

## 气相色谱-质谱法同时检测动物组织中多种激素类兽药的残留量

林维宣\*, 董伟峰, 陈溪, 田苗, 于灵, 赵景红, 杨春光

(辽宁出入境检验检疫局, 辽宁大连 116001)

**摘要**:建立了不同动物基质(肌肉、肝脏、肾脏)中己烷雌酚、己烯雌酚、己二烯雌酚、还原尿睾酮、表睾酮、雌酮、雌二醇、炔雌醇和雌三醇激素残留量的气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测方法。以乙腈为提取溶剂,固相萃取柱净化,微波辅助衍生化,用双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)与甲基氯硅烷(TMCS)(体积比为99:1)的硅烷化试剂在吡啶存在下进行衍生化反应。实验结果表明9种激素的检出限为0.1~1 μg/kg。3种动物基质中9种激素的平均回收率为68.8%~93.1%,实验室内相对标准偏差(RSD)为4.1%~22.3%,实验室间RSD为3.1%~17.9%。方法的技术指标满足动物组织中激素类兽药残留分析的要求。

**关键词**:气相色谱-质谱法;固相萃取;微波辅助衍生;激素;兽药;多残留检测;动物组织

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)03-0294-05 栏目类别:研究论文

## Determination of hormone multi-residues in animal tissues by gas chromatography-mass spectrometry

LIN Weixuan\*, DONG Weifeng, CHEN Xi, TIAN Miao, YU Ling, ZHAO Jinghong, YANG Chunguang

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

**Abstract**: A method of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the simultaneous determination of nine sex hormone residues, such as hexestrol, diethylstilbestrol, dienestrol, etiocholan-3 $\alpha$ -ol-17-one, epitestosterone, estrone, estradiol, ethinylestradiol and estriol, in animal tissues was developed. The sex hormones were extracted with acetonitrile, then cleaned-up with a C18 solid-phase extraction (SPE) column. The microwave-assisted derivatization of the target components with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and trimethylchlorosilane (TMCS) (99:1, v/v) using pyridine as solvent was performed, and then the derivatives were analyzed by GC-MS. The limits of detection were 0.1 - 1 μg/kg for all hormones, and the limits of quantification were 0.2 - 2 μg/kg. The average recoveries of sex hormones were 68.8% - 93.1%. The relative standard deviations (RSDs) of inter- and intra-assay were 4.1% - 22.3% and 3.1% - 17.9%, respectively. The real sample tests showed this method can be used for the sensitive and accurate determination of multi-sex hormones residues in biological samples.

**Key words**: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); solid-phase extraction (SPE); microwave-assisted derivatization; hormones; veterinary drugs; multi-residue determination; animal tissues

性激素被广泛地用于动物养殖业,其在促进畜禽生长和提高饲料转化率的同时也带来了动物源性食品中残留兽药的风险。激素通过食物链进入人体产生一系列与内分泌相关的诸如生长发育障碍、出生缺陷和生育缺陷等非健康效应,且多数激素类物质具有潜在的致癌性。为此,各国相继制定了相

应的法律限制或禁止激素在动物饲养中应用。

激素通过代谢残留于动物的肝、肾、组织等器官中,其含量非常低(μg/kg ~ ng/kg),因此需要高效率和灵敏的检测方法。目前有关激素类兽药残留的检测方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[1-6]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[7-9]</sup>、液相色谱-质谱法

\* 通讯联系人:林维宣,硕士,研究员。Tel:(0411)82592656, E-mail:dlcqlwx@sina.com.cn.

