

固相萃取 - 超高效液相色谱串联质谱法 快速测定猪尿中的赛庚啶

曲 斌, 陆桂萍, 蒋天梅, 耿士伟, 朱志谦, 吴 玲

(江苏省畜产品质量检验检测中心, 南京 210036)

[收稿日期] 2012 - 10 - 08 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2013) 01 - 0028 - 04 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 建立了猪尿中赛庚啶的固相萃取 - 超高效液相色谱串联质谱的测定方法。猪尿样品经酸化, 混合型阳离子交换固相柱萃取后, 以超高效液相色谱串联质谱测定, 外标法定量。本方法的测定线性范围为 0.2 ~ 5.0 $\mu\text{g/L}$, 在 0.2、0.4、2.0 $\mu\text{g/L}$ 低、中、高三个浓度的回收率为 80% ~ 120%, 批内、批间精密度小于 20%。本方法简便、快速、灵敏, 经实际样品分析, 适用于猪尿中赛庚啶的定量测定和确证。

[关键词] 赛庚啶; 超高效液相色谱 - 串联质谱; 猪尿; 固相萃取; 残留

Simple, Rapid Determination of Cyproheptadine in Pig Urine by SPE - UPLC - MS/MS

QU Bin, LU Gui - ping, JIANG Tian - mei, GENG Shi - wei, ZHU Zhi - qian, WU Ling

(Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products, Nanjing, 210036, China)

Abstract: A simple and rapid UPLC - MS/MS method for determination of cyproheptadine in pig urine was developed. The sample of pig urine was acidified, and purified by SPE with mixed cation exchange column. The analyte was determined by UPLC - MS/MS with external standard for quantification. The linearity range of the method was between 0.2 and 5.0 $\mu\text{g/L}$ with good coefficient. The recoveries were between 80% and 120%, and precision was lower than 20% for low, middle and high concentrations. After the practice of real samples, it was shown that the method was simple, rapid, sensitive and suitable for monitoring the residue levels of cyproheptadine in pig urine.

Key words: cyproheptadine; UPLC - MS/MS; pig urine; SPE; residue

赛庚啶 (Cyproheptadine) 是一种人用处方药, 属抗组胺类药物, 可对抗体内组胺对血管、支气管平滑肌的作用, 从而消除过敏症状^[1]。违法添加赛庚啶在猪饲料中可产生刺激猪食欲的功能, 提高猪的生长速度和体重^[2]。食用含有赛庚啶残留的动物源性食品, 会对人体健康具有一定的危害性。赛庚啶作为一种人用药物, 并未列入欧盟法规 2377/90 的附件 1、2、3 中^[3], 根据欧盟指令 2001/82 的要

求^[4], 赛庚啶禁止作为兽药在动物中使用。目前, 我国农业部第 1519 号公告将赛庚啶列入禁止在饲料和动物饮水中使用的物质^[5]。因此, 为确保食品安全, 除了在饲料中建立赛庚啶的检测标准^[6]和方法^[7]外, 有必要建立动物源性食品及其相关产品中赛庚啶的含量测定与确证方法。动物尿液是畜产品质量安全监测的常见常用样本, 具有获得容易、基质简单等特点。本文结合实际工作需要, 建立了

固相萃取-超高效液相色谱串联质谱简便快速测定猪尿中赛庚啶的方法。

1 仪器与试剂

Waters Acquity 超高效液相色谱仪(含二元高压泵、自动进样器、柱温箱和 Empower2 数据处理系统), Thermo Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX 串联四极杆质量分析器(含 Xcalibur 1.4 数据处理系统), N-EVAP 112 氮吹仪, Organomation Associates 公司; KS 501 振荡器, IKA 公司; Sigma 3K30 离心机, Sartorius 公司。倍半水合盐酸赛庚啶(CAS: 41354-29-4), Sigma 公司。Oasis MCX Vac RC 混合型阳离子交换固相萃取柱(60 mg/20 mL), Waters 公司; PTFE(17 mm × 0.45 μm) 针式过滤器, National Scientific 公司; 乙腈, 色谱纯, Thermo Fisher 公司; 甲醇、盐酸、氨水, 分析纯, 南京化学试剂有限公司; 甲酸, 色谱纯, Tedia 公司; 水为纯净水。

2 标准溶液的配制

称取倍半水合盐酸赛庚啶对照品适量, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释定容, 摇匀, 得每 1 mL 含 100 μg 赛庚啶的储备液。

