

气相色谱/质谱法测定猪肉中 4 种苯二氮䓬类镇静剂残留

汪丽萍^{1,2} 李翔¹ 孙英² 赵海香^{2,3} 邱月明^{*1} 仲维科¹
唐英章¹ 王大宁¹ 周志强^{*2}

¹ (中国检验检疫科学研究院, 北京 100025) ² (中国农业大学应用化学系, 北京 100094)

³ (河北北方学院, 张家口 075131)

摘 要 建立了同时测定猪肉中 4 种苯二氮䓬类药物 (地西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑) 残留量的固相萃取/气相色谱/质谱方法。用乙腈提取药物, C_{18} 固相萃取柱净化, GC/MS 分析。运用 HP-5 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) 进行分离, 电子轰击电离源 (EI) 质谱选择离子模式 (SM) 检测 (地西洋 m/z 241、256、257、284; 艾司唑仑 m/z 205、239、259、294; 阿普唑仑 m/z 204、273、279、308; 三唑仑 m/z 238、313、315、342), 外标法定量 (定量离子 m/z 分别为 256、259、270 和 313)。4 种苯二氮䓬类药物的标准曲线线性回归系数均在 0.99 以上, 地西洋线性范围超过 5 ~ 100 μ g/L; 回收率为 60% ~ 70%; 相对标准偏差 7.6% ~ 12.9%, 最低检出限为 2 μ g/kg。艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑 3 种药物的线性范围超过 50 ~ 1000 μ g/L; 回收率为 60% ~ 115%; 相对标准偏差 3.8% ~ 19.7%, 检出限为 10 μ g/kg。

关键词 地西洋, 艾司唑仑, 阿普唑仑, 三唑仑, 固相萃取, 气相色谱/质谱, 猪肉

1 引言

苯二氮䓬类镇静剂属于一类生长促进剂, 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。也用在屠宰和动物检疫之前, 或将动物转移屠宰之前, 起镇静作用, 以减轻动物紧张状态。因该类物质对人体中枢神经系统会造成不良反应, 为此许多国家将此类物质列入禁用药物。

国内外有关检测苯二氮䓬类药物残留的文献报道较多, 主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[1,2]、气相色谱法 (GC)^[3,4]、薄层色谱法 (TLC)^[5]、气/质联用法 (GC/MS)^[6~8]、液/质联用法 (LC/MS)^[9,10] 等; 其样品前处理技术得到了快速发展, 主要有液/液萃取 (LLE)^[11]、固相萃取 (SPE)^[12,13]、固相微萃取 (SPME)^[14,15] 等; 报道涉及的样品主要为血、尿, 而对动物组织的检测报道相对较少。GC/MS 测定猪肉中巴比妥类药物残留方法已有报道^[16], 本实验建立了以 C_{18} 固相萃取柱预处理, GC/MS 法检测猪肉中 4 种苯二氮䓬类镇静剂残留量的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

6890N/5973I 气质联用仪和 7683 型自动进样器 (美国 Agilent 公司); 色谱柱: HP-5 柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m); 载气高纯 He (1.1 mL/min); 不分流进样 1 μ L; 进样口温度 300 $^{\circ}$ C; 柱温: 70 $^{\circ}$ C (15 min) / 300 $^{\circ}$ C (4 min); 传输线温度 280 $^{\circ}$ C; 四极杆温度 150 $^{\circ}$ C; 离子源温度 230 $^{\circ}$ C; 电子轰击电离源 (EI, 70 eV), 选择离子模式 (SM): 地西洋 m/z 241、256、257、284; 艾司唑仑 m/z 205、239、259、294; 阿普唑仑 m/z 204、273、279、308; 三唑仑 m/z 238、313、315、342。

地西洋、艾司唑仑、阿普唑仑和三唑仑标准品 (中国药品生物制品鉴定所), 含量均大于 99.0%, 4 种药物均配成 1000 mg/L 无水甲醇标准储备溶液, 移取适量的标准储备溶液配成含地西洋 50 μ g/L, 艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑 500 μ g/L 的混合标准溶液; pH 7 的 K_2HPO_4 缓冲溶液, 称取一定量的 K_2HPO_4 溶解在水中, 用磷酸调 pH 至 7; 甲醇、丙酮、正己烷、乙酸乙酯均为农残级 (瑞士 Fluka 公司); 其他试剂均为国产分析纯; C_{18} 固相萃取柱, 3 mL, 500 mg (美国 Supelco 公司)。

