

动物组织中 19-去甲睾酮残留量的气相色谱-质谱检测

韩 丽¹, 李 波¹, 杨惠琴¹, 盛永刚¹, 黄叶倩²

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要: 本工作建立了动物组织中 19-去甲睾酮的残留分析方法。动物组织在缓冲溶液中酶解, 用甲醇提取, 正己烷去脂, 提取液经 SPE-C₁₈ 小柱净化, 衍生化反应后在气相色谱-质谱仪(GC/MS)上以选择离子的方式进行定性定量分析。回收率为 82%~93%, 变异系数 < 10%, 最低定量检出限为 1.0 μg · kg⁻¹。该方法高效、准确、灵敏, 并满足食品中兽药检测要求。

关键词: 气相色谱-质谱(GC/MS); 19-去甲睾酮; 动物组织

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2007)01-31-05

Analysis of Residual 19-Nortestosterone in Animal Tissues by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HAN Li¹, LI Bo¹, YANG Hui-qin¹, SHENG Yong-gang¹, HUANG Ye-qian²

(1. Shanghai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;

2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A residue method was described for analysis of 19-nortestosterone in animal tissues. The animal tissues were hydrolyzed by enzyme in the buffer solution. The residues were extracted with methanol and fat was deprived with hexane. The extracted solution was purified by SPE-C₁₈, qualification and quantitation were made by gas chromatography-mass spectrometry with selective-ion mode (SIM) after derivatization. Recovery is 82%~93%. Coefficient of variation is less than 10%, and the lowest quantitative level is 1.0 μg · kg⁻¹. The method is a high efficient, accurate, sensitive and satisfies with requirement of determination of animal drug in food.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS); 19-norandrosterone; animal tissues

19-去甲睾酮(19-nortestosterone)又被称作诺龙(nandrolone),属于促蛋白合成的同化激素^[1],于1950年由Birch首次合成。临床上它可用于治疗严重灼伤、骨质疏松症和儿童发育不良等,但它具有抑制垂体促性腺激素分泌,抗雌

激素的作用,对代谢产生不良影响,可使女性产生男性化作用^[2]。将其添加在动物饲料中,可促进动物生长发育,提高产率。在欧盟96/23/EC指令中,禁止在食源性动物中使用促蛋白合成的同化甾体激素,并规定其最高残留量为不得检

出。许多国家包括我国都禁止其作为饲料添加剂使用。目前检测该化合物的方法主要是 GC/MS^[3-5]法,本工作采用 SPE 小柱净化样品,GC/MS 的选择离子方式(SIM)对动物组织中 19-去甲睾酮残留量进行定性定量分析。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

GC/MS 5973 气相色谱-质谱联用仪;美国 Agilent 公司产品;19-去甲睾酮标准品和 β -葡萄糖醛酸苷酶;Sigma 公司产品;七氟丁酸酐(HFPA)和 SPE-C₁₈小柱;Supelco 公司产品;有机溶剂为残留级。

1.2 气相色谱-质谱联用条件

1.2.1 GC 条件 弹性石英毛细管柱 HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μ m);载气为高纯氮气;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样口温度 260 °C;升温程序:80 °C 保持 1 min,以 10 °C·min⁻¹升温到 170 °C,以 2 °C·min⁻¹升温到 220 °C,保持 1 min,以 20 °C·min⁻¹升到 260 °C,保持 5 min,不分流进样;进样量 1.0 μ L。

1.2.2 MS 条件 电子轰击(EI)离子源;接口温度 280 °C;电子能量 70 eV;SIM 方式采集数据;溶剂延迟 8 min。

1.3 样品处理

1.3.1 酶解 称取 10 g(精确到 0.01 g)在组织绞碎机上绞好的动物组织(肝、肾、肌肉)样品于 50 mL 塑料离心瓶中,加入 0.2 mol·L⁻¹醋酸缓冲液(pH=5.2±0.2) 10 mL,在均质器上混匀。加入 50 μ L β -葡萄糖醛酸苷酶,混匀,于 37 °C 下保温过夜。

1.3.2 提取 酶解后加入 30 mL 甲醇,混合后在 60 °C 水浴中放置 15 min,再置于-18 °C 冰箱中 2 h,取出后立即以 3 500 r·min⁻¹速度离心 5 min。将上层清液缓缓倒入另一个 50 mL 塑料离心瓶中,用 10 mL 正己烷萃取上清液 2 次,正己烷层弃之。剩余溶液倒入 100 mL 锥形烧瓶,40 °C 水浴中旋转蒸发,除去甲醇,剩余溶液待净化。

1.3.3 净化 将 C₁₈-SPE 柱置于固相萃取装置上,并依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,将上述

溶液全部上样,再用 13 mL V(正己烷):V(乙醚)=7:3 将目标化合物洗脱并收集。向收集的洗脱液中加入 1 mL 1 mol·L⁻¹氢氧化钠,振荡后离心(2 000 r·min⁻¹),取有机层于另一干净试管中,在缓慢的氮气流浓缩后用洗脱液全部转移到 2 mL 自动进样瓶中,继续吹干,然后加入 100 μ L 异辛烷溶解残留物。

1.3.4 衍生 向 2 mL 自动进样瓶中加 50 μ L 七氟丁酸酐(HTFA),振荡后放入 80 °C 的恒温箱中反应 30 min,取出后冷却至室温,然后在小的氮气流下吹干,加入 200 μ L 异辛烷溶解,用 GC/MS 分析。

