超高效液相色谱-串联质谱法检测猪肉和猪肾中残留的 10 种镇静剂类药物

孙 雷* , 张 骊 , 徐 倩 , 王树槐 , 汪 霞

(中国兽医药品监察所 , 北京 100081)

摘要 :建立了猪肉和猪肾中安眠酮、氯丙嗪、异丙嗪、地西洋、硝西洋、奥沙西洋、替马西洋、咪达唑仑、三唑仑和唑吡坦 10 种镇静剂类药物残留检测的超高效液相色谱-串联质谱分析方法。样品经酶解后 ,调节 pH 值呈碱性 ,分别用乙酸乙酯和叔丁基甲醚进行萃取 ,高速冷冻离心去除脂肪等杂质。提取液经 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱分离 ,以 0.1% 甲酸乙腈溶液和 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。电喷雾正离子(ESI⁺)模式电离 ,多反应监测(MRM)模式检测 ,基质匹配标准溶液法进行定量。结果表明 :10 种镇静剂在 2 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系 ,相关系数(r)均大于 0.998 ; 10 种镇静剂的检出限($S/N > 3$)为 0.5 $\mu\text{g/kg}$,定量限($S/N > 10$)为 1 $\mu\text{g/kg}$ 。3 个添加水平的回收率为 64.5% ~ 111.4% ,批内、批间相对标准偏差(RSD)均小于 15%。该方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等特点。

关键词 :超高效液相色谱-串联质谱 ;镇静剂 ;残留 ;猪肉 ;猪肾

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)01-0038-05

Determination of ten sedative residues in pork and kidney by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SUN Lei* , ZHANG Li , XU Qian , WANG Shuhuai , WANG Xia

(China Institute of Veterinary Drug Control , Beijing 100081 , China)

Abstract : An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of methaqualone , chlorpromazine , promethazine , diazepam , nitrazepam , oxazepam , temazepam , midazolam , triazolam and zolpidem residues in pork and kidney. After enzymolysis , the samples were extracted by ethyl acetate and *tert*-butyl methyl ether , separately. The separation of the ten sedatives was performed on a Waters Acquity UPLC system with a BEH C₁₈ column. The mobile phases were acetonitrile (containing 0.1% formic acid) and water (containing 0.1% formic acid) at a flow rate of 0.3 mL/min. The electrospray was operated in the positive ionization mode and the ten sedatives were identified by multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method of matrix-matched standard solution was adopted as the quantitative method. The calibration curves showed good linearity within the concentrations of 2 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficients $r > 0.998$. The limits of detection of the ten sedatives were 0.5 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantification was 1 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries of the ten sedatives were 64.5% ~ 111.4% at the spiked levels of 2 , 5 and 10 $\mu\text{g/kg}$. The relative standard deviations of intra- and inter-day coefficients of variation were both less than 15%. This method is simple , sensitive and accurate in the determination of sedative residues.

Key words : ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) ; sedatives ; residues ; pork ; kidney

* 通讯联系人 : 孙 雷 , 硕士 , 助理研究员. Tel : (010) 62103654 , E-mail : sunlei@ivdc.gov.cn.

基金项目 : 国家科技支撑计划课题项目(No. 2006BAD31B09).

收稿日期 : 2009-06-01

镇静剂(sedative)是指能使中枢神经系统产生轻度抑制,减弱机能活动,从而起到消除躁动不安、恢复安静的一类药物。临床上常见的有吩噻嗪类的氯丙嗪、异丙嗪,苯二氮草类的地西泮、硝西泮、奥沙西泮、替马西泮、咪达唑仑、艾司唑仑、三唑仑,唑啉酮类的安眠酮和咪唑并吡啶类的唑吡坦等药物。近年来,个别畜牧业饲养者因经济利益的驱使,擅自在畜禽饲养过程中添加此类药物以起到镇静催眠、增重催肥、缩短出栏时间的作用;另外,在动物运输过程中,为减少动物死亡和体重下降,防止肉品质降低,也常使用此类药物以减少应激带来的损失。非法使用此类药物会使其原形和代谢产物不可避免地残留于动物源食品中,人们食用了这些食品后会对人体中枢神经系统等造成不良影响,因此许多国家都将此类药物列为禁用药物。我国农业部176号和235号公告规定严禁在动物饲料和饮用水中使用此类药物,在动物源食品中不得检出此类药物。

