超高效液相色谱—串联质谱法检测六种动物组织中盐酸氯丙嗪残留

李丹妮,黄士新,张文刚,张　鑫
(上海市兽药饲料检测所,上海　201103)

[收稿日期]2009-09-01　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2010)02-0007-05　[中图分类号]S859.84

[摘　要] 建立了检测六种动物组织中盐酸氯丙嗪残留的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC/MS/MS)分析方法。样品经碱性乙醚提取,浓缩后用甲醇溶解,经超高液相色谱-串联质谱在多反应检测(MRM)模式下测定。在3 min以内完成盐酸氯丙嗪的定量分析。结果显示盐酸氯丙嗪标准曲线在0.2～100 μg/L浓度范围内线性良好,标准溶液中D_3-氯丙嗪内标浓度为固定值5 μg/L。线性相关系数(r)为0.999 8;在0.5、1、5、10 μg/kg添加水平下,盐酸氯丙嗪的加标回收率在83%～104%,相对标准偏差(RSD)均小于10%(n=6);本方法对六种动物组织中盐酸氯丙嗪的定量限为0.5μg/kg(S/N>10),检出限为0.2 μg/kg(S/N>3)。

[关键词] 盐酸氯丙嗪;动物组织;残留;超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of Chlorpromazine Hydrochloride Residue in Six Kinds of Animal Tissues by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Dan-Ni, HUANG Shi-xin, ZHANG Wen-gang, ZHANG Xin
(*Shanghai Municipal Institute of Veterinary Drug and Feedstuff Control, Shanghai, 201103; China*)

Abstract: A simple, sensitive and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UPLC/MS/MS) method has been developed for the quantification of chlorpromazine hydrochloride residue in six kinds of animal tissues. Chlorpromazine hydrochloride extracted by alkaline ether from animal tissue, was finally dissolved in the methanol after the procedure of being concentration. The sample was separated on BEH C_{18} (100 mm×2.1 mm i.d., 1.7 μm) column using a mobile phase of acetonitrile/5 mmmol/L ammonium acetate. Chlorpromazine hydrochloride was detected in positive ion mode using multiple reactions monitoring (MRM). The quantitative analysis was finished in 3.0 min. Results showed that in the range of 0.2 to 100 μg/L the standard curves for chlorpromazine hydrochloride were in good linearity, concentration of internal standard (D_3-chlorpromazine) was 5 μg/L and the correlation coefficients (r) were 0.999 8. The recoveries for chlorpromazine at the addition of four levels (0.5, 1, 5, 10 μg/kg) were 83%～104% and the relative standard deviation (RSD) for the determination of chlorpromazine were less than 10% (n=6). The limits of quantity (S/N≥10) and limits of detection (S/N≥3) by the present method for chlorpromazine hydrochloride were found to be 0.5 μg/kg and 0.2 μg/kg, respectively.

Key words: chlorpromazine hydrochloride; animal tissue; residue; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

作者简介:李丹妮(1978年-),女,畜牧师,从事兽药残留检测。E-mail: yure@yeah.net

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

氯丙嗪(Chlorpromazine,结构见图 1)又称冬眠灵,属于吩噻嗪类药物,是抗精神病类药的一种[1]。作为一种治疗药物在兽医临床上具有广泛的药理作用[2],涉及中枢神经、植物神经、心血管和内分泌系统等方面,其中主要被用作镇静药。一些养殖户因经济利益的驱使,在饲料中违规添加氯丙嗪抑制动物的运动,从而间接起到催肥作用。在动物运输过程中使用,可降低动物的维持需要和减少途中失重、死亡率。氯丙嗪在家畜饲养中的滥用,不仅会引起动物的中毒,还会通过在动物性食品的残留直接危害到人类。欧盟早已将氯丙嗪列入禁用清单中,我国也规定氯丙嗪禁止用于食品性动物。

