

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中的八种镇定剂残留

LCMSMS-103

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 8 种镇定剂残留的方法。该方法在 15 min 内完成氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、咪唑心安八种常见镇定剂的分离。在牛奶基质中甲苯噻嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨基、乙酰丙嗪在 0.1~500 ng/mL，阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、咪唑心安在 0.1~100 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.996 以上。用牛奶基质配制浓度为 2 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 的标准溶液考察重复性，牛奶基质中连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.38% 和 0.70~3.02% 之间，仪器精密度良好。牛奶中八种镇定剂的定量限在 0.019~0.052 ng/mL 之间，检出限在 0.0057~0.016 ng/mL 之间，定量限和检出限均优于《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》的检测标准。

关键词： 三重四极杆质谱 牛奶 镇定剂

氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、咪唑心安八种药物是一类广谱镇定剂，该类药物作为麻醉剂具有止痛、肌肉松弛的作用。该类镇定剂因其抗精神病、抑制躁狂、兴奋、跳动、镇吐作用而广泛地用于动物。大量的药物成份潜伏于牛奶中并被人吸收。而这类药物有导致过敏性反应，可引起体位性低血压、心悸、运动障碍、肝损害、恶性综合征，诱变致癌的副作用。因此，在各国对食用动物中镇定剂类药物残留量均有严格的限量要求。所以，建立一种高灵敏度的测定牛奶中镇定剂

类药物的残留定量和定性方法是十分必要的。测定镇定剂类药物在动物组织中残留的分析方法比较多，而测定牛奶中镇定剂类药物残留的方法较少，主要只限于高效液相色谱法。本研究参照《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用，建立了一种测定牛奶中 8 种常见镇定剂（氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、咪唑心安）的方法，供相关行业检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D. × 150 mm L., 5 μm)

流动相：A: 0.01 mol/L 甲酸铵水溶液

B: 乙腈

流速：0.32 mL/min

柱温：40 °C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	30
9.00	Pumps	Pump B Conc.	60
9.01	Pumps	Pump B Conc.	80
10.00	Pumps	Pump B Conc.	80
10.01	Pumps	Pump B Conc.	30
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8040	加热气流速:	15.0 L/min
离子源:	ESI, 正离子	离子源电压:	4.5 kV
加热模块温度:	450°C	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
脱溶剂管温度:	250°C	MRM 参数:	见表 2
雾化气流速:	3.0 L/min		

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	甲苯噻嗪	221.1	90.10*	-30	-22	-16
			164.10	-30	-26	-29
2	咪唑心安	299.10	166.20*	-16	-21	-21
			222.10	-16	-20	-23
3	阿扎哌醇	330.20	121.10*	-25	-25	-21
			321.20	-25	-15	-21
4	阿扎哌隆	328.20	165.10*	-27	-21	-16
			121.20	-27	-23	-21
5	乙酰丙嗪	327.10	58.10*	-17	-36	-22
			86.20	-17	-21	-15
6	氟哌啶醇	376.10	123.10*	-29	-42	-21
			165.10	-29	-23	-30
7	丙酰二甲氨	341.10	58.10*	-18	-39	-22
			86.20	-18	-21	-15
8	氯丙嗪	319.10	58.10*	-17	-38	-22
			86.20	-17	-21	-15

*表示定量离子

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质: 共 8 种, 氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、咪唑心安。

标准工作溶液配制: 用无水乙醇配制 500 µg/mL 的混合标准贮备液, 用甲醇-水 (1:1) 溶液稀释成 5 µg/mL 的混合标准溶液。

1.4 标准曲线的配制

前处理方法采用《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》的第 7 部分。

牛奶前处理液用氮气吹干后再用甲醇-水 (1:1) 溶液复溶, 该复溶液过 0.22 µm 有机滤膜后再用其将 5 µg/mL 的标准溶液稀释成 500 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.1 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

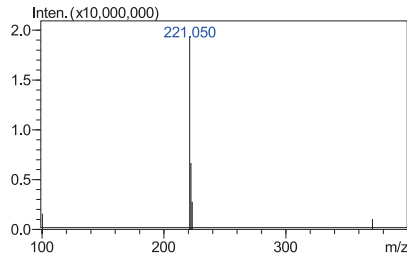


图1 甲苯噻嗪一级质谱图

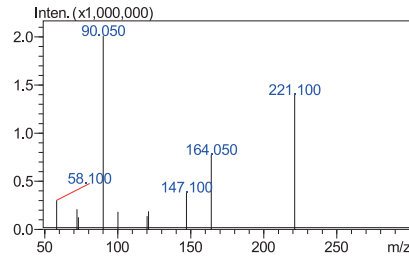


图2 甲苯噻嗪产物离子扫描图(CE值)

