

高效液相色谱串联质谱法测定动物源食品中 群勃龙、勃地酮和黄体酮残留量

夏 敏, R éale, Etwann, 高红波, 王欣欣, 刘清珺, 刘 清, 张小满

(北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

类固醇激素是在畜牧业养殖中经常使用的一类激素, 滥用同化激素会对人及动物健康、社会 and 生态环境造成直接和潜在的危害。因此, 20 世纪 80 年代以来许多国家或组织通过立法来限制或禁止在食用性动物养殖中使用类固醇激素。但由于利益驱动, 在世界范围内类固醇激素仍在被大量滥用。国外有关尿、血、组织中类固醇激素残留检测的文献报道较多^[1-2], 主要集中在分析活体动物的尿液或屠宰现场采集的高浓度靶组织。用于类固醇检测的方法主要有气相色谱 - 质谱联用法 (GC - MS)、液相色谱 - 质谱联用法 (LC - MS)^[3-5]等。我国于 20 世纪 90 年代起开始禁止将甾类同化激素用于促生长目的, 并开始相关的监测工作。但目前在国内尚没有成熟的针对动物肌肉中甾类同化激素残留检测的确证方法。

本文通过对类固醇激素多残留测定的研究探讨, 优化并简化了提取和净化过程, 建立了用高效液相色谱 / 离子阱串联质谱 (HPLC - MS/MS) 测定动物肌肉中群勃龙、勃地酮和黄体酮多残留的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱 - 串联质谱仪: Surveyor - LCQ Advantage (美国 Thermo 公司), 配有二极管阵列检测器 (DAD) 和电喷雾离子源 (ESI); 冷冻干燥机: FD - 1C (北京德天佑科技发展有限公司)。

Helix Pomatia (Sigma - Aldrich); 甲醇、环己烷、乙酸乙酯为色谱纯, 乙酸铵缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH = 5.2), 乙醚、乙酸为分析纯; C₁₈、SDH 固相萃取柱 (SPE): 500 mg/6mL (Agilent)。

1.2 标准储备液配制

分别称取 10.0 mg 群勃龙、勃地酮、黄体酮 (Sigma - Aldrich), 用甲醇分别配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液。放置冰箱中 - 20 °C 下保存。

1.3 样品处理

1.3.1 样品提取 15.0 g 新鲜肉搅碎后放入冰箱 - 20 °C 冷冻, 在真空冷冻干燥机中过夜去除水分。研磨成粉末放入试管中, 加入 10 mL 甲醇、15 mL 乙酸缓冲溶液, 超声 30 min, 在 4 °C 下高速离心后, 加入 100 μL β - Glucuronidase, 53 °C 下搅拌 12 h, 将 30% 的溶液蒸发。

1.3.2 样品净化 将上层溶液用有机微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤后加到 C₁₈ SPE 柱 (先用 5 mL 甲醇, 再加入 5 mL 水预活化) 用 5 mL 水 - 甲醇 (体积比 60:40)、5 mL 环己烷淋洗, 再用 5 mL 乙醚洗脱。洗脱液氮气吹干, 加入 0.25 mL 乙酸乙酯溶解, 再加入 4.75 mL 环己烷混匀。然后加入到 SDH SPE 柱 (用 5 mL 环己烷预活化), 用 5 mL 环己烷 - 乙酸乙酯 (体积比 95:5) 淋洗, 用 5 mL 乙酸乙酯 - 环己烷 - 乙酸 (体积比 95:5:5) 洗脱, 洗脱液氮气吹干, 用甲醇溶解后用液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.4 液相色谱与质谱条件

1.4.1 液相色谱条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱, 2.1 mm × 150 mm (5 μm, i. d.), 保护柱: Eclipse XDB - C₈ 柱, 2.1 mm × 12.5 mm (i. d.), 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇 (A) 和 0.5% 乙酸水溶液 (B); 梯度洗脱: 0 秒 30 min, 45% A 秒 80% A; 流速: 0.25 mL/min, 进样量 20 μL。