目前国际上比较成熟的氯丙嗪残留检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法[3]、气质联用(GC/MS)法[2]和液质联用(LC/MS和LC/MS/MS)法[4-5]等,并越来越趋向于用高灵敏度、高特异性的液相色谱串联质谱仪进行检测。本研究采用超高效液相-串联质谱(UPLC/MS/MS)技术,建立了六种动物组织中盐酸氯丙嗪残留量的检测方法。本方法采用氘代氯丙嗪作为内标物质,具有定量准确,灵敏度高,检出限低,操作简单,分析时间短,适用样品类型广的优点。

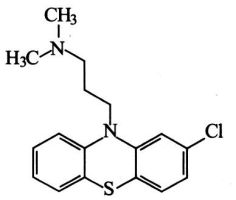


图 1 氯丙嗪化学结构

1 材料和方法

1.1 仪器 超高效液相色谱-串联质谱仪 UPLC/Quattro Premier XE,Waters公司;MassLynx v4.1质谱工作站软件;漩涡振荡器;PT-MR2100组织匀浆机,瑞士 Kinematice公司;CL3R冷冻离心机,美国 IEC公司;Laborota 4000旋转蒸发器,德国 Heidolph公司。

1.2 药品与试剂 盐酸氯丙嗪对照品,纯度≥95%,Sigma公司;同位素内标对照品(氯丙嗪-D_3)浓度 100 μg/mL,CIL公司;甲醇、叔丁基甲醚,色谱纯,Merck公司;乙醚、氢氧化钠、乙酸铵、乙酸乙酯均为分析纯,上海生工;实验用水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 液相色谱和质谱条件 Acquity UPLC BEH C_{18}(100 mm×2.1 mm),粒径 1.7 μm(waters公司),柱温 40 ℃;进样量 10 μL;流动相为乙腈∶5 mmol/L乙酸铵溶液(80∶20,*V*/*V*);流速 0.2 mL/min;电喷雾离子源,正离子电离(ESI^+);多反应监测(MRM);毛细管电压 3.0 kV;离子源温度 110 ℃;脱溶剂气流量 700 L/h;锥孔气流量 50 L/h;去溶剂温度 350 ℃;碰撞气(Ar)流量 0.24 mL/min;碰撞室压力 3.8×10^{-3} Pa。分析中以保留时间和离子对(母离子和两个子离子)的信息比较进行定性分析;氯丙嗪和氘代氯丙嗪分别以碎片离子 *m*/*z* 86.2和 89.2进行内标法定量。经过优化的质谱参数见表 1。

表 1 盐酸氯丙嗪及氘代氯丙嗪的母离子、子离子及质谱参数

化合物	母离子(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
盐酸氯丙嗪	319.2	58.2,86.2	25	25,18
氘代氯丙嗪	322.2	61.2,89.2	25	25,18

1.3.2 标准溶液的配制 准确称取盐酸氯丙嗪对照品 10 mg至 10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度使成浓度约为 1 mg/mL的标准贮备液,2～8 ℃冷藏保存,有效期 6个月;准确量取标准储备液 1 mL至 100 mL容量瓶中,用甲醇稀释成浓度为 10 μg/mL的盐酸氯丙嗪标准工作液,2～8 ℃冷藏保存,有效期 1个月;准确量取标准储备液适量,氯丙嗪-D_3贮备液用甲醇稀释成 200 μg/L的工作液。

分别准确量取盐酸氯丙嗪工作液(10 μg/mL)和氯丙嗪-D_3工作液(200 μg/L),再用甲醇逐级稀释,制得盐酸氯丙嗪浓度分别 0.20、0.50、1.00、5.00、10.0、50.0、100 μg/L的系列标准溶液,内标氯丙嗪-D_3浓度为 5 μg/L的混合标准工作溶液,临用现配。

