司法部司法鉴定科学技术研究所；甲醇(色谱纯)；二次蒸馏水。

1.2　溶液配制　苯巴比妥标准工作溶液：准确移取一定量苯巴比妥标准溶液置于 10 mL 容量瓶中，应用色谱纯甲醇稀释至刻度，使其浓度为 0.01 mg/mL。待测样品：沙某心血、肝脏、胃及胃内容物。

1.3　实验方法

1.3.1　GC/MS 仪器条件　离子源：EI 源；离子化能量：70 eV；离子源温度：230 ℃；4 极杆温度：150 ℃；色谱柱：HP-5ms 30 m×0.25 mm×0.25 μm。进样口温度：280 ℃；传输线温度：250 ℃；程序升温：初温 80 ℃保持 3 min，以 30 ℃/min 的速率升温至 300 ℃，保持 8 min；进样方式：分流进样；分流比：10∶1；载气：氦气；纯度：>99.99%；流速：1.0 mL/min。

1.3.2　样品前处理　分别取送检沙某心血 5 mL，肝脏 10 g(剪碎)，胃及胃内容物 10 g(剪碎)，置于 50 mL 具塞塑料离心

*　**基金项目：**云南省科技厅/昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(2014FB013；2016FZ007)。
作者简介：解润芳，女，讲师，主要从事毒药物分析研究。

管中，均加入 20 mL 丙酮：水(8∶2)浸泡约 30 min，然后3 000 r/min 离心机离心 3 min，取出上清液分别放置于 3 个瓷坩埚中，残渣仍然用 20 mL 丙酮：水浸提 2 次，并把后 2 次的上清液合并于同一个瓷坩埚中，把瓷坩埚放在 85 ℃水浴锅上挥干，取下瓷坩埚，冷却至室温。采用 15 mL pH 值为 3～4 的盐酸水溶液少量多次地洗涤瓷坩埚上的挥干物，并转移至 50 mL 具塞塑料离心管，使用 50 mL 乙酸乙酯萃取 3 次，3 次萃取液都置于同一瓷坩埚中，把瓷坩埚置 85 ℃水浴锅上挥干，取下瓷坩埚，冷却至室温，应用色谱纯甲醇少量多次地洗涤瓷坩埚中的物质，并定容在 1 mL 色谱纯甲醇中，置于进样瓶中，分别得到沙某待测心血、肝脏、胃及胃内容物。

1.3.3　分析检测　将空白对照样品(色谱纯甲醇)，0.01 mg/mL 苯巴比妥标准工作液，沙某待测心血、肝脏、胃及胃内容物，分别进样 1 μL，应用 GC/MS 在 1.3.1 条件下进行分离分析。

2　结　　果

2.1　对照样品结果　空白对照样品在 TIC 图中 8.385 min 处未出峰，说明色谱纯甲醇可作为空白试剂使用，不影响测定，可排除假阳性干扰的可能。苯巴比妥标准工作液的 TIC 图表明，8.385 min 出现苯巴比妥的色谱峰，且峰形很好基本呈正态分布，说明所建立的分离分析方法适用于苯巴比妥的检测。苯巴比妥 TIC 图中色谱峰所对应的质谱图(MS 图)显示苯巴比妥的特征离子碎片为 m/z 204 和 m/z 232，与 Nest11.0 化学图谱库中苯巴比妥的匹配度较高(＞95%)，进一步确证为苯巴比妥，且 GC/MS 分离分析方法还提供苯巴比妥的分子结构，使定性更加准确、可靠。

2.2　待测样品结果　沙某待测心血 TIC 图中 8.385 min 未出现苯巴比妥的色谱峰，提示待测心血中未检出苯巴比妥。沙某待测肝脏、胃及胃内容物的 TIC 图和所对应的 MS 图表明，8.472 min 处出现苯巴比妥的色谱峰，但在 8.462 min 处出现苯巴比妥的色谱峰，与苯巴比妥标准工作液中苯巴比妥的保留时间(8.385 min)比较，两者均存在微小差异，其中相对误差最大的为 1.03%，在定性过程中误差小于 3%，不影响定性的准确性。MS 图显示待测肝脏、胃及胃内容物均说明苯巴比妥的特征离子碎片为 m/z 204 和 m/z 232，与 Nest11.0 化学图谱库中苯巴比妥的匹配度较高(＞95%)，将成为待测肝脏、胃及胃内容物中检出苯巴比妥的直接依据。见图 1。

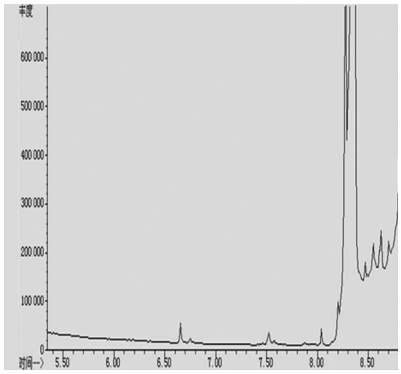

图 1　沙某待测心血的 TIC 图

2.3　定量结果

2.3.1　定量待测肝脏的制备　准确称取沙某肝脏 10.304 50 g(剪碎)，按 1.3.2 的方法进行样品前处理后，得到沙某定量待测肝脏(CX)；将定量待测肝脏用 GC/MS 在 1.3.1 条件下进样 1 μL，得到以 m/z 204 的特征离子碎片为定量离子的峰面积(AX)。将 0.01 mg/mL 苯巴比妥标准工作液(CS)，用 GC/MS 在 1.3.1 条件下进样 1 μL，得到以 m/z 204 的特征离子碎片为定量离子的峰面积(AS)。

