

在线凝胶色谱净化结合三重四极杆气质联用仪测定人体血液中有毒物质

GCMSMS-063

摘要：本文建立了在线凝胶色谱净化结合三重四极杆气质联用仪 (GPC-GC-MS/MS) 系统测定人体血液中 23 种常见有毒物质的方法。血液样品经固相萃取小柱简单去水洗脱后，经在线 GPC 系统进行净化，去除血液中的蛋白质、脂肪及色素等大分子物质后，大体积进样到 GC-MS/MS 进行分析。23 种有毒物质在 0.01~0.1 mg/L 的浓度范围内线性良好，加标浓度在 0.02 mg/L 下，方法回收率在 50%~130% 之间，绝大多数化合物的检出限小于 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。该方法简单易操作，同时消除了血液中其他杂质干扰，结果准确可靠，可用于日常司法鉴定及刑事案件原因调查的辅助检测。

关键词：GPC 净化 GC-MS/MS 血液有毒物质

近年来，随着人们工作和生活压力的增大，患各类神经症和心理障碍的人群逐渐增加。因此使用安眠药和镇静药的人也越来越多，这其中使用不当和服用安眠镇静类药物成瘾者比较普遍存在着。

滥用药物是指连续使用后产生依赖性，并具有滥用倾向的精神活性物质。随着药物滥用行为的日益泛滥，以及药物滥用导致的犯罪事件日益增加，滥用药物分析已经成为司法毒物鉴定不可或缺的重要部分；同时，有机磷农药是常用的杀虫剂，急性中毒时有发生。在中毒致死案件的司法鉴定中，有机磷农药作为常见致死物质，

其分析也是司法鉴定当中毒药物分析的项目之一。

在实际检测中，由于生物检材成分复杂，存在大量的干扰物，因此在生物检材中进行定性定量分析具有较大难度。目前检测血液中此类物质，需根据检测的特定物质调节 pH 值后进行提取、浓缩、检验，操作繁琐且所需血液量大。本文采用血液样品直接经 SPE 小柱去水洗脱后，再经 GPC 系统净化，大体积进样到 GCMSMS 进行分析，即简化了样品前处理方法，又提高了分析灵敏度，可以很好地适应司法鉴定工作及刑事案件的原因调查等，为毒物检测提供一个新的有效方法。

实验部分

1.1 仪器

GPC-GCMS-TQ8040(岛津公司)

1.2 分析条件

GPC 条件：

色谱柱：Shodex CLNpak EV-200(2.1 mm \times 150 mm)

流动相：丙酮 / 环己烷 (3/7, V/V)

流速：0.1 mL/min 柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：10 μL

GC-MS/MS 条件：

色谱柱：惰性石英管：5 m \times 0.53 mm

预柱：Rxi-5 MS, 5 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm

分析柱：Rxi-5 MS, 25 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm

柱温程序：82 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)-8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -120 $^{\circ}\text{C}$ -15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -300 $^{\circ}\text{C}$ (5.25 min)

PTV 进样口温度程序：120 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)-100 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -250 $^{\circ}\text{C}$ (20.7 min)

不分流进样时间：7 min；

溶剂切割时间：9 min

接口温度：280 $^{\circ}\text{C}$ ；

离子源温度：250 $^{\circ}\text{C}$

采集方式：MRM+Scan 同时采集，Scan 采集范围：86~500 amu

1.3 标样配置

乙醇配制 2 mg/mL 的混合标准储备溶液, 用空白血液经 SLE 固相萃取小柱洗脱液 (乙酸乙酯: 二氯甲烷 = 1:1, V/V) 配置成为 0.01、0.02、0.025、0.05、0.1 mg/L 的标准溶液使用液。

1.4 样品处理

移取 1 mL 血液样品于 SLE 固相萃取小柱上, 静至 5 min 后, 利用 4 mL 乙酸乙酯: 二氯甲烷 = 1:1(v/v) 进行洗脱, 洗脱液直接上 GPC-GC-MS/MS 进行分析。

