

超高效液相色谱 - 质谱对动物源食品中 氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物的测定

齐士林¹, 吴敏², 严丽娟², 吴抒怀², 邹伟², 林立毅², 周昱²

(1. 厦门大学 化学系, 福建 厦门 361002; 2. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361026)

摘要: 建立了动物源食品中吩噻嗪类药物氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物氯丙嗪亚砷和异丙嗪亚砷同时测定的固相萃取超高效液相色谱 - 电喷雾电离串联四极杆质谱 (UPLC - ESIMS/MS) 方法。样品用乙酸乙酯和氢氧化钠溶液提取, Oasis HLB 柱富集净化, 超高效液相色谱 - 电喷雾串联四极杆质谱仪检测, 采用多反应监测正离子模式, 可以一次性对动物源性食品中的吩噻嗪类药物氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物氯丙嗪亚砷和异丙嗪亚砷进行定性和定量测定。方法在 1~100 $\mu\text{g/L}$ 范围具有良好的线性, 回收率为 76%~96%, 定量下限 ($S/N > 10$) 为异丙嗪 5 $\mu\text{g/kg}$, 氯丙嗪、氯丙嗪亚砷、异丙嗪亚砷 1 $\mu\text{g/kg}$, 检出限 ($S/N = 3$) 为异丙嗪 1.5 $\mu\text{g/kg}$, 氯丙嗪、氯丙嗪亚砷、异丙嗪亚砷 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 固相萃取; 超高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱; 氯丙嗪; 异丙嗪; 氯丙嗪亚砷; 异丙嗪亚砷; 动物源性食品

中图分类号: O657.63; S859.84 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 4957(2009)06 - 0677 - 05

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2009.06.009

Determination of Chlorpromazine and Promethazine and Their Metabolites in Animal Food Using Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

QI Shi-lin¹, WU Min², YAN Li-juan², WU Shu-huai², ZOU Wei², LN Li-yi², ZHOU Yu²

(1. Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361002, China; 2. Xiamen Entry - Exit
Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China)

Abstract: A method for the simultaneous detection residues of chlorpromazine and promethazine and their metabolites chlorpromazine sulphoxide and promethazine sulphoxide in animal foods was developed by using solid phase extraction (SPE) combination with ultra performance liquid chromatography - electrospray ionization triple-quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC - ESIMS/MS). The chlorpromazine and promethazine and their metabolites in the test sample was extracted with ethyl acetate and sodium hydroxide solution. The homogenate was centrifuged and the supernatant was collected. The extract was cleaned up and concentrated on an Oasis HLB cartridge, and then analyzed by UPLC - ESIMS/MS under the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) mode. Extraction and chromatographic conditions were optimized and the best separation was obtained. The calibration curves were linear in the range of 1 - 100 $\mu\text{g/L}$. The average recoveries were between 76% and 96% ($n = 6$) in the spiked range of 5 - 100 $\mu\text{g/kg}$ in pork, fish, duffrog and milk. The limits of quantification ($S/N > 10$) were in the range of 1 - 5 $\mu\text{g/kg}$ and the limits of detection ($S/N = 3$) were 0.3 - 1.5 $\mu\text{g/kg}$.

Key words: solid phase extraction (SPE); ultra performance liquid chromatography - electrospray ionization triple-quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC - ESIMS/MS); chlorpromazine; promethazine; chlorpromazine sulphoxide; promethazine sulphoxide; animal food

氯丙嗪和异丙嗪合用组成的冬眠灵合剂, 可用于镇吐、抗晕眩、晕动症以及镇静催眠。其在兽医

收稿日期: 2009 - 01 - 13; 修回日期: 2009 - 02 - 09

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研计划资助项目 (2007 IK137)