目前,国内外报道的镇静剂类药物残留检测的仪器方法主要有液相色谱法(LC)^[1-2]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[3-6]和液相色谱-串联质谱联用法(LC-MS/MS)^[7-14]等。其中LC法灵敏度较低,无法满足对禁用药物检测的要求。GC-MS有较好的灵敏度,但部分药物的前处理需衍生化,费时较长。LC-MS/MS作为目前报道较多的方法,可以进行多残留定性定量检测。已有文献报道主要是对血液和尿液等生物样本的检测,动物源性食品中镇静剂类药物多残留检测方法的报道较少。本文建立了猪肉和猪肾样品中安眠酮等10种镇静剂快速简便、专属性强、灵敏度高的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分离检测方法,为其他动物源食品中镇静剂的检测提供了有利工具。

1 实验部分

1.1 仪器

ACQUITY UPLC-Quattro premier XETM 质谱联用仪(Waters公司);AE260 电子天平(Mettler Toledo公司);DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备公司);Delta 320 pH计(Mettler Toledo公司);Biofuge Strators 高速冷冻离心机(Heraeus公司);Organomation Associates 氮吹仪(JNC公司);SIR4 漩涡混合器(IKA公司)。

1.2 药品与试剂

1 g/L 的安眠酮、氯丙嗪、异丙嗪、地西泮、硝西泮、奥沙西泮、替马西泮、咪达唑仑、三唑仑和唑吡坦标准溶液(Cerilliant公司);乙腈、甲酸为色谱纯

(Fisher公司); β -盐酸葡萄糖醛苷酶-芳基硫酸酯酶(Merck公司);乙酸铵、乙酸、氢氧化钠、乙酸乙酯、叔丁基甲醚均为分析纯;所用水为超纯水。

1.3 混合标准工作溶液和校正溶液配制

准确移取1 g/L的各镇静剂标准溶液适量,用50% 甲醇水溶液稀释配制制成适当浓度的混合标准工作溶液。向经提取净化处理后空白组织的残余物中加入适当浓度的混合标准工作溶液,充分溶解后即

1.4 样品前处理

称取2 g(精确至0.01 g)匀质样品于50 mL离心管内,加入0.2 mol/L 乙酸铵溶液(pH 5.2)6 mL,再加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶-芳基硫酸酯酶40 μ L,涡旋混匀,于37 $^{\circ}$ C下避光水浴振荡16 h。酶解后涡旋混匀,用10 mol/L 氢氧化钠溶液调节pH值至 9.7 ± 0.02 ,再加入乙酸乙酯10 mL,涡旋混匀并振荡5 min,于5 000 r/min速率下离心5 min,取上层有机相至另一50 mL离心管内。再在下层水相中加入叔丁基甲醚10 mL,涡旋混匀并振荡5 min,于5 000 r/min速率下离心5 min,移取上层有机相。合并有机相,并于40 $^{\circ}$ C下用氮气吹干。残渣中加入4 mL 1% 甲酸乙腈溶液使其充分溶解,然后于-4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min速率下离心10 min,取上层有机相2 mL,于40 $^{\circ}$ C下用氮气吹干。残余物用0.5 mL 50% 甲醇水溶液充分溶解,于-4 $^{\circ}$ C下以15 000 r/min高速离心10 min后,取上清液适量,经过滤膜过滤后,滤液供UPLC-MS/MS测定。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)。流动相:A相为0.1% 甲酸乙腈溶液,B相为0.1% 甲酸水溶液;梯度洗脱:0-5 min,20% A线性变化至50% A;5 min时恢复至20% A,保持1 min;流速为0.3 mL/min。柱温为30 $^{\circ}$ C。