精密量取赛庚啶储备液适量, 以甲醇稀释, 制得每 1 mL 含 100 ng 赛庚啶的工作液。

3 样品处理

精密量取猪尿样品 5 mL, 加入 0.1 mol/L 盐酸-甲醇(80:20)溶液 15 mL, 涡旋混匀 10 min, 4 °C 下 10000 r/min 离心 5 min, 上清液备用过 MCX 固相萃取柱。

Oasis MCX Vac RC(60 mg/20 mL) 固相萃取柱, 依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 活化, 上清液过柱, 水 5 mL、甲醇 5 mL 依次淋洗后, 抽干, 5% 氨化甲醇 3 mL 洗脱, 收集洗脱液, 50 °C 水浴氮气流下吹干, 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(10:90) 1 mL 溶解残渣, 0.45 μm 滤膜过滤后, UPLC-MS/MS 分析测定。

4 UPLC-MS/MS 分析

4.1 超高效液相色谱条件 色谱柱: Waters BEH C18 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm); 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱: 0~7 min, 5% B~80% B, 7~7.2 min, 80% B~5% B, 7.2~9.5 min, 5% B~5% B, 流速 0.2 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

4.2 质谱条件 电喷雾离子化, 正离子检测, 喷雾电压 3500 V, 离子传输管温度 350 °C, 鞘气流速 10

L/min, 辅助气流速 5 L/min, 碰撞气为氩气(1.5 torr), 定性、定量选择性离子监测见表 1。

表 1 赛庚啶的色谱保留时间和定性、定量离子参数

药物名称	保留时间/min	定性离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV
赛庚啶	6.6	288 > 96	30
		288 > 191*	38

注: * 表示定量离子。

4.3 标准曲线 精密量取 100 ng/mL 赛庚啶工作液 10、25、50、100、250 μL, 分别置于 5 mL 空白猪尿样品中, 涡旋混合, 使之成为 0.2、0.5、1.0、2.0 和 5.0 μg/L 的试样, 照“3 样品处理”项步骤操作, 并经 UPLC-MS/MS 分析测定, 以添加浓度为横坐标, 赛庚啶峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程和相关系数。

4.4 精密度和回收率试验 取 0.2、0.4、2.0 μg/L 的阳性添加试样, 照“3 样品处理”项步骤操作, 每一浓度每批次进行 5 个平行试验, 分别考察 3 个批次, 分别计算批内、批间精密度和加标回收率。

5 结果

5.1 专属性分析 赛庚啶的标准溶液色谱图见图 1, 赛庚啶的保留时间 6.6 min, 空白猪尿的典型色谱图见图 2, 空白猪尿阳性添加(1.0 μg/L)的色谱图见图 3, 由图可见, 空白猪尿中不含有干扰测定物质, 赛庚啶峰形对称, 保留时间适宜。

5.2 标准曲线与线性范围 赛庚啶在 0.2~5.0 μg/L 范围内线性关系良好, 回归方程 $y = 118437x - 26629$, 相关系数 $R^2 = 0.9970$, 最低定量限在 0.2 μg/L。

