

气质联用法同时测定猪尿中的 20 种同化激素

湛 嘉* 俞雪钧 李佐卿 谢东华 黄绍棠 樊苑牧 陈树兵 彭锦峰

(宁波出入境检验检疫局, 宁波 315012)

摘 要 采用安捷伦 5975GC/MS 对猪尿中 20 种同化激素进行同时检测。对于 10.0 g 尿液样品, 采用 β 葡萄糖苷酸酶 (来自 *Helix pomatia*) 对提取物水解后, 加入过饱和 NaCl, 经乙腈提取, 用过 C_{18} 小柱和 NH_2 小柱净化后七氟丁酸酐对其进行衍生, 最后利用 GC/MS 进行检测。采用外标法定量, 以 $S/N \geq 3$ 确定的, 检出限均能达到 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。通过对 3 个添加水平的回收实验表明, 平均回收率为 77.0%~111.0%。

关键词 同化激素, 气相色谱 质谱联用, 猪尿

1 引 言

同化激素, 尤其是通过人工合成的外源激素, 具有强且持久的蛋白质同化作用, 通过增强食欲、抑制发情、提高饲料转化率和控制性别等作用, 能达到大幅度提高动物养殖经济效益的目的^[1~3]。然而, 消费者长期摄入含有此类激素类药物的动物源性食品会导致内分泌紊乱和性早熟, 影响儿童的正常生长发育, 增加致癌、致畸风险等诸多负面作用。猪肉是我国居民消费量最大的动物源性食品, 通过对猪尿的监控检测可以判定是否服用禁用药物, 从源头上保障食品安全。猪尿成分复杂, 以往报道的检测方法多采用乙醚、叔丁基甲醚等溶剂提取再通过不同的净化方式检测, 存在前处理步骤复杂、净化效果欠佳、回收率不理想等缺点。本方法采用乙腈提取, 简化前处理步骤, 净化效果和回收率也取得满意的效果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

GC6890-5975N 气相色谱 质谱仪 (美国 Agilent 公司); PL2002 型电子天平; Sigma 3K30 冷冻离心机; B iCH 真空旋转浓缩仪; Organomation Associates 氮吹仪; Supelco 固相萃取仪器; 超 MLL IPORECO 纯水器和 Votexgenie-2 型旋涡混合仪。

己烷雌酚纯度 98%、醋酸氯地孕酮纯度 98.2%、炔雌醇纯度 98% 和左炔诺孕酮纯度 99% (Sigma 公司); 己烯雌酚纯度 99.5%、雌酮纯度 99.0%、丙酸睾酮纯度 98% 和醋酸甲地孕酮纯度 98.5% (Dr Ehrenstorfer); 睾酮纯度 98%、甲基睾酮纯度 97.5%、炔诺酮纯度 98%、雌二醇纯度 97% (Tokyo kasei); 去氢睾酮纯度 98.8%、双烯雌酚纯度 98.0%、甲孕酮纯度 98.4%、戊酸雌二醇纯度 97%、醋酸甲孕酮纯度 99.3% (Sigma-Aldrich); 雌三醇纯度 99.7%、19-去甲睾酮纯度 99% (Fluka); 孕酮纯度 98% (Acros)。己烯雌酚中顺反异构体的比例为 $cis\text{-DES} : trans\text{-DES} = 284 : 72$ ^[3]。

β 葡萄糖苷酸酶 (Sigma G0876) 为 H-2 型, 甲醇、异辛烷、乙酸乙酯和丙酮为色谱纯, 七氟丁酸酐 (纯度 97%), H_3PO_4 、 $NaHCO_3$ 、醋酸和醋酸钠为分析纯, 无水 Na_2SO_4 为分析纯经 550 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 4 h。0.2 mol/L 水解缓冲液: 12.95 g 醋酸钠和 2.52 g 醋酸溶解在 800 mL 二次蒸馏水中, 调整 pH 至 5.0 后, 定容至 1 L。15% 甲醇淋洗液: 15% 甲醇水溶液 (0.25% H_3PO_4 , 调整 pH 至 3.5)。

2.2 样品前处理

2.2.1 样品水解和提取 称取 10.0 g 猪尿样品, 加入 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液 10 mL, 调整 pH = 5.2, 50 μL β 葡萄糖苷酸酶, 37 $^{\circ}\text{C}$, 水解 12 h。水解结束后调节 pH 至中性, 加入 5.0 g NaCl 和 0.5 g 乙酸锌, 加入 20 mL 乙腈, 充分混匀, 冷至 4 $^{\circ}\text{C}$, 以 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 然后用 20 mL 乙腈重复提取 1 次, 上清液经无水 Na_2SO_4 脱水、微孔 (孔径 $\leq 20 \mu\text{m}$) 过滤后, 合并于鸡心瓶中, 45 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干。