1.4.2 质谱条件 离子源: ESI 源; 离子源电压 (kV): 4.5; 毛细管温度: 群勃龙、勃地酮 200 °C, 黄体酮 300 °C; 毛细管电压 (V): 4.0; 碰撞能量 (eV): 35; 雾化气 N₂ (L/min): 0.9; 辅助气 N₂ (L/min): 9; 扫描方式: 正离子模式采用全扫描一级、二级质谱 (MS/MS)。

表 1 群勃龙、勃地酮和黄体酮的保留时间、母离子和子离子

被测物	保留时间 t/min	母离子 m/z	子离子 m/z
群勃龙	9.81	272	253 *, 228, 197, 159
勃地酮	10.45	287	269 *, 173, 135, 121
黄体酮	18.25	315	297 *, 279, 255, 109, 97

2 结果与讨论

2.1 LC - MS分离条件的选择

研究了不同配比的甲醇 - 水流动相体系，添加不同量 (0.2% 至 1.0%) 的乙酸梯度洗脱优化。3 种激素的化学结构、性质相似，色谱柱中的保留时间相近，采用等度洗脱不能将待测组分完全分离，经反复试验最终确定用甲醇 (A) 和 0.5% 乙酸水溶液的流动相体系，采用梯度洗脱。此外，对质谱分离条件进行了优化，获得了令人满意的结果，见图 1。

2.2 线性范围

取标准储备液适量配制成质量浓度为 5、10、20、50、100、200、400、800 μg/L 标准工作液，按上述色谱分离条件和质谱分析条件进行分离、测定。实验结果表明群勃龙、勃地酮和黄体酮在 5 至 800 μg/L 质量浓度范围内各物质的峰面积 (y) 与浓度

(x) 线性相关性良好。群勃龙、勃地酮和黄体酮的回归方程和线性相关系数分别为： $y = 248\ 144x + 348\ 718$, $R^2 = 0.998\ 3$; $y = 250\ 583x + 4 \times 10^6$, $R^2 = 0.997\ 7$; $y = 356\ 069x + 2 \times 10^6$, $R^2 = 0.997\ 5$ 。

2.3 方法的检出限

依据前述的样品前处理方法，采用质谱进行定量分析时，群勃龙、勃地酮、黄体酮的定量下限 (LOQ) 分别为 5.0、8.0、5.0 μg/L ($S/N = 10$)，检出限 (LOD) 分别为 1.5、2.4、1.5 μg/L ($S/N = 3$)，相当于实际样品的 LOQ 0.33、0.53、0.33 μg/kg ($S/N = 10$)，LOD 为 0.10、0.16、0.10 μg/kg ($S/N = 3$)。

2.4 实际样品加标回收率

按上述方法，在空白样品中分别加入 3 种不同浓度的混合标准溶液 (50、200、800 μg/L) 做回收试验，按确定的方法进行样品前处理，每个浓度点做 3 个平行，上机测定，计算样品的加标回收率。3 种激素的平均回收率介于 62% 至 99%，见表 2。

2.5 方法的精密度试验

用 20 μg/L 的标准样品按照 “1.4” 仪器条件重复测定 10 次，计算 RSD 结果，群勃龙、勃地酮、黄体酮的 RSD 分别为 8.0%，15.2%，12.9%。

3 结 论

建立了不同动物肌肉中甾类同化激素多残留的 LC - MS 分析方法，该方法对动物肌肉中群勃龙、勃地酮和黄体酮的检出限为 0.10 至 0.16 μg/kg；定量下限为 0.33 至 0.53 μg/kg。检出下限达到了国内外技术法规的要求，能满足实际样品的检测及监控的要求。