表1 组分名称、保留时间及特征离子

编号	保留时间 (min)	CAS 号	化合物名称	定量离子	CE	定性离子	CE
1	10.226	10265-92-6	甲胺磷	141>95	8	141>126	4
2	13.810	57-44-3	巴比妥	156>141.1	9	141>98.1	9
3	13.857	2631-40-5	异丙威(灭必虱)	136>121	10	136>103	22
4	14.829	13194-48-4	灭线磷(灭克磷)	200>158	6	200>114	14
5	15.358	298-02-2	甲拌磷	260>75	8	260>231	4
6	15.643	8065-48-3	内吸磷	88>60	5	89>60	5
7	15.770	1563-66-2	呋喃丹	164.1>149.1	8	164.1>131.1	18
8	16.154	333-41-5	二嗪农	304.1>179.1	10	304.1>162.1	8
9	16.504	309-43-3	速可眠	167>124.1	9	168>153.1	9
10	16.918	6740-88-1	氯胺酮	180>116	20	180>145	10
11	17.108	298-00-0	甲基对硫磷	263>109	14	263>136	8
12	17.266	63-25-2	甲萘威(西维因)	144.1>116.1	12	144.1>89	38
13	17.526	121-75-5	马拉硫磷	173.1>99	14	173.1>127	6
14	17.720	55-38-9	倍硫磷	278>109	20	278>125	20
15	17.779	56-38-2	对硫磷	291.1>109	14	291.1>137	6
16	17.855	24353-61-5	水胺硫磷	289.1>136	14	289.1>113	6
17	17.926	50-06-6	苯巴比妥	204>161.1	9	204>115.1	27
18	20.950	439-14-5	安定	256.1>221.1	21	283>248	15
19	21.801	59467-64-0	米达唑仑	325.1>310.1	9	310.1>257.1	24
20	23.824	1622-61-3	氯硝安定	280.1>234.1	12	314.1>268.1	12
21	24.241	29975-16-4	舒乐安定	259.1>205.1	18	293.1>239.1	18
22	24.513	28961-97-7	阿普唑仑	308.1>273.1	9	273.1>245.1	18
23	25.476	28911-01-5	三唑仑	313>277	24	313>242	33

结果讨论

2.1 在线 GPC 时间选择

本文采用 1 mL 空白血液样品中, 按 2.2 节的操作流程进行样品处理及测定, 通过在线凝胶色谱的紫外检测器测定, 同时以氟胺氰菊酯、灭螨猛标准品直接进样测定 (见图 1), 最后选取 3.5 min-5.5 min 时间内的收集组分既能保证各待测样品有较高的回收率, 降低检测限, 同时又可最大程度地避免脂肪等杂质的干扰, 达到待测组分在线 GPC 净化的目的。



图1 1-空白血、2-氟胺苄菊酯和灭螨猛紫外图

2.2 标样色谱图

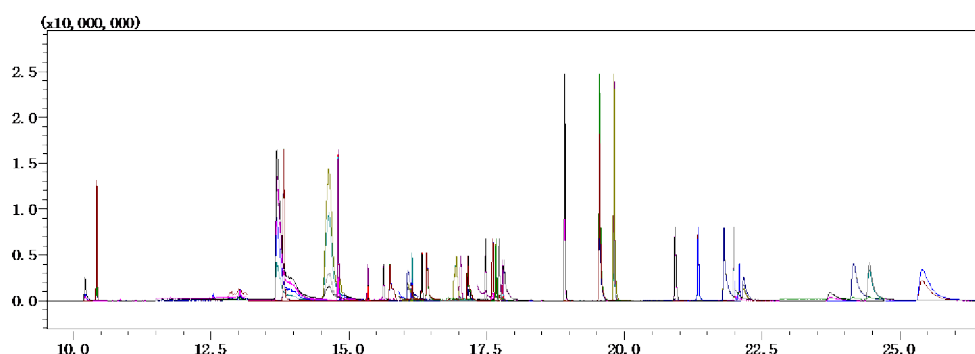


图2 标准溶液TIC图(0.05 mg/L)

2.3 标准曲线

将不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示（因篇幅所限，仅列出 3 种化合物的标准曲线及 MRM 色谱图），各物质的检出限，按照 3 倍的信噪比（峰峰比）进行计算，各物质相关系数及检出限见表 2。

