

气相色谱-质谱法同时测定腊肠中 7 种镇静剂类药物残留

谭贵良¹, 赵天珍¹, 王文林², 李向丽², 张娜²

(1. 广东省中山市质量计量监督检测所, 广东中山 528403)

(2. 中山火炬职业技术学院生物医药系, 广东中山 528436)

摘要: 本研究建立了同时测定腊肠中地西洋、奥沙西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、苯巴比妥、异丙嗪 7 种镇静剂残留的固相萃取气相色谱-质谱 (GC-MS) 方法。试样中的镇静剂类药物经氯化乙腈和酸化乙腈提取, 用 C₁₈ 固相萃取柱净化, 甲醇:丙酮 (5:5, V/V) 洗脱, 上 GC-MS 分析。采用毛细管色谱柱 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 进行分离, 电子轰击电离源 (EI), 在选择离子扫描 (SIM) 模式下测定, 外标法定量 (定量离子分别为 256、205、259、279、313、204、72)。实验结果表明, 7 种镇静剂类药物在一定的含量范围内线性关系良好 (分别为 0.0488~0.7808 mg/L, 0.1039~1.2468 mg/L, 0.0971~1.4566 mg/L, 0.1006~1.5090 mg/L, 0.0975~1.1700 mg/L, 0.0605~1.5360 mg/L, 0.0454~1.0896 mg/L), 相关系数大于 0.997, 检出限为 0.020~0.082 mg/L, 回收率为 63.20~88.23%, 相对标准偏差 (n=5) 为 7.02~16.89%。结果表明, 该方法简便快速、灵敏可靠, 适用于肉制品中多种镇静剂类药物残留的检测。

关键词: 气相色谱-质谱; 镇静剂类药物; 残留; 腊肠; 肉制品

文章编号: 1673-9078(2014)2-274-278

Determination of Seven Sedative Residues in Sausage by Gas Chromatography-mass Spectrometry

TAN Gui-liang¹, ZHAO Tian-zhen¹, WANG Wen-lin², LI Xiang-li², ZHANG Na²

(1. Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, China)

(2. Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Technology College, Zhongshan 528436, China)

Abstract: A method for the determination of seven sedative residues (diazepam, oxazepam, estazolam, alprazolam, triazolam, phenobarbital, promethazine) in sausage using solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was established. Five different sausage samples were extracted respectively with basic and acidic acetonitrile solutions, followed by purified on C₁₈ column and eluted by methanol: acetone (5:5, V/V), the analytes were then screened with GC-MS. After separated on chromatographic column DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), external standard calibration was used for quantitative analysis of targeted compounds. The characteristic ions were 256, 205, 259, 279, 313, 204 and 72. The results indicated that seven sedatives had a satisfactory linearity in certain range of concentration (from 0.0488 to 0.7808 mg/L, 0.1039 to 1.2468 mg/L, 0.0971 to 1.4566 mg/L, 0.1006 to 1.5090 mg/L, 0.0975 to 1.1700 mg/L, 0.0605 to 1.5360 mg/L, 0.0454 to 1.0896 mg/L, respectively), with the correlation coefficient more than 0.997. The limit of detection (LOD) of seven sedatives was in the range of 0.020~0.082 mg/L and the average recoveries ranged from 63.20% to 88.23%, and the RSD was from 7.02% to 16.89%. The developed method was simple and accurate, which was available for the detection of sedative residues in meat product.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry; sedatives; residues; sausage; meat product

收稿日期: 2013-11-06

基金项目: 广东省质监局科技计划项目 (2011CS02); 中山市科技局科技计划项目 (20114A239)

作者简介: 谭贵良 (1977-), 男, 博士, 高级工程师, 从事食品检测技术研究

通讯作者: 李向丽 (1979-), 女, 博士, 副教授, 从事食品药品检测

镇静剂类药物 (Sedatives) 是指能缓和激动, 对中枢神经系统有抑制作用, 起到减轻或消除动物狂躁不安, 恢复安静的一类药物。常用的药物有: 苯二氮卓类的地西洋、硝西洋、奥沙西洋, 吩噻嗪类的氯丙嗪、异丙嗪、奋乃静, 以及安乃近、苯巴比妥等。该类物质除具有镇静作用外, 很多还是一类生长促进剂,

被用作动物饲料添加剂,具有使动物嗜睡少动、生长快且有改变肉质的作用。这些药物可对人体中枢神经系统造成不良反应,我国及许多其他国家已将此类药物列为禁用药物。但是近年来也有个别商贩在畜禽饲养及运输过程中擅自非法使用镇静剂类药物,最终可能导致畜禽产品中该类药物的残留,造成食品安全隐患,严重威胁到人们的身体健康。

