

# 动物组织中多种残留非类固醇同化激素的液相色谱 - 串联质谱法同时测定

许泓<sup>1</sup>, 庞国芳<sup>2</sup>, 林安清<sup>1</sup>, 古珑<sup>1</sup>, 何佳<sup>1</sup>,  
张曼<sup>1</sup>, 张骏<sup>1</sup>, 林娜<sup>1</sup>

(1. 天津出入境检验检疫局, 天津 300201; 2. 秦皇岛出入境检验检疫局, 河北 秦皇岛 066002)

**摘要:** 用液相色谱 - 串联质谱 (LC - MS/MS) 同时测定动物组织中玉米赤霉醇 (ZER)、玉米赤霉酮 (ZEAR)、己烯雌酚 (DES)、己烷雌酚 (HEX)、双烯雌酚 (DEN)。动物组织均质后, 用叔丁基甲基醚和乙酸盐缓冲液加酶解剂分别提取试样中残留激素及代谢物, 经硅胶柱净化, 应用 LC - MS/MS 大气压化学电离负方式 (APCI<sup>-</sup>), 以多反应离子监测 (MRM) 方式进行检测, 方法检测能力 (CC) 为 0.143 ~ 0.496 ng · g<sup>-1</sup>。选用 ZER、DES 的同位素标记物作内标, 内标法定量。DES、DEN 在 0.5 ~ 10 ng · g<sup>-1</sup> 范围内回收率为 58% ~ 108%, ZER + TAL、ZEAR、HEX 在 0.25 ~ 5 ng · g<sup>-1</sup> 范围内回收率为 66% ~ 109%。

**关键词:** 液相色谱 - 串联质谱; 动物组织; 残留; 玉米赤霉醇; 玉米赤霉酮; 己烯雌酚; 己烷雌酚; 双烯雌酚  
**中图分类号:** O657.63; TQ467.93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)06 - 0837 - 04

## Simultaneous Determination of Residual Nonsteroid Anabolic Hormones in Animal Tissues by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

XU Hong<sup>1</sup>, PANG Guo-fang<sup>2</sup>, LIN An-qing<sup>1</sup>, GU Long<sup>1</sup>, HE Jia<sup>1</sup>,  
ZHANG Man<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, LIN Na<sup>1</sup>

(1. Tianjin Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300201, China; 2. Qinhuangdao Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao 066002, China)

**Abstract:** A liquid chromatographic (LC) - tandem mass spectrometry (MS/MS) method was developed for simultaneous determination of zeranol (ZER), zearalanone (ZEAR), diethylstilbestrol (DES), hexestrol (HEX), and dienestrol (DEN) in animal tissue samples. The analytes were extracted with methyl tert-butyl ether and acetate buffer solution from the tissues after homogenization. The extract was cleaned up with a silica gel column before analysis. Detection capabilities (CC) related to the transition products of lowest abundance for the method were 0.143 - 0.496 ng · g<sup>-1</sup> in tissue and were achieved using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) in negative ion scan and multiple reaction monitoring (MRM) determination modes. Isotopically-labeled ZER-d4 and DES-d8 were used as internal standard in this method. The recoveries of the method were 58% - 108% for DES and DEN between 0.5 and 10 ng · g<sup>-1</sup>, and 66% - 109% for ZER, ZEAR and HEX between 0.25 and 5 ng · g<sup>-1</sup>, respectively.

**Key words:** liquid chromatography - tandem mass spectrometry; animal tissue; residues; zearalanone; zearalanone; diethylstilbestrol; hexestrol; dienestrol

玉米赤霉醇包括 玉米赤霉醇 (zeranol)、玉米赤霉酮 (zearalanone), 简称 ZER。玉米赤霉酮 (zearalanone, ZEAR) 为玉米赤霉醇代谢物。二苯乙烯类激素 (stilbenes) 主要包括己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES)、己烷雌酚 (hexestrol, HEX)、双烯雌酚 (dienestrol, DEN)。玉米赤霉醇和二苯乙烯类激素均属人工合成非类固醇同化性激素。国外毒理研究表明这些药物可诱导癌症<sup>[1]</sup>, 各国陆续公布法令禁止在畜牧业饲养过程中使用这类激素<sup>[2-3]</sup>。

已有文献报道应用液相色谱 - 串联质谱 (LC - MS/MS) 法分别检测动物组织中玉米赤霉醇和二苯乙烯类激素<sup>[4-5]</sup>, 玉米赤霉醇及代谢物和二苯乙烯类激素残留量同时检测还未见报道。本实验采用 LC -

收稿日期: 2007 - 04 - 06; 修回日期: 2007 - 06 - 07

基金项目: 国家标准化管理委员会资助项目 (20051879 - T - 326)