2008-03-18 收稿; 2008-07-28 接受

本文系国家质检总局 (Na 2005 IK033) 资助项目

* E-mail: zhanjia2000@163.com

2.2.2 净化 在鸡心瓶中加入 1 mL 乙腈和 15 mL 15% 甲醇溶液 (pH = 3.5) 溶解提取物, 超声 2 min 后通过 C_{18} 柱 (上样前预先依次用 5 mL 甲醇、15% 甲醇淋洗液和水各洗涤 1 次), 然后用 15% 甲醇淋洗液 5 mL 洗涤 1 次, 弃去流出液, 并充分抽真空。NH₂ 小柱预先装入 1.5 g 无水 Na₂SO₄, 串连在 C_{18} 小柱下, 用 3 × 2 mL 乙酸乙酯洗脱, 洗脱液在 50 °C 水浴用 N₂ 吹干。

2.2.3 衍生化 在吹干后的残渣中加入 125 μL 七氟丁酸酐-丙酮 (1:4, V/V, 临用时配制), 旋涡混匀, 65 °C 下密闭衍生 60 min 后, 冷却后吹干, 并用 150 μL 异辛烷溶解。

2.3 色谱质谱条件

HP-5MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 以氦气为载气, 流速 0.6 mL/min, 进样口温度 265 °C; 柱初始温度 70 °C (1 min) $\xrightarrow{40\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 185 °C (20 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 225 °C (10 min) $\xrightarrow{30\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 270 °C (8 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 315 °C (6 min)。不分流方式进样, 进样体积 2.0 μL。接口温度 285 °C, 离子源: E 源, 温度 230 °C, 电子轰击能量 70 eV, 溶剂延迟时间 10.0 min, 全扫描范围为 m/z 80~999。

2.4 标准曲线

所有标准品均用甲醇配成质量浓度为 200 mg/L 的标准贮备液, 于 -18 °C 下保存。临用前, 用甲醇逐级稀释使之成为含上述各标准品均为 125 μg/L 的混合标准液。采用选择离子监测模式 (SM) 测定 (图 1)。空白样品 10.0 g 中添加标准品做标准曲线, 以添加质量浓度 (X) 为横坐标 (0, 0.5, 2.5, 5 μg/kg), 以衍生产物的定量离子的峰面积 (Y) 为纵坐标, 拟合线性回归方程, 作为定量检测依据。

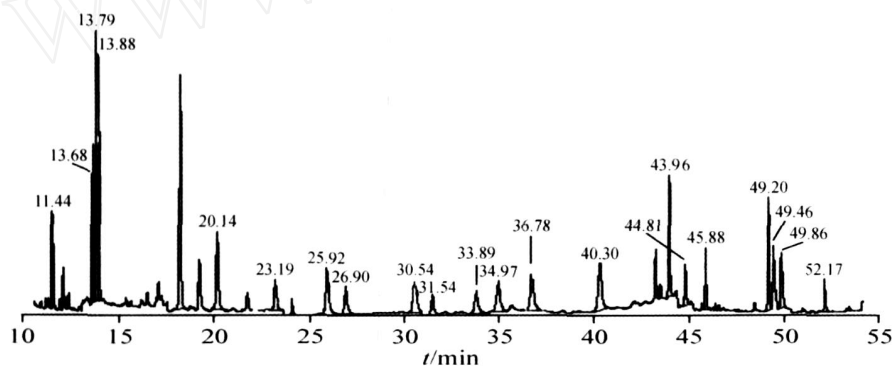


图 1 添加 2.5 μg/kg 的 20 种同化激素的选择离子流图

Fig 1 Selective ion chromatogram of 20 anabolic steroids in blank pig urine fortified at 2.5 μg/kg

2.5 阴性对照、检出限、回收率和精密度测定

按上述步骤进行对照处理 5.0 g 空白样品 ($n \geq 6$)。在空白样品中添加待测物, 使之理论含量为 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 和 5 μg/kg, 以定量离子 $S/N \geq 3$ 作为检出限。在空白样品中添加待测物, 使之理论含量为 1, 2.5 和 5 μg/kg, 经上述步骤处理后, 对 3 个水平进行回收率测试 (对于本底含有的激素, 应扣除), 求出回收率及其相对标准偏差。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线、检出限

