

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01272

凝胶渗透色谱-固相萃取净化-超快速液相色谱-串联质谱法 检测牛肉中 9 种类固醇激素残留

孙汉文^{*1} 康占省¹ 李挥^{1,2}

¹(河北大学化学与环境科学学院, 河北省分析科学重点实验室, 保定 071002)

²(河北省食品质量监督检验研究院, 石家庄 050051)

摘 要 建立了凝胶渗透色谱分离-固相萃取净化-超快速液相色谱-串联质谱 (GPC-SPE-RRLC-MS/MS) 测定牛肉中群勃龙、勃地龙、诺龙、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、司坦唑醇、黄体酮、苯丙酸诺龙 9 种类固醇激素残留的方法。试样经 β -盐酸葡萄糖苷酶/芳基硫酸酯酶酶解, 叔丁基甲醚超声提取, 凝胶渗透色谱和 HLB 固相萃取柱净化, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 经 Agilent Plus C₁₈ 柱分离后以 MS/MS 多反应监测扫描模式检测。方法线性相关系数 $r > 0.999$, 定量限为 0.2 ~ 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 3 种浓度添加水平 0.3, 1.0, 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 下, 其平均回收率为 81.4% ~ 110%; 相对标准偏差 (RSD) 为 2.2% ~ 9.8%。本方法已成功应用于高脂肪和基质复杂样品中 9 种类固醇激素残留的检测。

关键词 凝胶渗透色谱; 固相萃取; 超快速液相色谱-串联质谱; 类固醇激素; 牛肉

1 引 言

类固醇激素属于甾类同化激素, 具有强且持久的蛋白同化作用, 可以促进动物超常态生长, 大幅提高动物养殖经济效益, 在养殖业中被大量使用。滥用该类激素会造成其在动物组织中不同程度的残留, 导致机体代谢紊乱、发育异常或潜在致癌、致畸风险。畜牧业中滥用激素问题已经成为国内外关注的焦点问题。因此, 世界各国对类固醇类激素采取禁用或限量使用^[1,2]。我国在监测和抽查中多次在动物源性食品中检出违禁激素类药物残留, 出口食品屡发贸易壁垒事件, 是激素监控的重点。

目前, 对动物源性样品前处理大多采用液-液提取和固相萃取方式^[3~5], 但是其对类固醇等脂溶性较强目标物提取效率低、脂肪基质的净化困难, 影响重现性和准确度。液相色谱法和气-质联用法已用于样品中类固醇的检测^[6~9]。液相色谱法检测类固醇的选择性和特异性差; 气-质联用衍生过程繁琐; 而液-质联用法不需对目标物进行衍生处理, 操作简便, 而且灵敏度高, 选择性与特异性好^[10~12], 现已成为国家标准方法^[13]。近年来, 以液-质联用法用于动物源食品中类固醇激素多残留监测已多见报道^[3,14~17], 其中多数结合固相萃取净化程序, 但是仍存在回收率与检测能力偏低等问题。为有效去除动物组织的复杂基质和提高提取率, 本研究将样品经酶解后, 采取凝胶渗透色谱与固相萃取两步净化, 建立了凝胶渗透色谱-固相萃取-超快速液质联用准确而灵敏地检测牛肉样品中常见的 9 种类固醇激素残留的新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1200-6410 LC-MS/MS 超快速液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司); J2 凝胶色谱净化系统(美国 J2 公司); 固相萃取装置(美国 Agilent 公司), Oasis HLB 固相萃取柱(1 g/6 mL, 美国 Waters 公司)。

β -盐酸葡萄糖苷酶/芳基硫酸酯酶(Merck 公司); 群勃龙、勃地龙、诺龙、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、司坦唑醇、黄体酮、苯丙酸诺龙标准品(纯度均大于 98%, Sigma 公司); 乙腈、乙酸乙酯、环己烷为色谱

2009-12-31 收稿; 2010-04-27 接受

本文系教育部博士点基金(No. 20050075003), 河北省自然科学基金(No. B2008000583), 河北省科技支撑项目(No. 09227134D) 资助

* E-mail: hanwen@hbu.edu.cn

纯; 其它试剂均为分析纯。

2.2 样品前处理

称取约 500 g 剔除骨和皮的牛肉组织, 切碎, 于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

称取 $(5.0 \pm 0.05)\text{ g}$ 试样于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 醋酸盐缓冲溶液 $(0.04\text{ mol/L}, \text{pH } 5.0)$, 匀质 30 s 后, 加入 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 100 μL , 涡旋混匀, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温酶解过夜。