2004-06-09 收稿; 2004-11-11 接受

本文系科技部食品安全专项课题 (No. 2001BA804A18) 资助

2 2 样品预处理

准确称取匀浆处理好的猪肉样品 5.0 g置于 50 mL 塑料离心管,加入适量的无水硫酸钠和 30 mL 乙腈,振荡器上振荡提取 1 h,离心分离固体组织颗粒和有机相(4000 r/min, 5 min),上清液转入 250 mL 分液漏斗中,重复振荡离心操作一次,加 40 mL 正己烷,振荡 5 min,静置 20 min使之分层。乙腈液收集于 100 mL 蒸馏瓶在旋转蒸发仪上蒸发至近干,残留物中加入 10 mL K_2HPO_4 缓冲溶液,涡动溶解,供固相萃取上样用。

C_{18} 柱依次用 5 mL 洗脱液(正己烷:丙酮,5:5,V/V)、5 mL 甲醇和 5 mL 蒸馏水活化,将上述 K_2HPO_4 溶液直接上样,依次用 5 mL 蒸馏水和 10 mL 正己烷淋洗柱子,然后用(正己烷:丙酮,5,V/V)洗脱液洗脱,收集洗脱液 6 mL 于 10 mL 离心试管中,将收集的洗脱液在 40℃下氮气吹干,用乙酸乙酯定容 1 mL。

3 结果与讨论

3 1 色谱图

图 1 中 a、b 和 c 分别是猪肉空白样品、4 种药物混合标准溶液和添加样品的总离子流色谱图。从图中可以看出, C_{18} 柱净化效果良好,4 种药物附近没有明显干扰峰。

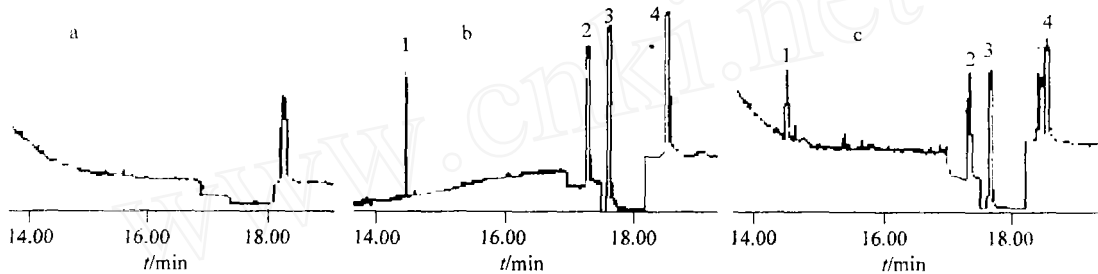


图 1 典型总离子流色谱图

Fig 1 Typical total ion current chromatogram

a 猪肉空白 (drug-free pork sample); b 4 种药物标准混合液 (mixture of four standard benzodiazepines): 1. 20 $\mu\text{g/L}$, 2 ~ 4. 100 $\mu\text{g/L}$; c 添加样品 (drug-free pork fortified with four benzodiazepines); 1. 4 $\mu\text{g/kg}$, 2 ~ 4. 20 $\mu\text{g/kg}$ 。色谱峰 (chromatographic peaks): 1. 地西泮 (diazepam); 2. 艾司唑仑 (estazolam); 3. 阿普唑仑 (alprazolam); 4. 三唑仑 (triazolam)。

3 2 标准曲线的绘制

分别取含地西泮 5、10、20、25、50、100 $\mu\text{g/L}$, 艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑各 50、100、200、250、500 和 1000 $\mu\text{g/L}$ 的标准混合液进样。以药物浓度对药物峰面积线性回归,得各药物的回归方程及线性回归系数 (见表 1)。

表 1 标准曲线方程和线性回归系数

Table 1 The linear equations and regression coefficients of the calibration curves

标准品 Samples	线性方程 Linear equations	回归系数 Regression coefficients	标准品 Samples	线性方程 Linear equations	回归系数 Regression coefficients
地西泮 Diazepam	$Y = 144.26X + 506.99$	0.999	艾司唑仑 Estazolam	$Y = 26.774X + 342.68$	0.9985
阿普唑仑 Alprazolam	$Y = 32.706X + 686.25$	0.9991	三唑仑 Triazolam	$Y = 24.113X + 29.345$	0.9958