基金项目:国家质量监督检验检疫总局立项课题(课题编号:2002IK042)。

收稿日期:2008-10-20

(LC-MS)<sup>[10-15]</sup>、超高效液相色谱-串联质谱法(UP-LC-MS/MS)<sup>[16]</sup>等,且大多集中于对尿液的分析检测。由于GC-MS具有高灵敏度和特异性,且检测成本较低,因而开发GC-MS对动物组织中多种激素类兽药残留的检测方法很有必要。然而,采用GC-MS分析激素样品时所采用的传统的水浴衍生化技术比较复杂且耗时耗能。为此,近年来人们尝试对衍生化技术进行了改进,如Amendola等<sup>[2]</sup>在对尿液中23种糖皮质激素的分析中使用了微波加热(900 W)与传统水浴加热联合的衍生化方法,Zuo等<sup>[17]</sup>在对水中6种性激素的分析中采用了微波辅助衍生的方法。本实验建立了同时检测9种激素类兽药残留量的GC-MS方法,而所采用的微波辅助衍生方法(使用家用微波炉)不但大大缩短了衍生化反应的时间,提高了衍生效率,而且适用于不同动物基质的多种激素类兽药残留检测的要求。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 6890-5973N GC-MS 联用仪;衍生瓶(5 mL);旋转蒸发器;氮吹仪;家用微波炉(输出功率700 W)(海尔公司);固相萃取装置:VISIPREP;固相萃取(SPE)柱:C18 SPE柱(500 mg,3 mL)、硅胶SPE柱(500 mg,6 mL)、氨基SPE柱(500 mg,6 mL)(Waters公司)。

甲醇:HPLC级(美国TEDIA公司);正己烷:HPLC级(Fisher公司);吡啶:HPLC级(Burdick & Jackson公司);衍生试剂:双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)-甲基氯硅烷(TMCS)(体积比为99:1)(Supelco公司)。性激素标准品:己烷雌酚(hexestrol)、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、己二烯雌酚(dienestrol)、还原尿睾酮(etiocholan-3 $\alpha$ -ol-17-one)、表睾酮(epitestosterone)、雌酮(estrone)、雌二醇(estradiol)、炔雌醇(ethinylestradiol)、雌三醇(estriol)纯度均大于97.7%,其中除表睾酮购自Sigma公司外,其余标准品均购自Riedel-dehaen公司。

标准溶液:用甲醇分别配制9种标准样品的标准储备溶液,质量浓度为100 mg/L,分析前用甲醇稀释到所需浓度。

激素混合标准工作液:用上述标准溶液根据需要配制混合标准工作液。

### 1.2 实验条件

#### 1.2.1 色谱条件

DB-5 MS 色谱柱(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m);载气:高纯He,纯度99.999%以上;流量:1.0

mL/min,恒流模式;压力:74.24 kPa(11.6 psi);进样口、接口温度:280  $^{\circ}$ C;进样方式:不分流进样;进样量:2  $\mu$ L。升温程序:120  $^{\circ}$ C保持1 min,以15  $^{\circ}$ C/min的速率升至250  $^{\circ}$ C,保持6 min;再以5  $^{\circ}$ C/min的速率升至280  $^{\circ}$ C,保持6 min。

#### 1.2.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源温度:230  $^{\circ}$ C;溶剂延迟时间:10 min;电子轰击源能量:1 624 eV;四极杆温度:150  $^{\circ}$ C。选择离子监测(SIM)模式。

### 1.3 实验方法

称取5 g(精确至0.01 g)经绞肉机绞碎的动物组织(猪肉、猪肝、猪肾)置于50 mL离心管中,分别加入25 mL、15 mL乙腈提取两次,提取液收集于鸡心瓶中待过SPE柱。

将C18小柱依次用2 mL甲醇、二氯甲烷、甲醇和水活化后,将乙腈提取液移入C18小柱,用1 mL水淋洗鸡心瓶2次,将淋洗液一并移入C18小柱过柱。依次用3 mL水、3 mL甲醇-水(体积比为40:60)洗涤C18小柱,离心抽干小柱。最后用6 mL甲醇洗脱。将洗脱液浓缩至近干后用3 mL正己烷-二氯甲烷(体积比为60:40)溶解,待过硅胶柱。

将硅胶柱用6 mL正己烷活化,将上述经C18小柱净化的样液过柱。首先用3 mL正己烷-乙酸乙酯(体积比为75:25)淋洗,再用15 mL正己烷-乙酸乙酯(体积比为25:75)洗脱。收集洗脱液于50 mL鸡心瓶中,浓缩并用2 mL乙酸乙酯-甲醇(体积比为80:20)溶液溶解,待过氨基柱。

将氨基柱用5 mL水饱和的乙酸乙酯和5 mL乙酸乙酯-甲醇(体积比为80:20)活化,将上述经硅胶柱净化的样液过柱,用6 mL乙酸乙酯-甲醇(体积比为80:20)溶液洗脱,收集上样液和洗脱液于衍生瓶中,浓缩后待衍生。