1.5.2 质谱条件

电喷雾电离(ESI)源,正离子模式;毛细管电压为3.1 kV;萃取电压为5.0 V;预六极杆电压为0.5 V;源温度为110 $^{\circ}$ C;脱溶剂温度为350 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流速为650 L/h;锥孔反吹气流速为50 L/h。

1.5.3 定性定量

定性需满足4个条件:①空白实验不出现与阳性对照相同的离子峰;②特征离子色谱峰信噪比(S/N)都在3以上;③试样中目标物的色谱峰保留时间应与校正溶液的一致,容许偏差为 $\pm 2.5\%$;④

检测到的离子丰度比应与校正溶液的一致,容许偏差应符合欧盟 2002/657/EC 中的规定。定量时以响应强度最强的离子对作为定量离子对,通过基质匹配标准溶液法进行定量。

2 结果与讨论

2.1 样品处理方法的选择

2.1.1 酶解条件的选择

地西泮等苯二氮䓬类药物因其结构中有氨基或羟基,在动物体内代谢过程中主要以与葡萄糖醛酸或芳基硫酸结合成苷或酯的形式存在,因此提取前需对样品进行酶解,使这些结合态的待测物解离释放出来。有研究表明,即使不能成苷的药物如三唑仑等,在酶解后也能获得较高的回收率^[6]。关于酶解的方法、酶的品种及用量、酶解时间等均有报道^[7]。本文参考相关文献,采用了 2 g 组织中添加 40 μL β-盐酸葡萄糖醛苷酶-芳基硫酸酯酶,在 pH 5.2 的乙酸铵缓冲液中于 37 ℃ 下避光酶解 16 h 的方法。另外,进一步试验表明,在 55 ℃ 条件下避光酶解 2 h 也可达到同样的效果。

2.1.2 样品提取与净化条件的选择

苯二氮䓬类药物具有类似的环状结构,且大多数呈中性或弱碱性,因此在弱的酸性或碱性条件下即可被有机溶剂提取出来。吩噻嗪类药物属于脂溶性药物,在碱性条件下易溶于有机溶剂。已报道的用于提取的有机溶剂有乙酸乙酯、叔丁基甲醚、乙腈、乙醚、异丙醇、叔丁醇、正己烷、氯仿等^[5-14]。本方法为兼顾 10 种不同性质的镇静剂类药物,比较了多种有机溶剂的提取效果后,发现在酶解后用氢氧化钠溶液将体系的 pH 值调至 9.7 ± 0.2,然后分别用乙酸乙酯和叔丁基甲醚进行提取,采取低温脱脂、高速离心等办法进行净化,每种药物均获得了满意的回收率,且能很好地去除杂质干扰。

2.2 分析方法的评价

2.2.1 多反应监测离子的选择

按照欧盟对违禁使用兽药残留确证检测的要求,要确证镇静剂类药物至少需要 4 个识别点(IP)。本实验使用 LC-MS/MS 方法选择每种药物的母离子以及对应的两个响应较强的子离子,通过多反应监测(MRM)方式进行采集,这样一个母离子获得 1 个 IP 点,对应两个子离子各获得 1.5 个 IP 点,刚好满足 4 个 IP 点的要求。所测定的 10 种镇静剂的定性和定量离子对、锥孔电压以及碰撞能量等参数见表 1。

表 1 测定 10 种镇静剂的定性和定量离子对、锥孔电压以及碰撞能量

Table 1 Confirmation and quantitative ions , cone voltages and collision energies for the determinations of the ten sedatives

Drug	Confirmation ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage/V	Collision energy/eV
Zolpidem	308.3 > 235.1 *	50	35
	308.3 > 263.1		25
Midazolam	326.1 > 249.1	45	35
	326.1 > 291.2 *		25
Nitrazepam	282.1 > 179.9	40	35
	282.1 > 236.2 *		25
Promethazine	285.2 > 85.8 *	20	15
	285.2 > 198.0		30
Oxazepam	287.1 > 241.0 *	30	20
	287.1 > 269.1		15
Methaqualone	251.3 > 90.8	45	38
	251.3 > 131.8 *		25
Triazolam	343.1 > 308.2 *	50	25
	343.1 > 315.1		25
Temazepam	301.3 > 255.2 *	30	22
	301.3 > 283.3		15
Chloropromazine	319.3 > 57.8	28	30
	319.3 > 85.8 *		20
Diazepam	285.2 > 153.9 *	35	25
	285.2 > 193.0		30

* quantitative ion.