1.3.3 样品的前处理 动物组织(牛肉、鸡肉、猪肉、猪肝、猪肾、猪心)样品切成小块后用匀浆机粉碎,准确称取匀浆后的样品 2.0 g于 50 mL离心管中,添加氯丙嗪-D_3工作液(200 μg/L)50 μL,充分混匀。在样品中加入含氢氧化钠浓度为 10 mmol/L的碱性乙醚 10 mL,充分振荡,7 000 r/min离心 10 min,将上清液转移至 50 mL梨形瓶中,在离心管中再加入同样 10 mL碱性乙醚重复提取一次,合并上清液,旋转蒸发(50 ℃)至干。用甲醇 2.0 mL溶解残余物,经 0.22 μm滤膜过滤后进样测定。

1.3.4 样品回收率与精密度 选取六类动物性食品组织的代表性空白样品(牛肉、鸡肉、猪肉、猪肝、

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

猪肾、猪心),准确称取匀浆后的样品 2.0 g于 50 mL离心管中,分别添加浓度为 10.0 μg/L的盐酸氯丙嗪工作液 0.1、0.2、1、2 mL至样品中,制得添加浓度分别为 0.5、1、5、10 μg/kg样品。按照本方法确定的条件进行加标回收重复性试验,每个浓度重复测定 6次,计算回收率及相对标准偏差。

1.3.5　检测限和定量限　取空白样品,按上述步骤操作,测得噪音信号的平均值,按信噪比 ≥3为检测限,信噪比 ≥10为定量限。

2　结　果

2.1　超高液相色谱 - 串联质谱的测定　结果见图 2～图 6。六种动物组织在利用本方法进行前处理后进行检测,均显示出去除杂质干扰效果好,基质效应小的特点,在此仅以猪肝和猪心两种组织为例列图说明。

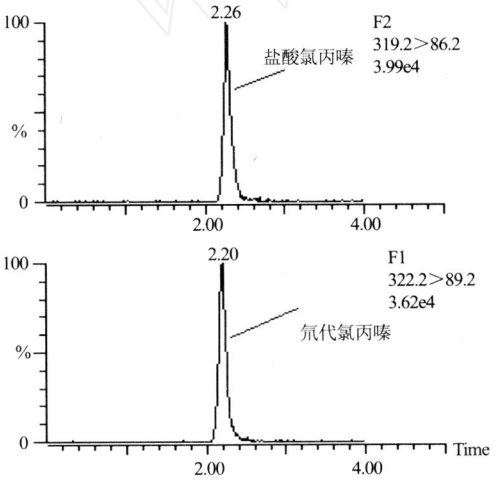


图 2　盐酸氯丙嗪及氘代氯丙嗪标准溶液 MRM 色谱图
(标准品浓度为 5 μg/L)

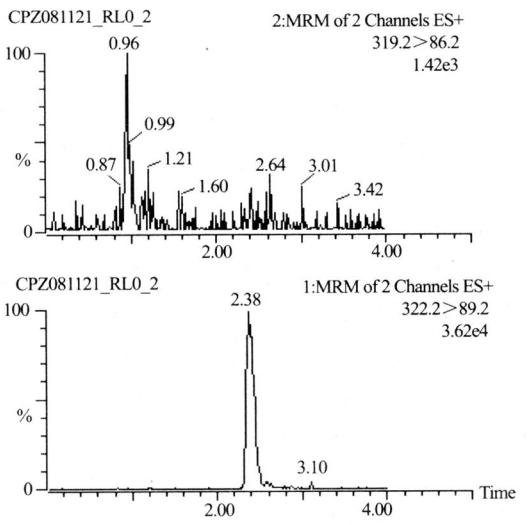


图 3　猪肝空白样品 MRM 图

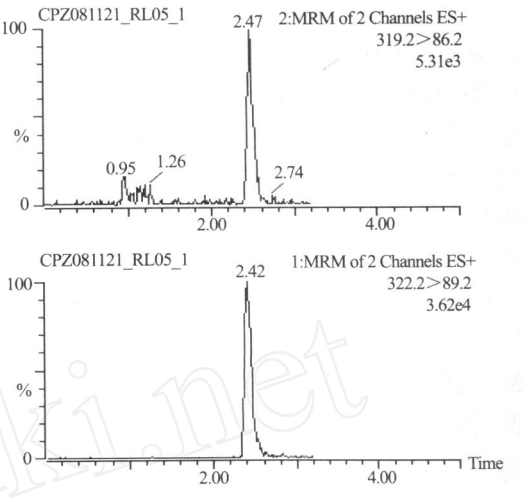


图 4　猪肝添加样品 MRM 图
(盐酸氯丙嗪添加浓度 0.5 μg/kg)