Y. 峰面积 (peak area); X. 药物标准液浓度 (concentration of standard solution) ($\mu\text{g/L}$)

3 3 样品处理条件的考察及优化

对比了甲醇和乙腈的提取效果,使用乙腈提取干扰物相对较少,同时加入适量无水硫酸钠即可除去基质中的水分,又有盐析作用,有利于药物提取。利用正己烷-乙腈液分配除去脂肪。因苯二氮䓬类药物为极性药物,提取溶剂乙腈的残留对回收率的影响较大,须将提取溶剂吹干再用 K_2HPO_4 缓冲溶液溶解上样,避免造成穿漏。考察二氯甲烷、不同配比的正己烷-氯仿以及正己烷-丙酮溶液的洗脱净化效

果和回收率,同时综合考虑溶剂用量、溶剂毒性及普适性,选择 6 mL 正己烷 丙酮 (5 5, V/V)作为洗脱剂。图 2 为固定洗脱体积为 6mL,不同比例的正己烷 丙酮洗脱 4 种药物的洗脱曲线。由图 2 可知,用 6 mL 正己烷 丙酮 (5 5, V/V)作洗脱剂,药物回收率基本稳定。

3 4 方法的回收率和精密度

分别在 5 g 空白猪肉样品中加入不同量的标准品,涡动混匀,室温放置过夜。按前述样品处理方法处理,气相色谱 质谱测定,分别计算其相对标准偏差 (RSD)及回收率 (见表 2)。

按照 SN/T0001-1999 的有关规定,在 $\mu\text{g/kg}$ 浓度级别下,以上回收率和相对标准偏差数据完全满足残留检测的要求。在本实验的色谱及检测条件下, $S/N = 3$ 时,地西洋的检出限为 $2\text{ }\mu\text{g/kg}$,艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑的检出限为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

表 2 不同加标浓度苯二氮䓬类药物在猪肉样品中的回收率 (n = 6)

Table 2 The recoveries of four benzodiazepines in porks fortified with different concentrations (n = 6)							
样品 Samples	加标浓度 Concentration fortification ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)	样品 Samples	加标浓度 Concentration fortification ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
地西洋 Diazepam	10	60.0	12.9	艾司唑仑 Estazolam	50	67.6	19.7
	20	60.8	11.1		100	92.2	13.4
	50	68.1	7.6		200	98.9	6.1
阿普唑仑 Alprazolam	50	101.7	8.9	三唑仑 Triazolam	50	110.9	10.3
	100	91.9	11.1		100	96.0	9.8
	200	98.4	3.8		200	98.8	5.3

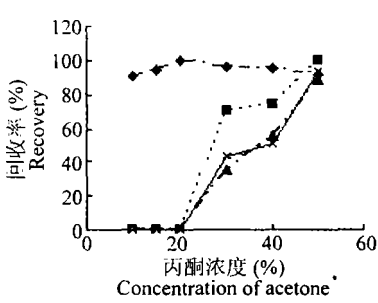


图 2 正己烷 丙酮洗脱分布图
Fig 2 Elution pattern of n-hexane-acetone
() 地西洋 (diazepam); (■) 艾司唑仑 (estazolam); (×) 三唑仑 (triazolam); (▲) 阿普唑仑 (alprazolam)。

3 5 阳性样品确证条件的确定及实际样品的测定

确定 4 种药物的确证条件为:样品与标准品保留时间符合;选择的离子在质谱图中出现,猪肉空白质谱图与药物质谱图对照,确证空白中无相关干扰;样品峰质谱离子的相对丰度与标准品峰质谱离子的相对丰度的相对标准偏差小于 10%。地西洋浓度为 $50\mu\text{g/L}$,艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑分别为 $100\mu\text{g/L}$ 时,添加药物和标准溶液的质谱图中,各离子相对丰度的相对标准偏差见表 3。利用上述方法对从北京地区市场购买的猪肉样品进行提取、净化,气相色谱 质谱定量分析。检测结果没有发现呈阳性样品。

表 3 苯二氮䓬类药物的检测离子强度重复性 (n = 7)

Table 3 Repeatability of the percentage of fragment ions for the four benzodiazepines (n = 7)									
分析物 Analyte	保留时间 Retain time (min)	RSD (%)	基峰 Basic peak	离子 bn		离子 bn		离子 bn	
				m/z	RSD (%)	m/z	RSD (%)	m/z	RSD (%)
地西洋 Diazepam	14.51	0.026	256	241	5.9	257	4.7	284	5.7
艾司唑仑 Estazolam	17.38	0.031	259	205	8.0	239	6.9	294	5.3
阿普唑仑 Alprazolam	17.72	0.028	279	204	4.5	273	5.2	308	4.4
三唑仑 Triazolam	18.61	0.020	313	238	8.3	315	7.4	342	5.9