国内外报道的镇静剂药物检测方法主要有:酶联免疫吸附(ELISA)法^[1-2]、高效液相色谱(HPLC)法^[3-4]、液相色谱-质谱(LC-MS)法^[5-8]、气相色谱-质谱(GC-MS)法^[9-13]等,其中应用最为广泛的是LC-MS和GC-MS法。特别是LC-MS法,目前在药物多残留检测方面用得最多,被农业部等部门定为标准方法使用,食品方面所涉及的检测样本主要为猪肉^[7-8]和猪肾^[8]。但由于涉及的设备昂贵,目前LC-MS法还无法在大部分检测实验室普及使用。相比较而言,气相色谱(GC)、气相色谱-质谱(GC-MS)在很多实验室都有配备,然而采用GC-MS法检测猪肉及猪肉制品中镇静剂药物残留的研究报道还不多见^[9, 13],特别对肉制品中镇静剂残留的监测国内外更为罕见。本文建立了采用C₁₈柱固相萃取后GC-MS快速测定腊肠中地西洋、奥沙西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、苯巴比妥、异丙嗪7种镇静剂类药物的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

7890A/5975I气质联用仪,美国Agilent公司;毛细管色谱柱DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)美国Agilent公司;振荡器,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;离心机, Sigma公司;IKA涡旋混合器,上海天呈科技有限公司。

标准品地西洋、奥沙西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、苯巴比妥、异丙嗪(购自广州市药品检验所),含量均大于99.0%,上述7种药物均配成1000 mg/L的无水甲醇标准储备液。pH=7.0的K₂HPO₄缓冲溶液:称取一定量K₂HPO₄溶解在超纯水中,用磷酸调pH至7.0;甲醇、乙腈、丙酮为农残级(瑞士Fluka公司);其他试剂为国产分析纯;C₁₈固相萃取柱(3 mL, 500 mg),购自美国Supelco公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理

样品提取:称取腊肠(来自于本地不同品牌)5.0 g于具塞离心管中,加入适量无水硫酸钠和30 mL乙

腈,振荡器上振荡提取1 h,加入15 mL氨水-乙腈(1:99, V/V),涡旋混匀1 min,在4℃,8000 r/min离心5 min,收集上清液,剩余部分加入15 mL乙酸-乙腈(1:99, V/V),涡旋混匀1 min,取上层清液与前次提取液合并。乙腈于100 mL蒸馏瓶蒸发至近干,残留物中加入10 mL pH为7.0 K₂HPO₄缓冲溶液,充分溶解后,待净化。

样品净化:C₁₈柱依次用5 mL甲醇和5 mL蒸馏水活化,然后将样品上样至C₁₈柱,用6 mL洗脱液(甲醇:丙酮,5:5, V/V)洗脱,收集洗脱液于10 mL离心试管中,洗脱液在40℃下N₂吹干,用甲醇定容至1 mL,移入进样瓶,待GC-MS分析。

1.2.2 色谱条件

色谱柱为DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为高纯He,流速为1.1 mL/min;不分流进样,进样量1 μL;进样口温度300℃;柱温:50℃保留1 min,10℃/min升温至300℃(保留4 min);传输线温度280℃;四极杆温度150℃;离子源温度230℃;电子轰击电离源(EI, 70 eV),质量扫描范围50~650 amu。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

对7种镇静剂类药物进行全扫描(SCAN)和选择离子模式扫描(SIM),药物的特征离子、保留时间及定量离子见表1。

表1 7种镇静剂类物质谱条件

Table 1 Mass condition for seven sedatives

药物	特征离子	保留时间	定量离子
苯巴比妥	204、117、161、232	18.966	204
异丙嗪	72、284、198、180	22.033	72
奥沙西洋	205、239、268、77	22.521	205
地西洋	256、257、283、287	23.430	256
艾司唑仑	259、205、294、239	26.972	259
阿普唑仑	279、204、308、273	27.284	279
三唑仑	313、238、342、279	27.976	313

