

液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱 鉴定赛拉嗪在人尿中的代谢产物

崔晶晶^{1,2}, 孙英英³, 沈保华², 刘万卉¹, 向平²

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005;

2. 司法鉴定科学研究院, 上海市法医学重点实验室, 上海市司法鉴定专业技术服务平台, 上海 200063;

3. 山东省威海市公安局刑事科学技术研究所, 山东 威海 264200)

摘要: 为研究赛拉嗪在人体内的代谢产物, 采用液-液萃取法和蛋白沉淀法对赛拉嗪阳性尿液进行前处理, 利用液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(LC-Q-Orbitrap MS)技术, 在 HESI-II 正离子模式下分析, 利用 Compound Discoverer 软件对赛拉嗪代谢产物进行质谱解析。结果表明, 赛拉嗪在人体内的主要代谢途径包括羟基化、氧化、N-脱烷基化、S-氧化成砜与葡萄糖醛酸及硫酸的结合等, 在人尿液中共检测到 13 个代谢产物。本工作初步阐明了赛拉嗪在人体内的代谢途径以及主要代谢物。

关键词: 赛拉嗪; 液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(LC-Q-Orbitrap MS); 代谢物; 质谱; 人尿

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2019)03-0280-09

doi: 10.7538/zpxb.2018.0137

Identification of the Metabolites of Xylazine in Human Urine by Liquid Chromatography-Quadrupole/Orbitrap Mass Spectrometry

CUI Jing-jing^{1,2}, SUN Ying-ying³, SHEN Bao-hua², LIU Wan-hui¹, XIANG Ping²

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Shanghai Forensic Service Platform,
Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, PRC, Shanghai 200063, China;

3. Institute of Criminal Science and Technology, Weihai 264200, China)

Abstract: Xylazine is used for sedation, anesthesia, and muscle relaxant as a veterinary drug and is not approved by the FDA for human use. Its chemical structure closely resembles the phenothiazine. But intoxication cases in human were identified due to its anesthetic effect in recent years, especially occurred in DFSA (drug-facilitated sexual assault) cases. So far, limited data concerning xylazine human metabolism have been

收稿日期: 2018-10-30; 修回日期: 2019-01-17

基金项目: 国家自然科学基金(81871531, 81772022); 上海市法医学重点实验室项目(17DZ2273200); 上海市司法鉴定专业技术服务平台项目(16DZ2290900)资助

作者简介: 崔晶晶(1993—), 女(汉族), 山东滨州人, 硕士研究生, 药物分析专业。E-mail: bx0207jing@163.com

通信作者: 刘万卉(1964—), 男(土家族), 湖南张家界人, 教授, 从事药物分析与药物代谢研究。E-mail: wanhui@luye.com

向平(1968—), 女(汉族), 河南南阳人, 研究员, 从事法医毒物分析研究。E-mail: xiangp@ssjfd.cn

reported. Urine is the preferred material for metabolite identification in forensic toxicology analysis because it can extend the detection time limit. In the last few years, high-resolution mass spectrometry (HRMS) such as time-of-flight (TOF) and Orbitrap MS have been widely used to discover and identify drug metabolites due to its high sensitivity, rapidity and mass accuracy. Drug metabolites can be rapidly detected and identified based on high resolution mass and multiple stage mass by high performed chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). To study the metabolites of xylazine in humans, the metabolism of xylazine was investigated in human urine after several sample workup procedures. For liquid-liquid extraction, the supernatant after mixing 1 mL of urine with 2 mL of ethyl acetate was first transferred, and further extraction was carried out by adding 1 drop of 10% NaOH and 2 mL of ethyl acetate. Then the two extracts were mixed, evaporated and reconstituted in 100 μ L of methanol. For protein precipitation, 100 μ L of urine was precipitated by 900 μ L acetonitrile. After shaking and centrifugation, 5 μ L supernatant was taken for analysis. For this study, samples were separated on a Hypersil GOLD PFP column (100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 3 μ m), the mobile phase consisted of solvents A (5 mmol/L ammonium acetate solution with 0.1% formic acid) and B (acetonitrile). The analysis of metabolites were performed by liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (LC-Q-Orbitrap MS) with positive electrospray ionization (HESI- II) interface operation in the full scan-ddMS² ion mode. The metabolites were identified by the comparison of theoretical accurate molecular mass, isotopic pattern abundance and product ion characteristics obtained through Compound Discover software. By analyzing the fragment ion given in the MS² spectrum, 7 phase I metabolites were detected in liquid-liquid extraction, including hydroxylation, oxidation and S-oxidation, 8 metabolites were detected in protein precipitation, including 4 phase II metabolites, excreted as glucuronides and sulfates. As a result, a total of 13 phase I and II metabolites were detected in human urine. It is preliminarily clarified the metabolic pathways and major metabolites of xylazine in humans. This paper shows great value for clinical and forensic toxicology research.