第一作者: 齐士林 (1983 -), 男, 山东曲阜人, 硕士

通讯作者: 吴敏, Tel: 0592 - 3269943, E - mail: wum@xmcq.gov.cn

临床上的药理作用广泛, 饲料中添加此类药物, 可间接起到催肥作用; 另外, 使用吩噻嗪类药物可降低动物运输过程中的死亡率。因该类药物脂溶性高, 易蓄积于脂肪组织, 停药数周乃至半年后, 尿中仍可检出其代谢物, 且部分代谢物仍具有药物活性。2008年在对动物源性食品吩噻嗪类及其代谢物残留量普查时发现 60%的猪肉内都含有微量异丙嗪亚砷。残留的氯丙嗪、异丙嗪和部分具有原药活性的代谢物能引起白细胞减少和粒细胞缺乏症, 从而引起人体肝脏、肾脏的病变, 还会引起眼部并发症等。目前吩噻嗪类药物在养殖业中的使用已经引起了美国、欧盟和日本等国家的高度重视。日本厚生劳动省于 2005年 6月 21日, 向各世界贸易组织(WTO)成员通报了“临时最大残留限量标准”、“一律基准”以及“豁免物质”最终草案——G/SPS/N/JPN/145。其中 9种动物源性产品评估表将吩噻嗪类药物氯丙嗪列为“高贸易影响程度”的药物, 明确规定在动物源性食品中该类物质及其代谢产物均不得检出^[1]。

目前有关动物源性食品中氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物的测定方法还较少, 大部分研究局限于法医学方面^[2-6], 样品为血液和尿液, 相对食品样品比较干净; 路平等^[7]和吕燕等^[8]用 GC-MS测定猪肝中的氯丙嗪残留量, 检出限为 1 μg/kg, 灵敏度不高; Vyncht等^[9]和 Toussaint等^[10-11]用 HPLC-MS/MS测定类似药物在猪肾等中的残留; 黄土新等^[12]用高效液相色谱法测定饲料中的氯丙嗪残留量, 检出限为 0.05 mg/L。2008年新执行的国家标准 NY/T 1458-2007^[13]的检出限为 0.2~1 mg/kg。目前尚无对于动物源性食品中氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物的共同研究。本实验在乙酸乙酯提取、固相萃取后, 采用 UPLC-ESIMS/MS法对动物源性食品中吩噻嗪类药物及其代谢物进行测定。该方法快速、准确、抗干扰能力强。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

WatersTQD型串联四极杆质谱仪, 配 WatersUPLC超高效液相色谱仪、自动进样器、电喷雾离子源(美国 Waters公司); GX-274/406 ASPEC四通道自动固相萃取仪(美国吉尔森公司); IKA T18分散机; LDZ 5-2离心机。

乙腈、甲醇(德国 Merck公司), 乙酸铵(美国 Tedia公司)均为 HPLC级; 氯丙嗪、异丙嗪(美国 Sigma公司), 氯丙嗪亚砷、异丙嗪亚砷(英国 LGC公司), 纯度均大于 99.9%; Oasis HLB cartridge固相柱 3 mL 60 mg(美国 Waters公司); 0.1 mol/L磷酸二氢钠缓冲液(pH 6); 其余试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 标准工作液的配制

将氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物用少量甲醇溶解, 再用乙腈配制成 0.1 g/L的标准储备液, 根据需要用甲醇稀释成适当质量浓度的标准工作液, 4℃下保存, 有效期 2个月。

1.3 实验步骤

称取 5.00 g样品, 依次加入 10 mL乙酸乙酯和 1.0 mL 1.0 mol/L NaOH溶液, 以 12 000 r/min均质 1 min, 静置 0.5 h后 3 000 r/min离心 5 min, 取 5 mL上清液, 加入 10 mL磷酸二氢钠缓冲液混匀, 混合液以 0.5 mL/min通过分别用 2 mL甲醇、蒸馏水和磷酸二氢钠缓冲液活化过的固相萃取柱, 然后分别用 5 mL水、磷酸二氢钠缓冲液、水以 1 mL/min冲洗固相柱, 通氮气干燥 2 min, 最后用 2 mL二氯甲烷洗脱, 收集洗脱液浓缩至干, 加入 0.5 mL甲醇溶解残渣, 超声 1 min, 过 0.2 μm微孔滤膜后供 UPLC-ESIMS/MS测定。

1.4 仪器工作参数

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 1.7 μm ×2.1 mm ×50 mm; 流动相: 乙腈 - 0.02 mol/L 乙酸铵溶液(体积比 65 : 35); 等度洗脱; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 1.0 μL。

1.4.2 质谱条件 离子源: ESI(+); 毛细管电压: 2.6 kV; 离子源温度: 110℃; 锥孔反吹气流速: 35 L/h; 脱溶剂气温度: 300℃; 脱溶剂气流速: 750 L/h。第一重四极杆和第二重四极杆的低端分辨率及高端分辨率均为 15。检测方式为多反应监测扫描(MRM)。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