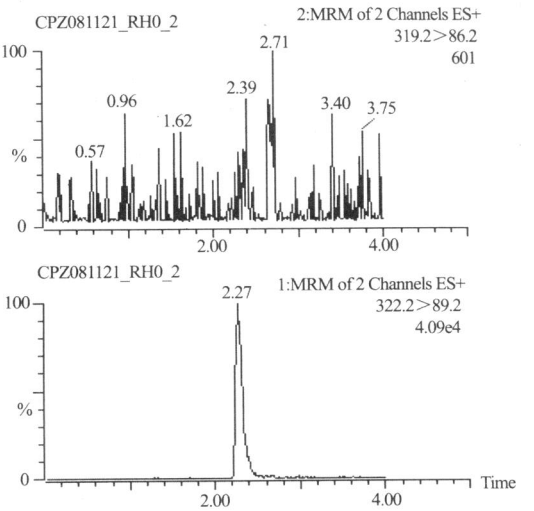


图 5　猪心空白样品 MRM 图

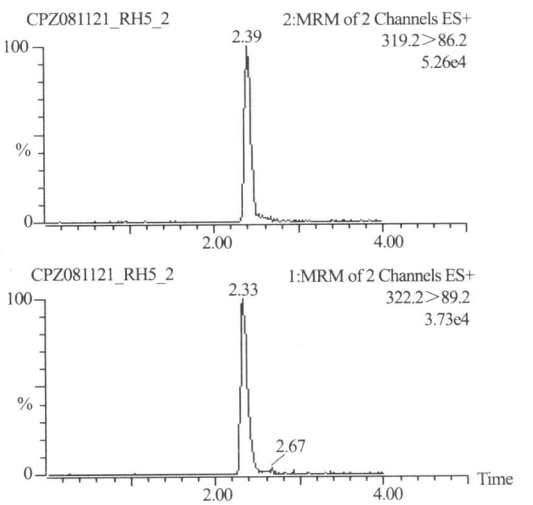


图 6　猪心添加样品 MRM 图
(盐酸氯丙嗪添加浓度 5.0 μg/kg)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2　标准曲线　在确定的仪器条件下用液相色谱-串联质谱测定盐酸氯丙嗪工作液,标准工作液浓度为 0.20、0.50、1.00、5.00、10.0、50.0、100 μg/L,以定量离子色谱峰面积与内标的峰面积比为纵坐标,标准溶液的浓度为横坐标,绘制标准曲线。盐酸氯丙嗪在 0.2～100 μg/L 浓度范围内线性良好,标准溶液中内标 D_3-氯丙嗪浓度为固定值 5 μg/L。线性方程为 $A_{盐酸氯丙嗪} = -0.046\,646\,9 + 1.075\,82C$,线性相关系数 $r = 0.999\,8$。

2.3　回收率和精密度　选择六种动物组织的空白样品,按照本方法确定的条件进行加标回收重复性试验。实验表明,盐酸氯丙嗪的加样回收率在 83%～104%,相对标准偏差均 ≤10%,表明采用本方法测定六种动物组织中盐酸氯丙嗪具有较好的精密度、重复性。统计结果见表 2。

