

液相色谱-串联质谱法测定动物组织中 1,2-二苯乙烯类药物残留的研究

应永飞¹, 朱聪英¹, 陈慧华¹, 吴平谷², 周文海¹

(1. 浙江省畜产品质量安全检测中心, 浙江 杭州 310020; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

摘要:建立了固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时测定动物组织中 3 种 1,2-二苯乙烯类药物(包括己烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚)残留量的方法。试样中的药物经甲醇超声提取后,过 HLB 固相萃取柱净化、氮吹至干,用流动相溶解后进行液相色谱-串联质谱法测定,以 D₈-己烯雌酚为内标进行定量分析。方法的最低检出限为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,定量限均为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;在 $1.0 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性良好;加标浓度在 $0.5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内,动物组织中己烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚的回收率在 78.8%~110.9%,批内相对标准偏差小于或等于 8.0%,能满足相关法规要求。

关键词:固相萃取-液相色谱-串联质谱;1,2-二苯乙烯类药物;残留量;动物组织

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2008)06-343-06

Determination of 1, 2-Stilbenes Residues in Animal Tissues by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

YING Yong-fei¹, ZHU Cong-ying¹, CHEN Hui-hua¹, WU Ping-gu², ZHOU Wen-hai¹

(1. Zhejiang Provincial Center for Animal Products Quality Testing, Hangzhou 310020, China;

2. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

Abstract: A new solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) method for simultaneous determination of 1,2-stilbenes, diethylstilbestrol (DES), dienolestrol (DIS) and hexestrol (HES) in animal tissues was reported. The 1,2-stilbenes were extracted with methanol from analyte by ultrasonic. The extraction was evaporated (40°C) to 5 mL, purified by passing through HLB($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) solid-phase extraction cartridges. The elution was evaporated by nitrogen blow and dissolved by mobile phase, and then assayed by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. The limits of detection(LOD) are $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the limits of quantitation(LOQ) are $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The calibration curves are linear between $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1,2-stilbenes. Recoveries of DES, DIS, HES in animal tissues are 78.8%~110.9%, and inter-relative standard deviation($n=5$) are less than 8.0%, respectively, at

收稿日期:2008-03-27;修回日期:2008-05-23

基金项目:浙江重大科技攻关项目(No. 2006C12025);浙江重点科技攻关项目(No. 2005C22029)资助

作者简介:应永飞(1977~),男(汉族),浙江仙居人,兽医师,从事兽药残留分析的研究。E-mail:yyf1001@163.com

通信作者:陈慧华(1962~),男(汉族),浙江东阳人,高级兽医师,从事兽药管理和兽药残留分析的研究。E-mail:zjxm_chh@163.com

spiked levels of $0.5 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The method is simple, sensitive and reliable for food safety.

Key words: SPE-HPLC-MS/MS; 1,2-stilbenes; residues; animal tissues

同化激素作为生物体内产生的一类调节机体代谢或生理功能的微量物质,能增强体内物质沉积和改善生产性能。1,2-二苯乙烯类药物作为人工合成非甾体类雌激素的代表药物,主要包括己烯雌酚(DES)、己烷雌酚(HES)和己二烯雌酚(DIS)等,具有促进动物生长和提高饲料转化率的作用,对畜牧生产者有很大的吸引力。但是,滥用 1,2-二苯乙烯类药物会导致动物生理系统功能失调甚至不可逆的病变,并通过食物链最终危害人类健康,长期摄入会干扰人体正常的激素平衡,导致机体代谢紊乱、发育异常肿瘤、女性乳腺癌和子宫内膜异位、胎儿畸形等严重的问题,在我国和欧美等国家都禁止在动物养殖过程中使用^[1-2]。