在蒸干的残渣中,加入50  $\mu$ L BSTFA-TMCS(体积比为99:1)与50  $\mu$ L吡啶,旋紧螺盖,迅速涡旋1 min,放入微波炉中,在700 W输出功率下衍生60 s后,取出衍生瓶冷却至室温,用正己烷定容至0.5 mL,于48 h内进行GC-MS测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

激素类药物的水溶性小,故常用有一定极性的有机溶剂提取。甲醇和乙腈为应用广泛的溶剂,其优点是溶解作用强,提取的同时兼有脱蛋白和脱脂作用。然而动物源性样品一般脂肪含量比较高,与乙腈相比,用甲醇提取更容易将大量脂肪提取出来,不利于提取液的浓缩和净化,因此选用乙腈作为提取溶剂。

### 2.2 净化条件的选择

由于动物组织成分十分复杂,激素含量又非常低( $\mu\text{g}/\text{kg} \sim \text{ng}/\text{kg}$ ),因此对净化提出了很高的要求,尤其是若不除去动物组织中的大量脂肪和有机酸类物质,会对色谱柱造成污染,使其分离效果明显下降,且缩短色谱柱的使用寿命。SPE 是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物与干扰化合物分离,从而达到分离和富集目标化合物的一种常用的样品前处理技术<sup>[18]</sup>。在本实验中,将样品依次经过 C18 柱、硅胶柱和氨基柱净化。C18 柱与硅胶柱主要为了脱油去脂,减少它们对色谱测定的干扰,而氨基柱主要用于去除动物组织中的酸性物质<sup>[6]</sup>,从而获得比较理想的色谱图。实验表明,9 种激素在 C18 柱上均表现出很好的色谱保留行为,当采用 6 mL 甲醇洗脱且过柱流速小于 1 mL/min 时,能够完全将它们洗脱下来。另外,硅胶柱用 15 mL 正己烷-乙酸乙酯(体积比为 25:75)洗脱,氨基柱用 6 mL 乙酸乙酯-甲醇(体积比为 80:20)溶液洗脱

时,回收效果也都比较好。

### 2.3 衍生化条件的选择

由于激素分子中有多个极性基团,沸点高,不容易挥发,因此采用 GC-MS 测定时,必须首先对样品进行衍生化处理。本实验分别选用了 BSTFA、BSTFA-TMCS 两种硅烷化试剂与性激素分子中的羟基进行硅醚化反应。结果表明,以 BSTFA-TMCS 作为 9 种激素的衍生试剂,衍生效果较好。另外,由于在硅烷化衍生剂中添加亲核的试剂如吡啶等可以促进形成三甲基硅的衍生物,所以本实验在单一的硅烷化试剂中添加了吡啶,以提高衍生化效率。实验中需要注意衍生试剂要避水。

考察了传统水浴衍生方法在不同反应温度和时间下的衍生效果,结果如图 1 所示。图 1 表明,最佳衍生化条件为 70 °C 和 45 min。比较了传统衍生化方法与微波辅助衍生化(700 W, 60 s)的反应效率,结果见图 2。可见微波辅助衍生化技术可以缩短衍生化时间,提高衍生化效率。

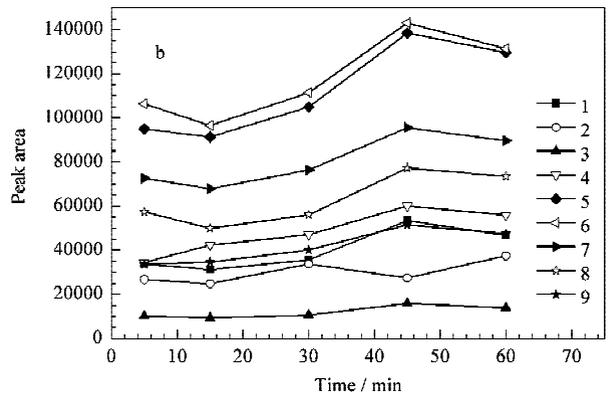
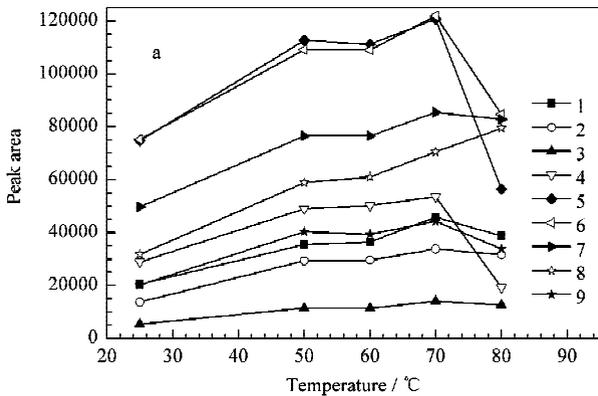