吩噻嗪类药物是极性较大的弱碱性药物, 实验分别以乙腈-甲酸溶液、乙腈-水、乙腈-乙酸铵溶液为流动相。结果发现, 乙腈-甲酸溶液为流动相时, 组分体系不稳定, 色谱柱对氯丙嗪没有保留; 而乙腈-水作流动相时峰形拖尾; 乙腈-乙酸铵溶液流动相的 pH 值较高, 分离效果最好且目标离子的信号响应值高, 因此选定乙腈-乙酸铵溶液为流动相。流动相体系中的有机相比例过高, 则目标物的保留时间短, 得不到很好地分离, 有机相比例低时峰形不理想。比较各种比例的流动相组成后, 确定流动相为乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液 (体积比 65:35)。

2.2 质谱解析及质谱条件的优化

根据氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物的结构特征, 选择电喷雾 (ESI) 离子源, 在正离子模式下对 4 种物质进行一级质谱分析, 得到其分子离子峰, 确定氯丙嗪、氯丙嗪亚砷、异丙嗪、异丙嗪亚砷的分子离子均为 $[M+H]^+$ 型, m/z 分别为 319.1、335.1、285.2、301.2, 分别以其为母离子做二级质谱, 并进行质谱条件优化。氯丙嗪主要产生 m/z 239.1 和 214.1 等子离子, 其中 m/z 239.1 为氯丙嗪失去 H, 脱 N(CH₃)₂ 和 C 的碎片离子峰, m/z 214.1 为氯丙嗪失去 H, 脱 (CH₂)₂N(CH₃)₂ 和 S 的碎片离子峰; 氯丙嗪亚砷主要产生 m/z 232.1 和 86.0 等子离子, 其中 m/z 232.1 为氯丙嗪亚砷失去 H, 脱 (CH₂)₃N(CH₃)₂ 的碎片离子峰, m/z 86.0 为氯丙嗪亚砷开环重排失去 H、CH₃CH=CH₂N(CH₃)₂ 的碎片离子峰; 异丙嗪主要产生 m/z 240.1 和 154.0 等子离子, 其中 m/z 240.1 为异丙嗪失去 H、脱 N(CH₃)₂ 的碎片离子峰, m/z 154.0 为异丙嗪开环重排失去 H、HS-C₆H₄-NH₂⁺-CH₂CH₃ 的碎片离子峰。异丙嗪亚砷主要产生 m/z 239.1 和 86.1 等子离子, 其中 m/z 239.1 为异丙嗪亚砷失去 H、脱 NH(CH₃)₂ 和 O 的碎片离子峰, m/z 86.1 为异丙嗪亚砷开环重排失去 H、CH₂=CH(CH₃)N(CH₃)₂ 的碎片离子峰。各选取丰度最强的 1 对子离子作为监测离子, 以其质荷比及相对丰度比定性 (如表 1), 分别以 m/z 214.1、86.0、240.1、86.1 为定量离子, 峰面积外标法定量。

表 1 氯丙嗪和氯丙嗪亚砷、异丙嗪、异丙嗪亚砷的优化质谱条件
Table 1 Optimized MS/MS conditions for chlorpromazine, chlorpromazine sulphoxide, promethazine and promethazine sulphoxide

Compound	Precursor ion m/z	Daughter ion m/z	Abundance	Dwell time t/s	Cone voltage V/V	Collision energy E/eV
Chlorpromazine	319.1	239.1, 214.1*	68, 100	0.100, 0.100	37.0, 37.0	46.0, 16.0
Chlorpromazine sulphoxide	335.1	86.0*, 232.1	100, 24	0.100, 0.100	52.0, 52.0	26.0, 22.0
Promethazine	285.2	154.0, 240.1*	47, 100	0.100, 0.100	47.0, 47.0	40.0, 24.0
Promethazine sulphoxide	301.2	86.1*, 239.1	100, 5	0.100, 0.100	57.0, 57.0	32.0, 34.0

* quantitative ion

2.3 样品提取方法的选择

吩噻嗪类药物易溶于乙腈、甲醇和乙酸乙酯。以加标回收率为指标对比了 3 种物质作为提取剂时的效果, 结果发现, 采用甲醇为提取剂时, 由于其极性很强, 提取出较多的基体杂质, 给后续的净化与分析带来干扰, 难以进行加标回收率实验; 乙腈作为提取剂时由于提取出的脂肪量较乙酸乙酯少, 而吩噻嗪类药物属于脂溶性物质, 因此回收率不理想; 乙酸乙酯作为提取剂 (加入少量 NaOH 溶液调节 pH 值呈弱碱性), 干扰较小, 回收率达 90%, 效果最好。