1,2-二苯乙烯类药物的结构式示于图 1。目前,该类药物的检测方法主要包括免疫分析法^[3-4]、液相色谱法^[5]和气相色谱-质谱法^[3,6-9]。其中免疫法往往作为筛选方法,不能作为定性依据;液相色谱法也容易受到杂质干扰,且检测限很难达到要求;气相色谱-质谱法作为定性方法往往需要衍生化等步骤,操作较为繁琐。高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)是一种集高效分离和多组分定性、定量于一体的系统,对高沸点、不挥发和热不稳定化合物的分离和鉴定具有独特优势,成为近年来研究同化激素类药物检测的主要方向,并已经应用到 1,2-二苯乙烯类药物残留检测中^[10]。同位素稀释技术在微量检测方面具有很大的优势,在很大程度上提高了定量准确性,在兽药残留检测领域有很好的应用前景。本工作拟对样品前处理方法、液相色谱条件、质谱条件进行系统优化,并对采用同位素稀释技术解决离子抑制效应问题进行初步研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器

Waters Alliance 2695 液相色谱仪-Micromass Quattro micro 三重四极杆质谱仪,配 MassLynx V4.0 软件;Sigma 3k18 冷冻离心机;BÜCHI B-490 旋转蒸发仪;MS² minishaker 漩涡混匀器;METTLER AG-285 电子天平;氮吹

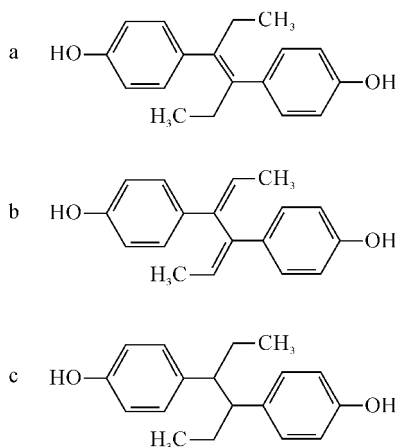


图 1 1,2-二苯乙烯类药物的结构式

Fig. 1 Molecular structures of 1,2-stilbenes

a. DES; b. DIS; c. HES

仪;Waters 固相萃取装置。

1.2 主要材料与试剂

己烯雌酚(99.1%):购自 Sigma 公司;己二烯雌酚(99.5%)、己烷雌酚(98.0%):购自 Dr. Ehrenstorfer 公司;D₈-己烯雌酚(98.0%):购自 Cambridge Isotope Laboratories 公司;乙腈(色谱纯):美国 Tedia 公司产品;实验用水为 milli-Q 超纯水;其他试剂均为分析纯;HLB 固相萃取柱(20 g · L⁻¹):购自 Waters 公司。

1.3 标准溶液

1.3.1 标准溶液 分别精密称取 DES、DIS、HES 对照品 10 mg,置于 100 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品储备液,置于 -18°C 冰箱中保存。分别吸取 1.00 mL 标准品储备液至同一 100 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合标准品工作液,冷藏保存。

1.3.2 同位素内标溶液 精密称取 D₈-DES 标准品,用甲醇稀释成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 同位素内标工作溶液。

1.3.3 标准曲线的制备 吸取一定量的混合标准品工作液和同位素内标工作溶液,用 50% 甲醇水溶液稀释成浓度为 1.0、2.0、4.0、10.0、20.0、100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准工作溶液,每毫升标准

工作曲线溶液含有同位素内标 20 mg。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters XTerra MS C₁₈ 柱(3.0 m×150 mm×3.5 μm);柱温:30 ℃;流动相:乙腈(A)和 0.2% 氨水溶液(B);流速:0.4 mL·min⁻¹;进样量:50 μL。流动相洗脱梯度:0 min A 25%(φ),0.01 min A 48%(φ),8.00 min A 48%(φ),8.01 min A 80%(φ),12.00 min A 80%(φ),12.01 min A 25%(φ)。

1.4.2 质谱条件 离子源为 ESI 负离子电离源;毛细管电压 3.3 kV;萃取电压 2 V;离子源温度 120 ℃;脱溶剂温度 350 ℃;脱溶剂气和锥孔气均为 N₂,其中脱溶剂气流速 450 L·h⁻¹,锥孔气流速 50 L·h⁻¹;碰撞气为高纯氩气,控制碰撞室的压力为 0.3 Pa。监测模式:采用 MRM 多反应监测方式;母离子(Q₁)/子离子(Q₃)离子对均设为单位分辨,各离子对的驻留时间均为 0.1 s,离子监测条件列于表 1。