图 1 (a)温度和 (b)时间对传统水浴衍生效果的影响

Fig. 1 Effects of (a) temperature and (b) time on traditional water bath derivatization

1. hexestrol; 2. diethylstilbestrol; 3. dienestrol; 4. etiocholan-3 $\alpha$ -ol-17-one; 5. epitestosterone; 6. estrone; 7. estradiol; 8. ethinylestradiol; 9. estriol.

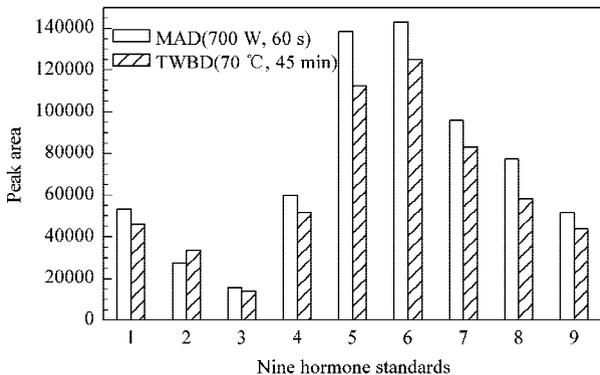


图 2 传统水浴衍生(TWBD)与微波辅助衍生(MAD)效率的比较  
 Fig. 2 Efficiency comparison of derivatization for traditional water bath derivatization (TWBD) and the microwave-assisted derivatization (MAD)  
 For nine hormone standards, see Table 1.

### 2.4 实验条件的选择

针对激素衍生化产物极性低、分子质量高的特点,实验中对 DB-5 MS 和 DB-1 两种色谱柱的分离效果进行了比较。在其他色谱条件相同时,对所选 9 种性激素而言,DB-5 MS 色谱柱的分离效果更好,故本实验选用 DB-5 MS 柱为分析柱。

9 种激素的特征离子和保留时间见表 1。对混合标准溶液(其中己烷雌酚的质量浓度为 0.064 mg/L,雌酮和雌二醇均为 0.64 mg/L,雌三醇、还原尿睾酮和炔雌醇均为 1.28 mg/L,己烯雌酚和己二烯雌酚均为 0.128 mg/L,表睾酮为 0.384 mg/L)进行分段扫描,得到的 SIM 色谱图如图 3-a 所示,可见 9 种性激素得到了很好的分离。图 3-b 为空白样品中添加 9 种激素标准品的 SIM 色谱图。

表 1 9 种激素的特征离子及保留时间  
Table 1 Characteristic ions and retention times of nine sex hormones

No.	Sex hormone	t/min	Qualitative ions ( m/z ) ( relative abundance/% )	Quantitative ion ( m/z ) ( relative abundance/% )
1	hexestro( 己烷雌酚 )	12.29	414( 0.86 ) , 399( 4.08 ) , 179( 25.34 )	207( 100 )
2	diethylstilbestro( 己烯雌酚 )	12.42	413( 28.58 ) , 397( 20.99 ) , 383( 22.69 )	412( 100 )
3	dienestro( 己二烯雌酚 )	12.42	395( 73.40 ) , 381( 27.75 ) , 217( 22.02 )	410( 100 )
4	etiocholan-3 $\alpha$ -ol-17-one( 还原尿睾酮 )	14.97	347( 18.2 ) , 257( 65.66 ) , 244( 74.94 )	272( 100 )
5	epitestosterone( 表睾酮 )	16.84	345( 35.66 ) , 270( 88.11 ) , 226( 66.85 )	360( 100 )
6	estrone( 雌酮 )	16.93	257( 45.15 ) , 244( 22.05 ) , 218( 36.39 )	342( 100 )
7	estradio( 雌二醇 )	17.57	401( 17.81 ) , 326( 19.69 ) , 285( 100.78 )	416( 100 )
8	ethinylestradio( 炔雌醇 )	19.51	440( 40.31 ) , 300( 62.02 ) , 285( 100.39 )	425( 100 )
9	estrio( 雌三醇 )	20.91	386( 81.17 ) , 345( 135.15 ) , 311( 133.05 )	504( 100 )