作者简介: 许泓 (1956 -), 男, 江苏宜兴人, 高级工程师, Tel: 022 - 28374405, E - mail: hongxu@yahoo.com.cn

MS/MS法同时检测玉米赤霉醇及代谢物和二苯乙烯类激素残留量,并根据欧盟指令<sup>[6]</sup>,通过实验数据计算出本方法对几种被测物的判断限(CC)和检测能力(CC)。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

1100液相色谱(美国 Agilent公司),API4000串联质谱仪(美国 AB公司),配有大气压化学电离源。色谱柱:ZORBAX SB C8, 150 mm ×4.6 mm, 3.5 μm(美国 Agilent公司)。自动固相萃取仪:ASPEC XLi(美国 Gilson公司)。固相萃取柱:Bakerbond SPE Sillica Gel, 3 mL, 500 mg(美国 J. T. Baker公司)。

玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚(含量均不低于 98%, 美国 Sigma公司)。己烯雌酚同位素标记物(含量不低于 98%, DES-d8, 美国 Cambridge Isotope Laboratories公司), 玉米赤霉醇同位素标记物(含量不低于 99%, ZER-d4, 荷兰 Rimm)。储备液用甲醇配制, 工作液根据需要以甲醇由储备液稀释。葡糖苷酸酶: H-2(Helix pomatia, 美国 Sigma公司)。氢氧化钠、乙酸、乙酸钠、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯等为分析纯。叔丁基甲基醚(MTBE)、乙腈、甲醇为色谱纯(德国 Merck公司)。基质提取液: 空白样品, 不加 ZER-d4和 DES-d8内标工作溶液, 其它按“1.3 操作”后得到。基质标准工作溶液: 将标准工作溶液及内标溶液混合后在氮吹仪中吹干, 以基质提取液涡旋 30 s 溶解。

### 1.2 LC-MS/MS分析条件

流动相为乙腈-水(体积比 70:30), 流速 1 mL/min; 进样量 50 μL。MS/MS条件: 电离方式 APCI(-), 离子源温度 325 °C; 气帘气压力 68.950 kPa; 雾化气压力 103.425 kPa; 辅助气 1压力 241.325 kPa; 喷雾器电流 - 5 μA; 电喷雾电压 - 4 500 V, 碰撞气高纯氮。检测以多反应监测(MRM)方式扫描, 测定 ZER、ZEAR、DES、HEX、DEN的负离子。监测离子及相应参数见表 1。

表 1 被测物结构及在多反应监测方式下被测物的监测离子及其相应参数

Table 1 Structures, diagnostic ions of hormones and parameters in MRM

Analyte (被测物)	Structures of nonsteroid anabolic hormone (化合物结构)	Transition( <i>m/z</i> )(离子对) Precursor ion(母离子)→ product ion(子离子)	Declustering potential (去簇电压) U/V	Collision energy (碰撞气能量) U/V	Collision cell exit potential(碰撞室 出口电压) U/V
ZER		321.1→277.2*	-100	-35	-8
		321.1→303.2	-100	-35	-8
ZEAR		319.3→205.1*	-126	-42	-8
		319.3→160.9	-126	-34	-8
ZER-d4		325.1→208.9	-100	-36	-8
		325.1→263.1*	-100	-38	-8
DES		267.0→222.1*	-90	-40	-10
		267.0→237.1	-90	-40	-10
DEN		265.0→221.1	-90	-35	-7
		265.0→235.1*	-90	-32	-7
HEX		269.0→134.0*	-75	-22	-7
		269.0→119.0	-75	-46	-7
DES-d8		275.1→227.9*	-74	-40	-15
		275.1→245.0	-73	-40	-15

\* quantification ions

### 1.3 样品前处理

称绞碎混匀后样品 5.0 g于离心管中, 加入 20 mL MTBE, 1 mL ZER-d4(50 μg/L)和 DES-d8(5 μg/L)内标溶液, 高速均质 1 min, 3 000 r/min离心 5 min, 上清液转移至另一试管中。离心管中残渣置于通