Key words: xylazine; liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (LC-Q-Orbitrap MS); metabolites; mass spectrometry; human urine

赛拉嗪(xylazine, C₁₂H₁₆N₂S)是一种 α -2-肾上腺素受体激动剂,它通过刺激中枢神经 α -2-肾上腺素受体,减少中枢神经系统中去甲肾上腺素和多巴胺的释放,导致镇静、肌肉松弛和对疼痛刺激的感知减少^[1],常作为动物的镇静剂、止痛药和肌肉松弛剂,又因其能产生麻醉效果,常被滥用导致中毒事故或犯罪的发生^[2]。

药物辅助犯罪(drug-facilitated crime, DFC)是指在中枢神经抑制剂、兴奋剂和致幻剂等精神活性物质影响下,实施的麻醉抢劫、性犯

罪等不法行为。随着网络传播和网购的盛行,药物辅助性犯罪(drug-facilitated sexual assault, DFSA)案件的数量及涉案药物种类呈上升趋势^[7-8]。DFSA 案件因所涉药物摄入量小,代谢快等是法医毒物鉴定的难点,而尿液中代谢产物检测时限长的优势在 DFSA 案件中发挥了重要作用^[7]。赛拉嗪是近两年常出现于DFSA案件中的药物之一,但其在人体内的代谢途径以及主要代谢物的研究资料很少。

目前,代谢物确证研究多采用液相色谱-质谱法^[9-10]、气相色谱-质谱法^[11-12]、高效液相色谱

谱-高分辨质谱法^[13-14]等。液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(LC-Q-Orbitrap MS)是基于Orbitrap 静电场轨道阱技术测定原理的液质联用技术,具有高分辨率、高精密度、高灵敏度和动态范围宽等特点,可同时获得高质量的多级质谱图(MS^n),保证分析结果的可靠性和准确性^[15]。Compound Discoverer 软件包含丰富的工具集,可以进行预期化合物搜索及使用碎片离子搜索阐明(FIsh)结构,将多个样品数据信息合并到一份报告中,可对研究药物的体内代谢物提供技术支持。

本研究拟采用 LC-Q-Orbitrap MS 法及 Compound Discoverer 软件对赛拉嗪阳性尿液进行筛查,并对其代谢物进行结构解析,探索赛拉嗪在人体内的代谢方式及途径。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

UltiMate 3000 UHPLC 液相系统,Thermo-Scientific™ Q-Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪(LC-Q-Orbitrap MS):美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品,配有电喷雾离子源(HESI-Ⅱ)及 Xcalibur™ 3.1 工作站;TDZ4-WS 离心机:上海卢湘仪离心机有限公司产品;XW-80A 涡旋混合器:上海医大仪器有限公司产品;Milli-Q 超纯水机:美国 Millipore 公司产品;Minspin 高速离心机:德国 Eppendorf 公司产品;超声波清洗器:深圳市洁盟清洗设备有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

甲醇、乙腈:色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司产品;乙酸乙酯:分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司产品;甲酸、乙酸铵:瑞士 Fluka 公司产品;实验用水:超纯水,经 Mili-Q 系统制备;其他试剂均为分析纯。

阳性尿液来自一例 DFSA 案件,受害人尿液经 GC/MS 分析检出赛拉嗪成分。

1.3 样品前处理

1.3.1 液-液萃取法 取 1.0 mL 待测尿液于 5 mL 具塞试管中,加入 2.0 mL 乙酸乙酯提取溶剂,涡旋振荡 2 min 后,以离心半径 12 cm,3 000 r/min 离心 3 min。转移有机层,取上层有机溶液,加入一滴 NaOH(10%)溶液,重复上述步骤。合并上层有机溶液,于 40 °C 空气流

下吹干,向残留物中加入 100 μ L 甲醇复溶后,待进样分析。

1.3.2 蛋白沉淀法 取 100 μ L 待测尿样于 1.5 mL 离心管中,加入 900 μ L 乙腈,涡旋振荡 2 min 后离心 3 min,上清液转移至进样衬管,取 5 μ L 进样分析。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 Thermo Scientific Hyper-sil GOLD PFP 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 3 μ m),流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~0.5 min (98%A),0.5~10 min (98%~2%A),10~15 min (2%A),15~20 min (98%A);进样量 5.0 μ L;流速 400 μ L/min;柱温 26.7 °C。

1.4.2 质谱条件 电喷雾电离正离子模式(ESI^+);喷雾电压 3.5 kV;壳气、辅助加热气、碰撞气:均使用高纯氮气;探头加热器温度 300 °C;毛细管温度 325 °C;鞘气流速 35 arb,辅助气流速 10 arb。采用一级全扫描和自动触发二级(full scan-dd MS^2)的数据采集模式。