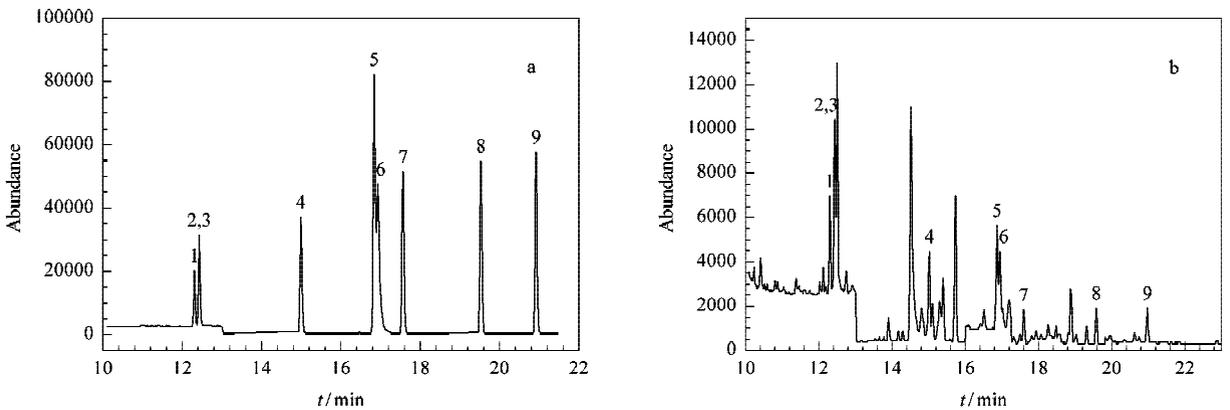


图 3 ( a ) 9 种激素混合标准溶液和 ( b ) 添加检出限水平激素的空白样品的选择离子色谱图

Fig. 3 SIM chromatograms of ( a ) the nine hormone standard mixture and ( b ) a blank sample spiked with 9 hormone standards at LOD level

For peak identifications , see Table 1 .

### 2.5 标准曲线、线性范围及检出限的测定

将混合激素标准储备液配制成系列质量浓度,以峰面积( Y )对质量浓度( X ,mg/L )做标准曲线( 见表

2 )。由表 2 可见,在相应的质量浓度范围内,各激素类兽药的响应值与质量浓度呈良好的线性关系。9 种性激素的检出限均达到国外有关法规要求。

表 2 9 种性激素的线性范围、线性方程、相关系数( r<sup>2</sup> )和最低检出限( LOD )

Table 2 Linear ranges , linear equations , correlation coefficients ( r<sup>2</sup> ) and detection limits ( LOD )

No.	Sex hormone	Linear equation *	r <sup>2</sup>	Linear range/( mg/L )	LOD/( $\mu$ g/kg )
1	hexestrol	Y = 10 <sup>6</sup> X - 153.3	0.9974	0.0010 - 0.16	0.1
2	diethylstilbestrol	Y = 448962X - 268.81	0.9950	0.0030 - 0.48	0.3
3	dienestrol	Y = 202360X - 89.151	0.9901	0.0015 - 0.48	0.15
4	etiocholan-3 $\alpha$ -ol-17-one	Y = 85945X + 91.957	0.9955	0.0010 - 0.16	1.0
5	epitestosterone	Y = 429319X - 615.64	0.9918	0.0017 - 0.272	0.17
6	estrone	Y = 277850X - 660.34	0.9919	0.0030 - 0.48	0.3
7	estradiol	Y = 129538X - 474.67	0.9982	0.0040 - 0.64	0.4
8	ethinylestradiol	Y = 57892X - 141.39	0.9921	0.0035 - 0.56	0.35
9	estriol	Y = 61579X - 136.23	0.9912	0.0030 - 0.48	0.3

\* Y : peak area ; X : mass concentration , mg/L .