2.2.2 线性关系

对 6 份空白猪肉样品进行酶解、提取净化并吹干,向其残余物中依次加入用 50% 甲醇水溶液配制成的 2, 5, 10, 20, 50, 100 μg/L 的系列标准溶液各 0.5 mL,充分溶解后制得系列基质匹配标准溶液,过滤后进行 UPLC-MS/MS 分析。以测得的各药物定量离子色谱峰面积 *y* 为纵坐标,质量浓度 *x* (μg/L) 为横坐标,绘制标准曲线,结果见表 2。10 种镇静剂在 2 ~ 100 μg/L 内呈现良好的线性关系,相关系数(*r*)均大于 0.998。

表 2 10 种镇静剂的标准曲线及相关系数

Table 2 Calibration curves and correlation coefficients of the ten sedatives

Drug	Linear equation *	<i>r</i>
Zolpidem	<i>y</i> = 2178.7 <i>x</i> - 237.4	0.9994
Midazolam	<i>y</i> = 905.5 <i>x</i> + 892.9	0.9993
Nitrazepam	<i>y</i> = 333.6 <i>x</i> + 688.4	0.9989
Promethazine	<i>y</i> = 908.4 <i>x</i> - 1698.0	0.9984
Oxazepam	<i>y</i> = 156.8 <i>x</i> + 171.2	0.9987
Methaqualone	<i>y</i> = 1036.3 <i>x</i> + 1575.8	0.9991
Triazolam	<i>y</i> = 327.6 <i>x</i> - 91.4	0.9997
Temazepam	<i>y</i> = 923.1 <i>x</i> + 796.8	0.9984
Chloropromazine	<i>y</i> = 995.4 <i>x</i> + 146.2	0.9980
Diazepam	<i>y</i> = 373.5 <i>x</i> + 420.0	0.9991

* *y* : peak area of the quantitative ion ; *x* : mass concentration , μg/L.

2.2.3 方法的灵敏度和精确度

采用在空白组织中添加目标化合物的方法 ,依据特征离子色谱峰的 $S/N > 3$ 为方法的检出限 , $S/N > 10$ 为方法的定量限 ,得出安眠酮、氯丙嗪、异丙嗪、地西洋、硝西洋、奥沙西洋、替马西洋、咪达唑仑、三唑仑和唑吡坦的检出限为 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$,定量限为 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。图 1 为空白猪肉中添加 10 种镇静剂药物($5\text{ }\mu\text{g/kg}$)获得的多反应监测色谱图。

图 1 空白猪肉中添加 10 种镇静剂药物($5\text{ }\mu\text{g/kg}$)的多反应监测色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of a blank pork spiked with the ten sedatives at $5\text{ }\mu\text{g/kg}$

以空白猪肉为样品 ,制备添加 $2, 5, 10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 3 个水平的样品进行测定 ,每个添加水平重复测定 5 个样品 ,连续 3 d 重复操作 ,最终结果见表 3。10 种镇静剂在空白猪肉中的平均添加回收率为 $64.5\% \sim 111.4\%$,日内、日间相对标准偏差(RSD)均小于 15% ,方法回收率和 RSD 符合国内外有关标准和法规的要求。另外 ,通过方法学考察发现该方法同样适用于对猪肾组织样品的分析。

表 3 猪肉样品中 10 种镇静剂添加回收率实验结果

Table 3 Average recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the ten sedatives in pork

