

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定猪肉中的八种镇定剂残留

LCMSMS-137

摘要: 使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 联用测定猪肉中 8 种镇定剂残留的方法。该方法以 D₆- 氯丙嗪为内标物在 10 min 内完成乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆及其代谢物阿扎哌醇和 β- 受体阻断剂咪唑心安残留量的分析。在猪肉基质中八种镇定剂在 0.1~50 ng/mL 范围内线性良好, 标准曲线的相关系数均在 0.997 以上。用猪肉基质配制浓度为 0.5 ng/mL、5 ng/mL、25 ng/mL 的标准溶液考察重复性, 猪肉基质中连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02~2.23% 和 0.81~8.34% 之间, 仪器精密度良好。猪肉中八种镇定剂的定量限均为 0.1 μg/kg, 优于《GBT 20763-2006 猪肾和肌肉组织中乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、咪唑心安残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》的检测标准。。

关键词: 三重四极杆质谱 猪肉 镇定剂

氯丙嗪、乙酰丙嗪、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪和甲苯噻嗪属于吩噻嗪类镇定剂, 氟哌啶醇和阿扎哌隆是丁苯类镇定剂, 阿扎哌醇是阿扎哌隆的代谢物。咪唑心安是 β 受体阻断剂, 可引起支气管痉挛及鼻粘膜微细血管收缩, 对哮喘及过敏性鼻炎病人有一定的危害。以上药物具有抑制脑干及大脑皮质, 产生安静和降低运动性的作用, 同时也具有一定副作用。噻吩类镇定剂已被欧盟禁止用于食用性动物, 我国也将氯丙嗪列入食用动物禁止使用的兽药清单。本实验以猪肉为基质, 建立一种高灵敏度的测定镇定剂类药物残留的检测方法。本方法使用先碱化、再酸化、最后再碱化的三步提取, 有效去除猪肉基质干扰。八种镇定剂为碱性化合物, 在碱性条件下易分配到乙醚相, 在酸性条件下易分配到水相。由于乙醚的极性较低, 猪肉基质中的弱极性物质将与目标物一同被碱化乙醚提取。酸水二次提取后, 弃去乙醚层, 将弱极性干扰物一同除去。最后一步碱化, 又将目标物提取到乙醚层, 氮气吹干后流动相复溶进样分析。使用岛津高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用, 以 D₆- 氯丙嗪为内标物, 定量限满足法规要求。供相关行业检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验 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: Kinetex C18 (2.1 mm I.D. × 50 mm L., 2.6 μm)

流动相: A: 2 mM 甲酸铵水溶液, 0.1% 甲酸
B: 甲醇

流速: 0.35 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	20
2.50	Pumps	Pump B Conc.	32
4.00	Pumps	Pump B Conc.	55
6.00	Pumps	Pump B Conc.	55
6.10	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.10	Pumps	Pump B Conc.	20
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子

加热模块温度: 450°C

脱溶剂管温度: 250°C

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

离子源电压: 4.5 kV

扫描模式： 多反应监测 (MRM)

MRM 参数： 见表 2

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	阿扎哌醇	330.2	121.1*	-25	-25	-21
			321.2	-25	-15	-21
2	甲苯噻嗪	221.1	90.1*	-30	-22	-16
			164.1	-30	-26	-29
3	阿扎哌隆	328.2	165.1*	-27	-21	-16
			121.2	-27	-23	-21
4	唑啉心安	299.1	166.2*	-16	-21	-21
			222.1	-16	-20	-23
5	氟哌啶醇	376.1	123.1*	-29	-42	-21
			165.1	-29	-23	-30
6	乙酰丙嗪	327.1	58.1*	-17	-36	-22
			86.2	-17	-21	-15
7	丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	341.1	58.1*	-18	-39	-22
			86.2	-18	-21	-15
8	氯丙嗪	319.1	58.1*	-17	-38	-22
			86.2	-17	-21	-15
9	D ₆ 氯丙嗪	325.1	92.2	-17	-21	-16

*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、唑啉心安。内标物质是 D₆- 氯丙嗪。

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 8 种混合标准溶液。

1.4 样品前处理

前处理方法参考《GBT 20763-2006 猪肾和肌肉组织中

乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、唑啉心安残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》的第 7 部分。区别在于使用乙醚做提取剂。

