

文章编号: 1006-2858(2010)06-0466-04

GC-MS法测定猪肉中雌激素类药物残留量

王丽娜^{1,2}, 陈晓辉¹, 毕开顺¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁省兽药饲料监察所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立测定猪肉中己烯雌酚 (diethylstilbestrol)、雌二醇 (estradiol)、炔雌醇 (ethinylestradiol)、戊酸雌二醇 (estradiol valerate) 残留量的 GC-MS 法, 为控制食源性动物食品的质量提供依据。方法 样品经乙酸乙酯提取, HLB 固相萃取小柱净化, 70 衍生后在 EI 源 SM 模式下进样分析。结果 己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇含量在 2.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 内线性关系良好, 戊酸雌二醇含量在 4.0 ~ 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 内线性关系良好。己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇、戊酸雌二醇相关系数分别为 0.998 4、0.999 2、0.998 8、0.991 7, 平均回收率 ($n=6$) 为 78.3% ~ 82.5% (RSD 为 4.4% ~ 9.6%)。结论 该方法为测定猪肉中这 4 种雌激素类药物残留量提供了可靠依据。

关键词: 气相色谱 质谱法; 猪肉; 己烯雌酚; 雌二醇; 炔雌醇; 戊酸雌二醇; 残留量
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

雌激素类药物在畜禽养殖中具有通过蛋白质同化作用提高食欲的功效, 可以用来提高饲料转化率, 促进动物生长。人体一旦食用有雌激素残留的动物性食品后, 就可通过食物链扰乱人体内激素平衡, 使女性儿童提前发育, 男性儿童呈女性化, 使男性生殖系统病变及女性乳腺癌发生率上升^[1-3]。己烯雌酚及其盐在《中华人民共和国农业部公告第 235 号》中被列为禁止使用的药物, 在动物性食品中不得检出。欧盟于 2007 年 7 月在 WTO/TBT 通报中, 规定将全面禁止在食源性动物中使用雌甾二醇 17 及其衍生物 (《关于禁止在畜牧业中使用具有激素或甲亢疗效物质以及激动药的理事会指令 96/22/EC 的修正》), 在动物性食品中不得检出。

目前检测雌激素类药物残留的方法主要为 HPLC 法^[4]、GC-MS 法^[5-9]、LC-MS 法^[10]、酶联免疫分析法 (ELISA)^[11] 等。其中酶联免疫分析法灵敏度高但难以同时对多种类药物残留进行测定, HPLC 法的灵敏度较低, 我国目前畜禽产品中检测己烯雌酚的 HPLC 法检测限为 0.25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 难以满足残留检测的要求^[2,12]。GC-MS 法在低物质浓度、高基质背景的情况下, 具有降低背景干扰, 改善灵敏度等优点。目前, 在国内尚未见有关上述 4 种雌激素类药物同时检测的 GC-MS 法。作者所建立的方法样品前处理简单, 灵敏度高, 专属性强, 且能够同时检测 4 种雌激素类药物, 达到多残留检测的目的。四种雌激素类药物的化学结构式见图 1。

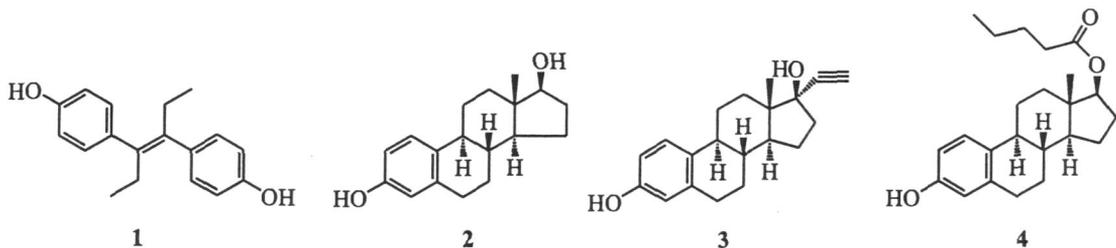


Fig 1 Structures of diethylstilbestrol (1), estradiol (2), ethinylestradiol (3) and estradiol valerate (4)

1 仪器与材料

Agilent 6890-5973N 气相色谱质谱联用仪

(美国 Agilent 公司)。己烯雌酚对照品 (美国 Sigma 公司, 批号 3048X), 雌二醇对照品 (批号 100182-200103)、戊酸雌二醇对照品 (批号

收稿日期: 2009-09-24

作者简介: 王丽娜 (1982-), 女 (汉族), 辽宁凌源人, 硕士研究生, E-mail wln1982929@163.com; 毕开顺 (1956-), 男 (汉族), 河北唐山人, 教授, 博士, 主要从事药品质量标准 and 中药现代化研究, Tel 024-23986296, E-mail bikaishun@yahoo.com.

