

# PTV-GC-MS/MS 法测定全血中 5 种常见 兽用麻醉剂

## GCMSMS-312

**摘要：** 本文采用程序升温进样技术 (PTV) 结合气相色谱 - 三重四极杆质谱仪建立了全血中的 5 种常见兽用麻醉剂 (替来他明、赛拉唑、氯胺酮、甲苯噻嗪、唑拉西泮) 检验方法。采用盐析辅助液液萃取法作为前处理方法, 提取液经小型 QuEChERS 净化柱净化后使用 PTV 进样口结合 GC-MS/MS 进行分析。结果表明, 5 种常见兽用麻醉剂检出限为 10~20 ng/mL。在 20~2000 ng/mL 浓度范围内线性良好 ( $R>0.998$ ), 不同浓度的添加样品回收率为 71.61%~119.1%。本文建立的方法前处理简便、稳定性好、灵敏度高, 具有广阔的开发前景, 可用于实际案件检验。

**关键词：** 兽用麻醉剂 气相色谱-三重四极杆质谱 程序升温进样 盐析辅助液液萃取

### 技术特点：

- ❖ 程序升温进样口技术 (PTV) 最大程度改善乙腈对仪器系统的影响。
- ❖ 该方法可实现实际案例中血液中 5 种兽用麻醉剂的高灵敏度检测。

兽用麻醉药在保障畜牧业生产中发挥重要作用。常用的兽用麻醉剂有舒泰、隆朋、静松灵、速眠新等。相对于安眠药和其他含镇定作用的处方药而言, 兽用麻醉剂的管理较为松散, 更容易获得, 常出现在药物辅助犯罪等有关刑事案件中。因此, 兽用麻醉剂的快速检验和准确定量是处理相关案件的重要一环。

目前, 血液中兽用麻醉剂的检测方法以色谱法为主, 有气相色谱法、液相色谱法、GCMS 法和 LC-MS/MS 等。GC-MS/MS 具有敏度高、抗干扰能力强等优点, 常用于复杂基质中痕量目标物的检验。血液中存在大量蛋白质、脂肪、血细胞等, 基质成分复杂, 乙腈可避免提取过多的脂肪, 而且乙腈沉淀蛋白的效果最佳, 是首选提取溶剂, 但是长期使用乙腈等强极性溶剂会对气相色谱系统造成一定的损害。程序

升温进样口技术 (PTV) 可通过低温进样放空溶剂、富集溶质, 然后关闭分流阀、急速升温, 实现待测物的汽化和进样, 不仅可以降低乙腈对分离系统的伤害, 也能实现待测物的高灵敏度检测。因为乙腈与水存在一定的互溶性, 使用盐析辅助液液萃取 (Salting-out-assisted liquid-liquid extraction, SALLE) 技术则可以有效实现乙腈与水的两相分离, 再结合 QuEChERS 净化技术可最大程度的去除乙腈中包括水在内的残留杂质, 得到对仪器分离系统更加友好的样品提取液。

本文采用程序升温进行技术结合 GC-MS/MS 实现了血液中 5 种兽用麻醉剂的快速检测。该方法操作简单、灵敏度高, 并应用于实际案件血液中兽用麻醉剂的定性定量工作。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

GCMS-TQ8050 NX 气相色谱 - 三重四极杆质谱仪

### 1.2 分析条件：

色 谱 柱 : SH-I-5Sil MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm  
柱 温 程 序 : 60°C (2 min)\_10°C /min\_320°C (5 min)  
PTV 升温程序 : 65°C (1 min) \_200°C /min\_ 280°C (6 min)  
分 流 阀 程 序 : 0-0.9 min 打开, 0.9-6 min 关闭, 6 min 后打开

载气控制方式：恒线速度（45.6 cm/s）      离子源温度：230℃  
 进样方式：分流进样，分流比 30:1      接口温度：320℃  
 进样量：1 μL      检测器电压：调谐电压 +0.4 kV  
 扫描方式：MRM，离子对信息见表 1