猪肉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 50 ng/mL、25 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.1 ng/mL 的工作溶液，其中内标物 D₆- 氯丙嗪的浓度为 50 ng/mL。

结果与讨论

2.1 猪肉基质加标样品的 MRM 色谱图

空白猪肉样品的色谱图如图 1 所示，加标样品色谱图如图 2 所示。

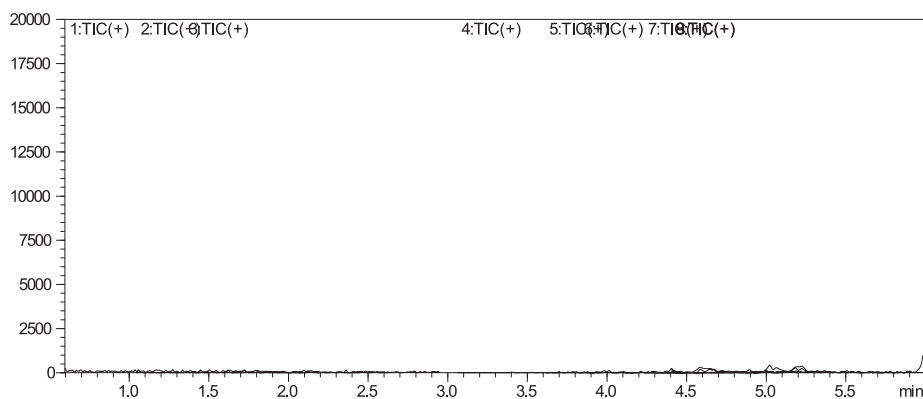


图1 猪肉空白基质样品的MRM色谱图

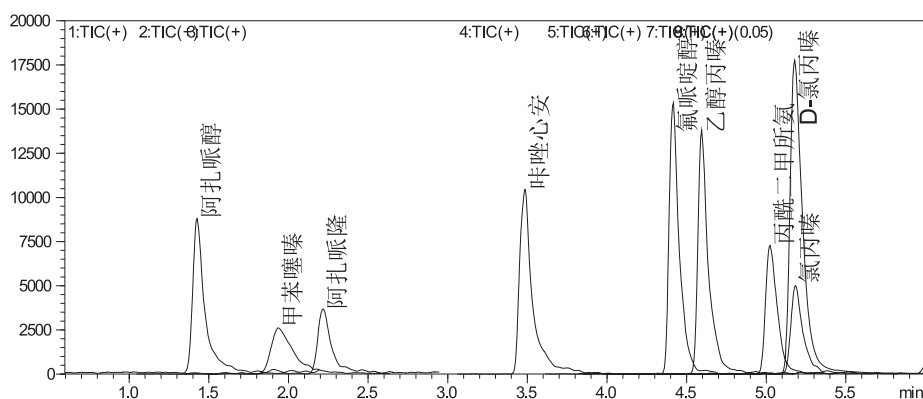


图2 八种镇定剂及内标在猪肉基质加标样品的MRM色谱图 (0.5 ng/mL)

2.2 线性关系

将 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、25 ng/mL 和 50 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 至图 10 所示。乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇和咪唑心安在 0.1~50 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。