根据衍生物对应的质谱图并参考文献 [1~3, 5] 确定特征离子。20 种同化激素保留时间、检出限以及在基质的标准曲线及其回归系数见表 1 所示。本方法的检出限与文献 [8] 的 LC/MS/MS 方法相当。

3.2 回收率与重复性

待测物 3 个水平的添加平均回收率范围为: 77.0%~111.0%, RSD 为 4.3%~23.2% (见表 2)。

3.3 本样品前处理方法的特点

猪尿成分复杂, 本方法采用乙腈提取, 加上乙酸锌的沉淀蛋白质的作用, 通过盐析, 乙腈与水相分层, 有色干扰成分大部分留在水相, 有机相与水相交界处会有一层固体颗粒, 需要通过过滤去除, 然后通过 C_{18} 小柱和 NH₂ 小柱净化效果理想。

表 1 20 种同化激素的保留时间、特征离子、检出限和标准曲线

化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	选择离子 Selected ions	检出限 LOD (μg/kg)	标准曲线 Standard curve	线性相关 系数 r^2
顺式己烯雌酚 <i>cis</i> -Diethylstilbestrol	11.44	660 ⁺ , 631, 341, 303	0.07	$Y = 5.93 \times 10^4 X + 1.11 \times 10^3$	0.993
反式己烯雌酚 <i>trans</i> -Diethylstilbestrol	13.88	660 ⁺ , 631, 341, 303	0.18	$Y = 1.17 \times 10^5 X + 7.45 \times 10^3$	0.994
双烯雌酚 Dienoestrol	13.68	658 ⁺ , 445, 461, 446	0.25	$Y = 9.45 \times 10^4 X - 1.20 \times 10^3$	0.988
己烷雌酚 Hexestrol	13.79	331 ⁺ , 332, 303, 275	0.10	$Y = 6.27 \times 10^5 X + 5.92 \times 10^4$	0.991
甲基睾酮 Methyltestosterone	20.14	480 ⁺ , 465, 369, 335	0.25	$Y = 1.17 \times 10^5 X - 8.62 \times 10^3$	0.996
炔诺酮 Norethisterone	23.19	476 ⁺ , 477, 461, 355	0.25	$Y = 6.94 \times 10^4 X - 2.58 \times 10^3$	0.997
炔雌醇 17α-Ethinylestradiol	25.92	474 ⁺ , 459, 446, 431	0.25	$Y = 5.62 \times 10^4 X - 1.58 \times 10^3$	0.995
去氢睾酮 Boldenone	26.90	678 ⁺ , 465, 464, 369	0.25	$Y = 9.45 \times 10^4 X - 6.03 \times 10^3$	0.997
左炔诺孕酮 <i>D</i> -(-)Norgestrel	30.78	461 ⁺ , 490, 462, 355	0.25	$Y = 1.36 \times 10^5 X - 4.10 \times 10^3$	0.987
19-去甲睾酮 19-Nortestosterone	31.82	666 ⁺ , 667, 306, 453	0.25	$Y = 9.07 \times 10^4 X - 6.58 \times 10^3$	0.996
睾酮 Testosterone	33.89	320 ⁺ , 680, 681, 467	0.25	$Y = 8.29 \times 10^4 X \sqrt[3]{2.18 \times 10^3}$	0.989
雌二醇 β-Estradiol	35.94	664 ⁺ , 409, 451, 355	0.25	$Y = 1.14 \times 10^5 X \sqrt[3]{5.04 \times 10^3}$	0.998
雌酮 Estrone	37.08	466 ⁺ , 409, 448, 422	0.25	$Y = 1.09 \times 10^5 X + 1.87 \times 10^4$	0.991
雌三醇 Estriol	40.54	876 ⁺ , 663, 449, 409	0.25	$Y = 5.67 \times 10^4 X \sqrt[3]{1.02 \times 10^3}$	0.996
甲孕酮 Medroxyprogesterone	44.04	479 ⁺ , 480, 383, 369	0.10	$Y = 2.03 \times 10^5 X + 9.87 \times 10^3$	0.991
孕酮 Progesterone	44.88	510 ⁺ , 511, 495, 425	0.25	$Y = 1.04 \times 10^5 X \sqrt[3]{1.18 \times 10^4}$	0.995
Testosterone propionate	45.94	540 ⁺ , 541, 525, 451	0.25	$Y = 5.25 \times 10^4 X + 5.73 \times 10^3$	0.990
醋酸甲地孕酮 Megestrol acetate	49.26	477 ⁺ , 478, 520, 381	0.25	$Y = 6.14 \times 10^4 X + 5.27 \times 10^3$	0.993
戊酸雌二醇 Estradiol valerate	49.54	552 ⁺ , 450, 422, 409	0.25	$Y = 1.45 \times 10^4 X \sqrt[3]{1.19 \times 10^3}$	0.993
醋酸甲孕酮 Medroxyprogesterone acetate	49.92	582 ⁺ , 479, 439, 383	0.25	$Y = 4.32 \times 10^4 X + 2.83 \times 10^3$	0.989
醋酸氯地孕酮 Chlormadinone acetate	52.25	497 ⁺ , 499, 461, 462	0.25	$Y = 1.93 \times 10^4 X + 1.67 \times 10^3$	0.990

