

超高效液相色谱 – 串联质谱法测定水产品中群勃龙残留方法研究

班付国, 陈 蔷, 宋志超, 贾振民, 吴宁鹏, 彭 丽

(河南省兽药监察所, 郑州 450008)

[收稿日期] 2010-07-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2010)10-0046-05 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了牛奶中苯并咪唑类药物及代谢物残留的超高效液相色谱 – 串联质谱检测方法。水产样品经乙酸乙酯提取, C₁₈固相萃取柱净化, 采用超高效液相色谱 – 串联质谱多反应监测模式检测, 外标法定量。不同基质中, 群勃龙在 2~100 ng/mL 的浓度范围内呈现良好的线性相关, 相关系数为 0.994 以上; 本方法对群勃龙在鱼、虾、鳖、蟹类产品中的检测限为 0.5 μg/kg, 定量限为 1 μg/kg, 在贝类产品中的检测限为 1 μg/kg, 定量限 2 μg/kg。不同水产品的基质中添加 1~10 μg/kg 浓度范围内, 其回收率为 74.2%~119%, 批内变异系数在 1.0%~9.0% 之间, 批间变异系数在 0.3%~8.5% 之间。本方法分析速度快, 灵敏度高, 重现性好, 各项技术指标均满足国内外相关法规要求, 可用于水产品中群勃龙的残留检测。

[关键词] 水产品; 群勃龙; 残留; 超高效液相色谱 – 串联质谱法

Determination of Trenbolone Residues in Fishery Products by Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry

BAN Fu-guo, CHEN Qiang, SONG Zhi-cao, JIA Zhen-min, WU Ning-peng, PENG Li

(Henan Institute of Veterinary Drug Control, Zhengzhou 450008, China)

Abstract A method based on ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS) has been developed for the determination of trenbolone residues in fishery products. The analyte was extracted with ethyl acetate, and cleaned by C₁₈ solid phase extraction cartridge. Quantification of the analyte was achieved by UPLC – MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) using external standard method. Detection limits and quantification limits of this method for the analyte were all 0.5 μg/g and 1 μg/g in fish, shrimp, turtle, crab, and were 1 μg/g and 2 μg/g in seashell. The overall recovery varies from 74.2%~119% at the spiked level of 1~10 μg/kg in different sample, and the intra- and inter- batch coefficients was from 1.0%~9.0% and from 0.3%~8.5%, respectively. The method was reliable, sensitive and reproducible, its performance can meet the requirements of the domestic and international legislation. The method adapts to the determination of trenbolone residues in fishery products.

Key words trenbolone; fishery products; residues; UPLC – MS/MS

群勃龙属于同化激素类药物, 具有环戊烷骈多氢菲母核结构。分子式为 C₁₈H₂₂O₃, 分子量为 270.162, 化学名为 17-羟基-4,9,11-雌甾三

烯-3-酮, 其结构式如图 1。群勃龙具有雄性激素作用和促生长作用, 主要表现为蛋白同化作用, 即促进蛋白质合成, 抑制蛋白质分解代谢, 提高基础

代谢, 改善饲料转化率^[1]。在水产养殖生产中非法使用群勃龙, 会造成水产品中的药物残留, 人们在食用了含有这些药物残留的水产品后可能会干扰人体正常的激素平衡, 导致内分泌紊乱, 而且, 多数激素类物质具有潜在的致癌性, 长期摄入同化激素会导致机体代谢紊乱, 发育异常和肿瘤, 危及消费者的健康。20世纪80年代以来, 许多国家和组织通过立法限制或禁止在食用性动物养殖中使用同化激素, 我国农业部也规定在所有食品动物中禁止使用群勃龙^[2]。但由于经济利益的驱使, 违法滥用现象仍较普遍。为了保障我国出口动物源食品的安全和人民的健康, 对群勃龙的残留监测势在必行。