Oasis HLB 固相萃取柱填料是一种亲水亲脂共聚物, 吩噻嗪类药物加入缓冲液, 弱酸性条件下上样, 可使待测物保持正离子态而被吸附在固相萃取柱上, 依次用 5 mL 水、缓冲液、水淋洗, 再用 2 mL 二氯甲烷洗脱, 能有效去除基质干扰, 2 种药物及其代谢物均获得较高的回收率。图 1 为优化条件下, 4 种混标 (0.5 mg/L) 及空白猪肉样品中添加 4 种混标 (5 μg/kg) 的提取离子图。

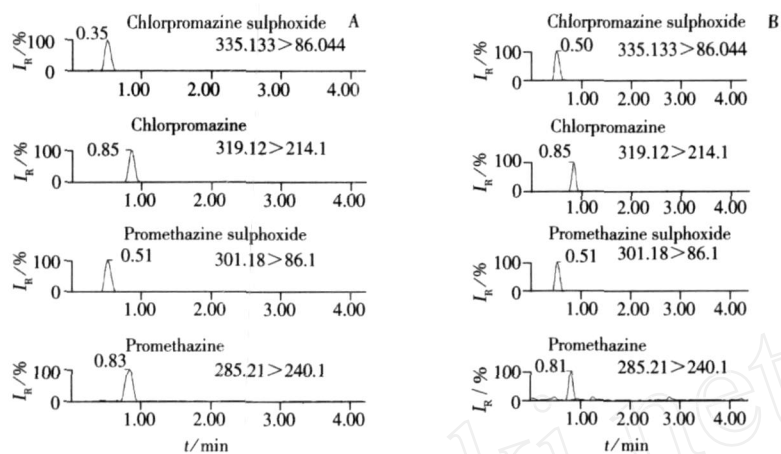


图 1 4种混标 (0.5 mg/L) (A)及空白猪肉样品中添加 4种混标 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (B)的提取离子图

Fig. 1 Reconstructed ion chromatograms of four mixed standards (0.5 mg/L) (A) and spiked pork sample (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (B)

2.4 线性关系与检出限

由标准储备液配制质量浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0 和 100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混标溶液,按照上述条件进行 HPLC - ESIMS/MS 分析,4 种药物在 1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围具有良好的线性,线性方程及相关系数列于表 2。由表 2 可见,本方法测定氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物的线性范围宽、灵敏度高。

在空白猪肉样品中添加氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物标准溶液,分别按信噪比 (S/N) 大于 10 和信噪比 (S/N) 等于 3 计算本方法的定量下限和检出限 (见表 2)。

2.5 回收率与精密度

取经检验未含有氯丙嗪、异丙嗪及氯丙嗪亚砷、异丙嗪亚砷的猪肉、鱼肉、牛蛙和牛奶样品进行 5、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平的添加回收实验。每个水平重复 6 次测定,实验结果列于表 3。方法的平均回收率为 76%~96%,相对标准偏差为 2.5%~5.3%。选取同一空白猪肉样品,添加 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的混标溶液,考察了方法的日间精密度,得到相对标准偏差为 3.6%~6.0% ($n=6$)。

表 2 氯丙嗪、氯丙嗪亚砷、异丙嗪与异丙嗪亚砷测定的工作曲线、相关系数、定量下限及检出限*

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, quantitation limits and detection limits for chlorpromazine, chlorpromazine sulphoxide, promethazine and promethazine sulphoxide*

Compound	Linear equation	r	Linear range / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	LOQ $w / (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	LOD $w / (\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
Chlorpromazine	$Y = 1.1 \times 10^4 X + 3.9$	0.999 8	1.0~100	1	0.3
Chlorpromazine sulphoxide	$Y = 2.1 \times 10^2 X + 1.6 \times 10^2$	0.999 9	1.0~100	1	0.3
Promethazine	$Y = 4.3X + 1.9$	0.999 0	5.0~100	5	1.5
Promethazine sulphoxide	$Y = 1.4 \times 10^3 X + 1.7 \times 10^3$	0.999 7	1.0~100	1	0.3

* Y : peak area; X : mass concentration, $\mu\text{g}/\text{L}$

表 3 方法的回收率与精密度 ($n=6$)