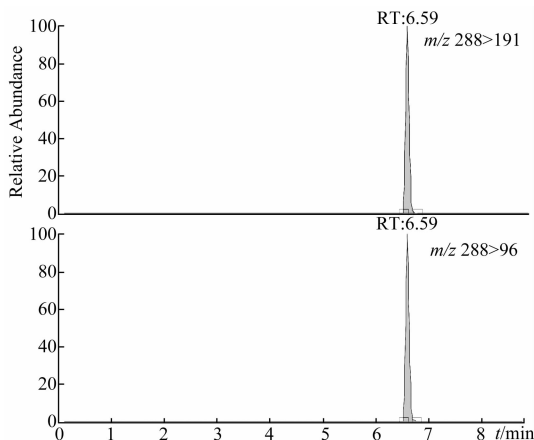


图 1 赛庚啶的标准溶液色谱图

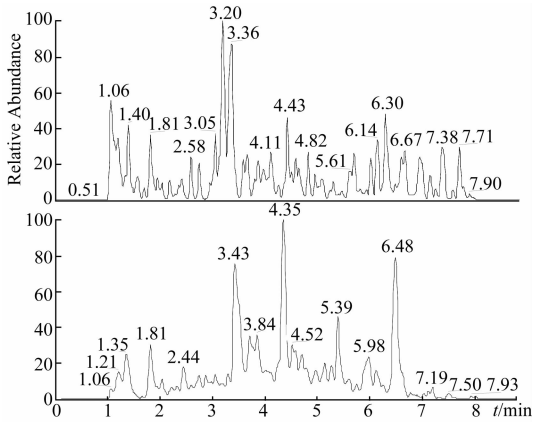


图2 空白猪尿的色谱图

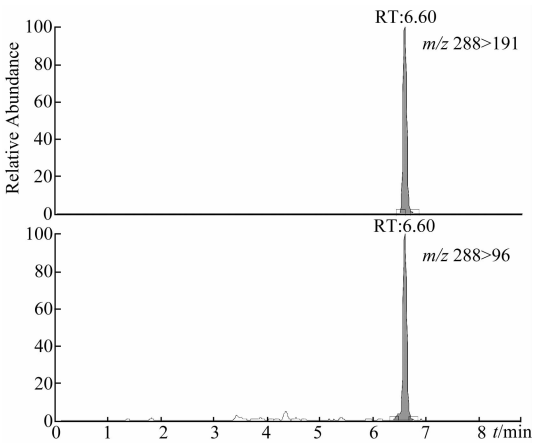


图3 空白猪尿阳性添加(1.0 µg/L)的色谱图

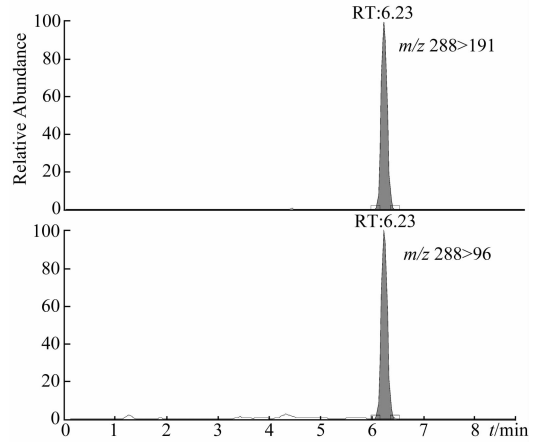


图4 实际猪尿样品中检出赛庚啉的色谱图(赛庚啉9.8 µg/L)

6 讨论与结论

在文献中,有关赛庚啉的分析报道,多数局限在人用药物^[8]和人体样本^[9]中,陈其焯报道了猪尿中可乐定和赛庚啉的有机溶剂提取-固相萃取净化的高效液相色谱-串联质谱法^[10],Feas等建立了分子印迹-固相萃取测定猪尿中赛庚啉的方法^[11],然而分子印迹固相萃取柱不易获得和推广,Fente等建立了亲水亲脂平衡(HLB)固相萃取-液质联用的测定法^[12]。本文结合赛庚啉的分子结构(含有二苯环,以及 $pK_a = 9.3$)^[12],参考其他碱性药物分析方法,使用混合型阳离子交换固相萃取柱,使得赛庚啉在固相萃取柱上具有双重保留作用,分析结果更稳定可靠。

在测定兽药残留的方法中,多数在前处理方法中首先使用酶解,以释放基质中的原型药物,根据药物代谢原理、赛庚啉的分子结构和有关赛庚啉在动物和人体中的代谢产物分析的结果^[13-17],推测猪尿中赛庚啉的可能代谢途径和代谢产物见图5,其中代谢产物M1(去甲基赛庚啉)、M2(去甲基赛庚啉环氧化物)和M3(赛庚啉环氧化物)即使酶解也不会恢复为原型药物赛庚啉,代谢产物M4(赛庚啉葡萄糖醛酸)是一种季铵盐型葡萄糖醛酸结合产物,结合力弱,在酸性条件下易于解离。因此,本文在前处理过程中略去了酶解的步骤。

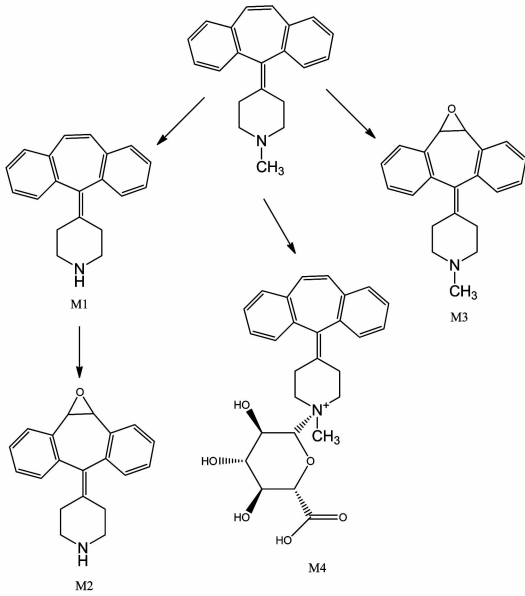
本文建立了猪尿中赛庚啉的简便快速含量测定和结构确证方法,固相萃取和超高效液相色谱串联质谱结合,使得检测限可达ppb级。本文也首次检测到实际猪尿样品中赛庚啉的存在,说明本方法切实可行。