2.3.2　肝脏中苯巴比妥含量　按以下 2 个公式计算沙某肝脏中苯巴比妥含量(WX)，式中 V 表示定容体积(mL)；W 表示称取检材的含量(g)。

$$C_X = \frac{C_S \cdot A_X}{A_S} (mg/mL) \quad (1)$$

$$W_X = \frac{C_S \cdot A_X \cdot V}{A_S \cdot W} (mg/g) \quad (2)$$

由公式计算获得肝脏中苯巴比妥含量为 0.006 7 mg/g，未超出临床用药的剂量，证实沙某不是死于苯巴比妥中毒。沙某出生 3 个月后家属发现其出现无诱因抽搐，确诊为癫痫。2015 年某日突发抽搐，急送医院救治，入院第 2 天 9:00 注射抗癫痫药后出现面色青紫，呼吸不畅，经抢救无效死亡。其生前使用过苯巴比妥，但用量未超出临床用药剂量，因为沙某心血中未检出苯巴比妥，虽肝脏中检出但含量不高，符合临床用药规范；胃及胃内容物中检出，可能是因为死后再分布所引起。

2.4　回收率　采用移液器精确吸取空白全血 0.99 mL 4 份，分别加入 0.01 mL 浓度为 1 mg/mL 的苯巴比妥标准溶液，使空白全血中苯巴比妥的添加浓度均为 0.01 mg/mL。再按 1.3.2的方法对 4 份样品进行处理后，分别进样 1 μL，用 GC/MS 在 1.3.1 条件进行分离分析，以 m/z 204 的特征离子碎片作为定量离子碎片，可得到 4 份样品的峰面积。由公式(1)可计算得到 4 份样品的实际浓度，从而获得 4 份样品的平均浓度。因此 4 份样品的平均浓度除以添加浓度 0.01 mg/mL，再乘以 100%可计算得出回收率，所建方法的回收率为 87.35%。虽然回收率不高，但是所建方法简单，易操作，完全能够满足法医毒物分析快速测定生物检材中苯巴比妥的要求。

2.5　精密度　将 0.01 mg/mL 苯巴比妥标准工作液，用 GC/MS 在 1.3.1 条件下，连续进样 5 次，每次进样 1 μL，可得到 5 次进样 m/z 204 的特征离子碎片的峰面积，由此可计算精密度，所建方法的相对标准偏差(*RSD*)为 5.43%，*RSD* 小于 10%说明所建方法的精密度良好，能满足实际工作的检测需要。

2.6　稳定性　按 2.4 方法配制的空白血添加样品，分别在样品处理前、后室温放置 1、3、6、12、24 h 后，采用 1.3.2 方法进行样品处理，用 GC/MS 在 1.3.1 色谱条件下进样进行测定，分析结果相对误差均小于 10%。结果显示，所建方法稳定性良好。

2.7　最低检测限(LLOD)　分别将 0.01 mg/mL 苯巴比妥标准工作液，用色谱纯甲醇梯度稀释配制成苯巴比妥含量为 0.005、0.001 mg/mL 的标准工作液。用 GC/MS 在 1.3.1 色谱条件下进行测定。苯巴比妥含量为 0.005 mg/mL 的标准工作液 S/N＞3，苯巴比妥含量为 0.001 mg/mL 的标准工作液 S/N＜3，因此，所建方法的最低检出限为 0.005 mg/mL，说明所建方法灵敏度良好。

3　讨　　论

采用 GC-MS 测定生物检材中的苯巴比妥是一种简便、快速、准确、可靠的方法，具有许多优点。方法简单、易操作、生物样品仅经过简单的样品前处理，检测结果显(下转第 2817 页)

预防液体聚集和体质量增加，达到保护呼吸功能、心脏功能的作用[12-14]。Golab 等[15]研究发现，术中维持较高的 COP 可降低术后血乳酸水平及缩短机械通气时间，带来较好的临床效果。本研究 CPB 组通过使用 ALB 预充、术后超滤等手段，提高体外循环术后的 COP，致使 2 组患者在手术结束返回 ICU 时 COP 差异无统计学意义（$P>0.05$）。2 组患者手术后低心排综合征、急性肺损伤的发生率均为 0，且急性肾损伤的发生率比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），2 组患者的机械通气时间、ICU 时间差异也无统计学意义（$P>0.05$）。

综上所述，心脏体外循环手术发展至今，技术已趋于成熟，预充液成分的调整，超滤技术的改良使得体外循环造成的不良反应减少，从而降低术后并发症，减少机械通气时间和 ICU 时间，临床预后相较于非体外心脏手术，差异无统计学意义（$P>0.05$），是比较安全的手术。由于本研究样本量有限，有待进一步收集更多数据以进行论证。

参考文献

[1] 冯志强. 整合应用生理学[M]. 北京：人民军医出版社，2006：63-154.