一级扫描分辨率 70 000,二级扫描分辨率 17 500,全质量扫描范围 m/z 70~1 050,可视宽度为 0.7,碰撞能量为 40、60、80 eV。进样前用校正液对质谱的质量轴进行校正,质量数偏差小于 5×10^{-6} 。

利用 Xcalibur™ 3.1 工作站及 Compound Discoverer™ 3.0 软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 液-液萃取法

阳性尿液经液-液萃取法前处理后,由 LC-Q-Orbitrap MS 分析,其全扫描总离子流图(TIC)示于图 1。赛拉嗪及各代谢产物的高分辨质谱数据列于表 1。赛拉嗪的保留时间为 3.96 min,准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 221.110 58,其 MS^2 谱图中的碎片离子为 m/z 164.052 76、147.091 69、90.037 21。 m/z 90.037 21 可作为噻嗪环的特征碎片离子。对于大多数代谢物,因其分子质量太小而不能进一步碎裂,得不到 MS^3 谱图,所以主要利用代谢物的 MS 和 MS^2 谱图进行结构解析。赛拉嗪及各代谢产物(M1~M5)的 MS^2 谱图示于图 2。通过 Compound Discoverer 软件分析得到 5 个

可疑分子离子峰。准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 237.105 48,保留时间为 3.37 min,比原准分子离子大 16 u,可能是增加了 1 个 O 为代谢产物 M1。M1 的 $[M+H]^+$ 离子在 MS² 谱图中对应的主要碎片离子为 m/z 163.086 55、180.047 76,比母离子的 MS² 碎片离子(m/z 147.091 69、164.052 76)大 16 u,而 m/z 90.037 21 没有发生改变,即噻嗪环没有开裂,进一步说明羟基化反应发生在 2,6-二甲基苯胺环上,但难以确认羟基化的具体位点,故推测存在羟基化的两个同分异构体(M1-1、M1-2)。

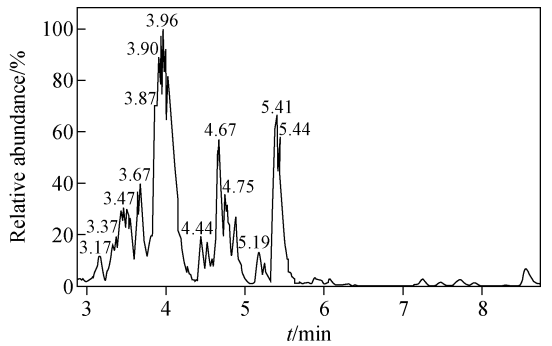


图 1 样品经液-液萃取处理后的总离子流色谱图
Fig.1 Total ion current chromatogram of the sample prepared by liquid-liquid extraction

表 1 赛拉嗪在人尿液中代谢产物的 LC-Q-Orbitrap MS 数据(液-液萃取方法)
Table 1 LC-Q-Orbitrap MS data of xylazine and its metabolites in human urine(liquid-liquid extraction)