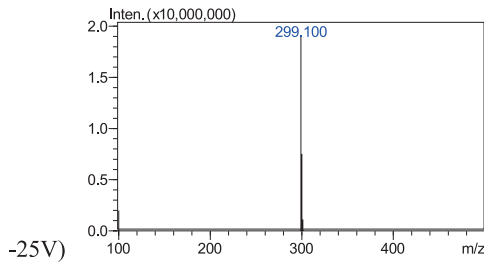


图3 吡唑心安一级质谱图

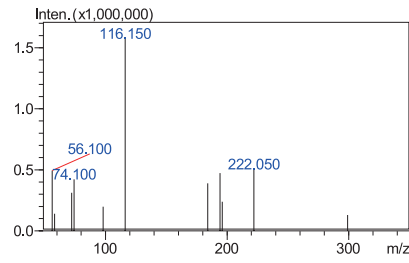


图4 吡唑心安产物离子扫描图(CE值)

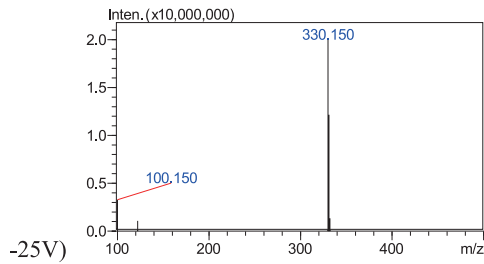


图5 阿扎哌醇一级质谱图

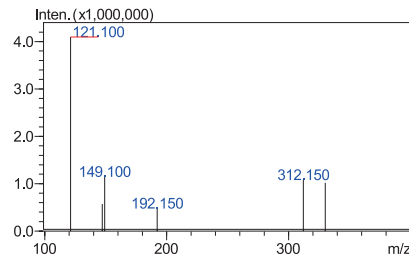


图6 阿扎哌醇产物离子扫描图(CE值-20V)

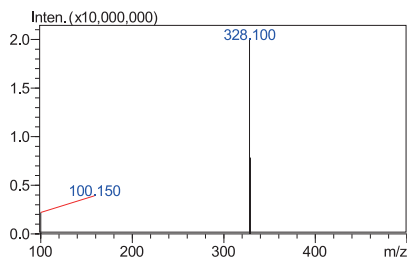


图7 阿扎哌隆一级质谱图

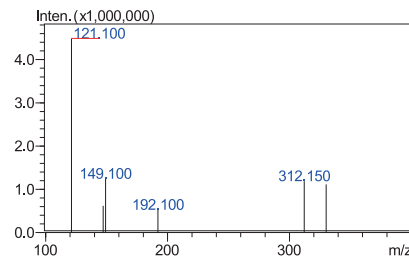


图8 阿扎哌隆产物离子扫描图(CE值-20V)

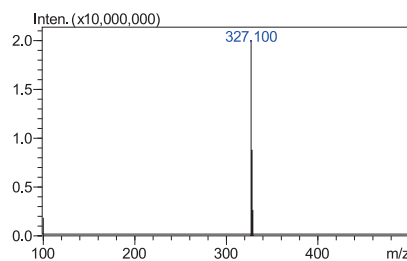


图9 乙酰丙嗪一级质谱图

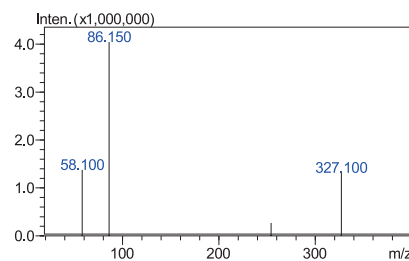


图10 乙酰丙嗪产物离子扫描图(CE值-20V)

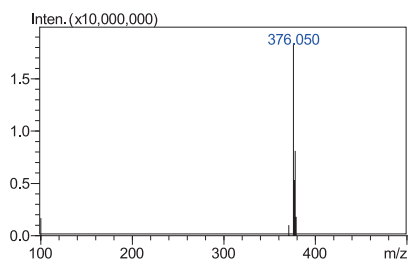


图11 氟哌啶醇一级质谱图

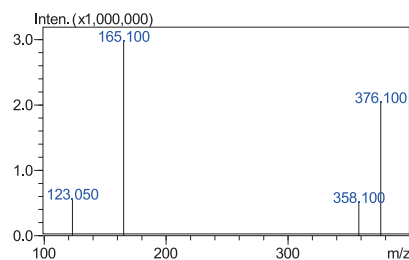


图12 氟哌啶醇产物离子扫描图(CE值-20V)