2.2 提取净化方法的选择

2.2.1 不同提取溶剂的提取效果

对比了甲醇、乙酸乙酯、乙腈三种有机溶剂对7种镇静剂类药物的提取效果,三种提取溶剂提取药物的总离子流色谱图见图1。

从图1可以看出,在其他条件相同的情况下,用甲醇提取时的共萃取物较多,干扰大且只能同时提取到三种药物,回收率较低。同样以乙酸乙酯提取时的

提取效果也不尽理想,仍有三个药物(艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑)未被提取到。相反,乙腈作为提萃取剂时,萃取效果最佳,七种目标组分得到有效提取,杂峰干扰少,药物得到了很好的分离。由此可见,乙腈是一种比较理想的镇静剂类药物提取溶剂。

经过 C₁₈ 固相萃取净化后,目标峰附近干扰杂质较少,无明显干扰峰影响,且七种待测物均能得到很好的分离。故选择 C₁₈ 固相萃取来测定 7 种镇静剂类药物残留。

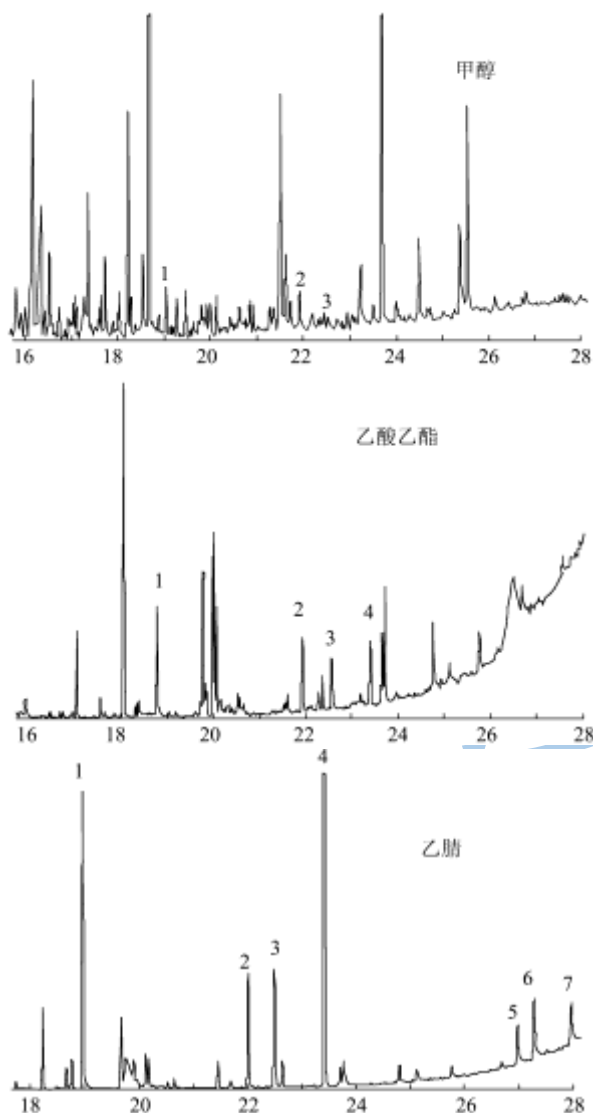


图 1 不同溶剂对 7 种镇静剂类药物提取的总离子流图

Fig. 1 TIC of seven sedatives extracted by different solvents

注: 1. 苯巴比妥; 2. 异丙嗪; 3. 奥沙西洋; 4. 地西洋; 5. 艾司唑仑; 6. 阿普唑仑; 7. 三唑仑。

2.2.2 净化方法的选择

目前对于复杂基质如猪肉等镇静剂类药物残留分析的前处理手段主要有两种:一是通过有机溶剂提取后再通过液液分配或冷冻离心去除脂肪的方式进行前处理^[8];二是通过有机溶剂提取再通过固相萃取净化^[7, 13]。本文比较了液液萃取和 C₁₈ 柱两种方法的净化效果。从图 2 可以看出,由于检测对象腊肠中糖和脂肪含量较高,基质复杂,选择通过有机溶剂提取,再过 C₁₈ 小柱,净化效果会好,对色谱柱、离子源影响不大。