Table 3 Recoveries and precisions in samples ($n=6$)

Compound	Matrice	Spiked 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Chlorpromazine	Pork	77	3.6	91	3.2	94	2.9
	Fish	76	4.2	89	4.6	93	3.4
	Bullfrog	78	2.7	86	4.1	89	3.8
	Milk	77	3.5	89	3.6	91	4.3
Chlorpromazine sulphoxide	Pork	82	2.9	95	3.4	90	4.6
	Fish	81	3.1	90	2.9	93	2.8
	Bullfrog	81	2.8	88	3.8	91	3.9
	Milk	83	4.2	96	3.6	93	4.7

(续表 3)

Compound	Matrice	Spiked 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Promethazine	Pork	79	3.5	84	2.5	82	3.6
	Fish	81	2.9	85	4.7	84	4.4
	Bullfrog	82	3.7	88	2.7	90	3.8
	Milk	86	4.7	90	3.1	89	3.3
Promethazine sulphoxide	Pork	77	3.4	80	3.2	85	2.9
	Fish	77	2.9	79	4.6	89	3.8
	Bullfrog	82	5.1	82	3.2	82	5.3
	Milk	87	4.3	83	4.1	90	4.7

2.6 实际样品测定

选取猪肉、猪肝、鱼肉、牛蛙作为检测品种, 采用本方法对厦门口岸进出口的 100 多份样品进行检测, 其中 30 多个猪肉样品中检出氯丙嗪阳性样品 2 个 (100、130 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、异丙嗪阳性样品 5 个 (50 ~ 230 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、异丙嗪亚砷阳性样品 5 个 (6 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及氯丙嗪亚砷阳性样品 4 个 (5 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。60% 猪肉内都含有略低于检出限的微量代谢产物异丙嗪亚砷。猪肝和鱼肉、牛蛙中未检出氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物。

参考文献:

- [1] 日本拟实施“肯定列表”制度并执行新的农兽药残留限量标准[J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 5: 68
- [2] HAYEN H, KARSTU. Analysis of phenothiazine and its derivatives using LC electrochemistry/MS and LC electrochemistry fluorescence[J]. Anal Chem, 2003, 75(18): 4833 - 4840.
- [3] KIRCHHERR H, KUHN - VELTEN W N. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach[J]. J Chromatogr. B, 2006, 843: 100 - 113.
- [4] 吴玉红, 邢丽梅, 许英键, 等. 尿中异丙嗪及其代谢物含量硅藻土萃取紫外导数光谱测定法[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(2): 89 - 91.
- [5] 陈国征. 气相色谱法测定尿液中盐酸氯丙嗪[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 2003 - 2004.
- [6] MCCLEAN S, O'KANE E J, SMYTH W F. Electrospray ionisation mass spectrometric characterisation of selected antipsychotic drugs and their detection and determination in human hair samples by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr. B, 2000, 740: 141 - 157.
- [7] 路平, 曲志娜, 谭维泉, 等. 气相色谱-质谱法测定猪肝中氯丙嗪残留的研究[J]. 中国动物检疫, 2006, 23(7): 30 - 31.
- [8] 吕燕, 杨挺, 赵健, 等. 气相色谱-质谱法测定猪肝中氯丙嗪残留量[J]. 分析实验室, 2008, 27(3): 119 - 121.
- [9] VYNCHT G V, JÁNOSIA, BORD N A, et al. Multiresidue determination of (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr. A, 2002, 952: 121 - 129.
- [10] TOUSSA NT B, CHED N M, BORD N G, et al. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Laboratory-validated method[J]. J Chromatogr. A, 2005, 1088: 32 - 39.
- [11] TOUSSA NT B, CHED N M, V NCENT U, et al. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography - tandem mass spectrometry Part : Intercomparison exercise [J]. J Chromatogr. A, 2005, 1088: 40 - 48.
- [12] 黄土新, 孙亚云, 曹莹, 等. 高效液相色谱法测定饲料中的违禁药物氯丙嗪[J]. 饲料研究, 2003, 8: 24 - 25.
- [13] 中华人民共和国卫生部, 中国标准化管理委员会. NY/T 1458 - 2007. 饲料中盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、硫酸硫利达嗪、奋乃静的同步测定高效液相色谱法和液相色谱质谱联用法[S]. 北京: 中国标准出版社.