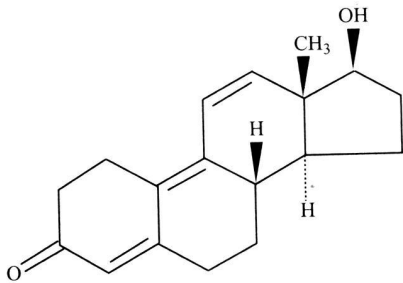


图1 群勃龙结构式

目前, 国内外报道的同化激素类药物检测方法主要有: 高效液相色谱法(HPLC)^[3]、气质联用法(GC-MS)^[4]、放射免疫分析法^[5]、液质联用法(LC-MS)^[6]等, 其中确证检测方法多为GC-MS和LC-MS法, 但气质联用方法往往需要衍生化, 使样品前处理过程较为繁琐。本方法参考已有的文献资料, 建立了水产品中群勃龙残留的超高效液相色谱-串联质谱检测方法, 以保障对此药物在水产品

表2 群勃龙保留时间及定性、定量离子对

药物名称	保留时间	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
群勃龙	0.84	271.1 > 199.1	271.1 > 199.1	30	23
		271.1 > 253.1			18

1.4.3 样品前处理 准确称取试料 2 g (± 0.05 g), 置于 5 mL 聚丙烯离心管中, 加入乙酸乙酯 10 mL, 涡旋混合 30 s, 超声提取 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 倾取上清液于另一离心管中; 用乙酸乙酯 10 mL 重复提取一次, 合并上清液, 于 40°C 水浴下氮气吹干。残余物用 20% 甲醇溶液 3 mL 溶解, 涡旋 1 min, 过用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化的 C_{18} 固相萃取柱, 3 mL 40% 甲醇溶液淋洗, 挤干, 3 mL 甲醇洗脱。洗脱液于 40°C 水浴下氮气吹干, 残余物用 80% 甲醇溶液 0.5 mL 溶解, 涡旋 1 min, 过 0.22 μ m

中的残留监控。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 超高效液相色谱-串联质谱仪 (ThermoFisher 公司); XP205 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), SIGMA 3-30K 离心机 (德国 SIGMA 公司); C_{18} 固相萃取柱 (3 mL / 200 mg)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯; 乙酸乙酯为分析纯; 群勃龙标准品含量为 97.0%, 购于德国 Dr Ehrenstorfer GmbH。

1.3 标准溶液的配制 精密称取群勃龙标准品约 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.1 mg/mL 的标准贮备液。再精密吸取标准贮备液 1 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 制成 1 μ g/mL 的标准中间液。

1.4 试验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱: C_{18} (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m); 柱温: 30°C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μ L; 流动相为 A 相: 乙腈; B 相: 0.1% 甲酸水溶液; 梯度洗脱程序见表 1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	A%	B%	变化曲线
1	50	50	1
2	80	20	6
3	50	50	1

1.4.2 质谱参考条件 电喷雾离子源; 正离子扫描; 多反应监测; 毛细管温度: 350°C; 碰撞气压力: 0.16 Pa; 测试药物定性、定量离子对及对应的碰撞能量见表 2。

微孔滤膜后, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.4.4 基质标准曲线的绘制 精密量取群勃龙标准中间液适量, 用甲醇配制成浓度为 2.5、10、20、50 和 100 ng/mL 的系列标准溶液; 再分别取 6 份空白试料, 按样品处理步骤处理, 在洗脱液中分别加入上述各浓度群勃龙标准溶液 0.5 mL, 吹干后, 残余物加入 80% 甲醇 0.5 mL, 使成浓度为 2.5、10、20、50 和 100 μ g/L 的基质标准曲线, 过 0.22 μ m 滤膜后上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐

标, 浓度为横坐标, 绘制基质标准曲线。

1.4.5 准确度和精密度 采用标准添加法。在不同基质空白组织样品中添加 1 μg/kg, 2 μg/kg, 5 μg/kg 3个不同浓度进行准确度和精密度试验, 各浓度进行 5个样品平行试验, 重复 3次, 计算回收率及批内、批间相对标准偏差。

1.4.6 检测限与定量限 添加适量标准溶液于 2 g空白样品中, 经提取、净化后测定, 依据信噪比 $S/N \geq 3$ (按 P/P 算) 为检测限, 依据信噪比 $S/N \geq 10$ (按 P/P 算) 为定量限。