风橱中挥发 30 min, 加入 15 mL 乙酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH 5.2), 高速均质 1 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至具塞试管中, 并在 40 °C 水浴氮吹仪中吹去残余 MTBE 后, 加入 80  $\mu$ L 葡萄糖苷酸酶, 于 52 °C 烘箱中放置过夜。在水溶液中加入氢氧化钠溶液 (3 mmol/L) 将溶液 pH 值调至 7, 加入 10 mL MTBE, 充分混合, 3 000 r/min 离心 2 min。移取 MTBE 层与前面的 MTBE 提取液混合在氮吹仪上于 40 °C 水浴吹干。加入 1 mL 正己烷 - 二氯甲烷 (体积比 60 : 40) 溶液, 涡旋 30 s 溶解, 准备过柱。用 6 mL 正己烷分两次预洗硅胶柱, 流速 4 mL/min。上样, 流速 2 mL/min, 在样品试管中加入 3 mL 乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 6 : 94) 淋洗液, 混合后过柱, 流速 2 mL/min。用 3 mL 淋洗液以 3 mL/min 速率淋洗, 2 mL 空气流以 4 mL/min 速率吹过硅胶柱。用 6 mL 乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 60 : 40) 洗脱液洗脱, 流速 2 mL/min, 2 mL 空气流以 6 mL/min 速率吹过硅胶柱, 收集洗脱液。将洗脱液在氮吹仪上于 40 °C 水浴中吹干, 加 1 mL 流动相, 涡旋 30 s 溶解。溶液经 0.45  $\mu$ m 有机微孔滤膜过滤后, 收集样品供 LC-MS/MS 测定。

#### 1.4 方法判断限与检测能力

本方法对被测物质判断限 (CC) 及检测能力 (CC) 的确定, 根据欧盟指令中不制定允许限量物质的检测方法测定及计算<sup>[6]</sup>。动物组织样品中肝和肾基质的本底相对复杂。因此采用 20 个空白牛肝基质的本底, 在预期目标物应出现离子的保留时间窗口, 计算其平均噪音值, 噪音的 3 倍信号强度时浓度即为方法的 CC。用该方法得到的 CC 既适合定性亦适合定量。在 20 个样品中添加检出限浓度的标准物质进行测定, 所得的标准偏差乘以 1.64, 再加上 CC 即为方法的 CC。几种激素及代谢物的 CC 和 CC 值见表 2。

表 2 被测物的 CC 和 CC  
Table 2 CC and CC of analytes

Analytes	CC (S/N = 3)	CC
	w / (ng · g <sup>-1</sup> )	w / (ng · g <sup>-1</sup> )
ZER	0.167	0.216
ZEAR	0.131	0.157
DES	0.253	0.382
DEN	0.329	0.496
HEX	0.097	0.143

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理

动物组织中玉米赤霉醇和二苯乙烯类激素的提取, 不同文献有所不同<sup>[4-5]</sup>。以本研究方法提取玉米赤霉醇及代谢物和二苯乙烯类激素, 实验结果表明本法效率较理想, 回收率均大于 80%。

玉米赤霉醇及代谢物与二苯乙烯类激素结构差异较大, 见表 1。因而在确定最终实验条件时需兼顾两类物质。实验结果表明, 淋洗液选用乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 6 : 94), 6 mL 最好。洗脱液应用乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 60 : 40), 6 mL 可得到全部目标物较高的回收率。在实际检测中, 对于肝肾等基质较复杂的样品, 为得到较好的净化效果可先用乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 25 : 75) 洗脱二苯乙烯类激素<sup>[5]</sup>, 然后用乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 35 : 65) 再淋洗 1 次, 最后用乙酸乙酯 - 正己烷 (体积比 60 : 40) 洗脱, 合并两次洗脱液。虽然二次淋洗 ZER 和 ZEAR 会少量丢失, 但因二者的 CC 值较低, 且实验中添加了同位素内标物, 减少了本底干扰, 信噪比并不因此而降低, 所以对最终的检测灵敏度和结果不会有影响。动物组织中肝和肾基质复杂, 净化效果不好会抑制目标化合物的离子化效率, 降低被测组分的检测灵敏度。应用自动固相萃取仪 (ASPE) 可减少人为因素误差, 提高重复性。

### 2.2 仪器条件参数的优化

HPLC 条件的优化: 参照文献 [5], 并进一步优化, 最终选择柱效更高些的 ZORBAX SB C8 柱。

离子化方式的选择: 参照文献选用 APCI(-) 方式<sup>[5]</sup>, 通过对 APCI(-) 条件优化 (见表 1), 得到方法的 CC 值 (见表 2), 该值可以满足残留监控 1  $\mu$ g/kg 的限量要求。

MS 参数的优化: 玉米赤霉醇及代谢物和二苯乙烯类激素均带 2 个以上羟基, 因而易丢失 1 个 H<sup>+</sup>, 成为 [M - H]<sup>-</sup> 准分子离子, 被测物对应的母离子 (准分子离子), 见表 1。经第二级碰撞 (Q2) 解离, 第三级质量分析器 (Q3) 对解离产物进行分析, 从所得 MS<sup>2</sup> 质谱图, 选择丰度比较强的 2 个特征离子作为子离子<sup>[6]</sup>。调谐相关参数, 最终得到表 1 所列最佳参数。5 种物质响应值较低离子对的样品回收质量色谱图见图 1。