References

1 Huang Shixin(黄士新), Shen Fulin(沈富林), Cao Ying(曹莹). China Feed(中国饲料), 2001, 1: 1~42
2 Martin D, Shearer G. J. Chromatogr, 1992, 624: 471~477
3 Louter A J H, Bosma E, Schipperen J C A, Vreuls J J, Brinkman U A Th. J. Chromatogr B, 1997, 689: 35~43
4 Krog M, Grefslie H, Rasmussen K E. J. Chromatogr B, 1997, (689): 357~364
5 Li Taiping(李太平). Chinese Journal of Pharmacy(中国医院药学杂志), 1996, 16(9): 418~419
6 Borrey D, Meyer E, Lambert W, Peteghen C V, Leenheer A P De. J. Chromatogr B, 2001, 765: 187~197
7 Omos-Camona M, Hernandez-Carrasquilla M. J. Chromatogr B, 1999, 734: 113~120

- 8 Inoue H, Maeno Y, Iwasa M, Matoba R, Nagao M. *Forensic Sci Int*, **2000**, (113): 367 ~ 373
- 9 Kumazawa T, Seno H, Watanabe-Suzuki K, Hattori H, Ishii A, Sato K, Suzuki O. *J. Mass Spectrometry*, **2000**, 35: 1091 ~ 1099
- 10 Liu Z. *J. Pharm. Biomed Anal*, **2001**, 26(2): 321 ~ 330
- 11 Carlsen S, Hayes M, Powell M L. *J. Pharm. Biomed Anal*, **1995**, 13(3): 313 ~ 318
- 12 Wang Songcai(王松才), Xing Ruokui(邢若葵), Dai Weilie(戴维列). *Public Security Science*(广东公安科技), **2002**, (3): 17 ~ 20
- 13 Xing Ruokui(邢若葵), Wen Jinfeng(温锦峰), Wang Songcai(王松才). *Forensic Science and Technology*(刑事技术), **2003**, 3: 12 ~ 15
- 14 van Hout M W J, de Zeeuw R A, de Jong G J. *J. Chromatogr A*, **1999**, (858): 117 ~ 122
- 15 van Hout M W J, van Egnond W M A, Franke J P, de Zeeuw R A, de Jong G J. *J. Chromatogr B*, **2001**, 766: 37 ~ 45
- 16 Zhao Haixiang(赵海香), Qiu Yueming(邱月明), Wang Liping(汪丽萍), Qiu Jing(邱静), Zhong Weike(钟维科), Tang Yingzhang(唐英章), Wang Daning(王大宁), Zhou Zhiqiang(周志强). *Chinese J. Anal Chem.*(分析化学), **2005**, 33(6): 777 ~ 780

Determination of Four Benzodiazepines Residues in Pork Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Wang Liping^{1,2}, Li Xiang¹, Sun Ying², Zhao Haixiang^{2,3}, Qiu Yueming^{*1}, Zhong Weike¹,
Tang Yingzhang¹, Wang Daning¹, Zhou Zhiqiang^{*2}

¹ (Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025)

² (College of Applied Chemistry, Agricultural University of China, Beijing 100094)

³ (Hebei North University, Zhangjiakou 075131)

Abstract Solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-mass spectrometric method have been developed for the determination of diazepam, estazolam, alprazolam and triazolam residues in pork. The conditions for extraction and cleanup on C₁₈ column of benzodiazepines were investigated and optimized. The analytes were separated by HP-5 chromatographic column, detected by mass detector in electron impact and time program-selected ion monitoring mode (EI/SM) and quantified with the external standard calibration curve method. Linear calibration curves were obtained in the concentration ranges from 5 to 100 µg/L for diazepam and from 50 to 1000 µg/L for estazolam, alprazolam and triazolam (the correlation coefficients were above 0.99). The average recoveries for the four benzodiazepines spiked in pork ranged from 60% to 115% and their relative standard deviations were between 3.8% and 19.7%. The limits of detection were 2 µg/kg for diazepam and 10 µg/kg for estazolam, alprazolam and triazolam in pork.

Keywords Diazepam, estazolam, alprazolam, triazolam, solid phase extraction, gas chromatography-mass spectrometry, pork

(Received 9 June 2004; accepted 11 November 2004)