2 结果

2.1 基质标准曲线 按照上述方法制标准曲线, 在鱼、虾、鳖、蟹、贝等不同水产品的基质中群勃龙回归方程及相关系数见表 3 从表中可以看出群勃龙在 2 μg/L~100 μg/L 的浓度范围内呈现良好的线性关系, 相关系数均在 0.994 以上。

表 3 群勃龙回归方程及相关系数

组织	回归方程	r
鳊鱼	$Y = 68974X + 20133$	0.999 8
对虾	$Y = 12351X - 553$	0.994 5
鲈鱼	$Y = 4751X + 8828$	0.998 7
鲤鱼	$Y = 5617X - 2890$	0.995 1
草鱼	$Y = 4877X + 7704$	0.998 3
扇贝	$Y = 18118X - 19544$	0.999 9
中华鳖	$Y = 102101X - 23410$	0.999 9
海蟹	$Y = 51975X + 19688$	0.999 9

2.2 准确度与精密度 在鱼、虾、鳖、蟹、贝等不同水产品的空白样品中添加三个不同浓度的群勃龙进行回收率试验, 结果汇总见表 4。可以看出群勃龙在鱼、虾、鳖、蟹、贝样品中的平均回收率为 74.2%~119%, 批内变异系数在 1.0%~9.0% 之间, 批间变异系数在 0.3%~8.5% 之间。群勃龙的标准溶液、空白溶液、添加溶液特征离子质量色谱图见图 2~图 4。

表 4 水产中群勃龙残留回收率试验及批内批间相对标准偏差

基质	添加浓度 / (μg·kg ⁻¹)	测定次数	平均回收率 / %	批内相对标准偏差 (n=5) / %	批间相对标准偏差 (n=3) / %
鳊鱼	1	1	95.7	3.6	1.2
		2	95.3	3.3	
		3	97.5	2.2	
	2	1	100.0	3.2	0.8
		2	101.2	2.2	
		3	101.5	3.0	
	5	1	99.2	7.0	2.7
		2	96.2	6.7	
		3	101.6	6.1	
对虾	1	1	93.7	4.7	3.5
		2	87.3	7.3	
		3	91.2	9.0	
	2	1	90.6	2.4	3.7
		2	84.2	1.2	
		3	88.6	3.3	
	5	1	80.3	4.3	6.6
		2	75.9	2.6	
		3	86.5	4.4	
鲈鱼	1	1	98.1	3.5	5.5
		2	91.2	6.1	
		3	88.2	5.2	
	2	1	98.1	3.5	8.5
		2	104.5	3.4	
		3	88.2	7.4	
	5	1	99.9	3.4	3.5
		2	106.1	4.4	
		3	106.3	6.6	
鲤鱼	1	1	103.1	3.5	5.6
		2	113.0	2.9	
		3	102.4	3.2	
	2	1	103.5	3.3	6.0
		2	112.7	3.1	
		3	100.6	2.6	

(续表)

基质	添加浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测定次数	平均回收率 %	批内相对标准偏差 ($n=5$) %	批间相对标准偏差 ($n=3$) %
鲤鱼	5	1	105.3	2.2	
		2	109.4	5.1	4.0
		3	101.0	7.0	
草鱼	1	1	98.9	2.4	
		2	97.4	5.6	2.6
		3	102.4	3.6	
	2	1	101.2	1.4	
		2	97.7	3.7	3.7
		3	105.2	2.5	
扇贝	5	1	107.6	5.1	
		2	110.2	3.7	5.6
		3	98.8	3.2	
	10	1	108.4	3.7	
		2	104.5	4.7	2.4
		3	103.7	5.1	
中华鳖	1	1	99.4	5.0	
		2	101.4	4.5	2.2
		3	97.0	7.0	
	2	1	101.8	2.2	
		2	102.2	1.0	1.0
		3	103.0	1.4	
海蟹	5	1	101.8	2.2	
		2	102.8	1.7	0.6
		3	102.1	2.3	
	1	1	99.2	1.8	
		2	99.7	1.6	0.5
		3	99.9	3.1	
海蟹	2	1	102.9	3.1	
		2	97.3	7.4	0.3
		3	102.0	3.8	
	5	1	102.6	1.6	
		2	102.7	3.3	3.0
		3	100.8	2.7	
5	1	105.9	2.3		
	2	107.6	6.8	1.1	
	3	106.4	7.6		