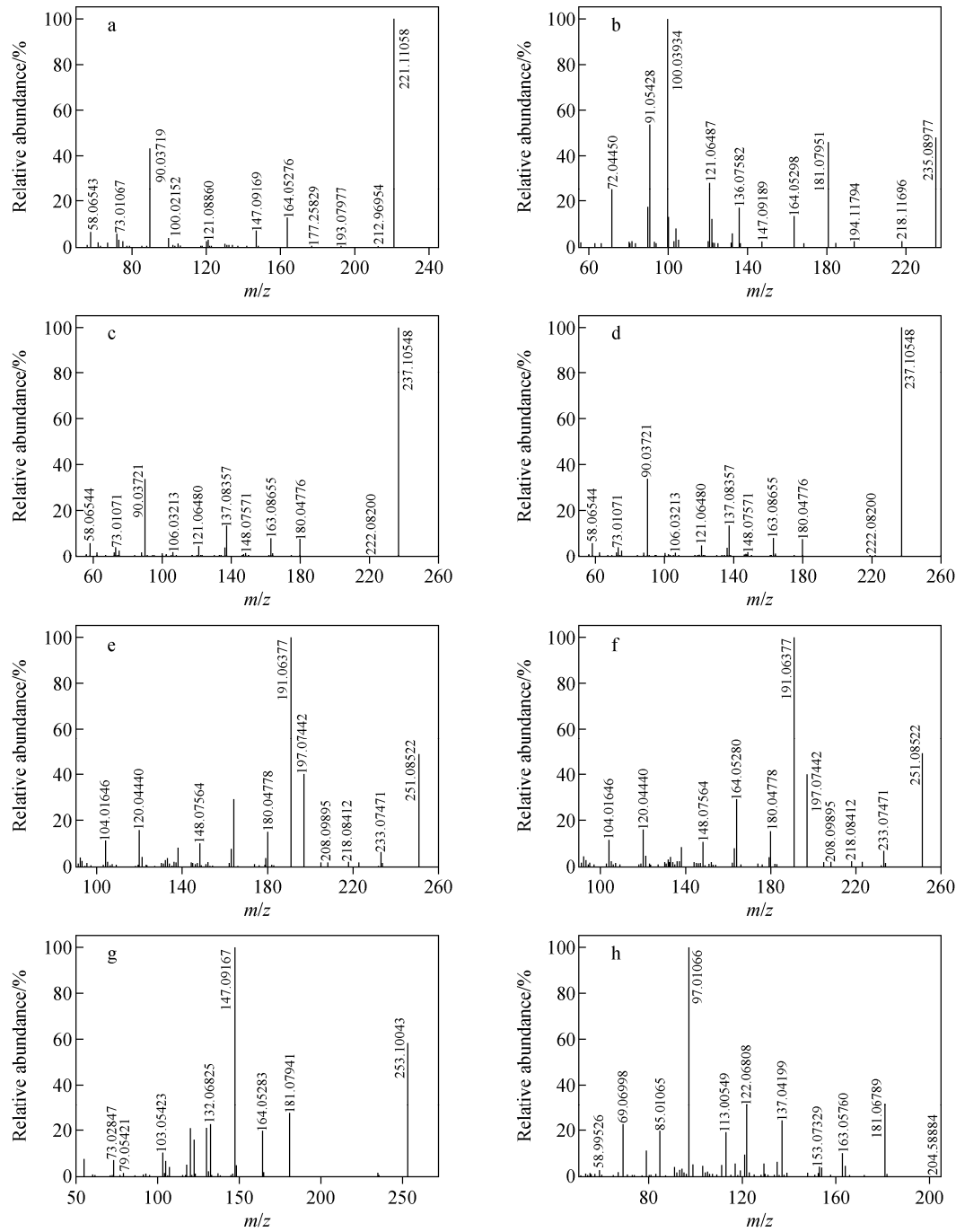
化合物 Compounds	化学式 Chemical formulas	保留时间 t_R /min	$[M+H]^+$ 理论值	$[M+H]^+$ 实测值	偏差 Error/ 10^{-6}
			Theoretical value(m/z)	Measured value(m/z)	
赛拉嗪	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S	3.96	221.11070	221.11058	-0.54
M1	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ SO	3.37	237.10561	237.10548	-0.55
M2	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ SO	3.46	235.08996	235.08977	-0.81
M3	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ SO ₂	4.52	251.08487	251.08472	-0.60
M4	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ SO ₂	3.42	253.10052	253.10043	-0.36
M5	C ₉ H ₁₂ N ₂ S	3.56	181.07939	181.07951	0.66

准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 235.089 77,保留时间为 3.46 min,比原准分子离子大 14 u (+16-2),推测为赛拉嗪的氧化代谢产物 M2。M2 的 $[M+H]^+$ 离子在 MS² 谱图中对应的主要碎片离子为 m/z 181.079 51、164.052 98、136.075 82,未观察到在 m/z 90.037 21 处噻嗪环的特征碎片离子,表明噻嗪环发生了氧化开环。

准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 251.084 72,保留时间为 4.52 min,比原准分子离子大 30 u (16+16-2),推测为赛拉嗪的氧化羟基化代谢产物 M3。M3 的 $[M+H]^+$ 离子在 MS² 谱图中的主要碎片离子 m/z 104.016 44 比对应原体的碎片离子 m/z 90.037 21 大了 14 u (+16-2),表明噻嗪环发生了氧化反应。MS² 谱图中 m/z 197.074 25、148.075 64 比 M2 的碎片离子 m/z 181.079 51、132.080 7 大了 16 u,表明在 2,6-二甲基苯胺环处发生了羟基化反应。由于难以确认发生羟基化的具体位点,故推测存在氧代羟基化的两个同分异构体(M3-1、M3-2)。

准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 253.100 43,保留时间为 3.42 min,比原准分子离子大 32 u (16+16),表明存在发生二羟基化或 S-氧化成砷反应的代谢产物 M4。MS² 谱图存在 m/z 147.091 67、164.052 83 处的丰富碎片离子及 2,6-二甲基苯胺环的特征碎片离子 m/z 181.079 41,排除 2,6-二甲基苯胺环的羟基化反应,推断该反应发生在噻嗪环上。因未发生水的消除反应,排除了噻嗪环的二羟基化反应,因此推测 M4 为赛拉嗪 S-氧化成砷的代谢产物。

准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 181.079 91,保留时间为 3.56 min,比原准分子离子小 40 u (-C₃H₄),推测为赛拉嗪经 N,S-脱烷基化生成 N-(2,6-二甲基苯基)硫脲,为代谢产物 M5。在 MS² 谱图中,可以观察到 m/z 122.096 46 处的丰富碎片离子,应是赛拉嗪 N-脱烷基化生成的代谢产物 2,6-二甲基苯胺, m/z 181.079 91可作为 2,6-二甲基苯胺的前体离子存在,因其分子质量较小,未能直接检测出来。