1.5 样品处理

1.5.1 试样提取 称取 5.0 g 动物组织样品(精确至 0.01 g)至 50 mL 聚丙烯离心管中,加 40 μL 同位素内标溶液。用 20 mL 甲醇提取,涡旋 2 min,在 60 ℃ 下超声提取 5 min,待蛋白质变性后,取出冷却,在 8 000 r·min⁻¹ 下离心 5 min,倾出甲醇层;另取 10 mL 甲醇,重复提取 1 次,合并提取液。用 15 mL 正己烷脱脂 1 次,甲醇层在 40 ℃ 下旋转蒸发至约 5 mL 左右,转移至 10 mL 离心管中,氮吹至约 2 mL,加 10% 甲醇溶液至 5 mL,8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液备用。

1.5.2 试样净化 取 HLB 固相萃取柱,依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,取 1.5.1 上清液过柱,用 5 mL 水和 5 mL 10% 甲醇溶液淋洗柱子,抽干,用 5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液至玻璃试管中,50 ℃ 下氮吹至干。残余物用 50% 甲醇

溶液定容至 1.0 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,进行液相色谱-串联质谱测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱定性定量分析

1,2-二苯乙烯因含有酚羟基结构,在 ESI 负离子电离模式下容易失去一个 H⁺ 形成较为稳定的 [M-H]⁻ 准分子离子。以 V(乙腈):V(水)=50:50 的溶液为基准流动相,采用“T”三通方式,分别获得各个药物的分子离子诱导产生的特征碎片离子,子离子扫描图示于图 2。通过优化锥孔电压、锥孔气、碰撞能量等仪器参数,将各监测离子的强度调整至最大。选择丰度比最强的碎片离子组成监测离子对:m/z 265.0、92.9,m/z 267.2、251.0,m/z 269.0、133.9,m/z 275.2、245.3,分别用于己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚、D₈-己烯雌酚的定量;而 m/z 265.0、249.0,m/z 267.2、237.0,m/z 269.0、118.9 分别用于待测药物的辅助定性离子。为了获得更高的离子强度,在 MRM 模式下优化质谱条件,结合基质空白和基质标准液的离子扫描图优化参数,从而相应地确定了各种药物在多反应监测模式下信号采集的特征离子对,具体检测条件列于表 1。

2.2 液相色谱条件

为了将 3 种待测物与基质干扰分开,本工作对色谱柱及流动相进行了优化。采用 1.4.1 所述色谱柱及流动相条件,各组分的色谱行为良好,减少了样品的分析时间,达到了快速检测的目的。在该流动相条件下,被测药物容易失去 H⁺ 而离子化,在很大程度上提高了检测的灵敏度。从加标样品的 MRM 色谱图(图 3)可见,在待测药物出峰的位置没有杂质干扰。

表 1 MRM 监测模式下 1,2-二苯乙烯类药物的监测条件
Table 1 The optimized MRM conditions for 1,2-stilbenes

组分	母离子 Q ₁	子离子 Q ₃ (CE/eV)	锥孔电压/V
己烯雌酚(DES)	267.2	251.0(27)* ,237.0(30)	43
己二烯雌酚(DIS)	265.0	92.9(29)* ,249.0(26)	40
己烷雌酚(HES)	269.0	133.9(17)* ,118.9(30)	30
D ₈ -己烯雌酚(D ₈ -DES)	275.2	245.3(28)*	42