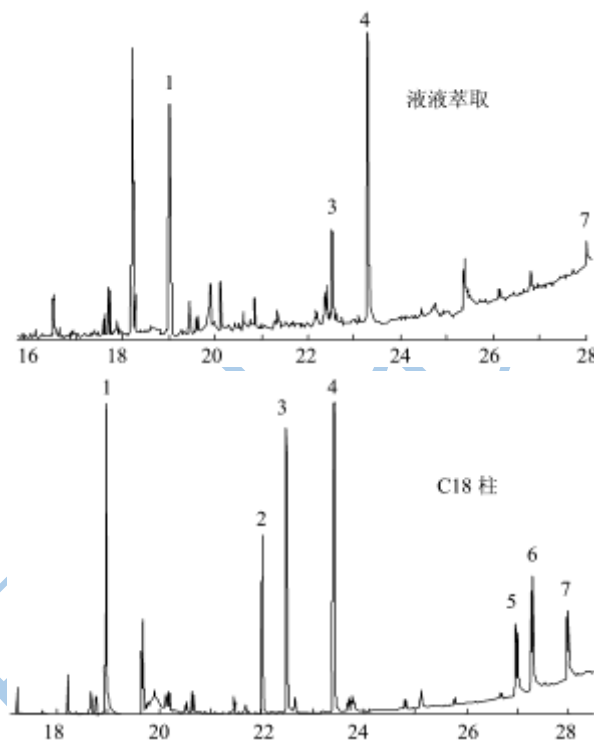


图 2 不同净化方法对药物提取的总离子流图

Fig. 2 TIC of seven sedatives after purification

注: 1. 苯巴比妥; 2. 异丙嗪; 3. 奥沙西洋; 4. 地西洋; 5. 艾司唑仑; 6. 阿普唑仑; 7. 三唑仑。

2.2.3 洗脱溶剂对回收率影响

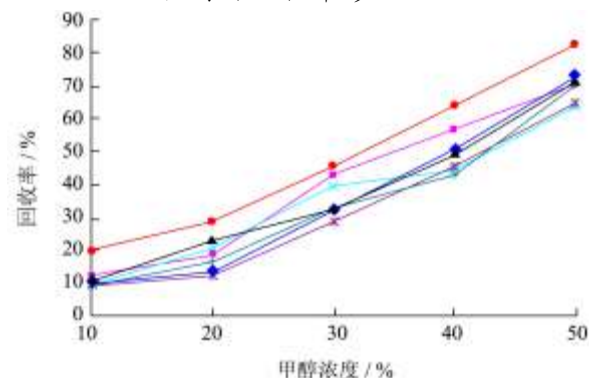


图 3 甲醇-丙酮的洗脱效果

Fig.3 Elution effect of methanol-acetone

注: ◆地西洋; ■奥沙西洋系列; ▲阿普唑仑; ×三唑仑; *艾司唑仑; ●苯巴比妥; 异丙嗪。

C₁₈ 是一种高分子多孔聚合物,对弱极性的物质有较强的吸附能力。试验中比较了正己烷、甲醇以及丙酮溶液的洗脱净化效果和回收率。综合考虑溶剂用量、溶剂毒性后,本文选择甲醇-丙酮作为洗脱剂。不同比例的甲醇-丙酮洗脱 7 种药物的洗脱效果见图 3。结果

表明,用 6 mL 含 50% 甲醇 (V/V) 的甲醇-丙酮作为洗脱剂时,7 种药物的回收率均达到最高水平。

2.2.4 线性方程、检出限和相关系数

准确称取 7 种药物标准品约 100 mg (精确至 0.1 mg) 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,得到镇静剂类药物浓度约为 1000 mg/L 的标准储备液,然后用甲

醇稀释至一系列标准工作液,上机测定,以标准工作液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,七种镇静剂的检出限为 0.02~0.082 mg/L,相关系数均大于 0.995,说明本方法适用于多种镇静剂药物的定量分析 (表 2)。

表 2 7 种镇静剂类药的检出限、定量限

Table 2 Limit of detection and quantification of seven sedatives in sausage

药物	线性方程	相关系数	线性范围/(mg/L)	检出限/(mg/L)
地西洋	Y=299675C-2391.2	0.9990	0.0488~0.7808	0.020
奥沙西洋	Y=65276C+3336.8	0.9971	0.1039~1.2468	0.070
艾司唑仑	Y=116432C+759	0.9990	0.0971~1.4566	0.082
阿普唑仑	Y=94279C+3472.2	0.9990	0.1006~1.5090	0.075
三唑仑	Y=65729C+2636.6	0.9993	0.0975~1.1700	0.080
苯巴比妥	Y=262824C-842.58	0.9992	0.0605~1.5360	0.030
异丙嗪	Y=184795C+972.95	0.9989	0.0454~1.0896	0.030