* : 定量离子 (quantitative ion)。

表 2 猪尿中 20 种激素的回收率测定结果

化合物 Compound	添加水平 Added level (μg/kg)					
	0.5		1.25		2.5	
	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
顺式己烯雌酚 <i>cis</i> -Diethylstilbestrol	86.0 ± 0.7	12.5	112.8 ± 6.6	5.8	95.3 ± 7.7	8.1
反式己烯雌酚 <i>trans</i> -Diethylstilbestrol	86.5 ± 1.0	12.7	96.0 ± 5.2	15.8	90.3 ± 4.3	15.8
双烯雌酚 Dienoestrol	97.0 ± 2.4	12.8	84.6 ± 3.7	4.3	80.9 ± 3.4	16.6
己烷雌酚 Hexestrol	95.0 ± 2.5	13.1	100.4 ± 5.4	15.3	92.7 ± 5.7	17.0
甲基睾酮 Methyltestosterone	88.0 ± 7.0	19.4	98.8 ± 5.6	15.8	93.2 ± 6.9	18.1
炔诺酮 Norethisterone	92.0 ± 9.4	10.2	90.2 ± 3.9	15.4	104.1 ± 4.6	14.0
炔雌醇 17α-Ethinylestradiol	77.0 ± 4.7	19.0	96.2 ± 8.3	8.6	92.4 ± 8.1	8.8
去氢睾酮 Boldenone	98.5 ± 6.8	17.1	98.0 ± 0.8	11.0	99.6 ± 5.7	5.7
左炔诺孕酮 <i>D</i> -(-)Norgestrel	85.0 ± 4.0	16.5	89.2 ± 5.8	6.5	94.0 ± 5.6	16.6
19-去甲睾酮 19-Nortestosterone	87.0 ± 6.5	19.0	97.2 ± 2.6	13.0	98.7 ± 3.8	14.0
睾酮 Testosterone	96.5 ± 20.7	21.4	90.0 ± 11.0	12.2	101.8 ± 2.9	2.8
雌二醇 β-Estradiol	90.5 ± 20.0	22.1	101.0 ± 6.8	16.6	91.3 ± 4.4	15.8
雌酮 Estrone	89.5 ± 4.5	16.2	95.2 ± 7.0	7.4	103.8 ± 8.4	8.1
雌三醇 Estriol	100.5 ± 7.0	7.0	95.4 ± 4.2	14.9	108.2 ± 1.9	11.0
甲孕酮 Medroxyprogesterone	91.0 ± 0.6	11.7	92.2 ± 0.8	11.7	89.9 ± 8.8	9.8
孕酮 Progesterone	97.0 ± 20.0	20.7	94.4 ± 7.2	7.6	94.3 ± 3.5	14.3
丙酸睾酮 Testosterone propionate	92.0 ± 20.5	22.2	96.8 ± 11.6	11.9	111.0 ± 7.5	6.8
醋酸甲地孕酮 Megestrol acetate	102.5 ± 2.4	12.1	95.2 ± 2.8	13.4	95.0 ± 7.2	18.1
戊酸雌二醇 Estradiol valerate	83.5 ± 5.0	16.0	90.2 ± 3.1	14.6	100.7 ± 4.2	14.1
醋酸甲孕酮 Medroxyprogesterone acetate	96.0 ± 4.2	22.0	89.4 ± 9.7	14.8	95.7 ± 0.8	11.2
醋酸氯地孕酮 Chlormadinone acetate	85.5 ± 9.0	10.5	97.8 ± 3.4	13.7	97.2 ± 6.3	16.7

同化激素前处理方法多采用乙醚或叔丁基甲醚等溶剂提取过 C₁₈柱,或直接过 C₁₈柱^[3,5~7]。但是,尿液中的有色的极性干扰物质也随着待测物富集,也极易洗脱下来,即使串连 NH₂小柱也不能去除这些干

