

超高效液相色谱-串联质谱法测定 动物源性食品中性激素多组分残留

王全林, 张爱之

(宁波市产品质量监督检验所, 浙江 宁波 315041)

Simultaneous Determination of Seven Sex Hormone in Animal Products by UPLC-MS/MS

WANG Quan-lin, ZHANG Ai-zhi

(Ningbo Academy of Product Quality Supervision & Inspection, Ningbo 315041, China)

Abstract: A rapid, specific and highly sensitive method for the simultaneous determination of seven sex hormones residue in animal product was developed, which was based on UPLC-MS/MS under positive mode using electrospray ionization(ESI) source. $ZnCl_2$ was added to the extract solution to remove fat, and then target compounds were purified by LC- C_{18} and LC- NH_2 solid phase extraction cartridge. Average recoveries for the seven sex hormone(spiked at the levels of $4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in fish product) range from 88% to 105%, with relative standard deviations between 4.3% and 24%.

Key words: simultaneous determination; hormone residues; animal products; UPLC-MS/MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0151-02

甲基炔诺酮、甲基睾酮、丙酸睾酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮、诺龙等含有烯酮基的性激素是我国和世界各国禁止在动物源性食品生产环节中添加的促生长药物, 它们残留于动物性食品中会危害消费者的身体健康。准确、快捷的测定动物源性食品中违禁性激素残留对保障食品安全具有重要意义。本工作利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)建立测定动物性食品中7种含烯酮基违禁性激素的方法, 并应用于鱼肉、牛奶、鸡蛋等动物性食品中性激素的检测。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

ACQUITY™超高效液相色谱仪: 美国Waters公司产品; Quattro Premier XE质谱仪: 美国Waters公司产品; 甲醇(色谱纯, Merck), 实验用水均为超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$): Millipore公司超纯水器制备。所有性激素标准品纯度均大于或等于98%, 除甲基炔诺酮购于Sigma公司外, 其他均为Dr.Ehrenstorfer GmbH试剂。内标物氘代诺龙(Nandrolone- d_3): 购于Toronto Research Chemicals Inc。 β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶(EC3.2.1.31+EC3.1.6.1, *Helix pomatia*, Sigma-aldrich)。

1.2 样品前处理方法

称取5.0 g已打碎鱼制品样品, 准确至0.1 g, 置于50 mL具塞塑料离心管中, 混匀。若为加标样品, 则加标样品加入一定量的标液, 然后加入10 mL $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH=5)的乙酸-乙酸钠缓冲溶液, 再加入50 μL 酶, 于37 $^\circ\text{C}$ 水浴震荡器中酶解12 h。取出, 冷却至室温, 加入15 mL甲醇超声提取15 min, $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 上清液转入另一洁净离心管中, 残渣再以15 mL甲醇重复

基金项目: 浙江省质检系统重大科研计划项目(20070106)资助

作者简介: 王全林(1962-), 男, 教授级高工, 从事食品安全检测技术及标准化研究。E-mail: quanlinwang@163.com

提取1次, 10 000 r·min⁻¹离心10 min, 上清液与前次上清液合并。向上清液中加入2 g ZnCl₂固体, 搅拌至ZnCl₂完全溶解, 此时有沉淀析出, 10 000 r·min⁻¹离心10 min, 上清液转入100 mL鸡心瓶中, 加入5 mL正丙醇溶液, 于45 °C、80 mbar旋转蒸发至近干, 加入1 mL甲醇超声溶解后, 再加入10 mL水稀释, 上固相萃取柱净化。

LC-C₁₈柱以5 mL甲醇、5 mL水活化平衡后, 将鸡心瓶中提取液全部上柱, 并以5 mL V(甲醇):V(水)=10:90洗涤鸡心瓶, 并作为淋洗液淋洗小柱后, 抽至近干。下端接上已用5 mL甲醇活化的LC-NH₂柱, 以6 mL甲醇洗脱后, 将LC-C₁₈柱去掉, 再以2 mL甲醇洗脱LC-NH₂柱。收集所有甲醇洗脱液于50 °C下N₂吹干, 加入1 mL V(甲醇):V(水)=80:20, 超声溶解30 s, 漩涡混匀30 s, 过0.2 μm滤膜, 上机分析。

1.3 UPLC-MS/MS分析条件

1.3.1 超高效液相色谱条件 Waters BEH C₁₈柱(2.1 m×100 mm×1.7 μm); 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL。流动相A为含0.1% (体积分数) 甲酸的水, 流动相B为含0.1% (体积分数) 甲酸的甲醇。洗脱程序为80%A $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 10%A $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 10%A $\xrightarrow{0.1\text{ min}}$ 80%A $\xrightarrow{2\text{ min}}$ 80%A

1.3.2 质谱条件 电喷雾电离(ESI⁺), 毛细管电压3.00 kV, 离子源温度100 °C, 脱溶剂温度350 °C, 脱溶剂气流量600 L·h⁻¹。采用MRM监测模式, 各激素优化采集参数列于表1。

表1 质谱优化参数

化合物	保留时间	母离子[M+H] ⁺	子离子/(m/z)		锥孔电压/V
	t _R /min	/(m/z)	(碰撞电压/V)		
醋酸氯地孕酮	6.46	405.30	345.1 (14)	<u>309.2 (16)</u>	30
醋酸甲羟孕酮	6.49	387.29	123.1 (30)	<u>327.2 (14)</u>	30
醋酸甲地孕酮	6.44	385.35	325.3 (14)	<u>267.3 (16)</u>	30
丙酸睾酮	7.25	345.39	97.2 (24)	<u>109.1 (30)</u>	40
甲基炔诺酮	6.19	313.25	91.1 (46)	<u>109 (28)</u>	35
甲基睾酮	6.27	303.30	109.1 (28)	<u>97.1 (26)</u>	40
诺龙	5.87	275.29	83.2 (28)	<u>109.1 (26)</u>	35
诺龙-d3	5.87	278.30	83.1 (34)	<u>109.1 (34)</u>	40

注: 带下划线的离子为定量离子

2 结果与讨论

以氘代诺龙为内标, 各性激素的校准方程、3倍信噪比时的检出限列于表2。

表2 内标法的线性方程、线性相关系数及检出限

化合物	线性方程	线性系数(R)	检出限(μg·kg ⁻¹)/(S/N=3)
醋酸氯地孕酮	Y=0.548 831X+0.424 54	0.996	0.09
醋酸甲羟孕酮	Y=1.956 98 X+0.893 962	0.998	0.08
醋酸甲地孕酮	Y=0.826 703 X+0.757 21	0.999	0.09
丙酸睾酮	Y=1.371 31 X+0.519 629	0.998	0.12
甲基炔诺酮	Y=0.413 819 X-0.041 31	0.996	0.17
甲基睾酮	Y=1.534 93 X-0.197 434	0.998	0.17
诺龙	Y=0.786 425 X-0.0702 085	0.998	0.14

按照实验方法, 我们对鱼肉、鸡蛋、牛奶中各性激素进行了测定。当样品中添加的标准物质为4 μg·kg⁻¹时, 回收率在88%~105%范围内, 5次重复测定结果的相对平均偏差在5.2%~8.1%范围内, 方法能够满足食品中兽药残留的检测。