注：a. 赛拉嗪；b. M2；c. M1-1；d. M1-2；e. M3-1；f. M3-2；g. M4；h. M5

图 2 赛拉嗪及各代谢产物 MS² 谱图(液液萃取法)

Fig. 2 MS² spectra of xylazine and its metabolites by liquid-liquid extraction

2.2 蛋白沉淀法

由蛋白沉淀法前处理后的阳性尿液经 LC-Q-Orbitrap MS 进样后,出现多个色谱峰,其 TIC 色谱图示于图 3。赛拉嗪的保留时间是 4.10 min,准分子离子峰 m/z 221.110 60,其 MS² 谱图中主要特征碎片离子为 m/z 164.052 76、

147.091 67、90.037 19,示于图 4。通过 Compound Discoverer 软件分析,得到 7 个分子离子峰。赛拉嗪及各代谢产物对应的高分辨质谱数据列于表 2,其中准分子离子 m/z 237.105 45、253.100 27 的主要碎片离子与液-液萃取法得到的代谢产物 M1、M4 一致,推断其结构相同。准分子离

子峰 m/z 165.102 28,保留时间为 3.07 min,与赛拉嗉相差 56 u(+O—C₃H₄S),经 Compound Discoverer 软件分析为代谢产物 M6,主要碎片离子为 m/z 148.075 82、122.096 44,推测其是由 N-(2,6-二甲基苯基)硫脲分解得到的尿素结构。

准分子离子峰 m/z 413.135 74,保留时间为 3.12 min,比原体增加了 192 u,为代谢产物 M7,与 M1 的准分子离子相比相差 176 u(+C₆H₈O₇),推测 M7 为 M1 与葡萄糖醛酸共轭得到的Ⅱ相代谢产物。

准分子离子峰 m/z 317.061 04,保留时间为 3.64 min,比赛拉嗉原体增加了 96 u(+SO₃),为代谢产物 M8,其主要碎片离子为 m/z 90.037 20,表明噻嗪环没有改变, m/z 237.105 47

与 M1 的准分子离子峰相同,故推断 M8(M8-1/M8-2)是由 M1(M1-1/M1-2)与硫酸共轭得到的Ⅱ相代谢产物。

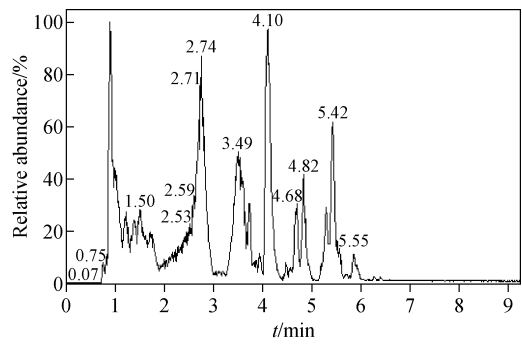
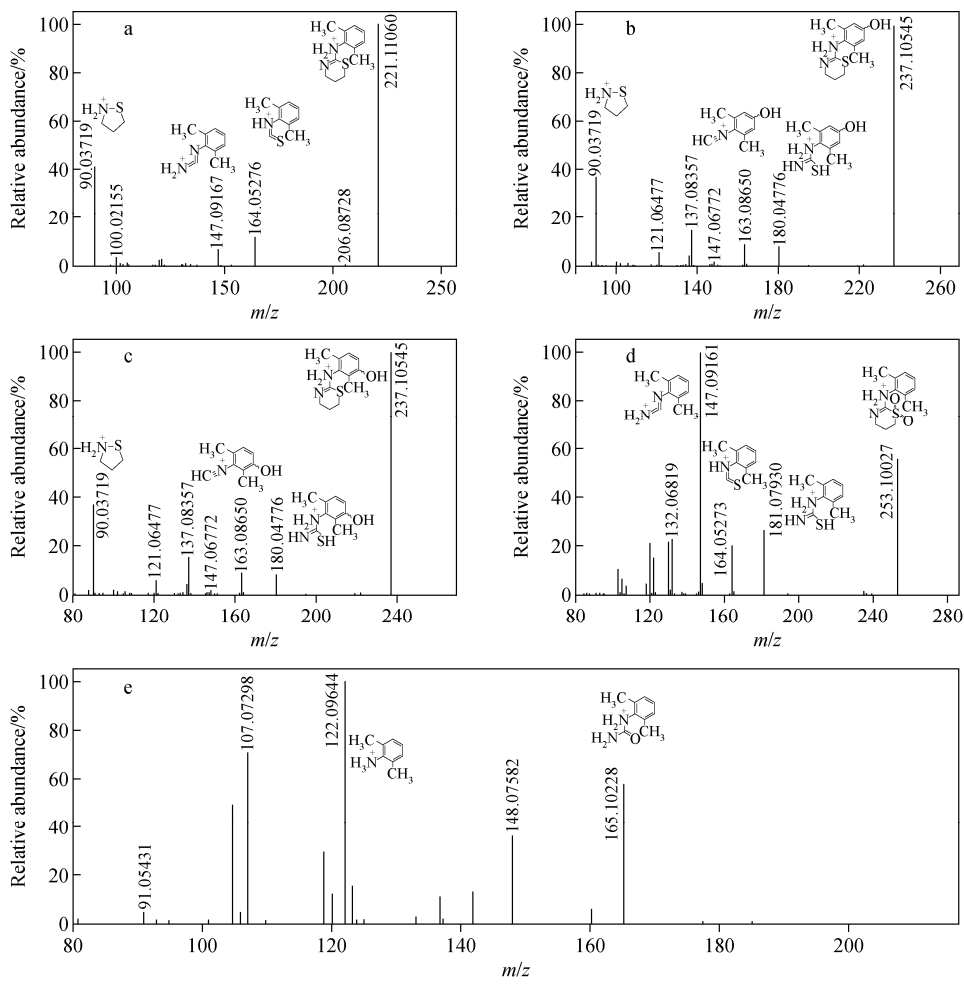