100163-199503) (中国药品生物制品检定所), 炔雌醇原料药 (北京紫竹药业有限公司)。HLB 固相萃取小柱 (美国 Waters 公司), 乙酸乙酯 (色谱纯, 美国 TED IA 公司), 正己烷 (分析纯, 北京化工厂), 水 (Milli-Q 超纯水, 美国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: HP-5MS 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm, i d 0.25 μ m); 进样口温度: 280 ; 程序升温: 100 1 min, 以 30 \cdot min⁻¹ 的升温速度升至 220 , 保持 2 min, 再以 8 \cdot min⁻¹ 升至 300 并保持 2 min; 载气: 体积分数为 99.999% 的高纯氦气; 载气流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 进样量: 不分流进样 1.0 μ L。

2.2 质谱条件

E 源, SM 采集; 电离电压: 70 eV; 四极杆温度: 160 ; 离子源温度: 230 ; 传输线温度: 280 ; 溶剂延迟: 8 min。4 种化合物的监测离子为: 己烯雌酚: m/z 412, m/z 413, m/z 383, m/z 397; 雌二醇: m/z 416, m/z 326, m/z 232; 炔雌醇: m/z 440, m/z 425, m/z 285; 戊酸雌二醇: m/z 428, m/z 244, m/z 218。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照溶液的制备

分别取己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇、戊酸雌二

醇对照品适量, 精密称定。加甲醇溶解配制成己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇 1.0 mg \cdot L⁻¹ 对照溶液, 戊酸雌二醇 2.0 mg \cdot L⁻¹ 对照溶液。

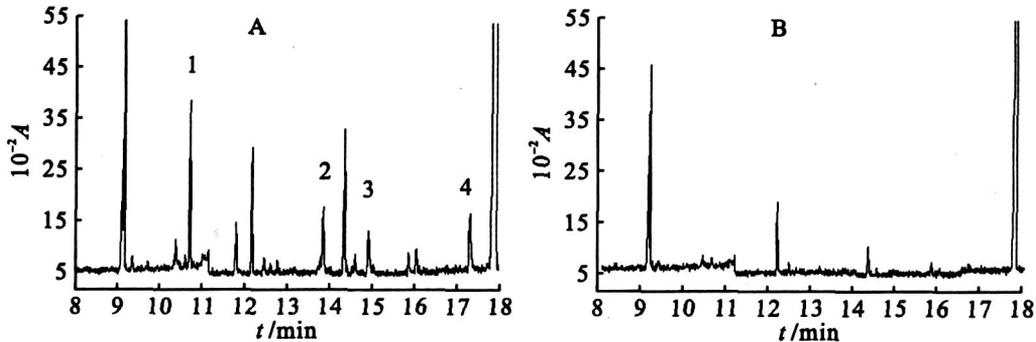
2.3.2 样品溶液的制备

称取粉碎样品约 5.0 g, 精密称定。置于 50 mL 离心管中, 分别加入质量分数为 10% 碳酸钠溶液 5 mL 和乙酸乙酯 15 mL, 均质后离心 5 min, 收集乙酸乙酯提取液, 用乙酸乙酯 15 mL 重复提取一次, 合并提取液。在提取液中再加入质量分数为 10% 的碳酸钠溶液 5 mL, 涡旋离心后取上清液于 40 \cdot 水浴旋转蒸发至干。残渣用乙酸乙酯-正己烷 (体积比 15:85) 5 mL 溶解后, 转移到依次用正己烷 5 mL、乙酸乙酯 5 mL、甲醇 5 mL、水 5 mL 活化的 HLB 固相萃取小柱上。抽干后, 先用乙酸乙酯 5 mL 洗脱, 再用乙酸乙酯-正己烷 (体积比 1:4) 5 mL 洗脱, 收集洗脱液, 在 60 \cdot 水浴上 N₂ 吹干。加入吡啶 250 μ L 和衍生剂双三甲基硅基三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷 (BSTFA-TMCS, 体积比 99:1) 250 μ L, 涡旋混合, 封口后在 70 \cdot 烘箱中衍生 40 min, 进行 GC-MS 分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性考察