5.3 精密度和回收率试验 高中低浓度的精密度和回收率结果见表2,批内和批间精密度均小于20%,高中低浓度的回收率均在80%~120%之间。

表2 精密度、回收率测定结果

添加浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	精密度/%		回收率/%
	批内/RSD	批间/RSD	
0.2	13.7	12.2	105.3
0.4	8.4	7.9	90.1
2.0	6.5	8.3	96.5

5.4 实际样品的分析 对某次例行监测经酶联免疫法筛选疑似阳性的三份猪尿样品(X1、X2、X3)进行了测试与确证,和随行标准曲线的对照品保留时间比对,结果三份样品中均含有赛庚啉,经标准曲线计算,结果分别为9.8、13.2、14.2 µg/L,典型色谱图见图4,说明此方法能够实现猪尿中赛庚啉的残留检测。



M1: 去甲基赛庚啶; M2: 去甲基赛庚啶环氧化物;

M3: 赛庚啶环氧化物; M4: 赛庚啶葡萄糖醛酸

图5 猪尿中赛庚啶可能的代谢途径和代谢产物

致谢:感谢中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室陈蓉博士在文献检索上的大力帮助。

参考文献:

- [1] Stone C A, Wenger H C, Ludden C T, *et al.* Antiserotonin - antihistaminic properties of cyproheptadine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1961, 131: 73 - 84.
- [2] 曹莹, 蒋音, 张文刚. 高效液相色谱法分析饲料中的赛庚啶 [J]. *中国饲料*, 2011, (2): 39 - 40.
- [3] Council Regulation 2377/90/EEC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [J]. *Off J Eur Communities*, 1990, L 224: 1 - 8.
- [4] Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products [J]. *Off J Eur Communities*, 2001, L 3314: 1 - 66.
- [5] 农业部第 1519 号公告. 禁止在饲料和动物饮水中使用的物质名单 [S].

- [6] 农业部第 1486 号公告 - 2 - 2010. 饲料中可乐定和赛庚啶的测定液相色谱 - 串联质谱法 [S].
- [7] 李丹妮, 张文刚, 严凤, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测饲料中盐酸可乐定和盐酸赛庚啶 [J]. *中国兽药杂志*, 2011, 45(10): 20 - 24.
- [8] Burrows G W, Alliger C L. High - performance liquid chromatographic determination of cyproheptadine hydrochloride in tablet formulations [J]. *J Pharm Sci*, 1983, 72, 1212 - 1213.
- [9] Koundourellis J E, Ebete K O, Malliou E T. Isocratic high performance liquid chromatographic method for the quantitation of cyproheptadine in human milk and plasma using solvent and solid phase extraction techniques [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 1999, 22: 603 - 614.
- [10] 陈其煌. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪尿液中盐酸可乐定和盐酸赛庚啶 [J]. *福建农业学报*, 2012, 27(6): 596 - 600.
- [11] Feás X, Ye L, Regal P, *et al.* Application of dummy molecularly imprinted solid - phase extraction in the analysis of cyproheptadine in bovine urine [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(10): 1740 - 1747.
- [12] Fente C A, Regal P, Vázquez B I, *et al.* Development and Validation of an LC - MS/MS Confirmatory Method for Residue Analysis of Cyproheptadine in Urine of Food - Producing Animals [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(6): 2595 - 2598.
- [13] Iwaki M, Ogiso T, Fujii Y, *et al.* Pharmacokinetics of cyproheptadine and its metabolites in rats [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1993, 16(12): 1276 - 1281.
- [14] Chow S A, Fischer L J. Metabolism and disposition of cyproheptadine and desmethylcyproheptadine in pregnant and fetal rats [J]. *Drug Metabolism and Disposition; the Biological Fate of Chemicals*, 1987, 15(6): 740 - 748.
- [15] Fischer L J, Thies R L, Charkowski D, *et al.* Formation and urinary excretion of cyproheptadine glucuronide in monkeys, chimpanzees, and humans [J]. *Drug Metabolism and Disposition; the Biological Fate of Chemicals*, 1980, 8(6): 422 - 424.
- [16] Porter C C, Arison B H, Gruber V F, *et al.* Human metabolism of cyproheptadine [J]. *Drug Metabolism and Disposition; the Biological Fate of Chemicals*, 1975, (393): 189 - 197.
- [17] Frigerio A, Sossi N, Belvedere G, *et al.* Identification of desmethyl - cyproheptadine - 10, 11 - epoxide and other cyproheptadine metabolites isolated from rat urine [J]. *J Pharm Sci*, 1974, 63(10): 1536 - 1540.

(责任编辑:侯向辉)