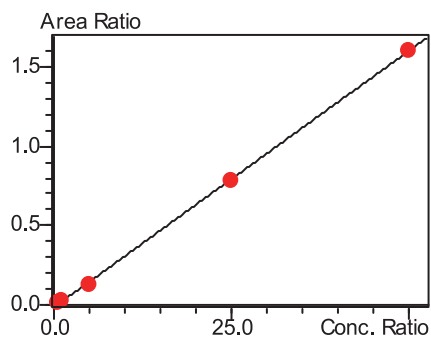


图3 阿扎哌醇标准曲线

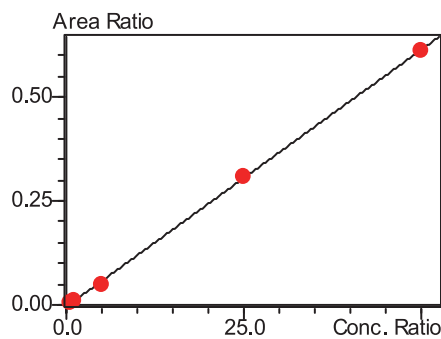


图4 甲苯噻嗪标准曲线

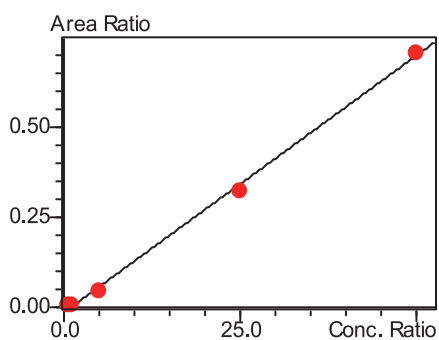


图5 阿扎哌隆标准曲线

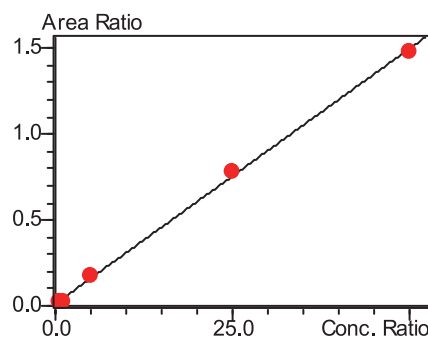


图6 咪唑心安标准曲线

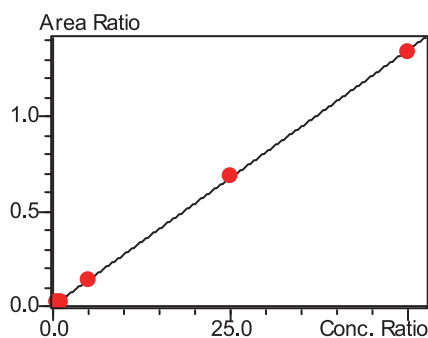


图7 氟哌啶醇标准曲线

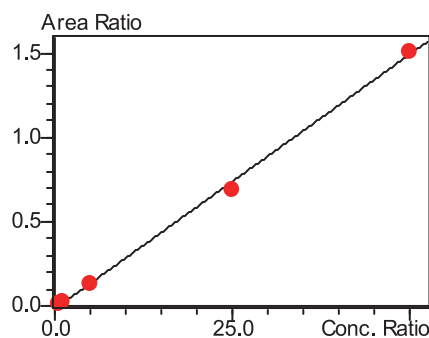


图8 乙酰丙嗪标准曲线

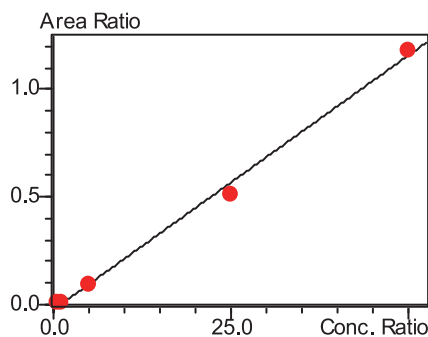


图9 丙酰二甲氨基丙吩噻嗪标准曲线

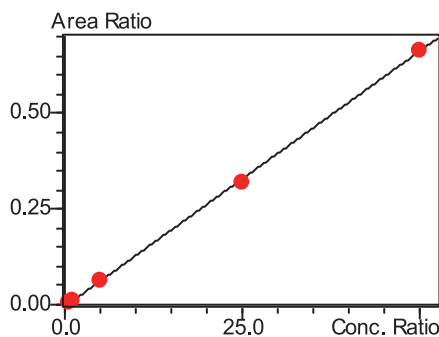


图10 氯丙嗪标准曲线

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	阿扎哌醇	$Y = (0.0321880)X + (-0.0122110)$	0.1~50	0.9998
2	甲苯噻嗪	$Y = (0.0123129)X + (-0.00235905)$	0.1~50	0.9999
3	阿扎哌隆	$Y = (0.0141913)X + (-0.0124341)$	0.1~50	0.9990
4	卡唑心安	$Y = (0.0296082)X + (0.0148377)$	0.1~50	0.9997
5	氟哌啶醇	$Y = (0.0268751)X + (0.00383163)$	0.1~50	0.9999
6	乙酰丙嗪	$Y = (0.0300782)X + (-0.0162544)$	0.1~50	0.9991
7	丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	$Y = (0.0242449)X + (-0.0261471)$	0.1~50	0.9979
8	氯丙嗪	$Y = (0.0147256)X + (-0.0127699)$	0.1~50	0.9998

