

超高效液相色谱-串联质谱法检测动物性食品中6种性激素残留

李丹妮, 黄士新, 张文刚, 曹莹

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

Research of 6 Sex Hormones Residues in Animal Foods by UPLC-MS/MS

LI Dan-ni, HUANG Shi-xin, ZHANG Wen-gang, CAO Ying

(Shanghai Municipal Inspection Institute for Veterinary Drugs and Feedstuffs, Shanghai 201103, China)

Abstract: A method for ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric(UPLC-MS/MS) was developed for the simultaneous identification and determination of 6 sex hormones in the duck liver. Components were extracted from homogenized sample with Methyl Tertiary Butyl Ether(MTBE) ordinarily, cleaned by Sep-Pak Silica SPE column, and detected by electrospray ionization mass spectrometry in the positive ion mode. This method is more suitable for determination of sex hormones in animal foods.

Key words: sex hormones residues; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); animal foods

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0155-04

合成类固醇药物属于兴奋剂中最重要的一大类。60年代起,性激素类固醇在体育中被广泛使用,运动员服用该类药物后可增强耐力,增强肌肉的爆发力,从而达到提高运动水平的目的。国际奥委会于1975年宣布禁用合成性激素类固醇。但是近年来一些提供运动员食用的动物性食品中也检出含有性激素类固醇,为了保证体育比赛公平竞争的原则,国际奥委会对运动员食品提出了严格检测的要求。2008年北京奥运会除对运动员进行严格的兴奋剂检测外,同样对供奥的各类食品进行了严格的检测。

在供奥食品的检测中研究建立了一种适用于检测高脂肪性的食品,如鸭肥肝、动物黄油等样品中性激素的方法,通过在前处理过程中使用正相柱固相萃取(SPE)小柱,实现高脂肪性动物源食品脱脂的目的,有效的提高了性激素检测的回收率水平,对现有的动物源性食品中性激素类药物检测方法做出了补充。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

标准对照品: 甲基睾酮、孕酮、睾酮、美雄酮、群伯龙及睾酮,均购自德国 Dr. Ehrenstorfer公司,纯度 $\geq 98\%$; 内标贮备溶液: $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氘代睾酮标准溶液 (-20°C 保存,有效期6个月)。甲酸、乙腈为色谱纯(Merck),叔丁基甲醚、正己烷、乙酸乙酯及丙酮为化学纯,其他试剂均为分析纯,实验用水为去离子水。

6种激素药物标准贮备溶液: 分别准确称适量的每种激素药物对照品至棕色容量瓶中,用甲醇配

制成 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准贮备溶液 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期6个月)。

6种激素药物混合标准中间溶液及内标中间溶液的配制: 分别准确量取适量的每种激素药物标准贮备溶液和内标贮备溶液, 用甲醇稀释成 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6种药物混合标准中间溶液和内标中间溶液 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期1个月)。使用时用 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=50:50$ 稀释到所需浓度工作液。

超高效液相色谱-串联质谱仪: 美国Waters公司产品; MassLynx v4.0数据处理软件; 漩涡振荡器; PT-MR2100组织匀浆机: 瑞士Kinematic公司产品; CL3R冷冻离心机: 美国IEC公司产品; Laborota 4000旋转蒸发器: 德国Heidolph公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的前处理 取 $(2\pm 0.05)\text{ g}$ 匀浆后的试料置于具塞离心管中, 加入适量氘代睾酮内标溶液和 20 mL 饱和氯化钠溶液, 置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中 10 min 左右, 待样品中脂肪溶解至呈透明状, 再加入 15 mL 叔丁基甲醚, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡 10 min , $8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 将上清液转移至梨形瓶中。用 15 mL 叔丁基甲醚重复提取1次, 合并上清液, 于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至干, 用 6 mL $V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯})=9:1$ 的混合溶液溶解残留物, 备用。

选择 Sep-Pak Silica $6\text{ mL}/500\text{ mg}$ 固相萃取小柱进行样品净化, SPE柱依次用 3 mL 丙酮及 6 mL 正己烷活化, 取备用液全部过柱, 再依次用 3 mL 正己烷洗涤, 减压抽干, 最后用 8 mL $V(\text{丙酮}):V(\text{正己烷})=1:1$ 的混合溶液淋洗, 收集洗脱液, 并在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至干, 用 1 mL 流动相溶解, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 进样检测。