## ■ 样品前处理

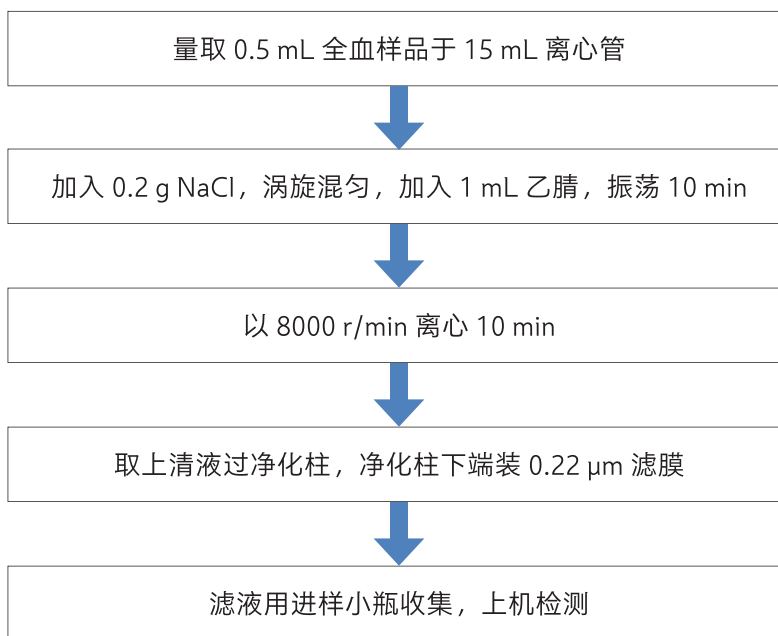


图 1 样品前处理流程图

## ■ 结果与讨论

### 3.1 质谱条件优化

首先采用溶剂甲醇配制质量浓度均为 10 μg/mL 的 5 种兽用麻醉剂混合标准溶液，然后选用 Q3 Scan 采集模式，在 m/z 45 ~ 500 范围内检测，选择丰度高且质荷比大于 100 的特征离子作为母离子，设置碰撞能（CE）范围为 3 ~ 45 eV，最后使用产物离子扫描方法进一步得到各目标物离子对信息和最佳 CE 电压，建立 MRM 分析方法。5 种兽用麻醉剂保留时间与质谱参数见表 1。1 μg/mL 的混合标准溶液总离子流图见图 2（MRM 采集模式）。

表 1 5 种兽用麻醉剂的保留时间与质谱参数

化合物	保留时间 /min	离子对	碰撞能 /eV
替来他明	15.690	166.0>123.1*, 166.0>79.1, 166.0>77.1	9,21,30
赛拉唑	15.847	204.0>144.1*, 177.0>156.1, 171.0>156.1	9,21,15
氯胺酮	17.663	209.1>180.1*, 180.1>145.1, 180.1>105.1	24,9,12
甲苯噻嗪	18.919	205.0>177.1*, 205.0>133.2, 220.0>205.1	15,27,9
唑拉西洋	22.020	267.0>251.1*, 285.0>269.1, 285.0>251.1	24,27,24

注：\* 定量离子对

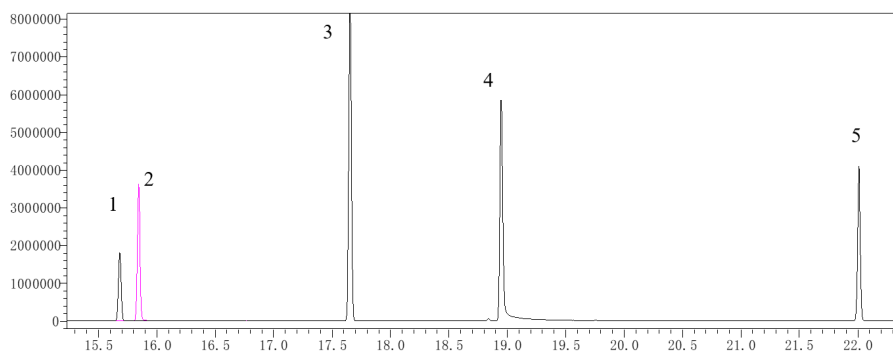


图 2 1 µg/mL 混合标准溶液的总离子流图  
(1. 替来他明, 2. 赛拉唑, 3. 氯胺酮, 4. 甲苯噻嗪, 5. 唑拉西洋)

### 3.2 前处理方法优化

#### 3.2.1 进样口程序及提取溶剂

在法庭科学毒物分析实践中，乙腈是最常见的提取溶剂，特别是在 QuEChERS 方法的应用上，乙腈作为首选溶剂为各类标准方法所考虑。本实验室拟开发一种同时适用于液相色谱串联质谱和气相色谱串联质谱的前处理方法，而乙腈作为提取溶剂在适配液相色谱串联质谱的方法中广泛应用，故本研究选择使用乙腈作为提取溶剂。