### 2.6 回收率与精密度

以不同基质的空白样品中分别添加一定量的标准溶液,配制成 3 个浓度的混合标准溶液,做 6 次平行添加实验。试验结果表明 9 种激素类兽药在猪肉中的平均回收率为 68.8% ~ 87.7% ,相对标准偏差( RSD )为 6.3% ~ 21.4% ;在猪肝中的平均回收率为 77.7% ~ 93.1% ,RSD 为 6.4% ~ 22.3% ;在猪肾中的平

均回收率为 73.6% ~ 90.9% ,RSD 为 4.1% ~ 22.0%。

5 个实验室的协同实验表明:采用本方法测定 9 种激素类兽药在猪肉中的平均回收率为 76.1% ~ 86.6% ,RSD 为 3.1% ~ 12.5% ;在猪肝中的平均回收率为 76.3% ~ 88.4% ,RSD 为 3.9% ~ 12.1% ;在猪肾中的平均回收率为 76.8% ~ 87.7% ,RSD 为 5.1% ~ 17.9%。

### 3 结论

建立了 GC-MS 同时检测己烷雌酚、己烯雌酚、己二烯雌酚、还原尿睾酮、表睾酮、雌酮、雌二醇、炔雌醇、雌三醇等激素残留量的方法。所采用的前处理衍生化技术操作简单,反应时间短,衍生效率较高。该方法具有灵敏度高、分离效果和重复性较好等特点,满足目前动物源性食品中激素类兽药残留检测的要求。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Mazzarino M. *Anal Chim Acta*, 2006, 559 : 30
- [ 2 ] Amendola L, Garribba F, Botrè F. *Anal Chim Acta*, 2003, 489 : 233
- [ 3 ] Delahaut P, Jacquemin P, Colemonts Y, et al. *J Chromatogr B*, 1997, 696 : 203
- [ 4 ] Liu S J, Li Q, Fang C G, et al. *Chinese Journal of Public Health Engineering* ( 刘思洁, 李青, 方赤光, 等. *中国卫生工程学* ), 2004, 3( 1 ) : 39
- [ 5 ] Chen J, Qin Y, Zhang M J. *Chinese Journal of Chromatography* ( 陈捷, 秦燕, 张美金. *色谱* ), 2006, 24( 1 ) : 19
- [ 6 ] Seo J J, Kim H Y, Chung B C, et al. *J Chromatogr A*, 2005, 1 067 : 303
- [ 7 ] Wang Y F, Zhou K, Li J G. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* ( 王玉飞, 周凯, 李继革. *中国卫生检验杂志* ), 2006, 16( 1 ) : 21
- [ 8 ] Wu S M, Wu H L, Chen S H. *Anal Chim Acta*, 1995, 307 : 103
- [ 9 ] Iglesias Y, Fente C A, Vázquez B, et al. *J Agric Food Chem*, 1999, 47( 10 ) : 4 275
- [ 10 ] Doppenschmitt S A, Scheidel B, Harrison F, et al. *J Chromatogr B*, 1995, 674 : 237
- [ 11 ] Van den Hauwea O, Dumoulin F, Antignac J P, et al. *Anal Chim Acta*, 2002, 473 : 127
- [ 12 ] Van den Hauwe O, Dumoulin F, Elliott C, et al. *J Chromatogr B*, 2005, 817 : 215
- [ 13 ] Fuh M R, Huang S Y, Lin T Y. *Talanta*, 2004, 64 : 408
- [ 14 ] Stan H J, Abraham B. *J Chromatogr*, 1980, 195 : 231
- [ 15 ] Marcos V, Perogordo E, Espinosa P, et al. *Anal Chim Acta*, 2004, 507 : 219
- [ 16 ] He L M, Huang X H, Fang B H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* ( 贺利民, 黄显会, 方炳虎, 等. *色谱* ), 2008, 26( 6 ) : 714
- [ 17 ] Zuo Y G, Zhang K, Lin Y J. *J Chromatogr A*, 2007, 1 148 : 211
- [ 18 ] Zhu W X, Yang J Z, Liang W, et al. *Progress in Veterinary Medicine* ( 祝伟霞, 杨冀州, 梁炜, 等. *动物医学进展* ), 2007, 28( 8 ) : 99