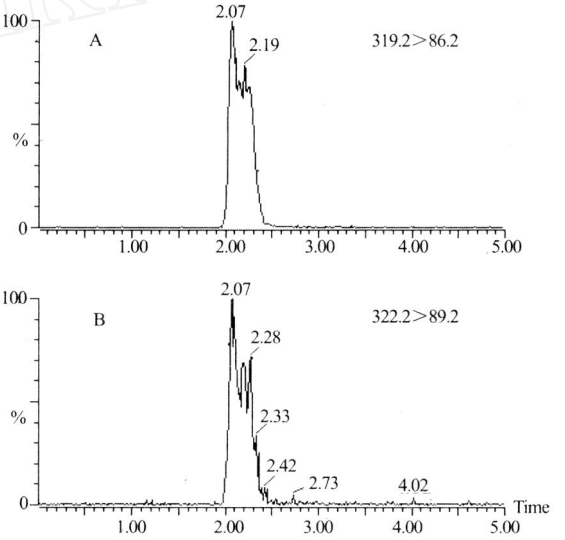
表 2　六种动物组织中添加盐酸氯丙嗪的回收率和精密度 ($n = 6$)

样品	添加量/(μg·kg^{-1})	回收率/%	相对标准偏差/%
猪肝	0.5	89	6.4
	1	89	7.1
	5	104	4.3
	10	88	5.0
牛肉	0.5	96	6.0
	1	83	3.9
	5	99	6.7
	10	88	5.0
猪肉	0.5	96	8.2
	1	89	5.2
	5	83	2.5
	10	93	4.1
猪心	0.5	85	7.2
	1	90	5.6
	5	93	4.5
	10	101	4.3
猪肾	0.5	94	6.0
	1	104	2.8
	5	97	7.3
	10	91	3.7
鸡肉	0.5	95	5.7
	1	85	3.9
	5	84	3.4
	10	88	3.8

2.4　定量限和检出限　通过组织样品加标的测定,方法最低检出限为 0.2 ug/kg,方法最低定量限为 0.5 ug/kg。

3　讨　论

3.1　液相条件的优化　由于盐酸氯丙嗪的胺类结构存在着与固定相表面游离硅醇基之间的离子交换或氢键作用,使胺类物质的色谱峰拖尾。由图 7可以看出通常的流动相如乙腈-水不适合作为盐酸氯丙嗪检测的流动相。在流动相中加入一定比例的铵盐,可以竞争、抑制或掩蔽固定相表面的游离硅醇基活性,使碱性药物易于出峰,改善峰形。经优化考察乙酸铵是较理想的流动相,可有效抑制拖尾,增强电离作用,因此最终选择乙腈-5 mmol/L 乙酸铵 (80∶20, V/V) 作为流动相,流速 0.2 mL/min,在该流动相条件下的色谱图见图 2 所示。