注: * 为定量子离子;CE 为碰撞能量

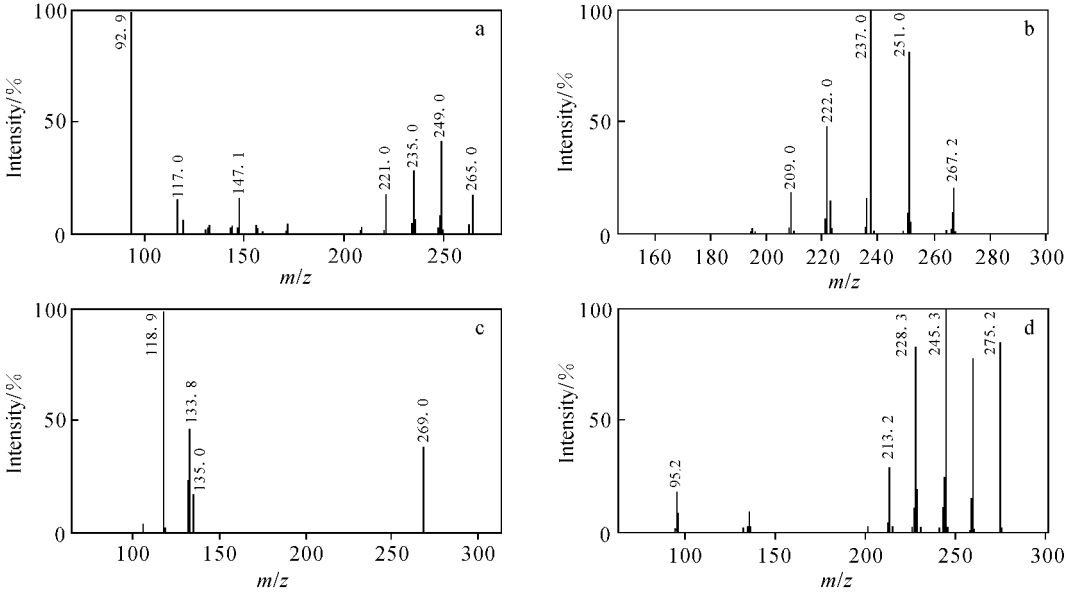


图 2 子离子扫描图

Fig. 2 Daughter ion scans of analytes

a. DIS; b. DES; c. HES; d. D₈-DES

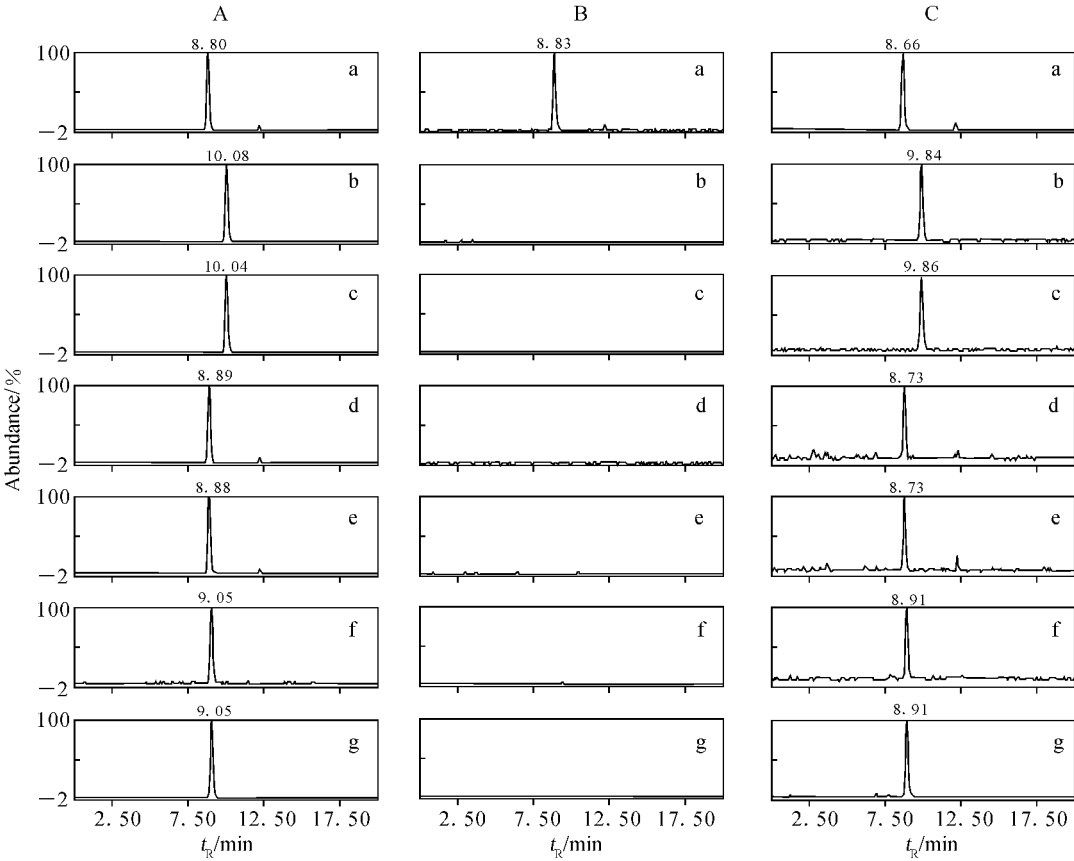


图 3 多反应监测模式下标准溶液(A)、空白样品(B)、空白加标样品(C)的提取离子色谱图(浓度 5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 3 Chromatograms of 1,2-stilbenes by MRM mode