酶解后样品, 加入 3 mL 10% $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaOH}$ 溶液调 pH 值至 11.0, 加 25 mL 叔丁基甲醚, 超声提取 10 min, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以 6000 r/min 离心 10 min, 将上层有机相转移至 50 mL 比色管中。用 25 mL 叔丁基甲醚重复提取一次, 合并上层有机相, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至近干。残渣用 10 mL 乙酸乙酯-环己烷 $(1:1, \text{V/V})$ 完全溶解, 过 GPC 净化, 收集 7.5 ~ 16.0 min 馏分, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至近干。以 0.3 mL 甲醇溶解残渣, 并加水稀释至 3 mL, 过 HLB 柱(用前以 3 mL 甲醇、3 mL 水分步活化), 以 4 mL 水淋洗, 抽干, 4 mL 甲醇洗脱。洗脱液在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 残余物用乙腈-水 $(1:1, \text{V/V})$ 溶解并定容至 1.0 mL, 15000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 供 RRLC-MS/MS 测定。

2.3 液相色谱-质谱条件

Agilent Plus C_{18} 色谱柱 $(150\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}, 3.5\text{ }\mu\text{m})$ 。流动相 A 为水 $(0.1\%$ 甲酸); B 为乙腈; 梯度洗脱: 0 ~ 7 min, 60% ~ 90% B; 7 ~ 8 min, 90% ~ 100% B; 8 ~ 14 min, 100% B。流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL ; 柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

电喷雾离子源, 正离子多反应监控扫描 (MRM) 模式; 干燥器温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速: 10 L/min, 毛细管电压: 4.0 kV。

表 1 9 种类固醇激素的质谱分析优化参数

Table 1 Optimized parameters for analysis of nine steroid hormones using MS/MS with MRM mode

药物 Drugs	分子式 Molecular formular	美国化学 文摘登记号 CAS-No	定性离子对 Ion pair for qualitation (m/z)	定量离子对 Ion pair for quantification (m/z)	裂解电压 Fragmentor voltage (eV)	碰撞能量 Collision energy (eV)
群勃龙 Trenbolone	$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_2$	10161-33-8	271/198.9 271/253	271/198.9	130	25 25
勃地龙 Boldenone	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$	846-48-0	287/135 287/121	287/121	120	15 15
诺龙 Nandrolone	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_2$	434-22-0	275/109 275/257	275/109	120	25 15
睾酮 Testosterone	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$	58-22-0	289/97 289/109	289/97	110	20 25
美雄酮 Methandienone	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$	72-63-9	301/121 301/149	301/121	100	15 15
甲基睾酮 Methyltestosterone	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	58-48-4	303/97 303/285.2	303/285.2	110	20 10
司坦唑醇 Stanozolol	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$	10418-03-8	329/81 329/121	329/81	160	45 35
黄体酮 Progesterone	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$	57-83-0	315.5/96.7 315.5/108.7	315.5/96.7	130	20 25
苯丙酸诺龙 Nandrolone Phenylpropionate	$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_3$	62-90-8	407.3/105.1 407.3/257.2	407.3/105.1	140	30 10

3 结果与讨论

3.1 样品前处理条件的选择及优化

3.1.1 酶解和提取 类固醇激素在动物体内以原型药物残留为主, 还有一部分以结合形式存在, 如葡萄糖醛酸甙、硫酸酯等。酶解可促进从肌肉样品中萃取可类固醇激素。实验中采用 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶酶解, 水解成游离组分, 降低提取过程中类固醇激素的损失。样品于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温酶解过夜, 未发现固相萃取柱堵塞现象。类固醇激素极性较低、脂溶性较强, 常规提取方式目标物提取效率低、脂肪基质难以净化, 影响结果重现性和准确度。比较了乙腈、甲醇、叔丁基甲醚、乙酸乙酯-环己烷 $(1:1, \text{V/V})$ 的提取效率。若以甲醇萃取, 较多的脂肪萃取物易导致堵塞固相萃取柱。以叔丁基甲醚提取效果最好。

3.1.2 GPC 和 SPE 净化条件的优化 采用单一的液-液萃取方法处理样品,色谱图显示背景干扰大。

凝胶渗透色谱能有效去除油脂、天然色素等高分子量的干扰物。采用凝胶色谱(GPC)实现了被测组分与脂肪分子的有效分离,提取率高。GPC 条件: C0785 凝胶净化柱(美国 J2 公司),填料为 Boi Beads S-X3 (200~400 目);检测波长 254 nm;淋洗液为乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V);流量 4.7 mL/min;进样量: 5 mL。实验表明,油脂流出时间为 4.2~7.5 min,因类固醇类物质在 254 nm 处响应低,因此,用与群勃龙分子量相近的六氯环己烷替代寻找收集时间下限。如图 1,收集 7.5~16.0 min 的馏分。100 μg/L 类固醇混和标准溶液按上述条件进行净化,回收率均大于 95%。