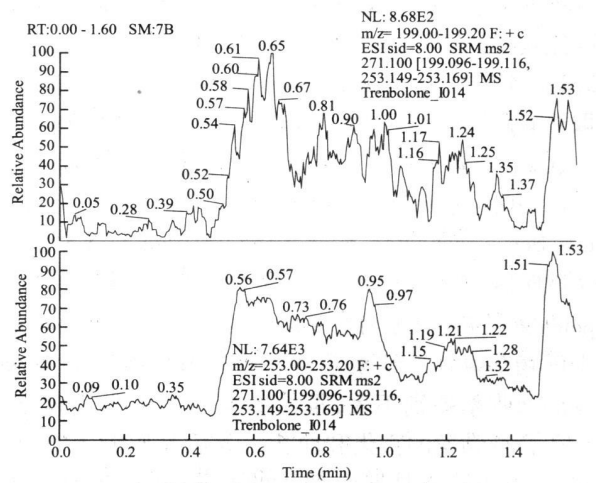
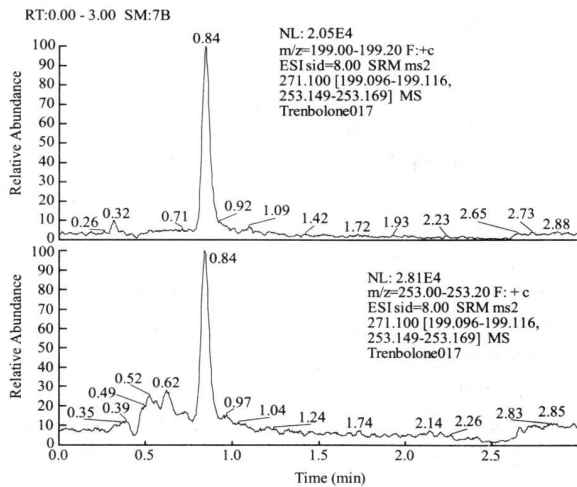


图2 基质标准溶液中群勃龙特征离子质量色谱图(5 $\mu\text{g/L}$)

图3 空白试样中群勃龙特征离子质量色谱图

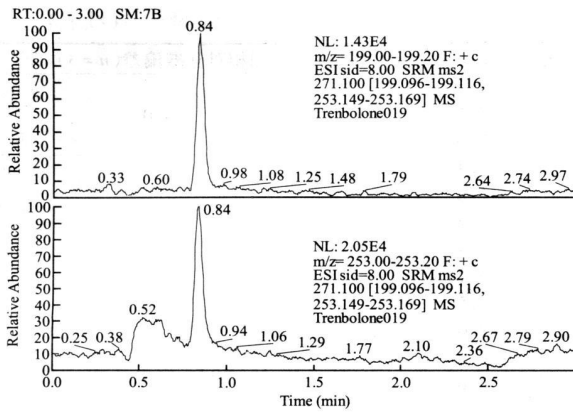


图 4 空白添加试样中群勃龙特征离子质量色谱图 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

2.3 检测限与定量限 群勃龙在鱼、虾、鳖、蟹类产品中的检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 在贝类产品中的检测限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群勃龙在鱼、虾、鳖、蟹类产品中的定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 在贝类产品中的定量限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$

3 讨论

3.1 提取条件 文献报道的提取方法, 采用的提取溶剂有乙腈^[7]、叔丁基甲醚^[4]、乙酸乙酯^[8]和甲醇-乙酸铵^[9]等。本方法比较了乙腈和乙酸乙酯的提取效果, 结果发现, 用乙腈提取样品, 第一次离心后再加乙腈提取时, 样品结块, 单纯用涡旋振荡的方式不能将其分散, 需用玻璃棒将其捣碎再提取; 在吹干乙腈的过程中耗时较长; 由于没有采取脱脂步骤, 吹干后加 20% 甲醇溶解后溶液浑浊, 过柱较慢。用乙酸乙酯作为提取液时, 离心后再提取样品无结块现象, 易于分散; 吹干时间较短; 考察两种提取方法的回收率及其变异系数, 发现用乙酸乙酯能获得比乙腈更高更稳定的提取效果。