但在气相色谱质谱中长时间使用乙腈这一种极性较强的溶剂，会造成色谱柱流失严重、柱效降低、仪器维护频率增加等系统性难题。本文采用程序升温进样口技术（PTV）最大程度改善乙腈对仪器系统的影响。如表 2 所示，本研究针对的 5 种兽用麻醉剂，无与乙腈沸点相似的物质，采用 PTV 进样口在溶剂放空阶段不会造成早出峰物质损失。

表 2 乙腈和 5 种兽用麻醉剂沸点

化合物	沸点 /°C	CAS 号
乙腈	81.6	75-05-8
替来他明	352.6±42.0	14176-49-9
赛拉唑	313.7	123941-49-1
氯胺酮	363.8	6740-88-1
甲苯噻嗪	334.2±52.0	7361-61-7
唑拉西洋	506.6	31352-82-6

将进样口初始温度设置在乙腈沸点附近，样品注入进样口后，溶剂乙腈汽化并通过分流阀放空，溶质吸附在衬管内的玻璃棉上，0.9 min 后关闭分流阀，1 min 后 PTV 迅速升温，通过分流阀和急速升温的配合，目标物汽化后进入色谱柱完成后续的分流分析过程。PTV 也可以在大体积进样中运用，能较好的降低方法检出限。在本实验中，主要体现其搭配乙腈溶剂的显著优势，通过比较传统的非极性溶剂 -SPL 进样体系和新型的极性溶剂 -PTV 进样体系，后者表现出较好提取效果和更少的背景噪音，见图 3 和图 4。