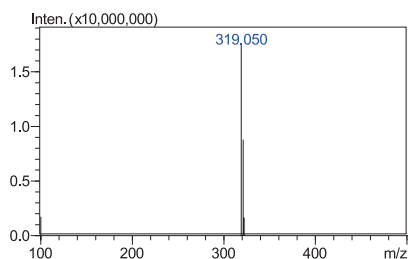


图13 氯丙嗪一级质谱图

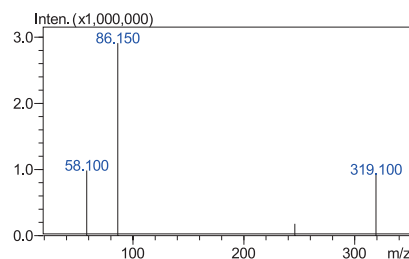


图14 氯丙嗪产物离子扫描图(CE值-25V)

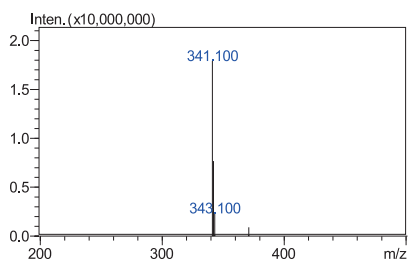


图 15 丙酰二甲氨一级质谱图

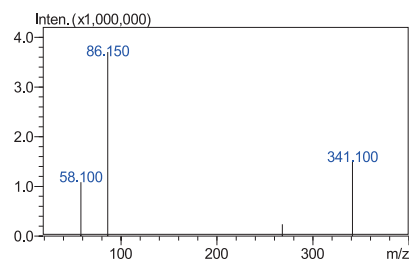


图16 丙酰二甲氨产物离子扫描图(CE 值-20V)

2.2 牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图

空白牛奶样品的色谱图如图 17 所示，加标样品色谱图如图 18 所示。

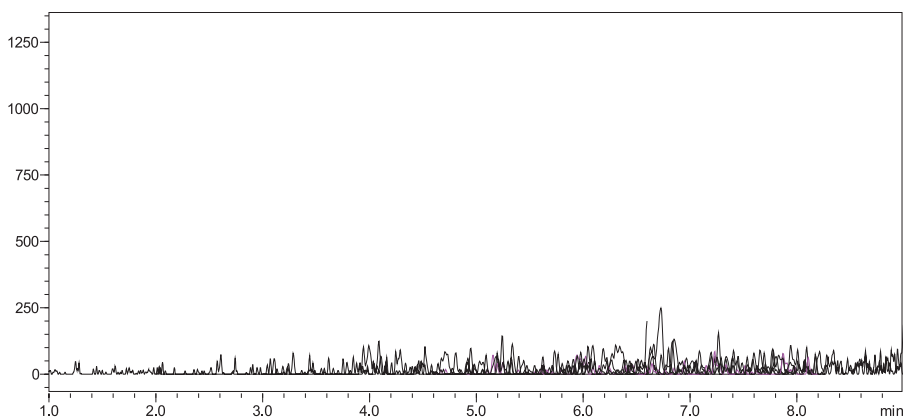


图 17 牛奶空白基质样品的 MRM 色谱图

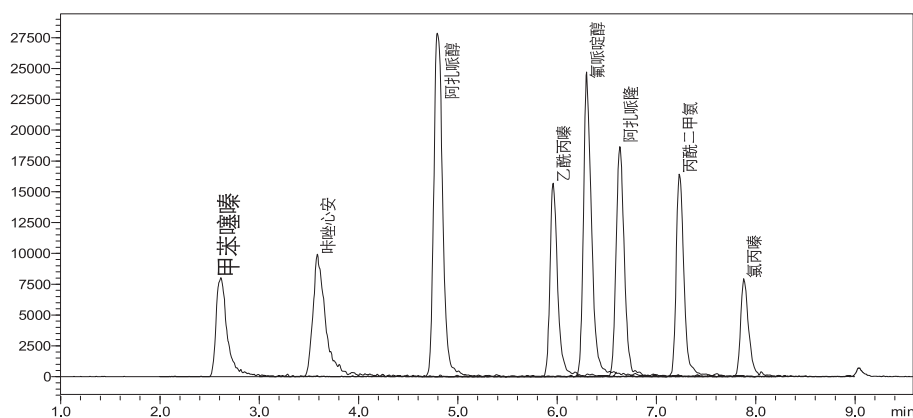


图 18 八种镇定剂牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图 (0.5ng/mL)