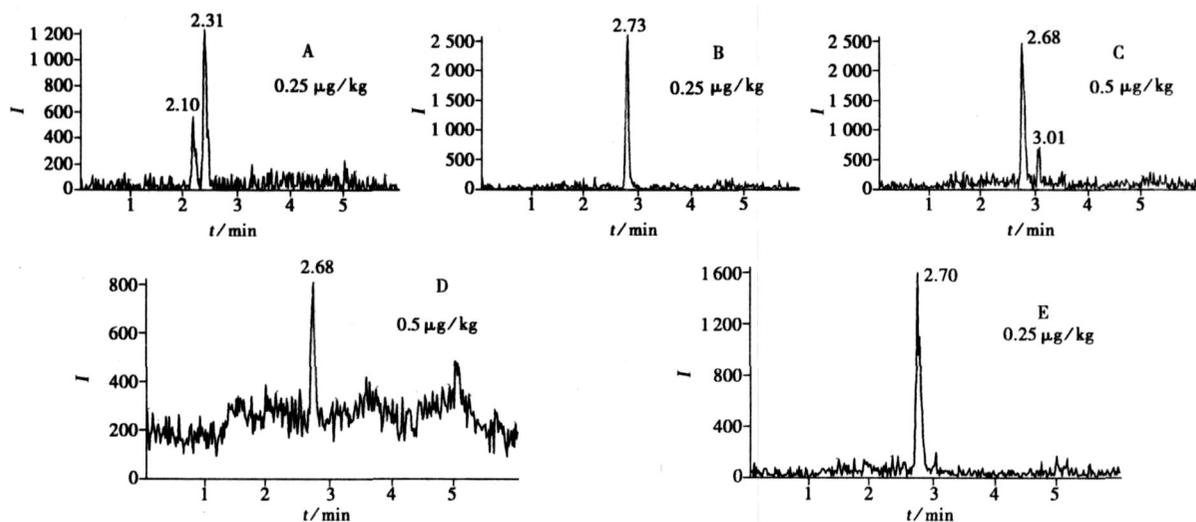


图 1 检出限回收 MRM 色谱图  
Fig. 1 MRM chromatograms of samples spiked at the limits of detection  
A. ZER; B. ZEAR; C. DES; D. DEN; E. HEX

### 2.3 定性定量离子的确定

按表 1 选择 1 个母离子和 2 个子离子可满足这类首要在定性时确证点数不得少于 4 的要求<sup>[6]</sup>。仪器按 CC 检测的所有被测物，其较弱离子对丰度比的变化均在允差范围内<sup>[6]</sup>。

本实验所选定量离子见表 1。检测动物组织中玉米赤霉醇和二苯乙烯类激素的残留量，由于基质复杂而对定量分析存在较严重的干扰，使定量的重复性难以满足要求<sup>[7]</sup>。为此实验选择 ZER-d4 作为 ZER 和 ZEAR 的内标物，DES-d8 作为二苯乙烯类激素的内标物，从实验第一步将其添加到样品中，校正了整个实验，提高了回收率和重复性，使方法更具操作性。

### 2.4 分析方法学参数

本方法 DES、DEN 在  $0.5 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  的检测范围内回收率为 58% ~ 108%，相对标准偏差为 3.36% ~ 14.7%；ZER、ZEAR、HEX 在  $0.25 \sim 5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  的检测范围内回收率为 66% ~ 109%，相对标准偏差为 5.49% ~ 15.2%。应用本方法检测了牛猪肝肾及肌肉组织、鸡、鱼、虾等样品。不同化合物在不同基质液中得到的线性  $r=0.9968 \sim 0.9997$ ，符合残留分析方法指令和基本规定的要求<sup>[6-7]</sup>。

### 参考文献：

- [1] 李瑞. 药理学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 293 - 302.
- [2] The Council of the European Union. Council Directive I 81/602/EEC [S]. Luxembourg: Official Journal of European Union, 1981.
- [3] 蔡辉益. 常用饲料添加剂 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 265 - 267.
- [4] 方晓明, 陈家华, 唐毅锋. 高效液相色谱法测定鸡肝中玉米赤霉醇的残留量 [J]. 色谱, 2003, 21: 158 - 161.
- [5] 许泓, 林安清, 古珑, 等. 自动固相萃取仪 / 高效液相色谱 - 质谱 / 质谱仪检测动物源性食品中残留二苯乙烯类激素的方法研究 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 20 - 23.
- [6] The Council of the European Union. Council Directive 2002/657/EC [S]. Luxembourg: Official Journal of European Union, 2002.
- [7] 富恩承, 钱毅, 庄无忌, 等. 出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定 [S]. 北京: 中国标准出版社, SN/T0001 - 1995.