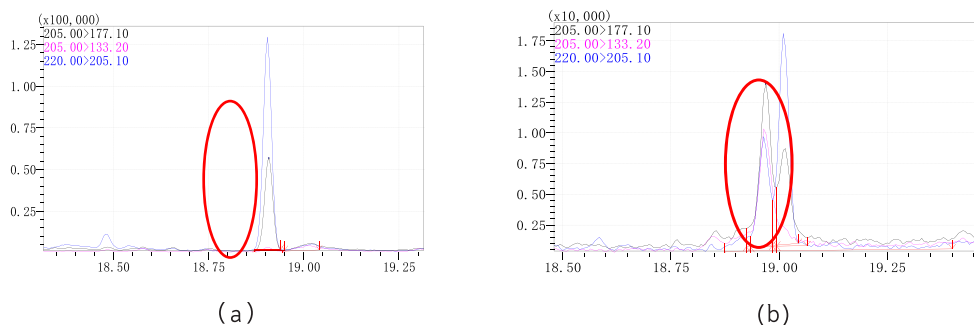


图3 同等血加标浓度下甲苯噻嗪使用不同溶剂 - 进样系统的对比图  
 (a) 乙酸乙酯-SPL 系统：未检出； (b) 乙腈-PTV 系统：检出

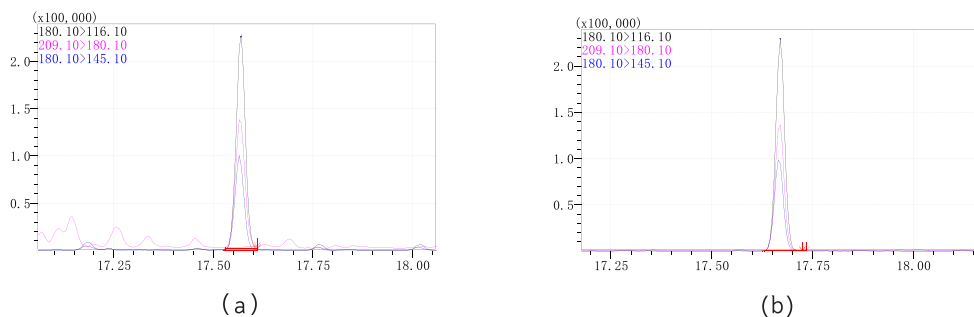


图4 同等血加标浓度下氯胺酮使用不同溶剂 - 进样系统的对比图  
 (a) 乙酸乙酯-SPL 系统：噪音大； (b) 乙腈-PTV 系统：噪音降低

### 3.2.2 盐析剂的使用

人体血液中含有约 83% 的水，乙腈与水拥有较好的互溶性，单纯使用乙腈沉淀蛋白法会导致乙腈中含有大量水，如果水分进入仪器系统，会对进样口和色谱柱造成不利影响。通过加入无水  $MgSO_4$  或者无水  $Na_2SO_4$  等传统的除水方式存在对目标药物的潜在吸附，本实验选用最常见的  $NaCl$  作为盐析剂，通过向乙腈水的混合溶液中加入过量的  $NaCl$ （每 0.5 mL 血中加入 0.2 g  $NaCl$ ）能够促进液液分层，如图 5 所示，同时结合回收率的数据， $NaCl$  展现出较好的盐析效果。提取上层有机相（乙腈层）经过 QuEChERS 小柱净化后继续除去残留的水。本文还对  $NaCl$  加入的次序（加入乙腈前或加入乙腈后）进行考察，发现两个实验组无明显区别。



图5 加入过量  $NaCl$  后乙腈与血液分层（上层为乙腈层）

### 3.3 方法学验证

采用空白全血基质配制兽用麻醉剂质量浓度分别为 20、40、200、1000、2000 ng/mL 的系列血添加标准溶液，在优化条件下测定，以各目标物的质量浓度 (x) 为横坐标，定量离子色谱峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准曲线，以 3 倍和 10 倍信噪比 (S/N) 对应的添加水平分别计算各化合物的检出限 (LOD) 和定量下限 (LOQ)，结果见表 3。5 种兽用麻醉剂在各线性范围内线性关系良好，相关系数 (R) 均大于 0.998。

采用空白全血进行低、中、高浓度加标回收实验，全血中的各兽药麻醉剂的加标浓度分别为 40、400、2000 ng/mL，按上述前处理步骤和分析条件进行分析检测，并计算各目标物的回收率，如表 3 所示，5 种物质的回收率为 71.61%~119.1%。

采用空白全血添加标准物质，使其质量浓度为 40、400、2000 ng/mL 的混合标准溶液，重复测定 6 次，连续测定 5 天。日内精密度 (RSD) 为 0.34% ~ 14.81%，日间精密度 (RSD) 为 4.03%~14.87%，结果见表 4。

表 3 5 种兽用麻醉剂的线性范围、相关系数、回收率、检出限与定量下限

化合物	线性范围 (ng/mL)	R	回收率 %			检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
			40 ng/mL	400 ng/mL	2000 ng/mL		
替来他明	20~2000	0.9981	90.42	99.94	119.1	10	20
赛拉唑	20~2000	0.9982	84.10	79.05	80.35	10	20
氯胺酮	20~2000	0.9982	71.61	87.38	84.81	10	20
甲苯噻嗪	40~2000	0.9986	89.07	80.66	78.32	20	40
唑拉西泮	20~2000	0.9983	99.84	95.04	106.33	10	20

表 4 5 种兽用麻醉剂日内精密度和日间精密度

化合物	日内精密度 (n=6)			日间精密度 (n=5)		
	40 ng/mL	400 ng/mL	2000 ng/mL	40 ng/mL	400 ng/mL	2000 ng/mL
替来他明	9.93%	4.83%	12.85%	12.22%	11.92%	14.87%
赛拉唑	10.87%	8.12%	1.35%	5.83%	6.09%	7.12%
氯胺酮	14.81%	11.94%	1.22%	4.06%	4.03%	5.34%
甲苯噻嗪	8.18%	2.85%	0.54%	10.85%	6.26%	5.78%
唑拉西泮	10.27%	0.68%	0.34%	10.67%	4.01%	4.94%

### 3.4 案例应用

2019 年黑龙江某地发生一起命案，嫌疑人从兽药店买来麻醉剂“舒泰”注射进被害人待治疗使用的注射液，导致受害人死亡，当地公安将心血送至我实验室检验。使用此方法测得心血中唑拉西泮含量为 1510 ng/mL，替来他明含量为 124 ng/mL。

## ■ 结论

本研究建立了采用程序升温进行技术（PTV）结合气相色谱 - 三重四极杆质谱（GC-MS/MS）检测血液中 5 种兽用麻醉剂的分析方法，同时采用了盐析辅助液液萃取和 QuEChERS 前处理技术，解决了乙腈作为提取溶剂无法应用于气相色谱的难题。该方法操作简单，无需浓缩溶剂，大幅度缩减样品前处理时间，提升工作效率。该方法稳定性好、准确度高，能够实现实际案例中血液中 5 种兽用麻醉剂的高灵敏度检测。

岛津应用云