2.3 线性关系

将 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，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 19 至图 26 所示。甲苯噻嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨、乙酰丙嗪在 0.1~500 ng/mL，阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、咪唑心安在 0.1~100 ng/mL 范围内线性良好。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

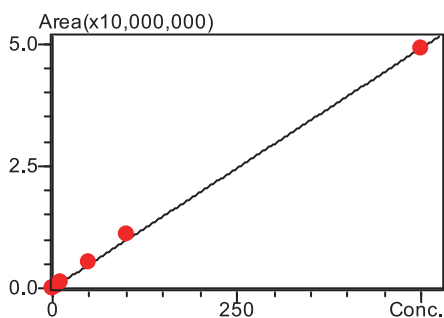


图 19 甲苯噻嗪标准曲线

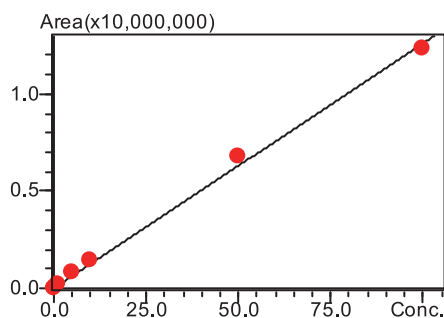


图 20 咪唑心安标准曲线

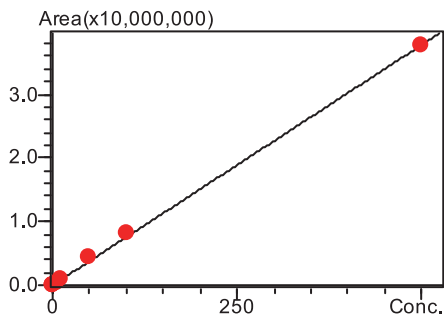


图 21 氯丙嗪标准曲线

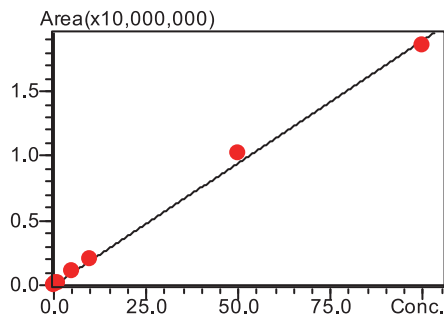


图 22 阿扎哌隆标准曲线

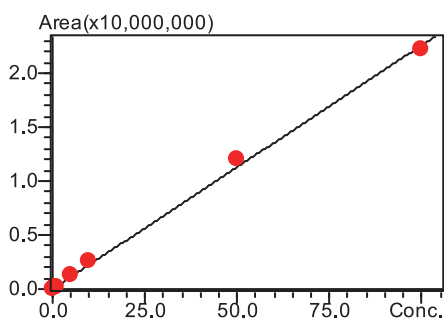


图 23 氟哌啶醇标准曲线

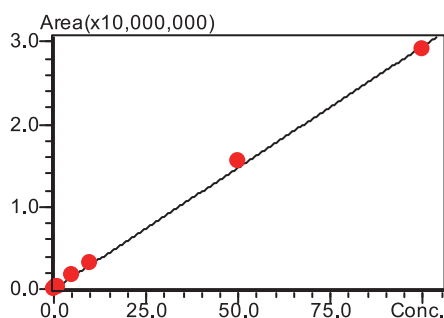


图 24 阿扎哌醇标准曲线

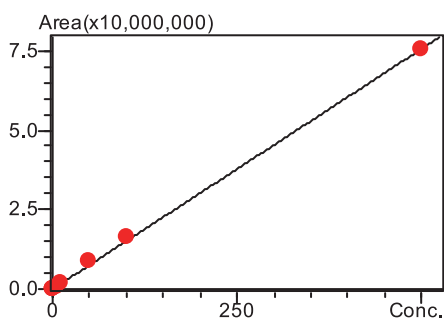


图 25 丙酰二甲氨标准曲线

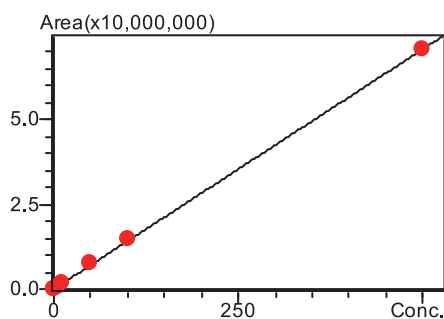


图 26 乙酰丙嗪标准曲线

表 3 八种镇定剂的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数r
1	甲苯噻嗪	$Y = (98221.7)X$	0.1~500	0.9997
2	唑啉心安	$Y = (128636)X$	0.1~100	0.9963
3	氯丙嗪	$Y = (75513.2)X$	0.1~500	0.9998
4	阿扎哌隆	$Y = (189486)X$	0.1~100	0.9987
5	氟哌啶醇	$Y = (226102)X$	0.1~100	0.9991
6	阿扎哌醇	$Y = (295473)X$	0.1~100	0.9991
7	丙酰二甲氨	$Y = (151240)X$	0.1~500	0.9998
8	乙酰丙嗪	$Y = (141570)X$	0.1~500	0.9999

2.4 精密度实验

对 2 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.38% 和 0.70~3.02% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (2ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
甲苯噻嗪	0.38	1.76	0.31	0.70	0.30	0.85
唑啉心安	0.25	1.85	0.29	0.86	0.37	0.99
氯丙嗪	0.06	2.77	0.08	2.64	0.07	2.13
阿扎哌隆	0.14	2.15	0.12	1.69	0.13	1.02
氟哌啶醇	0.12	3.02	0.11	3.01	0.13	2.86
阿扎哌醇	0.23	1.60	0.21	1.89	0.28	1.41
丙酰二甲氨	0.09	1.38	0.09	0.80	0.11	0.94
乙酰丙嗪	0.15	2.28	0.13	0.77	0.14	1.04