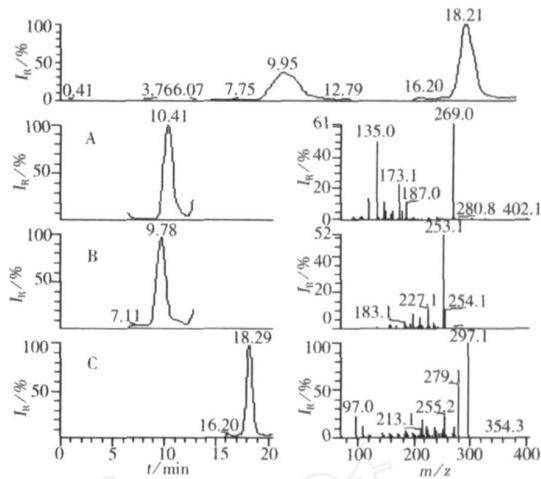


图 1 3 种激素混合标样总离子流图及质谱图

A. 勃地酮 (Boldenone) ; B. 群勃龙 (Trenbolone);

C. 黄体酮 (Progesterone)

表 2 LC - MS/MS 方法的回收率

样品	加入量 $\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 R/%		
		群勃龙	勃地酮	黄体酮
鸡肉	50	73 ±10.7	62 ±3.0	72 ±5.8
	200	80 ±6.9	85.5 ±14	95 ±6.0
	800	75 ±9.3	72 ±7.5	93 ±9.5
牛肉	50	69 ±0.8	81 ±2.8	80 ±2.9
	200	80 ±6.7	99 ±1.0	99 ±1.0
	800	86 ±6.3	96 ±4.0	99 ±1.0
猪肉	50	72 ±15.6	85 ±2.9	80.7 ±5.6
	200	91 ±13.8	96 ±5.2	92 ±7.0
	800	84 ±6.6	97 ±5.8	95 ±6.6

参考文献:

- [1] SEO A J, KMA H Y B CHUNGB B C, et al Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing - lipid filtration, solid - phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2005, 1067: 303 - 309.
- [2] TSCHMELAK J, PROLL G, GAUAL IGZ G Sub - nanogram per litre detection of the emerging contaminant progesterone with a fully automated immunosensor based on evanescent field techniques [J]. Anal Chim Acta, 2004, 519: 143 - 146.
- [3] VAN DEN HAUWEA O, DUMOUL N F, ANTIGNAC J P, et al Van Peteghem Liquid chromatographic - mass spectrometric analysis of 11 glucocorticoid residues and an optimization of enzymatic hydrolysis conditions in bovine liver[J]. Anal Chim Acta, 2002, 473: 127 - 134.
- [4] BEVERLEY E MURPHY, CYNDIE M P Allison Determination of progesterone and some of its neuroactive ring A - reduced metabolites in human serum[J].
- [5] RAUH M, GROSCHL M, RASCHER W, et al Automated, fast and sensitive quantification of 17 - hydroxy - progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on - line extraction steroids[J]. 2006, 71: 450 - 458.

Simultaneous Determination of Trenbolone , Boldenone and Progesterone in Animal Origin Food by HPLC - MS/MS

XIA Min, REALE Erwann, GAO Hong-bao, WANG Xin-xin, LIU Qing-jun,

LIU Qing, ZHANG Xiao-man

(Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract: The analytical method developed is based on HPLC - MS/MS to simultaneous determine Progesterone, Boldenone and Trenbolone in Chicken, Beef and Pork meats. The sample is freeze drying reduced in powder and a Methanol - Acetate Buffer (pH = 5.2) solution is added in order to perform the extraction and sonicated with a solution prior to deconjugation using β - glucosidase. The sample is purified using C18 and SDH solid phase extraction (SPE) cartridge prior to analyze on reversed phase with a elution gradient performed on Agilent C18 coupled with a HPLC - MS/MS. The detection Limit is respectively 0.11, 0.17 and 0.02 $\mu\text{g/kg}$ for Trenbolone, Boldenone and Progesterone with a ratio Signal/Noise > 3 in the 3 different kind of meat. The quantification was based on the peak area and overall recoveries of synthetic growth hormones were 62% - 99%.

Key words: Steroids; Progesterone; Trenbolone; Boldenone

(上接第 263 页)

analytes were extracted by ethyl acetate identification was achieved by electrospray ionization in positive mode (ESI+) using multiple reaction monitoring. The quantification was performed with external standards. The recoveries of 3 - Amino - 2 - oxazolidinone (AOZ) were in the range of 79.1% - 94.8% with spiked levels of 0.5 - 2 $\mu\text{g/kg}$. The RSD were less than 8.23%. The limits of detection were 0.10 $\mu\text{g/kg}$ for AOZ.

Key words: Furazolidone; Metabolize; Dry fish; UPLC - MS/MS