为达到进一步分离和富集目标化合物的目的,比较在空白试样中添加浓度均为 5.0 μg/kg 的标准物质,平行固相萃取 3 次,比较了 3 种不同填料固相萃取柱(C₁₈、硅胶和 HLB)的净化效果,其平均回收率分别为 87.2% C₁₈, 70.5% (硅胶)和 93.3% (HLB), HLB 柱的净化效果最佳。通过比较乙腈、甲醇和乙酸乙酯对洗脱效率影响发现 4 mL 甲醇的洗脱效果最好。经 GPC 分离后,再以 SPE 净化,可有效分离基质和富集目标化合物。

3.2 色谱分离

以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相,有利于类固醇激素的离子化。利用优选的梯度洗脱程序,实现了基线分离,可在 16 min 内完成样品测定。空白基质加标的总离子流色谱如图 2 所示。通过提取离子色谱可实现各组分的有效分离。

3.3 MS/MS 特征离子对的选择

类固醇激素极性较低,脂溶性较高。虽然采用大气压化学电离(APCI)作为离子源其响应灵敏度会更高,但电喷雾电离(ESI)离子源在满足检出限要求的基础上,更易操作和维护。因此,选用 ESI 源。以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为基准流动相,获得分子离子诱导产生的特征碎片离子扫描图。结合基质空白和基质标准液的离子扫描图,优化参数,从而确定了 9 种激素在多反应监测模式下信号采集的特征离子对(见表 1)。

3.4 方法的特性

以标准溶液浓度为横坐标(x),定量离子对色谱峰面积为纵坐标(y),求得回归方程。由表 2 可

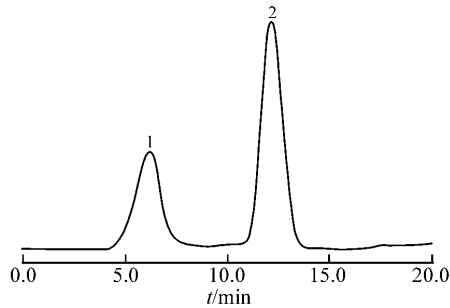


图 1 油脂(1)和六氯环己烷(2)的 GPC 色谱图
Fig.1 Gel permeation chromatogram of grease (1) and hexachlorocyclohexane(2)

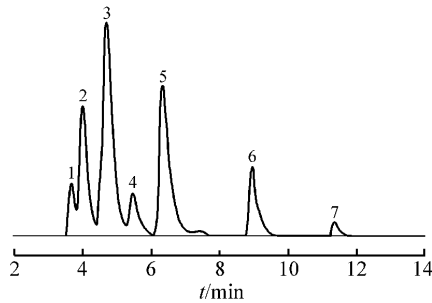


图 2 空白基质加标的总离子流色谱图
Fig.2 TIC chromatogram of spiked blank matrix
1. 群勃龙(Trenbolone); 2. 勃地龙 + 诺龙(Boldenone + Nandrolone); 3. 睾酮 + 美雄酮(Testosterone + Methandienone); 4. 甲基睾酮(Methyltestosterone); 5. 司坦唑醇(Stanozolol); 6. 黄体酮(Progesterone); 7. 苯丙酸诺龙(Nandrolone phenylpropionate)。

表 2 线性方程、检出限和定量限

Table 2 Linear equations , limits of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

药物 Drugs	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
群勃龙 Trenbolone	$Y = 5227.68X - 3051.46$	0.9998	0.2	0.7
勃地龙 Boldenone	$Y = 15539.61X + 5523.61$	0.9994	0.1	0.3
诺龙 Nandrolone	$Y = 3489.40X - 2371.92$	0.9999	0.1	0.3
睾酮 Testosterone	$Y = 10286.30X - 11178.95$	0.9997	0.1	0.3
美雄酮 Methandienone	$Y = 30142.48X - 19184.78$	0.9999	0.1	0.3
甲基睾酮 Methyltestosterone	$Y = 8345.96X - 6711.65$	0.9999	0.05	0.2
司坦唑醇 Stanozolol	$Y = 51893.53X - 44025.93$	0.9999	0.1	0.3
黄体酮 Progesterone	$Y = 8632.68X - 7889.88$	0.9999	0.2	0.7
苯丙酸诺龙 Nandrolone phenylpropionate	$Y = 21272.54X - 16069.83$	0.9999	0.1	0.3