1.2.2 UPLC 条件 色谱柱: BEH C_{18} ($150\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}\times 1.7\text{ }\mu\text{m}$) 美国 Waters 公司; 流动相: $V(\text{乙腈}):V(0.2\% \text{甲酸})=50:50$; 流速 $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.2.3 串联质谱条件 电喷雾离子源, 正离子扫描, 多反应监测, 电离电压 3.0 kV , 源温 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, 雾化温度 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, 锥孔气和雾化气均为氮气, 流速分别为 $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 和 $700\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 碰撞气为氩气。定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞电压列于表1。

表1 6种激素类药物及内标氘代睾酮的质谱参数 (母离子均为 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$)

被测药物名称	定性离子对/ (m/z)	定量离子对/ (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
群勃龙 Trenbolone	271.3/199.1	271.3/199.1	30	25
	271.3/253.2			20
睾酮 Testosterone	289.3/97.0	289.3/97.0	25	20
	289.3/109.0			25
美雄酮 (大力补) Methandienone	301.7/121.4	301.7/121.4	20	25
	301.7/283.6			10
甲基睾酮 Methyltestosterone	303.3/97.2	303.3/109.1	20	25
	303.3/109.1			25
氘代睾酮 (内标) $\text{D}_3\text{-Testosterone}$	292.3/97.1	292.3/109.0	25	20
	292.3/109.0			25
黄体酮 (孕酮) Progesterone	315.3/97.3	315.3/97.3	25	20
	315.3/109.3			23
丙酸睾酮 Testosterone Propionate	345.3/97.1	345.3/109.2	25	20
	345.3/109.2			22

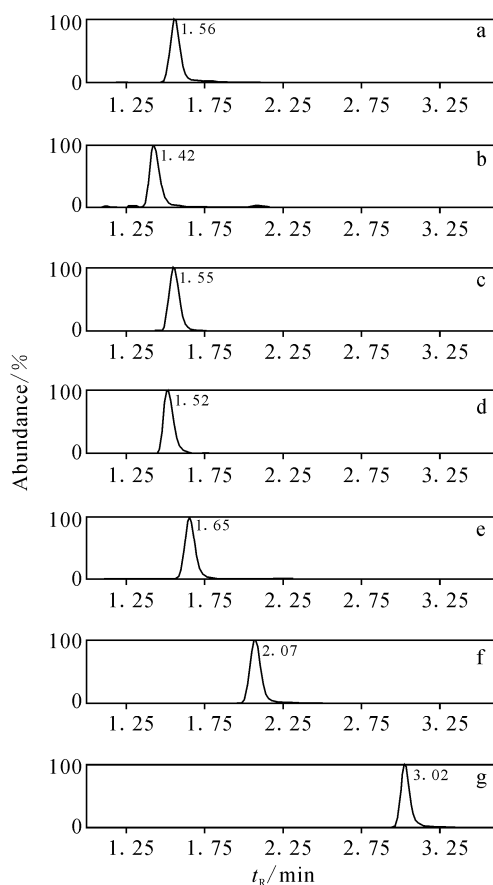
2 结果与讨论

2.1 线性范围考察

将6种激素标准工作液按与样品相同的衍生化和提取步骤处理, 制得浓度为1.0、2.0、5.0、10.0、50.0和100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 各衍生物对照溶液, 并进行测定。以标准溶液中被测组分峰面积与内标氘代睾酮的峰面积比为纵坐标, 对照溶液的浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 相应的回归方程和相关系数列于表2。6种激素类药物标准定量离子质谱图及保留时间示于图1。

表2 6种激素类药物的测定回归方程及相关系数

对应组分	线性方程	线性相关系数	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	检出限/ ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)
甲基睾酮	$Y=22.08X-79.57$	0.999 4	1.0~100.0	1.0
大力补	$Y=26.08X-137.7$	0.999 7		
睾酮	$Y=1.510X-10.12$	0.999 4		
群勃龙	$Y=0.990X-17.83$	0.999 1		
丙酸睾酮	$Y=15.62X-31.09$	0.999 8		
孕酮	$Y=0.180X+0.430$	0.999 8		



注: a. 睾酮; b. 群勃龙; c. 氘代睾酮; d. 美雄酮; e. 甲基睾酮; f. 孕酮; g. 丙酸睾酮

图1 6种激素类药物标准定量离子质谱图及保留时间 (混合标样浓度 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