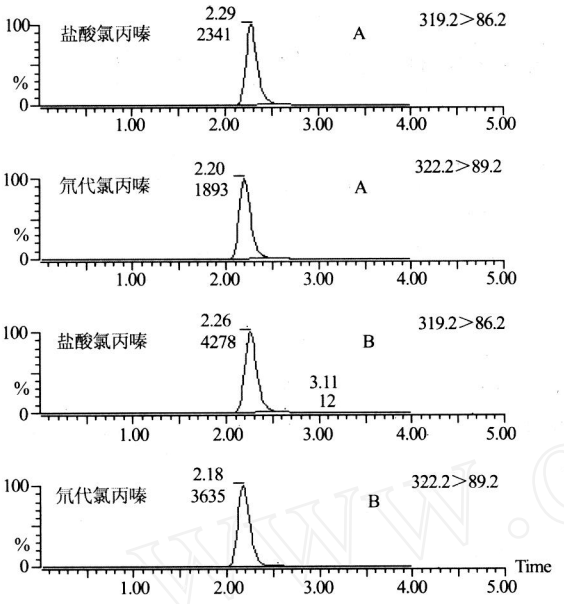


A. 盐酸氯丙嗪; B. 氘代氯丙嗪

图 7　乙腈-水 (50∶50) 流动相条件下盐酸氯丙嗪及内标的 MRM 色谱图

3.2　工作液稀释溶剂的选择　标准品的稀释溶剂会对色谱的选择性及样品在质谱检测中的电离特性产生影响,因此选择适当的工作液稀释溶剂,可以提高检测的灵敏度。在方法研制过程中我们分别利用纯甲醇、纯乙腈、乙腈水 (50∶50)、乙腈水 (80∶20) 等不同的溶剂进行标准品工作溶液的配置,经过实验发现,纯甲醇配置的标准品工作液,质谱峰形和灵敏度均最佳。图 8中 A 图为采用乙腈作为溶剂配置的浓度为 5 ng/mL 的标准品图谱,B 图为采用甲醇作为溶剂配置的浓度为同等浓度的标准品图谱,经比较发现,盐酸氯丙嗪峰面积响应值相差近一倍,因此选择甲醇作为标准品及最终样品进样的溶剂是最恰当的。同样样品溶剂也确定为甲醇。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A -乙腈; B -甲醇

图 8　两种溶剂配置的 5 μg/L盐酸氯丙嗪标准溶液 MRM色谱图

3.3　样品前处理方法的确定　盐酸氯丙嗪为脂溶性药物,比较常规有机试剂乙腈、乙酸乙酯、叔丁基甲醚、乙醚、碱性乙醚、碱性乙酸乙酯提取效果,使用以上提取试剂,对盐酸氯丙嗪添加水平在 10 ug/kg的猪肝进行的比较,结果见表 3。

经比较发现碱化的有机试剂提取效果比较好,与碱性乙酸乙酯相比碱性乙醚的提取液提取出组织中脂肪较少,有利于检测,故选择碱性乙醚作为提取剂。为了减少提取步骤中的损失,最终确定了一步提取方法。

表 3　猪肝中 10 ug/kg盐酸氯丙嗪添加浓度采用不同提取试剂所得到的回收率

提取试剂	回收率/%
乙腈	62
乙酸乙酯	57
叔丁基甲醚	45
乙醚	68
碱性乙醚	96
碱性乙酸乙酯	83

3.4　本方法灵敏度高,且前处理为一步提取法,提取步骤简单,在 3 min内可完成检测过程,体现了方法简单、快速、高效的特点。

参考文献:

[1] 李　婷,周启星. 氯丙嗪生态毒理效应与人体健康影响研究与展望[J]. 生态学杂志, 2006, 25(12): 1554 - 1558.

[2] 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.

[3] 范盛先,黄玲利,袁崇辉,等. 猪肾脏中氯丙嗪和异丙嗪残留检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(4): 412 - 413, 416.

[4] Guodong Zhang, Alvin V Terry Jr, Michael G Bartlett Sensitive Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of the Lipophilic Antipsychotic Drug Chlorpromazine in Rat Plasma and Brain Tissue [J]. J Chromatogr B, 2007, 854: 668 - 676.

[5] Stephen McClean, Edmund J O'Kane, W F Smyth. Electrospray Ionisation - Mass Spectrometric Characterisation of Selected Anti - psychotic Drugs and Their Detection and Determination in Human Hair Samples by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 740(2): 141 - 157.

2010年国内动物疫病监测计划之二:高致病性猪蓝耳病监测计划

1　监测范围　猪。重点对种猪场、中小规模饲养场、交易市场和发生过疫情地区的猪进行监测。

2　监测时间　月度常规监测由各地根据实际情况安排。春秋季节各进行一次集中重点监测,分别在6月底前和 12月底前完成。发现可疑病例,随时采样,及时检测。

3　监测数量　月度常规监测数量由各地根据实际情况确定。各省全年监测数量:血清学样品不低于1200份,病原学样品不低于 400份。

4　检测方法

4.1　**血清学检测方法与判定**　(1)方法: ELISA; (2)判定:活疫苗免疫 28天后,高致病性猪蓝耳病 ELISA免疫抗体 IRPC值 >20为合格,存栏猪免疫抗体合格率 ≥70%时为群体免疫合格。

4.2　**病原学检测方法**　RT - PCR或荧光 RT - PCR检测方法。

5　病原学检测阳性样品及动物的处理　(1)对病原学检测结果为阳性的猪进行扑杀,并进行无害化处理; (2)将阳性情况按快报要求报告。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net