见, 9 种药物在 1.0 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999。

采用向空白组织中添加目标化合物的方法, 依据色谱峰信噪比 $S/N=3$ 为方法检出限, $S/N=10$ 为方法定量限(见表 2)。9 种药物的检出限(LOD) 为 0.05 ~ 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其定量限(LOQ) 为 0.2 ~ 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法的检出限优于文献 [13 ~ 16]。本方法的定量限低于由欧盟制定的食品中类固醇激素最高残留限量^[3], 可用于牛肉样品中 9 种药物的定性与定量检测。

3.5 加标样品分析

本方法用于市场销售的实际样品测定, 未发现阳性样品。采用标准添加法, 在 1 ~ 3 号空白组织样品中分别添加 0.3, 1.0 和 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 9 种药物, 进行回收率实验。在 4 号和 5 号空白牛肉样品中加入标准物, 分别采用本方法和标准方法^[3]进行测定, 结果见表 3。9 种药物的平均回收率为 81.4% ~ 110.0%; 相对标准偏差(RSD) 为 2.2% ~ 9.8%。本方法的检出量略高于标准方法。本方法的回收率与精密度均优于文献 [12 ~ 16]。

表 3 加标牛肉样品的测定

Table 3 Determination of spiked beef samples

药物 Drugs	空白样品 1 Blank sample 1 + 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$		空白样品 2 Blank sample 2 + 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$		空白样品 3 Blank sample 3 + 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$		空白样品 4 Blank sample 4 + 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$		空白样品 5 Blank sample 5 + 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率 Recovery (%)	RSD ^a (%)	回收率 Recovery (%)	RSD ^a (%)	回收率 Recovery (%)	RSD ^a (%)	本方法 检出量 ^b Present method	标准法 检出量 ^c Standard method	本方法 检出量 ^b Present method	标准法 检出量 ^c Standard method
群勃龙 Trenbolone	*		101.0	9.82	98.8	4.86	*	*	4.94	4.91
勃地龙 Boldenone	81.4	9.50	110.0	5.40	103.0	3.17	0.25	*	4.96	4.90
诺龙 Nandrolone	104.0	5.44	109	4.78	104.0	3.29	0.42	*	4.97	4.91
睾酮 Testosterone	100.0	7.50	99.6	2.52	97.1	3.02	0.29	*	4.90	4.89
美雄酮 Methandienone	103.0	3.15	108	7.82	103.0	2.17	0.31	*	4.93	4.90
甲基睾酮 Methyltestosterone	103.0	2.34	108.0	8.71	103.0	6.91	0.30	*	4.98	4.90
司坦唑醇 Stanozolol	105.0	2.91	107	6.66	99.9	2.56	0.32	*	4.93	4.90
黄体酮 Progesterone	*		110.0	4.66	103.0	4.38	*	*	5.00	4.93
苯丙酸诺龙 Nandrolone phenylpropionate	106.0	2.84	101.0	0.69	87.4	8.05	0.32	*	4.97	4.91

a. $n=7$; b. $n=3$, RSD < 10%; c. $n=3$, RSD < 20%; * not detected.

4 结 论

本研究建立的 GPC-SPE-LC-MS /MS 方法可同时测定牛肉中 9 种类固醇激素, 样品前处理提取率高、重现性好, 方法灵敏度高, 选择性和特异性好, 条件易于控制。与单组分检测相比, 有效缩短了检测时间, 结果准确。本方法的回收率、精密度和检出限优于文献报道值。本方法的定量限低于由欧盟制定的食品中类固醇激素最高残留限量, 可用于牛肉样品中 9 种药物的定性与定量检测。