图 3 经蛋白沉淀后的总离子流色谱图
Fig. 3 Total ion current chromatogram of the sample prepared by protein precipitation



a. 赛拉嗉;b. M1-1;c. M1-2;d. M4;e. M6

图 4 赛拉嗉及代谢产物经蛋白沉淀后得到的 MS² 谱图
Fig. 4 MS² spectra of xylazine and its metabolites by protein precipitation

表 2 赛拉嗪在人尿液中代谢产物的 LC-Q-Orbitrap MS 数据(蛋白沉淀法)
Table 2 LC-Q-Orbitrap MS data of xylazine and its metabolites
in humans urine (protein precipitation)

化合物	化学式	保留时间	[M+H] ⁺ 理论值	[M+H] ⁺ 实测值	偏差
Compounds	Chemical formulas	t _R /min	Theoretical value	Measured value	Error/10 ⁻⁶
			(m/z)	(m/z)	
赛拉嗪	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S	4.10	221.11070	221.11060	-0.47
M1	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ SO	3.41	237.10561	237.10547	-0.59
M4	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ SO ₂	3.49	253.10052	253.10027	-0.99
M6	C ₉ H ₁₂ N ₂ O	3.07	165.10224	165.10228	0.24
M7	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₇ S	3.12	413.13770	413.13574	-4.74
M8	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄ S ₂	3.64	317.06242	317.06104	-4.35
M9	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆ S	3.92	397.14278	397.14108	-4.28

准分子离子峰 m/z 397.141 08,保留时间为 3.92 min,比赛拉嗪原体增加了 176 u($+C_6H_8O_6$),为代谢产物 M9,推测为赛拉嗪发生 *N*-葡糖醛酸结合反应得到的Ⅱ相代谢产物。

2.3 讨论

本实验利用液-液萃取法鉴定到赛拉嗪的 7 个代谢产物,M1-1、M1-2 为羟基化产物,M2 为氧化产物,M3-1、M3-2 为氧代羟基化产物,M4 为 *S*-氧化产物,M5 为 *N*-(2,6-二甲基苯基)硫脲。经 M5 的 MS² 谱图推导所得的代谢产物 2,6-二甲基苯胺与相关文献报道一致^[9-10]。利用蛋白沉淀法鉴定到赛拉嗪的 8 个代谢产物,M1-1、M1-2 为羟基化产物,M4、M6 为 *S*-氧化产物,M7、M8-1、M8-2、M9 均为Ⅱ相代谢产物。蛋白沉淀的前处理方法能够得到更多强极性的Ⅱ相代谢产物,而液-液萃取法更容易得到水溶性强的Ⅰ相代谢产物。两种方法相互补充,能够得到更充分的数据阐明药物的体内代谢途径。

根据鉴定所得的代谢产物结构可以推断赛拉嗪及其代谢产物之间的生物转化途径,示于图 5。转化途径与大鼠尿液^[13]、大鼠肝微粒体^[14]、马尿^[12]等的研究结果相似,主要的代谢物包括羟基化产物、氧化产物及 *S*-氧化产物

等。Lavoie 等^[14]在大鼠肝微粒体中检测到的 *N*-羟基化产物在人尿液中没有检测到,可能由物种不同或者浓度较低造成的。Meyer 等^[13]用标准尿液筛查方法(standard urine screening protocol)鉴定一例高加索人阳性案例的结果与本实验结果一致,可以认为不同人群赛拉嗪的体内代谢途径一致。经研究,建议在生物检材赛拉嗪分析时增加主要代谢物 M1 为目标物,以增强可靠性,延长检测时限,提供更丰富的药动学数据。含有硫脲结构的药物具有一定的毒性,赛拉嗪的代谢产物 *N*-(2,6-二甲基苯基)硫脲的毒理学研究对于中毒后的监测具有重要的临床意义。