将一定体积的雌激素类药物对照溶液加入空白猪肉 (已测定不含上述 4 种雌激素类药物) 中, 按“2.3.2 条操作, 得色谱图 1。将 6 份空白猪肉样品各取 5.0 g, 按“2.3.2 条操作, 得图 1。



1—Diethylstilbestrol; 2—Estradiol; 3—Ethinylestradiol; 4—Estradiol valerate

Fig 2 TIC chromatograms of estrogens (A) and blank pork (B)

2.4.2 线性关系考察

取空白猪肉样品 (已测定不含有上述 4 种雌激素类药物) 5.0 g, 精密称定。按“2.3.2 条操作, 制备成己烯雌酚、雌二醇和炔雌醇的含量分别为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μ g \cdot kg⁻¹, 戊酸雌二醇的含量为 4.0、10.0、20.0、40.0、100.0、

200.0 μ g \cdot kg⁻¹ 的样品。以待测物含量 (c) 为横坐标, 待测物峰面积 (A) 为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得直线回归方程。即: 己烯雌酚为 $A = 1.239 \times 10^5 c - 4.121 \times 10^5$, $r^2 = 0.9984$ ($n = 2$); 雌二醇为 $A = 6.91 \times 10^4 c - 1.318 \times 10^5$, $r^2 = 0.9992$ ($n = 2$); 炔雌醇为 $A =$

$3.13 \times 10^4 c - 1.57 \times 10^4$, $r^2 = 0.9988$ ($n = 2$); 戊酸雌二醇为 $A = 3.27 \times 10^4 c - 2.63 \times 10^4$, $r^2 = 0.9917$ ($n = 2$)。

结果表明,己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇含量在 $2.0 \sim 100.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系,戊酸雌二醇含量在 $4.0 \sim 200.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系。其中己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇检测限为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 定量下限可达 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 戊酸雌二醇的检测限为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 定量下限可达 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.4.3 精密度试验

取空白猪肉约 5.0 g , 精密称定。按“2.3.2”条操作, 配制低、中、高 3 个含量 (己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇的含量均为 $5, 20, 80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 戊酸雌二醇的含量为 $10, 40, 160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品。根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品

的测得含量, 根据 QC 样品的测定结果计算该方法的精密度。己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇、戊酸雌二醇的日内精密度分别为 $4.3\%, 5.0\%, 8.2\%, 4.0\%$, 日间精密度分别为 $3.4\%, 5.7\%, 6.8\%, 3.4\%$ 。均符合目前生物样品分析方法指导原则的有关规定。

2.4.4 回收率试验

取空白猪肉约 5.0 g , 精密称定。配制低、中、高 3 个含量 (己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇的含量均为 $5, 20, 80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 戊酸雌二醇的含量为 $10, 40, 160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的样品。同时另取空白猪肉 5.0 g , 按“2.3.2”条操作, 向获得的洗脱液中加入相应含量的对照溶液, 作为供试溶液进样分析。以每一含量的峰面积比值计算提取回收率 (表 1)。3 个含量雌激素类药物的回收率在 $78.3\% \sim 82.5\%$ 内。

Table 1 Results of the recovery test for the 4 kinds of estrogens ($n = 9$)

Compound	$m_{\text{added}} / \mu\text{g}$	$m_{\text{found}} / \mu\text{g}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
Diethylstilbestrol	0.025	0.019	76.4	78.3	6.4
	0.100	0.084	84.0		
	0.400	0.298	74.5		
Estradiol	0.025	0.021	84.0	80.2	4.4
	0.100	0.077	77.0		
	0.400	0.318	79.5		
Ethinylestradiol	0.025	0.022	88.0	82.5	5.8
	0.100	0.080	80.0		
	0.400	0.318	79.5		
Estradiol valerate	0.050	0.036	71.7	80.9	9.6
	0.200	0.174	86.9		
	0.800	0.674	84.3		