Drug	Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/ %	RSD _{inter-day} / % ($n = 3$)	RSD _{intra-day} / % ($n = 5$)
Zolpidem	2	89.7	9.9	6.4
	5	92.1	9.5	8.1
	10	96.0	7.2	5.8
Midazolam	2	93.4	7.6	6.4
	5	90.2	5.6	5.0
	10	111.4	7.8	6.7
Nitrazepam	2	80.2	8.4	5.4
	5	88.5	8.9	7.2
	10	90.0	7.0	6.8
Promethazine	2	82.7	11.3	10.3
	5	75.3	10.2	8.7
	10	78.0	9.8	7.7
Oxazepam	2	94.4	9.7	8.6
	5	93.8	8.6	7.9
	10	105.2	9.9	8.1
Methaqualone	2	101.2	12.4	9.5
	5	98.9	11.0	8.8
	10	90.2	9.5	7.4
Triazolam	2	96.8	7.8	5.7
	5	89.6	9.0	6.3
	10	87.1	6.6	6.1
Temazepam	2	86.8	13.2	12.2
	5	83.7	12.1	9.9
	10	89.4	9.8	9.5
Chlorpromazine	2	64.5	14.3	12.2
	5	69.5	10.1	10.8
	10	73.7	12.3	9.4
Diazepam	2	92.6	8.2	6.8
	5	97.3	9.0	8.7
	10	95.0	7.6	6.1

3 结论

通过对样品前处理方法的优化和改进 ,建立了猪肉和猪肾中 10 种镇静剂类药物残留检测的 UP-LC-MS/MS 方法。该方法具有快速简便、专属性强、灵敏度高等特点 ,其灵敏度、准确度均能满足兽药残留分析的要求 ,为其他动物源食品中镇静剂的检测提供了有利工具。

参考文献：

- [1] Fan S X , Huang L L , Yuan Z H , et al. Chinese Journal of Veterinary Science (范盛先 , 黄玲利 , 袁宗辉 , 等. 中国兽医学报) , 2005 , 25(4) : 412
- [2] Wang H J , Zhou Y M , Niu S. Chinese Journal of Food Hygiene (王海蛟 , 周艳明 , 牛森. 中国食品卫生杂志) , 2006 , 18(2) : 117
- [3] Li Y X , Meng L , Li F S , et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (李永香 , 孟磊 , 李发生 , 等. 中国卫生检验杂志) , 2004 , 14(4) : 466
- [4] Wang L P , Li X , Sun Y , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (汪丽萍 , 李翔 , 孙英 , 等. 分析化学) , 2005 , 33(7) : 951
- [5] Lu P , Qu Z N , Tan W Q , et al. Chinese Journal of Animal Health Inspection (路平 , 屈志娜 , 谭维泉 , 等. 中国动物检疫) , 2006 , 23(7) : 30
- [6] Kinani S , Bouchonnet S , Milan N , et al. J Chromatogr A , 2007 , 1141 : 131
- [7] Deng X J , Guo D H , Zhu J , et al. Journal of Instrumental Analysis (邓晓军 , 郭德华 , 朱坚 , 等. 分析测试学报) , 2008 , 27(11) : 1162
- [8] Govaert Y , Batjoens P , Tsilikas K , et al. Analyst , 1998 , 123 : 2507
- [9] Kaufmann A , Ryser B. Rapid Commun Mass Spectrom , 2001 , 15 : 1747
- [10] Delahaut P , Levaux C , Eloy P , et al. Anal Chim Acta , 2003 , 483 : 335
- [11] Liu Z , Short J , Rose A , et al. J Pharm Biomed Anal , 2001 , 26 : 321
- [12] Kirchherr H , Kuhn-Velten W N. J Chromatogr B , 2006 , 843 : 100
- [13] Verweij A M , Hordijk M L , Lipman P J. J Chromatogr B , 1996 , 686 : 27
- [14] Sminka B E , Brandsmaa J E , Dijkhuizen A , et al. J Chromatogr A , 2004 , 811 : 13