a. m/z 275.2, 245.3; b. m/z 269.0, 133.9; c. m/z 269.0, 118.9; d. m/z 267.2, 251.0; e. m/z 267.2, 237.0; f. m/z 265.0, 92.9; g. m/z 265.0, 249.0

2.3 线性方程和检测限

取 1.3.3 绘制标准曲线系列溶液,按 1.4 建立的仪器条件进行测定。分别以选定的定量离子峰面积 Y 对含量 $X(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 做标准曲线,己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚的标准曲线方程分别为 $Y = 39.06X - 38.13$ 、 $Y = 41.03 X - 37.55$ 、 $Y = 35.97X - 27.72$,相关系数 r 分别为 0.999 6、0.999 9 和 0.999 7。以 3 倍信噪比为检出限(LOD),3 种待测药物的检出限达到 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。采用空白样品中添加目标化合物的方法,按 1.5 的方法进行处理和检测,得到本方法样品的定量限(LOQ)为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,低于欧盟制定的 DES 最高限量标准($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

2.4 离子抑制的影响

为了考察基质离子抑制对定量结果的影响,在 0.5 、 2.0 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的添加水平下,采用空白样品洗脱液加标和标准溶液进行比较,结果表明在进行痕量分析时,样品基质对待测药物的离子化影响较大,离子化效率在 $47\% \sim 75\%$ 之间。采用同位素稀释技术进行定量时,由于内标物也存在离子化效率问题,且与 3 种被测药物结

构极为相近,可以有效地降低离子抑制对检测结果的影响,从而有效地提高定量的准确性。

2.5 加标回收率和精密度试验

取同一批号的空白猪肌肉和鸡肌肉等动物组织,添加适量混合标准工作液,使 DIS、DES 和 HES 的加标浓度在 $0.5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间,按 1.5 的方法处理后进行仪器分析。每个浓度点取 5 份样品,求其平均回收率,并计算批内相对标准偏差。加标浓度为 $0.5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时的回收率结果列于表 2。

由表 2 数据可知,动物组织中 DIS、DES 和 HES 的加标量在 $0.5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,批内相对标准偏差小于或等于 8.0% ,回收率为 $78.8\% \sim 110.9\%$ 。

2.6 样品分析

应用本方法,对 60 份市场随机采集到的猪肉和鸡肉样品进行测定,其中 1 份样品检测出含有己烯雌酚,含量为 $16.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;1 份样品检测出含有己二烯雌酚,含量为 $6.8 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;均未检出己烷雌酚。该检测结果表明,本方法完全能满足我国对动物组织中 1,2-二苯乙烯类药物进行监控的需要。

表 2 动物组织中回收率试验结果
Table 2 Results of recovery experiments

组分	样品基质	加标/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
DIS	猪肉	0.5	89.2,81.7,78.8,88.6,88.9	85.4	5.7
	鸡肉	0.5	87.5,92.6,96.3,79.6,89.3	89.1	7.0
	猪肉	2.0	92.7,102.6,108.3,101.7,101.0	101.3	5.5
	鸡肉	2.0	97.1,96.3,89.6,103.1,95.6	96.3	5.0
	猪肉	10.0	99.4,93.9,108.5,103.8,96.7	100.5	5.8
	鸡肉	10.0	100.5,105.2,95.3,87.3,88.6	95.4	8.0
DES	猪肉	0.5	103.2,101.2,98.5,92.0,102.4	104.3	5.5
	鸡肉	0.5	96.7,95.6,96.3,103.8,93.9	97.3	3.9
	猪肉	2.0	95.6,98.8,101.5,95.2,96.6	97.5	2.7
	鸡肉	2.0	96.9,98.7,96.9,94.1,93.5	96.0	2.3
	猪肉	10.0	96.5,102.4,92.3,103.9,102.5	99.5	5.0
	鸡肉	10.0	98.6,96.6,100.2,93.8,100.1	97.9	2.8
HES	猪肉	0.5	106.3,107.8,90.3,103.2,102.3	102.0	6.8
	鸡肉	0.5	103.2,106.5,109.1,100.6,105.2	104.9	3.1
	猪肉	2.0	110.2,101.0,103.6,105.2,110.9	106.2	4.0
	鸡肉	2.0	103.5,106.3,104.5,102.3,100.5	103.4	2.1
	猪肉	10.0	86.5,87.9,98.6,95.3,88.9	91.4	5.7
	鸡肉	10.0	95.7,98.3,91.2,89.6,100.3	95.0	4.8