2.5 灵敏度分析

用牛奶基质稀释得到浓度为 0.1 ng/mL 的溶液进样分析, 八种镇定剂的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 5 所示。

表 5 八种物质的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	甲苯噻嗪	22.51	0.013	0.044
2	咪唑心安	28.36	0.011	0.035
3	氯丙嗪	19.05	0.016	0.052
4	阿扎哌隆	35.36	0.0085	0.028
5	氟哌啶醇	52.48	0.0057	0.019
6	阿扎哌醇	47.85	0.0063	0.021
7	丙酰二甲氨	40.77	0.0074	0.025
8	乙酰丙嗪	32.94	0.0091	0.030

2.6 基质加标实验

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后加混标至浓度为 4 ng/mL, 平行 3 份样品测定回收率和 RSD。具体结果如表 6, 样品加标回收率在 90.75 ~ 109.25% 之间。

表 6 加标样的回收率结果(n=3)

No.	样品名称	实测平均值 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD%
1	甲苯噻嗪	4.13	103.25	1.56
2	咪唑心安	4.31	107.82	1.31
3	氯丙嗪	3.63	90.75	2.06
4	阿扎哌隆	4.37	109.25	2.39
5	氟哌啶醇	4.25	106.25	3.69
6	阿扎哌醇	4.24	106.00	1.18
7	丙酰二甲氨	3.89	97.25	0.58
8	乙酰丙嗪	3.72	93.00	1.24

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定牛奶中八种镇定剂的方法。该方法在 15 min 内完成氯丙嗪、乙酰丙嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、咪唑心安八种常见镇定剂的分离, 线性范围甲苯噻嗪、氯丙嗪、丙酰二甲氨、乙酰丙嗪为 0.1~500 ng/mL, 阿扎哌隆、阿扎哌醇、氟哌啶醇、咪唑心安为 0.1~100 ng/mL, 相关系数均在 0.996 以上。用牛奶基质配制 2 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 的标准溶液考察重复性, 连续 6 次进样, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.38% 和 0.70~3.02% 之间, 仪器精密度良好。牛奶中八种镇定剂的定量限在 0.019~0.052 ng/mL 之间, 检出限在 0.0057~0.016 ng/mL 之间, 定量限和检出限均优于《GBT 22993-2008 牛奶和奶粉中八种镇定剂残留量的测定》的检测标准。该方法具有灵敏高、重复性好的特点, 适合牛奶中镇定剂的高灵敏度检测。

附录:

表 7 八种镇定剂化合物信息表

No.	样品名称	英文名称	CAS号
1	甲苯噻嗪	xylazine	7361-61-7
2	咪唑心安	carazolol	57775-29-8
3	氯丙嗪	chlorpromazine	50-53-3
4	阿扎哌隆	azaperone	1649-18-9
5	氟哌啶醇	haloperidol	52-86-8
6	阿扎哌醇	azaperol	2804-05-9
7	丙酰二甲氨	propionylpromazine	7681-67-6
8	乙酰丙嗪	acepromazine	61-00-7