[2] 龙村. 体外循环学[M]. 北京：人民军医出版社，2004：399-404.

[3] Kmiecik SA, Stammers AH, Petterson CM, et al. The effect of volume replacement on serum protein concentration during cardiopulmonary bypass[J]. J Extra Corpor Technol, 2001, 33(4): 227-232.

[4] Hankins J. The role of albumin in fluid and electrolyte balance[J]. J Infus Nurs, 2006, 29(5): 260-265.

[5] Boldt J. Use of albumin: an update[J]. Br J Anaesth, 2010, 104(3): 276-284.

[6] Iimura O, Tabei K, Nagashima H, et al. A study on regulating factors of plasma refilling during hemodialysis[J]. Nephron, 1996, 74(1): 19-25.

[7] Boldt J. New light on intravascular volume replacement regimens: what did we learn from the past three years? [J]. Anesth Analg, 2003, 97(6): 1595-1604.

[8] 林植民. 婴儿心脏手术体外循环管理[J]. 现代医学仪器与应用，2002，14(2)：20-21.

[9] Tassani P, Schad H, Schreiber C, et al. Extravasation of albumin after cardiopulmonary bypass in newborns[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2007, 21(2): 174-178.

[10] Farstad M, Kvalheim VL, Husby P. Cold-induced fluid extravasation during cardiopulmonary bypass in piglets can be counteracted by use of iso-oncotic prime[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(2): 287-294.

[11] Jonas RA, Wypij D, Roth SJ, et al. The influence of hemodilution on outcome after hypothermic cardiopulmonary bypass: results of a randomized trial in infants[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(6): 1765-1774.

[12] Russell JA, Navickis RJ, Wilkes MM. Albumin versus crystalloid for pump priming in cardiac surgery: meta-analysis of controlled trials[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2004, 18(4): 429-437.

[13] Eising GP, Niemeyer M, Günther T, et al. Does a hyperoncotic cardiopulmonary bypass prime affect extravascular lung water and cardiopulmonary function in patients undergoing coronary artery bypass surgery? [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2001, 20(2): 282-289.

[14] Mehlhorn U, Allen SJ, Davis KL, et al. Increasing the colloid osmotic pressure of cardiopulmonary bypass prime and normothermic blood cardioplegia minimizes myocardial oedema and prevents cardiac dysfunction[J]. Cardiovasc Surg, 1998, 6(3): 274-281.

[15] Golab HD, Scohy TV, De Jong PL, et al. Relevance of colloid oncotic pressure regulation during neonatal and infant cardiopulmonary bypass: a prospective randomized study[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2011, 39(6): 886-891.

（收稿日期：2016-05-13　修回日期：2016-07-21）

（上接第 2814 页）

示基质干扰小，分离效果好，特别适用于临床及司法鉴定中快速测定的要求。所建方法以总离子流图苯巴比妥的保留时间初步定性，并将质谱图与 Nest11.0 化学图谱库比较进行确证，用单点外标法进行定量分析，方法定性定量准确。所建方法经过方法学验证，分离度、回收率、RSD、LLOD 等指标都符合测定要求。

参考文献

[1] 张杰. 浅谈红外光谱法定性分析苯巴比妥的一点体会[J]. 中国医药指南，2013，11(36)：374-374.

[2] 王勇，黄竹芳，贠克明，等. 生物检材中苯巴比妥气相色谱和气相色谱/质谱检测[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2009，7(5)：567-568.

[3] 刘光斌，姜芳宁，高颖. 高效液相色谱外标法快速测定苯巴比妥血药浓度[J]. 中国医院用药评价与分析，2012，12(9)：811-813.

[4] 余勤，梁茂植，向瑾，等. EMIT 法和 HPLC 法监测苯妥英和苯巴比妥血药浓度比较研究[J]. 检验医学，2007，22(4)：455-458.

[5] 蔡明招，金永春，吴惠勤，等. GC/MS 同时检测人体液中 8 种酰胺结构的精神类药物[J]. 分析试验室，2007，26(9)：46-50.

[6] 袁烨，郭巍巍，李军，等. GC-MS 法同时检测人尿液中 10 种常见安眠药物[J]. 中国药房，2013，24(46)：4362-4363.

[7] 朱鹏飞，刘文卫，周闰，等. HPLC-MS/MS 同时检测人尿中巴比妥，苯巴比妥，异戊巴比妥，司可巴比妥[J]. 中国卫生检验杂志，2012，29(9)：2003-2006.

[8] 施介华，彭丽. 胶束液相色谱法同时测定血浆中的苯巴比妥、艾司唑仑和氯硝西泮[J]. 色谱，2010，28(10)：959-964.

（收稿日期：2016-04-16　修回日期：2016-07-28）