References

- 1 Commission of the European Communities. Council Directive 96 /23 /EC. *Off. J. Eur. Commun.*, **1996**, L125: 10
- 2 The Chinese Ministry of Agriculture, Bulletin No. 176 [B]. The Contents of Banned Drugs in Feeds and Drinking Waters for Animals. **2001**
- 3 Blasco C, van Poucke C, van Peteghem C. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1154(1-2): 230 ~ 239
- 4 XU Jin-Zhong(徐锦忠), ZHANG Xiao-Yan(张晓燕), WU Bin(吴斌), SHEN Chong-Yu(沈崇钰), JIANG Yuan(蒋原), LIU Fei(刘飞). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(2): 341 ~ 346
- 5 LÜ Hui-Qing(吕惠卿), CHEN Hui-Hua(陈慧华), WEI Min-Jue(韦敏珏), YING Yong-Fei(应永飞). *Chinese Journal of Food Science*(食品科学), **2009**, 30(16): 235 ~ 239
- 6 Stubbings G W, Shepherd. M J. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **1993**, 16(1): 241 ~ 255
- 7 LIN Yi-Zhi(林奕芝), ZHANG Shi-Ying(张世英), LIANG Wei(梁伟), LIU Fen(刘奋), SITU Chao-Man(司徒潮满), DAI Ke-Jing(戴京晶). *Chinese Journal Health Laboratory Technology*(中国卫生检验杂志), **2001**, 11(6): 654 ~ 655

- 8 JIANG Jie(江洁), LIN Hong(林洪), FU Xiao-Ting(付晓婷), LU Wei-Li(卢伟丽), WANG Dong-Mei(王冬梅). *Marine Fisheries Research*(海洋水产研究), **2007**, 28(6): 667~671
- 9 Kuuranne T, Kotiaho T, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K E E, Leionen A, West wood S, Kostiaainen R. *J. Mass Spectrom.*, **2003**, 38(1): 16~26
- 10 Noppe H, Le Bizec B, Verheyden K, de Brabander H F. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 611(1): 1~16
- 11 Noppe H, Verheyden K, Gillis W, Courtheyn D, Vanthemsche P, De Brabander H F. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 586(1-2): 22~29
- 12 Xu C L, Chu X G, Peng C F, Jin Z Y, Wang L. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 41(2): 616~621
- 13 GB/T21981-2008 *Determination of Hormone Multiresidues in Foodstuffs of Animal Origin-LC-MS/MS Method*. Beijing: Standards Press of China, **2008**
- 14 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
- 15 CHEN Hui-Hua(陈慧华), YING Yong-Fei(应永飞), WU Ping-Gu(吴平谷), WEI Min-Jue(韦敏珏), ZHU Cong-Ying(朱聪英), QU Jian(屈健), CHEN Man-Qian(陈熳茜). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(2): 181~186
- 16 HE Li-Min(贺利民), HUANG Xian-Hui(黄显会), FANG Bing-Hu(方炳虎), HUANG Shi-Xin(黄士新), CAO Ying(曹莹), CHEN Jian-Xin(陈建新), ZENG Zhen-Ling(曾振灵), CHEN Zhang-Liu(陈杖榴). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2008**, 26(6): 714~719
- 17 Yang Y, Shao B, Zhang J, Wu Y N, Duan H J. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877(5-6): 489~496

Determination of Nine Steroid Hormones Residues in Beef Samples by Gel Permeation Chromatography-Solid Phase Extraction-Rapid Resolution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SUN Han-Wen^{*1}, KANG Zhan-Sheng^{1,2}, LI Hui^{1,2}

¹(College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Key Laboratory of Analytical Science of Hebei Province, Baoding 071002)

²(Hebei Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Shijiazhuang 050051)

Abstract A gel permeation chromatography solid phase extraction-rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometric(GPC-SPE-RRLC-MS/MS) method was developed for the determination of 9 steroid hormones(trenbolone, boldenone, nandrolone, testosterone methandienone, methyltestosterone, stanozolol, progesterone and nandrolone phenylpropionate) in beef tissue. The beef samples were enzymatically digested with β -glucuronidase/arylsulfatase, and then extracted with tert-butyl methyl ether under ultrasonication incubation. Clean-up was carried out with gel permeation chromatography followed by a further HLB solid phase extraction. After C₁₈ RRLC gradient elution separation using acetonitrile-0.1% aqueous formic acid as a mobile phase, the eluents were qualitatively and quantitatively determined under multi-reaction monitoring (MRM) scan type with tandem mass analyzer. The limit of quantification(LOQ) was 0.2~0.7 $\mu\text{g/kg}$, and the calibration curves showed good linearity with correlation coefficients larger than 0.999. At the spiked levels of 0.2, 1.0 and 4.0 $\mu\text{g/kg}$, the mean recoveries were in the range of 81.4% to 110%, and the relative standard deviations(RSDs) were in the range of 2.2% and 9.8% ($n=7$). The experimental results showed this method is sensitive, and accurate. The proposed method was used for the determination of 9 steroid hormones residues in high-fat and complex sample.

Keywords Gel permeation chromatography; Solid phase extraction; Rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Steroid hormones; Beef

(Received 31 December 2009; accepted 27 April 2010)