2.4.5 稳定性试验

取空白猪肉约 5.0 g , 精密称定。制备低、中、高 3 个含量 (己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇的含量均为 $5, 20, 80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 戊酸雌二醇的含量为 $10, 40, 160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 QC 样品, 在室温下放置 $0, 2, 5, 12, 24 \text{ h}$, 分别进样测定。测得样品含量的 RSD

小于 15% 。结果表明处理后的猪肉样品溶液在室温放置 24 h 内稳定。

2.5 样品含量测定

取不同批次的样品, 按“2.3.2”条方法操作, 进样分析, 计算样品雌激素类药物的含量, 结果见表 2。

Table 2 The results of content determination of samples ($n = 3$)

($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Run No	Diethylstilbestrol	Estradiol	Ethinylestradiol	Estradiol valerate
1	nd	nd	nd	nd
2	nd	10	nd	10
3	nd	nd	nd	nd
4	nd	20	nd	nd
5	nd	nd	20	20

nd—Not detected

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择

提取溶剂的选择。雌激素类药物易溶于弱极性和中等极性的有机溶剂,难溶于水。临床上使用剂量较低,因此在动物组织中的残留量很低。作者采用甲醇、乙腈、乙酸乙酯 3 种有机溶剂进行提取,结果乙酸乙酯提取回收较高。进而考察了乙酸乙酯在酸性和碱性条件下的提取回收率,结果表明在碱性条件下基质干扰低,提取回收率高。

固相萃取小柱的选择。作者考察了 C_{18} 柱、硅胶柱、HLB 柱 3 种固相萃取小柱。其中 HLB 柱可以将 4 种物质全部保留,且回收率大于 90%。硅胶柱只保留 DES 和 E2,对另外 2 种雌激素类药物没有保留。Oasis HLB 柱含有由乙烯吡咯烷酮和二乙烯基苯组成的亲脂-亲水平衡相,与 C_{18} 柱比较,Oasis HLB 柱在更宽的 pH 范围内稳定,净化效果和回收率更好^[6]。

3.2 分析测试条件的选择

由于雌激素分子中有多个极性基团,不易挥发,衍生化可提高挥发性,改善极性物质的色谱行为,提高它的选择性和灵敏度。考察了 N,O 双三甲基硅烷基三氟乙酰胺 (BSTFA)、N,O 双三甲基硅烷基三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷 (BSTFA-TMCS) (体积比 99:1)、N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA) 3 种衍生化试剂。结果表明,3 种衍生化试剂均能将雌激素类药物衍生,但衍生效率不同。其中 BSTFA 和 BSTFA-TMCS (体积比 99:1) 衍生效率相差不大,但 MSTFA 在衍生炔雌醇时衍生效率较差,衍生效率只有其他 2 种衍生试剂的 60%,对其他 3 种雌激素类药物衍生效率相差不大,故选用 BSTFA-TMCS (体积比 99:1) 为衍生化试剂。

4 结论

建立了猪肉中的雌激素类药物残留的液液萃取-固相小柱净化-衍生化前处理技术和质谱检测方法。所建立的分析方法样品前处理提取净化效果好,且专属性强、灵敏度高。其中己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇定量下限可达 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,戊酸雌二醇定量下限可达 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,适用于猪肉中

这 4 种雌激素类药物的检测。

参考文献:

- [1] 林奕芝,司徒潮满,刘奋,等. GC-MS 法测定肉中雌激素残留量方法的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1165 - 1167.
- [2] 王玉飞,周凯,挚继革. GC-MS-MS 法同时测定海产品中 4 种雌激素残留 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1): 21 - 23.
- [3] 吴银良,刘素英,单吉浩,等. 气相色谱-质谱法分析鸡肝中己烯雌酚残留量 [J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(11): 8 - 10.
- [4] 黄文繁,柳洁,何碧英. SPE-HPLC 法测定水产品中 4 种雌激素残留量 [J]. 现代预防医学, 2005, 32(8): 1027 - 1028.
- [5] 丁雅韵,徐晓云,谢孟峡,等. 动物组织中己烯雌酚残留的基体固相扩散-气相色谱-质谱分析方法研究 [J]. 分析化学, 2003, 31(11): 1356 - 1359.
- [6] 王建华,庞国芳,丁宁,等. 气相色谱-负化学电离质谱法检测牛尿中雌二醇的残留量 [J]. 化学分析计量, 2007, 16(3): 17 - 20.
- [7] ZHOU Yi-qi, WANG Zi-jian, JIA Ning. Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination [J]. Environmental Sciences, 2000, 19: 879 - 884.
- [8] BECK J, TOTSCHE K U, KNABNER I K. Rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chemosphere, 2008, 71: 954 - 960.
- [9] GABET V, MICHÉ C, BADOS P, et al. Analysis of estrogens in environmental matrices [J]. Trends, 2007, 26(11): 1113 - 1131.
- [10] 张翠英,李振国,徐金玲. LC-MS 测定猪肉中己烯雌酚方法的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(5): 786 - 787.
- [11] 孙俐,郑文杰,唐丹舟. S/N 1956-2007 肉及肉制品中己烯雌酚残留量的检测方法-酶联免疫法 [S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
- [12] 邹龙,林洪,江洁. 氘代同位素内标气相色谱-质谱法测定鱼贝类肌肉中雌二醇残留 [J]. 分析化学研究报告, 2007, 7(35): 983 - 987.

(下转至第 488 页)

DAI Jian-lu¹, LI Rui-fen^{1,2}, WANG Yi-guang¹, WU Lin-zhuan¹, HE Wei-qing¹

(1. Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China; 2. Tonglian Pharma Shenyang Antibiotic Manufacturer, Shenyang 110122, China)

Abstract: Objective To optimize the fermentation medium components for bitespiramycin production in a new gene-engineered bitespiramycin-producing strain with integrated double copy of isovaleryltransferase (ist) gene. **Methods** Response surface methodology (RSM) was adopted, two level fractional factorial design (FFD) was first used to evaluate the influence of six related factors. The path of steepest ascent was used to approach the optimal region of the fermentation conditions subsequently. The concentrations of those two main factors were further optimized by using central composite design (CCD). **Results** Two factors were determined to play important roles in the medium, which were KH_2PO_4 and NaCl. By solving the quadratic regression model equation, the optimal concentrations of the variables were determined as KH_2PO_4 $0.645 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $12.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. An optimized fermentation medium was obtained for this newly developed strain, which was composed of ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): starch 60, CaCO_3 7.0, MgSO_4 2.0, NH_4NO_3 6.0, yeast powder 3.0, fish meal 15, MnCl_2 0.10, NaCl 12.5, KH_2PO_4 0.645. Under the optimum conditions, the relative bitespiramycin titer of 139% as predicted in theory and 142% in the experiment were obtained with an increase of 42% compared to the initial medium. Meanwhile the relative proportion of total isovalerylspiramycin was no significant changes. **Conclusions** Response surface methodology as a statistical tool is efficient to improve the productivity of a new gene-engineered strain of antibiotic producer.

Key words: bitespiramycin; response surface methodology; medium optimization

(上接第 469 页)

Analysis of estrogen residues in pork by gas chromatographic-tandem mass spectrometry

WANG Li-na^{1,2}, CHEN Xiao-hui¹, BI Kai-shun¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Liaoning Supervising Agency of Veterinary Drug and Feed, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To develop and validate a rapid sensitive and specific method for quantitative analysis of estrogen residues (DES, diethylstilbestrol, E2, estradiol, EE2, ethinylestradiol, EV, estradiol valerate) in pork by gas chromatographic-tandem mass spectrometry, which can be applied to the study of estrogen residues in pork. **Methods** The 4 kinds of components were extracted from homogenized samples with ethyl acetate in base followed by solid-phase extraction with HLB column and trimethylsilylation at 70°C for 40 minutes, then the GC-MS method in selected ion monitoring mode (SIM) was used. **Results** A good linearity was achieved with the coefficient $r^2 > 0.9917$ ($n=2$). The average recovery of estrogens was more than 71.7% with RSD lower than 7.2% ($n=6$). **Conclusions** The method is sensitive, accurate, rapid, and suitable for the analysis estrogen residues in pork.

Key words: GC-MS; pork; diethylstilbestrol; estradiol; ethinylestradiol; estradiol valerate; residue