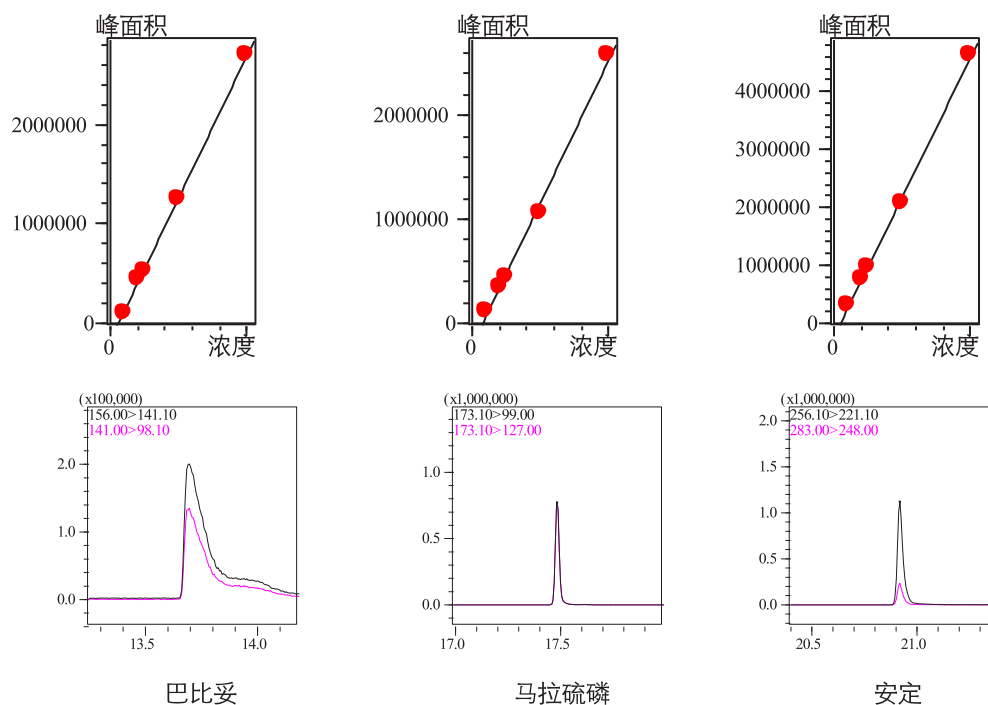


图3 部分毒物的标准曲线及MRM图(0.02mg/L)

表2 23种组分校准曲线相关系数、检出限及峰面积相对标准偏差(n=6)

No.	化合物名称	相关系数 r	检出限 (ug/L)	峰面积 RSD%	No.	化合物名称	相关系数 r	检出限 (ug/L)	峰面积 RSD%
1	甲胺磷	0.9996	0.07	4.89	13	马拉硫磷	0.998	0.01	5.50
2	巴比妥	0.9997	1.42	5.42	14	倍硫磷	0.9996	0.04	4.41
3	异丙威	0.9997	0.17	3.88	15	对硫磷	0.995	0.05	7.06
4	灭线磷	0.9997	0.16	4.84	16	水胺硫磷	0.998	0.17	6.03
5	甲拌磷	0.9995	0.01	4.89	17	苯巴比妥	0.998	1.25	7.35
6	内吸磷	0.9991	0.06	5.37	18	安定	0.9994	0.01	4.85
7	呋喃丹	0.9995	0.34	3.43	19	米达唑仑	0.998	0.16	5.27
8	二嗪农	0.9992	0.01	4.39	20	氯硝安定	0.995	0.49	8.44
9	速可眠	0.9996	1.29	4.41	21	舒乐安定	0.996	0.07	7.47
10	氯胺酮	0.9997	0.01	5.18	22	阿普唑仑	0.997	0.11	6.44
11	甲基对硫磷	0.996	0.08	7.32	23	三唑仑	0.997	0.06	7.09
12	甲萘威	0.9994	0.25	5.10					

2.4 精密度实验

对 0.05 mg/L 的混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，23 种组分峰面积的 RSD 结果如上表 2 所示，峰面积 RSD 值在 3.43~8.44% 之间，表明仪器的稳定性良好。

2.5 回收率实验

以不含所检有毒物质的血样为空白样品，添加标准溶液进行回收率测试，添加浓度为 0.02 μg ，平行试验 6 次，各化合物平均回收率及 RSD 见表 3。

表3 23种组分加标回收率

No.	化合物名称	回收率(%)	RSD%	No.	化合物名称	回收率(%)	RSD%
1	甲胺磷	54.85	3.60	13	马拉硫磷	54.11	4.20
2	巴比妥	133.53	5.14	14	倍硫磷	49.82	1.78
3	异丙威	113.74	3.63	15	对硫磷	53.51	2.75
4	灭线磷	113.48	4.35	16	水胺硫磷	104.19	9.53
5	甲拌磷	57.21	2.74	17	苯巴比妥	98.82	9.36
6	内吸磷	83.27	3.71	18	安定	113.73	2.31
7	呋喃丹	113.18	3.01	19	米达唑仑	120.96	5.56
8	二嗪农	53.90	7.21	20	氯硝安定	129.00	3.96
9	速可眠	121.35	5.97	21	舒乐安定	131.88	1.95
10	氯胺酮	112.11	4.54	22	阿普唑仑	123.30	2.84
11	甲基对硫磷	82.50	2.73	23	三唑仑	114.17	4.65
12	甲萘威	122.60	3.28				