扰物质, 酰化衍生后, 引起峰变宽, 灵敏度下降。Daeseleire 等^[2]采用乙醚提取尿液中的 26 种同化激素, 除了采用 C_{18} 小柱吸附后和 NH_2 小柱脱脂, 还用到了制备 HPLC 净化后, 通过七氟丁酸酐衍生后进行 GC/MS 分析, 回收率仅为 17%~81%; Hewitt 等^[6], 采用上述两种固相萃取小柱外, 且需要通过制备 HPLC 净化, 然后采用 LC/MS/MS 和 GC/HRMS 两种手段检测猪尿中去氢睾酮等 22 种同化激素。Draisci 等^[7]采用 C_{18} 小柱对 2 mL 牛尿的同化激素富集, 洗脱、浓缩后采用 LC/MS/MS 检测, 但 19 去甲睾酮、睾酮和孕酮的峰形差, 并存在干扰峰。Yoon 等^[9]利用 XAD-2 富集人尿中的睾酮等 18 种同化激素, 但对于 5 mL 尿液检测限只能达到 10 $\mu\text{g/L}$, 峰对称性较差。文献 [5] 采用乙醚提取后, 溶在 80% 以上的甲醇溶液中, 再用正己烷去脂肪, 氮吹去甲醇后, 过 C_{18} 小柱和 NH_2 小柱。笔者曾采用该方法发现, 丙酸睾酮和戊酸雌二醇几乎全部被正己烷所萃取而无法检测到; 孕酮, 醋酸甲孕酮, 醋酸甲地孕酮和醋酸氯地孕酮等损失率为 30%~50%; 且由于不能去除有色干扰物质, 净化效果并不理想。

实验结果表明, 本方法具有效率高、灵敏度理想、可靠性强等特点, 无需采用制备 HPLC、免疫亲和层析等净化步骤; 而且检测的对象多为外源禁用药物, 对保障消费者的健康, 具有一定的意义。

References

- 1 Stalker A A M, Zoontjes P W, van Ginkel L A. *Analyst*, **1998**, 123: 2671~2676
- 2 Daeseleire E, Vandeputte R C. *Analyst*, **1998**, 123: 2595~2598
- 3 Jansen E H J M, van Bitterswijk H, Stephany R W. *Vet Quart*, **1984**, 6: 60~65
- 4 Koole A, Franke J P, de Zeeuw R A. *J. Chromatogr B*, **1999**, 724(1): 41~51
- 5 Zhuang Wu-Ji (庄无忌). *The Methods for the Analysis of Residues of Veterinary Drug in Food Producing Animals and Their Products* (动物和动物源食品中兽药残留物分析方法). Beijing (北京): China Light Industry Publishing Company (中国轻工业出版社), **2003**: 8
- 6 Hewitt S A, Keamey M, Currie J W. *Anal Chim. Acta*, **2002**, 473: 99~109
- 7 Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Lucentini L, Cammarata P. *J. Chromatogr*, **2000**, 870(1-2): 511~522
- 8 Qin Yan (秦燕), Chen Jie (陈捷), Zhang Mei-Jin (张美金). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2006**, 34(3): 298~302
- 9 Yoon Y M, Lee K H. *J. Biosci*, **2001**, 26(5): 627~634

Determination of Multi-residue of Anabolic Steroids by Gas Chromatography Mass Spectrometry

ZHAN Jia*, YU Xue-Jun, LI Zuo-Qing, XIE Dong-Hua, HUANG Shao-Tang,

FAN Yuan-Mu, CHEN SHU-Bing, PENG Jin-Feng

(Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012)

Abstract A highly sensitive, specific and credible method for the simultaneous determination of 20 anabolic steroids in urine of pig performed by GC/MS was developed. Samples of urine of pig (10.0 g) were deconjugated by Helix pomatia juice, extracted with acetonitrile, cleaned-up through dual columns of C_{18} and NH_2 , the extracts obtained were derivatized with heptafluorobutyric anhydride, following formation of the di-heptafluorobutyl (di-HFB) derivative, and then identification and quantification were carried out by capillary gas chromatography-mass spectrometry. For quantitation, the external standards were used and the method was validated with blank samples fortified at 0.5, 2.5 and 25 $\mu\text{g/kg}$ with 10.0 g sample. The detection limits were less than 0.25 $\mu\text{g/kg}$ for all analytes. Overall recovery and repeatability (relative standard deviations, RSD) ranged from 77.0% to 111.0%, and from 4.3% to 23.2%, respectively.

Keywords Anabolic steroid, gas chromatography/mass spectrometry, urine

(Received 18 March 2008; accepted 28 July 2008)