2.3 精密度实验

对 0.5 ng/mL、5 ng/mL 和 25 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 RSD 分别在 0.02~2.23% 和 0.81~8.34% 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)

No.	样品名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)		RSD% (25 ng/mL)	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area
1	阿扎哌醇	1.52	6.57	0.86	1.50	0.21	3.97
2	甲苯噻嗪	2.23	8.34	1.05	5.10	0.26	1.90
3	阿扎哌隆	0.81	7.15	0.59	4.16	0.24	6.12
4	唑啉心安	0.18	2.98	0.12	2.48	0.15	0.86
5	氟哌啶醇	0.06	4.34	0.02	2.96	0.09	1.67
6	乙酰丙嗪	0.09	3.42	0.03	1.00	0.04	2.01
7	丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	0.05	5.24	0.03	0.81	0.64	3.49
8	氯丙嗪	0.39	3.97	0.04	3.08	1.56	5.39

2.4 灵敏度分析

用猪肉基质稀释配置浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标量对应的进样浓度, 如图 11 所示, 八种镇定剂的最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 均达到 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

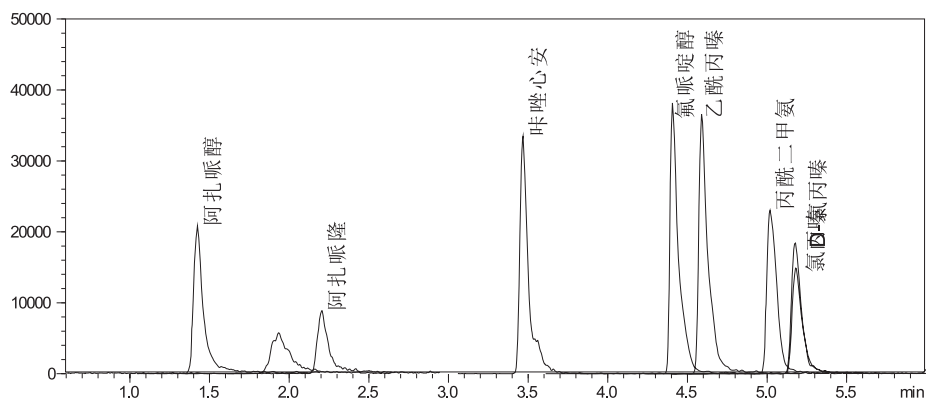


图11 八种镇定剂及内标在猪肉基质加标样品的MRM色谱图 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

2.5 基质加标实验

用猪肉基质按照 1.4 进行处理后, 加标浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平行 3 份样品测定回收率和 RSD%。具体结果如表 5, 样品加标回收率在 80.6 ~108% 之间。

表5 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	阿扎哌醇	0.978	97.8	7.1
2	甲苯噻嗪	0.908	90.8	7.3
3	阿扎哌隆	0.884	88.4	2.3
4	唑啉心安	1.04	104	5.2
5	氟哌啶醇	0.923	92.3	8.6
6	乙酰丙嗪	0.806	80.6	3.8
7	丙酰二甲氨基丙吩噻嗪	1.04	104	7.7
8	氯丙嗪	1.08	108	3.1

■ 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 测定猪肉中八种镇定剂的方法。该方法在 10 min 内完成乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、咔唑心安八种常见镇定剂的分离, 0.1~50 ng/mL 线性范围内, 八种物质的相关系数均在 0.997 以上。用猪肉基质配制 0.5 ng/mL、5 ng/mL、25 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 0.02~2.23% 和 0.81~8.34% 之间, 仪器精密度良好。猪肉中八种镇定剂的定量限均达到 0.1 μg/kg, 优于 GBT 20763-2006 的标准要求。本方法具有灵敏高、重复性好的特点, 适合猪肉中镇定剂的高灵敏度检测。

附录:

表6 八种镇定剂化合物信息表

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