2.6 样品 AMDIS 检索结果

在采集过程中,采用MRM和SCAN同时采集的方式,MRM方式可以对重点监测的化合物进行准确的定性与定量,而利用SCAN采集的数据可以利用AMDIS再次检索,以防止样品在排查过程中的漏检。

将采集到的样品加标数据进行数据转换后,直接导入到AMDIS中进行检索,检索结果表明即使在0.02 μg/L的加标浓度下,有5个化合物被检索出来(见图4),而未检出18个化合物因血液样品中的基质干扰而无法检索出来,如三唑仑被血液中的胆固醇而包裹而无法检索到。由此表明,MRM和SCAN同时采集时,也不会影响SCAN的灵敏度,可以利用SCAN数据直接进行AMDIS检索;同时AMDIS检索结果,可以对MRM监测的化合物进行补充,防止在司法鉴定及刑事案件中的漏检。

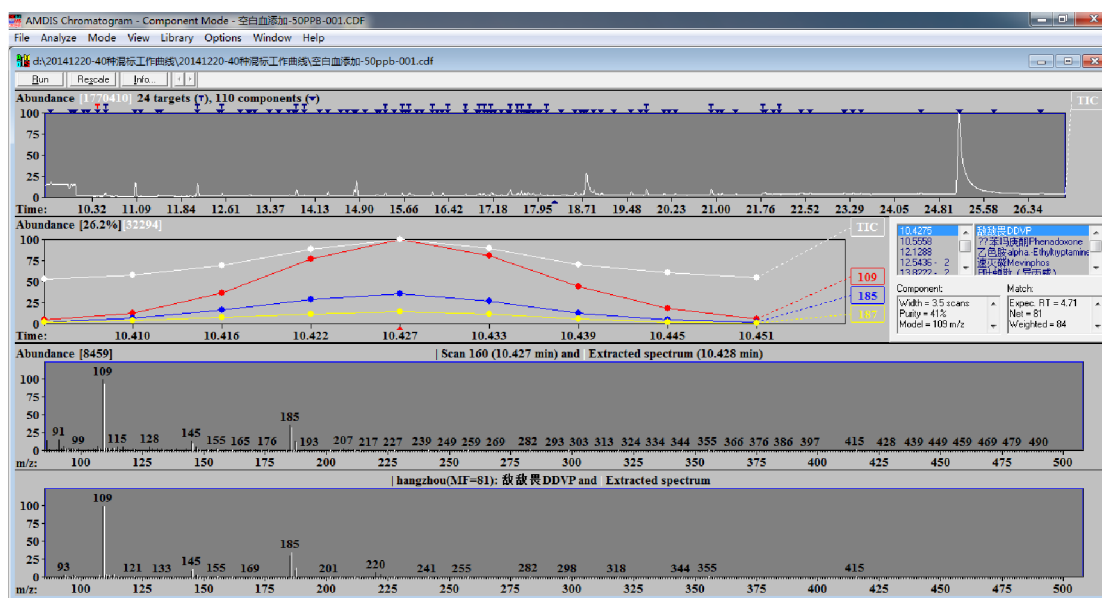


图4 加标样品利用AMDIS检索结果

结论

本文建立了在线 GPC-GC-MS/MS 系统测定人体血液中 23 种有毒物质的方法。该方法样品处理简单,快速,测定浓度范围内线性良好;标准溶液连续 6 次测定结果峰面积 RSD 小于 9%,重现性良好;23 种组分回收率范围在 49%~134% 之间。同时利用 MRM 和 SCAN 同时采集的方法,可以对 MRM 采集的化合物进行重点监测,有利于重点监测化合物的定性定量;而 SCAN 数据可以直接导入到 AMIDS 中,对未重点监测的化合物进行排查,两者相互补充,使得结果更加准确可靠。该方法可很好地适应司法鉴定工作及刑事案件的原因调查等,为毒物检测提供了一个新的有效方法。