3 结论

本研究利用液-液萃取法和蛋白沉淀法对赛拉嗪阳性尿液进行前处理,通过 LC-Q-Orbitrap MS 进行解析,共鉴定到 13 种代谢产物。赛拉嗪在人体内发生羟基化、氧化、*N*-脱烷基化、*S*-氧化等Ⅰ相代谢反应,羟基化代谢产物可与葡萄糖醛酸及硫酸结合发生Ⅱ相代谢反应。本研究初步阐明了赛拉嗪在人体内的代谢途径和主要代谢产物。

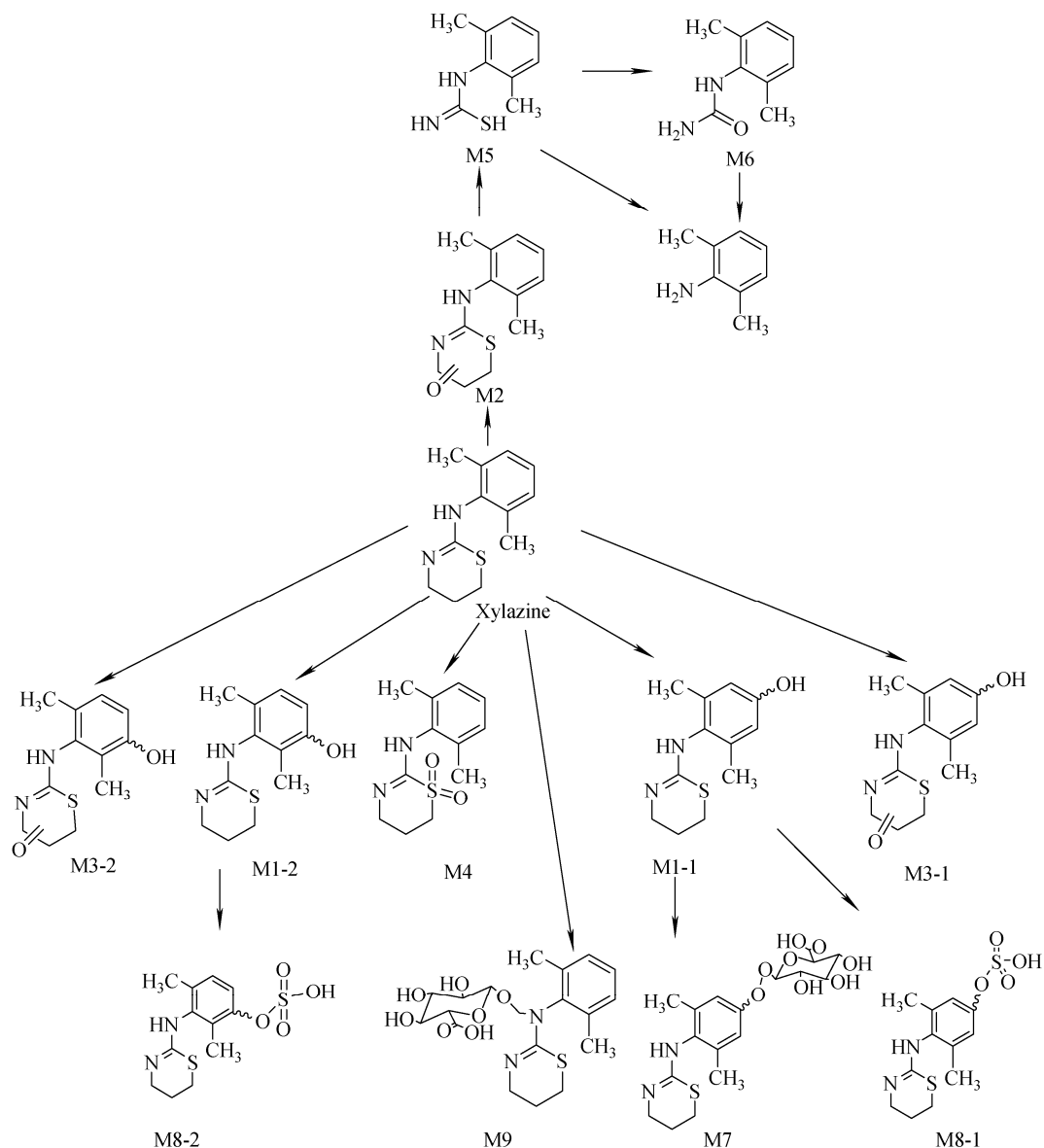


图 5 赛拉嗪在人体内的代谢途径

Fig. 5 Proposed metabolic pathways of xylazine in humans

参考文献:

[1] HOFFMANN U, MEISTER C M, GOLLE K, ZSCHIESCHE M. Severe intoxication with the veterinary tranquilizer xylazine in humans[J]. Journal of Analytical Toxicology, 2001, 25(4): 245-249.