3 结 论

本方法采用同位素稀释结合固相萃取技术,建立了液相色谱-串联质谱同时测定动物组织中违禁药物己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚残留量的方法,同单组分检测相比,有效地缩短了检测时间,节约了检测成本。在本实验的仪器条件下,被测样品中的各组分与样品基质均实现了较好分离,出峰时间合适,检测灵敏度较高。实验表明,该条件易于控制、结果准确、加标回收率稳定、重现性好,适用于动物组织中 1, 2-二苯乙烯类药物的定性定量测定,为管理部门制定和执行动物源性食品相关安全法规和动物源性食品中有毒有害残留物质监控计划提供了依据。

参考文献:

[1] Commission of the European Communities. Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2005, Council Directive 96/23/EC; 51.

[2] 农业部、卫生部、国家药品监督管理局. 农业部 176 号公告:禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录, 2007.

[3] WAJIH N S, KHALID P L, ADNAN H, et al. Screening for estrogenic steroids in sheep and chicken by the application of enzyme-linked immunosorbent assay and a comparison with analysis by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 1998, 63(4): 563-569.

[4] HUO T, WANG L, LIU L, et al. Rapid time-resolved fluoroimmunoassay for diethylstilbestrol residues in chicken liver[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 357(2): 272-276.

[5] REUVERS T, PEROGORDO E, JIMENEZ R. Rapid screening method for the determination of diethylstilbestrol in edible animal tissue by column liquid chromatography with electrochemical detection[J]. J Chromatography: Biomedical Applications, 1991, 56(2): 477-484.

[6] 吴银良, 刘素英, 侯东军, 等. 气相色谱-质谱法测定动物组织中三种 1, 2-二苯乙烯类药物的残留量[J]. 色谱, 2006, 24(3): 462-465.

[7] KOOTSTRA P R, ZOONTJES P W, VAN TRICHT E F, et al. Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC-MS[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586: 82-92.

[8] 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): 1 356-1 359.

[9] HAMOIR T, COURTHEYN D, DE BRABANDER H, et al. Comparison of purification procedures for the isolation and detection of anabolic residues in faeces using gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analyst, 1998, 123(12): 2 621-2 624.

[10] XU H, GU L, HE J, et al. Simultaneous determination of residual stilbenes and stilbene metabolites in animal tissue by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2007, 852(1/2): 529-533.

=====

仪器信息网新闻栏目改版:升级打造全新版“资讯中心”

始终密切关注分析测试及仪器行业动态和发展的仪器信息网“新闻”栏目(<http://www.instrument.com.cn/news/>),从开办之初就受到各方好评。而栏目的健康发展,更离不开广大用户的热心支持。为了将最新的行业发展动态及时传递给用户、方便用户,使本栏目达到更好的信息、资源共享效果,本网对“新闻”栏目进行了全面改版升级,推出了“资讯中心”栏目。用户只要点击仪器信息网首页导航栏中的“新闻”栏目,或者点击首页右侧“业界要闻”栏目的“更多要闻”,都可进入“资讯中心”。

近日推出的“资讯中心”栏目下设 6 个子栏目:业界要闻、展商动态、热点应用、专题资讯、人物专访、专家视点。

新版“资讯中心”使网上新闻资讯更集中、更系统、更鲜明,并加入了图片焦点新闻,使页面更加生动,给大家提供全面方便的阅读感受,界面更加美观。

“资讯中心”现已正式上线,欢迎广大网友提出宝贵意见。