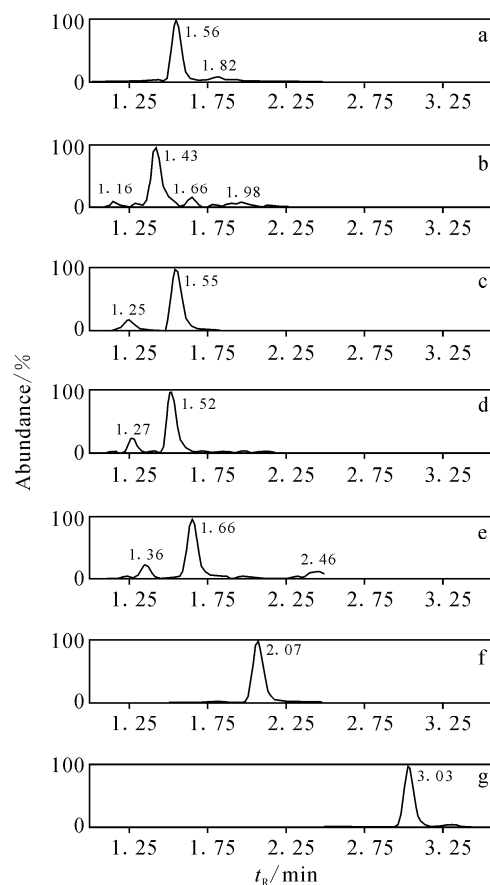


图2 鸭肥肝中添加6种激素类药物质谱图及保留时间 (添加浓度 $2.0 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)

2.2 方法的灵敏度

鸭肥肝空白样品按相同的步骤处理后, 经测定表明, 空白样品对所测分析物无干扰。按照标准要求, 在空白组织中进行添加实验, 经提取后测定, 当 6 种激素类药物添加浓度为 $2.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, 测得质谱峰信噪比 $S/N > 10$, 则该方法的定量限可达 $2.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。经同样的添加及前处理方法, 当鸭肥肝空白组织中添加浓度为 $1.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, 测定质谱峰的信噪比 $S/N > 3$, 即方法的检测限为 $1.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 检测方法的准确度和精密度

称取 2.0g 空白鸭肥肝样品, 分别添加 6 种激素类药物混合标样, 配制成 2.0、5.0、10.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 三个浓度的试样进行回收率试验, 各浓度 6 个样品平行试验, 重复 3 次, 添加典型质谱图示于图 2。回收率, 批内、批间相对标准偏差计算结果列于表 3。该方法在鸭肥肝中添加浓度 2.0~10.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内的回收率为 70%~120%。

表 3 鸭肥肝样品添加回收率结果 ($n=6$)

序号	组分	添加量 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		添加量 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		添加量 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
		平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD%
1	睾酮	85.7	11.0	88.4	5.7	86.4	1.0
2	群勃龙	96.9	10.6	110.4	5.2	112.0	6.1
3	大力补	91.9	9.0	73.4	2.1	82.6	2.5
4	甲基睾酮	98.3	9.3	94.6	3.3	84.6	2.1
5	孕酮	70.3	6.0	72.4	1.2	75.4	4.0
6	丙酸睾酮	75.5	10.9	78.3	9.8	80.0	11.3

3 结论

性激素类固醇属于脂溶性激素, 在结构上是环戊烷多氢菲衍生物。在用非极性有机溶剂进行提取时, 也会同时提取出较多油脂, 从而干扰样品前处理。本工作对肥鸭肝等脂肪含量较高的样品前处理方法进行了探索, 经过多次实验验证, 在前处理净化过程中引入正相 SPE 小柱。实验证明, 该前处理方法脱脂效果好, 同时增加了性激素类药物的提取效率, 该方法还适用于其他含脂肪较多的样品, 如动物性黄油、芝士、食用火腿等。

参考文献:

- [1] 农业部 1031 号公告-1-2008 动物源性食品中 11 种激素残留检测液相色谱-串联质谱法[S]. 2008.
- [2] 陈 溪, 董伟峰, 赵景红, 等. 类固醇(甾体)激素类兽药残留检测方法现状[J]. 检验检疫科学, 2007, 17: 93-98.
- [3] 严 凤, 李丹妮, 张文刚, 等. 鸡肉中的激素类药物多残留检测超高效液相-串联质谱法研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(3): 16-19.

(上接第 138 页)

参考文献:

- [1] http://en.wikipedia.org/wiki/2008_baby_milk_scandal
- [2] QIU B, LUO H. Desorption electrospray ionization mass spectrometry of DNA nucleobases: implications for a liquid film model[J]. J Mass Spectrom, 2009, 44(5): 772-779.