[2] TORRUELLA R A. Xylazine (veterinary sedative) use in Puerto Rico[J]. Substance Abuse Treatment Prevention & Policy, 2011, 6(1): 7.

[3] RUIZ-COLÓN K, CHAVEZ-ARIAS C, DÍAZ-ALCALÁ J E, MARTÍNEZ M A. Xylazine intoxication in humans and its importance as an

emerging adulterant in abused drugs: a comprehensive review of the literature[J]. Forensic Science International, 2014, 240(240C): 1-8.

[4] 侯磊,张欣远. 兽用麻醉药鹿眠灵中毒案例分析[J]. 刑事技术, 2013, 38(5): 56-57.

HOU Lei, ZHANG Xinyuan. Case analysis of veterinary anesthetic xylazine poisoning[J]. Forensic Sci Technol, 2013, 38(5): 56-57 (in Chinese).

[5] 孙立敏,王松才,朱焕慧. 兽类麻醉药赛拉嗪用于麻醉抢劫案件 1 例[J]. 刑事技术, 2010, (4): 63-64.

SUN Limin, WANG Songcai, ZHU Huanhui. A

- case of veterinary anesthetic xylazine for anesthesia robbery[J]. *Forensic Sci Technol*, 2010, (4): 63-64(in Chinese).
- [6] 夏书香, 焦安芬. 赛拉嗪中毒 7 例[J]. *临床荟萃*, 2006, 21(2): 14.
XIA Shuxiang, JIAO Anfen. 7 cases of xylazine poisoning[J]. *Clinical Focus*, 2006, 21(2): 14 (in Chinese).
- [7] 沈敏, 向平. 滥用物质分析与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [8] 向平, 沈保华, 严慧, 施妍, 刘伟, 沈敏, 吴何坚, 卓先义. 药物辅助性犯罪案件中新型苯二氮卓类策划药 2-氯地西洋的鉴定[J]. *法医学杂志*, 2018, 34(3): 248-252.
XIANG Ping, SHEN Baohua, YAN Hui, SHI Yan, LIU Wei, SHEN Min, WU Hejian, ZHUO Xianyi. Identification of new designer benzodiazepine diclazepam in drug facilitated sexual assault[J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2018, 34(3): 248-252(in Chinese).
- [9] 高雪, 盖薇, 顾朝康. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法测定血液与尿液中赛拉嗪及代谢产物 2,6-二甲基苯胺[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(6): 646-651.
GAO Xue, GAI Wei, GU Chaokang. Simultaneous determination of xylazine and 2,6-xylidine in blood and urine by auto solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2015, 34(6): 646-651(in Chinese).
- [10] 刘文文, 李婧, 许江萍, 郑经, 王俊伟. SPE-HPLC/MS/MS 检验体液中赛拉嗪及 DMA[J]. *中国法医学杂志*, 2017, 32(2): 182-185.
LIU Wenwen, LI Jing, XU Jiangping, ZHENG Jing, WANG Junwei. Detection of xylazine and 2,6-xylazine in blood and urine by SPE-HPLC/MS/MS[J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2017, 32(2): 182-185(in Chinese).
- [11] 王瑞花, 栾玉静, 刘瑞, 董颖, 杜鸿雁, 常靖. GC/MS 法测定全血中的甲苯噻嗪[J]. *刑事技术*, 2017, 42(5): 389-391.
WANG Ruihua, LUAN Yujing, LIU Rui, DONG Ying, DU Hongyan, CHANG Jing. Determination of xylazine in human whole blood by GC/MS[J]. *Forensic Science & Technology*, 2017, 42(5): 389-391(in Chinese).
- [12] SPYRIDAKI M H, LYRIS E, GEORGOU-LAKIS I, KOURETAS D, KONSTANTINIDOU M, GEORGAKOPOULOS C G. Determination of xylazine and its metabolites by GC-MS in equine urine for doping analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2004, 35(1): 107-116.
- [13] MEYER G M J, MAURER H H. Qualitative metabolism assessment and toxicological detection of xylazine, a veterinary tranquilizer and drug of abuse, in rat and human urine using GC-MS, LC-MSⁿ, and LC-HR-MSⁿ [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(30): 9 779-9 789.
- [14] LAVOIE D S, PAILLEUX F, VACHON P, BEAUDRY F. Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry[J]. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27(7): 882-888.
- [15] 吴泽明, 叶芳挺, 王勇为. Orbitrap 超高分辨质谱家族新成员 Q-Exactive 助力代谢组学研究[C]. 全国生物医药色谱及相关技术学术交流会, 2012.