2.2.5 方法的回收率和精密度

表 3 7 种镇静剂类药物回收率

Table 3 Results of recovery test

样品	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	RSD/%
地西洋	60	72.80	13.26
	100	75.63	12.03
	200	76.21	10.87
奥沙西洋	120	70.30	14.54
	250	72.27	13.66
	500	71.85	12.50
艾司唑仑	150	70.36	16.89
	300	74.26	15.72
	600	72.80	13.25
阿普唑仑	120	69.07	13.55
	250	72.81	9.42
	500	75.03	9.86
三唑仑	150	63.20	15.33
	300	72.87	13.81
	600	75.64	13.24
苯巴比妥	60	80.25	10.87
	100	82.38	8.99
	200	83.26	8.07
异丙嗪	60	70.31	11.80
	100	83.04	9.26
	200	88.23	7.02

分别在 5 g 空白腊肠样品中加入不同量的标准品,按前述的样品处理方法处理,气相色谱-质谱法平行测定 5 次,分别计算其回收率和相对标准偏差 (RSD)。从表 3 可以看出,7 种药物的回收率在 63.20~88.23%,

相对标准偏差 7.02~16.89%,完全满足分析的要求。

2.2.6 实际样品分析

为了解目前市场上腊肠类肉制品中镇静剂类药物的残留情况,本文对本地区销售的五个典型腊肠样品 (样 1~样 5) 进行了检测分析。结果表明,所有供试的样品中均未检测到镇静剂类药物残留。

3 结论

本研究建立了利用 GC-MS 法同时测定肉制品中七种镇静剂类药物残留的新方法。该方法具有检测限低、快速准确、操作简便的特点,适合腊肠这类复杂基质中镇静剂类药物的检测。新建立的 GC-MS 法可以作为现有检测方法的有效补充,适合在大多数检测机构中推广使用。

参考文献

- [1] Miller EI, Wylie FM, Oliver JS. Detection of benzodiazepines in hair using ELISA and LC-ESI-MS-MS [J]. J. Anal. Toxicol., 2006, 30(7): 441-448
- [2] Yue N, Wu L, Li L, et al. Multi-residue detection of benzodiazepines by ELISA based on class selective antibodies [J]. Food Agr. Immunol., 2009, 20(4): 281-293
- [3] Cerkvenik-Flajs V. Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Anal. Chim. Acta., 2007, 586(1-2): 374-382
- [4] 吕飞,朱事康,黄刚,等.高效液相色谱法检测猪肉中安眠酮残留量[J].食品科学,2010,31(18):295-297

LV Fei, ZHU Shi-kang, HUANG Gang, et al. Determination of methaqualone residues in pork by high performance liquid

- chromatography [J]. Food Science, 2010, 31(18): 295-297
- [5] Kim J, Lee S, In S, et al. Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC-MS/MS and its application to human and rat hair [J]. J. Chromatogr. B., 2011, 879(13-14): 878-886
- [6] Nakamura M, Ohmori T, Itoh Y, et al. Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a high-resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds [J]. Biomed. Chromatogr., 2009, 23(4): 357-364
- [7] 周德刚, 闫小峰, 翟淑平, 等. 液相色谱串联质谱法测定猪肉中的安定残留[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(11): 24-26
ZHOU De-gang, YAN Xiao-feng, ZHAI Shu-ping, et al. Determination of diazepam with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in swine muscle [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2008, 42(11): 24-26
- [8] 孙雷, 张骊, 徐倩, 等. 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[J]. 色谱, 2010, 28(1): 38-42
SUN Lei, ZHANG Li, XU Qian, et al. Determination of ten sedative residues in pork and kidney by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(1): 38-42
- [9] 汪丽萍, 李翔, 孙英, 赵海香, 等. 气相色谱/质谱法测定猪肉中 4 种苯二氮类镇静剂残留[J]. 分析化学, 2005, 33(7): 951-954
WANG Li-ping, LI Xiang, SUN Ying, et al. Determination of four benzodiazepines residues in pork using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(7): 951-954
- [10] 朱馨乐, 刘琪, 李丹, 等. 气相色谱-质谱法快速测定猪尿中地西洋[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(1): 28-30
ZHU Xin-le, LIU Qi, LI Dan, et al. Determination of diazepam in swine urine by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(1): 28-30
- [11] Papoutsis II, Athanaselis SA, et al. Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology [J]. J Pharmaceut. Biomed. Anal., 2010, 52(4): 609-614
- [12] Kinani S, Bouchonnet S, Milan N, et al. A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J. Chromatogr. A., 2007, 1141: 131-137
- [13] Zhao H, Wang L, Qiu Y, et al. Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of three barbiturates in pork by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) following microwave assisted derivatization [J]. Ana. Chim. Acta., 2007, 586(1-2): 399-406