3.2 净化条件 文献中报道的用于净化的固相萃取柱有碳黑柱 + 氨基柱、硅胶柱、阳离子交换柱、 C_{18} 柱、 C_{18} 柱 + 氨基柱^[4,9]等。本方法参考文献的净化方法, 我们选择 Waters Oasis HLB (3 mL, 60 mg)、Waters Sep-Pak Vac C_{18} (3 mL, 60 mg)、VARIAN BOND ELUT- C_{18} (3 mL, 100 mg) 和 SUPELCO SupelcleanTM LC-18 SPE Tubes C_{18} (3 mL, 500 mg) 4 种固相萃取柱。结果发现 4 种固相萃取柱对群勃龙的回收率差别不大, 批内的变异系数也比较小, 均适合群勃龙的富集和净化。其后又比较了 C_{18} 柱和 C_{18} 柱与氨基柱联合使用的效果, 试验发现二者的净化效果无差别, 但后者的回收率有所降低, 故

最终确定用 C_{18} 柱作为净化用固相萃取柱。

3.3 离子对的选择 根据欧盟 2002/657/EC 要求, 要确证该类物质至少需要 4 个识别点 (IP), 因此, 本试验分别选择了母离子以及对应的两个响应较强的子离子作为定性定量依据。分别采用 ESI^+ 和 ESI^- 离子模式进行调谐, 但以正离子模式响应值最高。群勃龙可能的裂解途径见图 5。

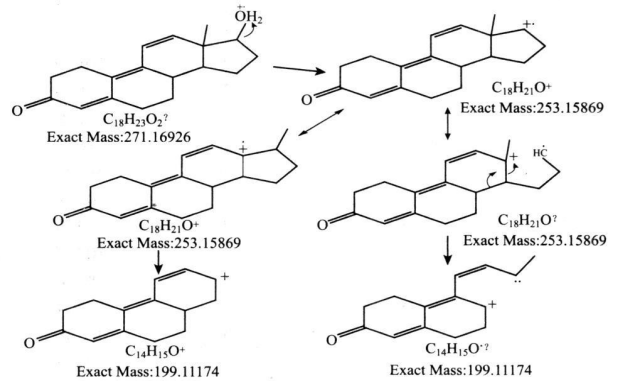


图 5 群勃龙可能裂解途径

4 结论

本方法采用超高效液相色谱分离复杂的水产品基质样品, 可以得到了尖锐的色谱峰, 普通的液相色谱提高了检测的灵敏度; 此外, 本方法前处理仅用一种 C_{18} 固相萃取柱, 比报道的采用串联固相萃取柱节省了检测费用。经方法学考察, 本方法完全适合水产中群勃龙残留的检测。

参考文献:

- [1] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 578-633.
- [2] 动物性食品中兽药最高残留限量. 农业部 235 号公告.
- [3] 江洁, 林洪, 付晓婷, 等. 水产品中多种激素残留测定的高效液相色谱法 [J]. 海洋水产研究, 2007, 28: 67-71.
- [4] 湛嘉, 俞雪钧, 李佐卿, 等. 黄鳍肌肉中的 20 种性激素同时测定的气质联用检测方法 [J]. 食品科学, 2008, 6: 298-303.
- [5] 方富永, 徐美奕, 蔡琼珍, 等. 紫红笛鲷体内三种性腺激素的残留 [J]. 内陆水产, 2006 31(12): 21-22.
- [6] 聂建荣, 朱孟丽, 朱铭立, 等. HPLC-MS/MS 快速检测水产品中甲基睾酮的研究 [J]. 广东农业科学, 2008 (6): 107-109.
- [7] 徐锦忠, 张晓燕, 丁涛, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测鸡肉和鸡蛋中合成类固醇类激素和糖皮质激素 [J]. 分析化学, 2009, 37(3): 341-346.
- [8] 张志刚, 施冰, 王根芳, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中的醋酸甲羟孕酮 [J]. 质谱学报, 2006, 1(27): 36-39.
- [9] 刘清, 王欣欣, Reale E wam, 等. 肉制品中群勃龙、勃地酮和甲氧酰胺的检测方法 [J]. 化学分析计量, 2007, 6(16): 14-16.