2 结果和讨论

2.1 提取方法的比较

本方法采用甲醇提取,然后减压蒸发将甲醇除去,剩余水溶液直接过小柱净化,提取过程除用少量正己烷去脂外,没有使用其他有机溶剂。而在欧盟确证方法 Cy1.2^[6]中采用甲醇提取后,再用大量的二氯甲烷分三次萃取甲醇水溶液,不仅操作繁琐,而且使用了大量的有毒有机溶剂,既容易造成目标分析物损失,又不利于环境的保护。但这种省去有机溶剂提取的方法容易使大量蛋白溶在其中,会造成净化时堵塞固相萃取小柱,因此要将溶液在 60 °C 水浴中放置 15 min,使蛋白充分沉淀。由于动物组织中所含的磷脂会使提取溶液在减压蒸发时产生大量泡沫,甚至会冲出烧瓶造成分析物损失,因此除用正己烷去脂外,还需要在低温冰箱中放置 2~3 h,不仅可以消除起泡现象,而且可以使蛋白进一步充分沉淀。

2.2 监测离子的选择

19-去甲睾酮衍生物的色谱图 and 全扫描质谱图示于图 1、图 2。从图中可确定四个特征离子,列于表 1,它们分别为 m/z 666、453、306 及 318,其结构示于图 3。其中 m/z 666 为分子离子峰,而 m/z 453 为 M-OCOC₃F₇,另外两个离子 m/z 306 和 m/z 318 是经过 B 环不同位置的断裂及分子重排后的离子碎片,并且这种重排方式在其他一些雄甾烷类激素中也很普遍^[7-8]。

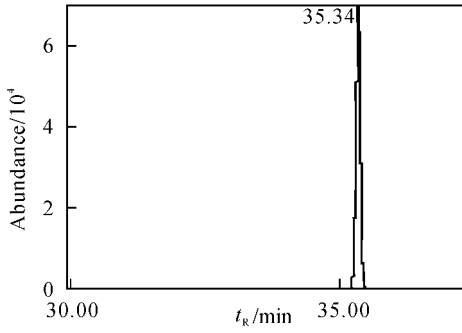


图 1 19-去甲睾酮 HPFA 衍生物的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of HPFA derivatives of 19-nortestosterone

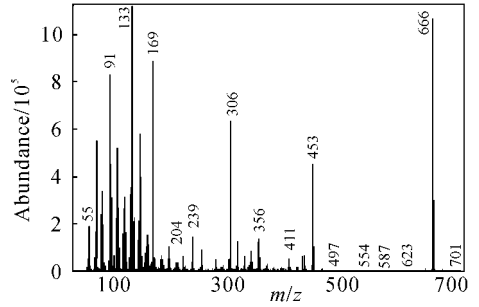


图 2 19-去甲睾酮 HPFA 衍生物的全扫描质谱图
Fig. 2 Full scan Mass spectrum of HPFA derivatives of 19-nortestosterone

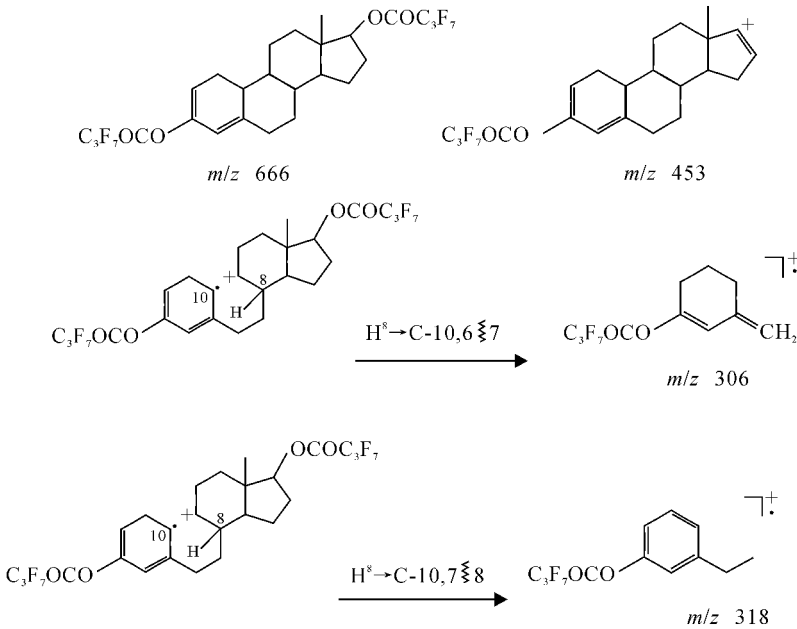


图 3 特征离子 m/z 666、453、306、318 的结构图
Fig. 3 Structure of characteristic ions m/z 666, 453, 306, 318

表 1 19-去甲睾酮衍生化产物的特征离子和相对丰度

Table 1 Characteristic ions and relative abundance of 19-nortestosterone derivatives

被测组分 Determined ingredient	19-去甲睾酮 HPFA 衍生物 HPFA derivatives of 19-nortestosterone			
	定量离子 Quantitative ion	其他监测离子 The rest of monitor ions		
质荷比 m/z	666	453	306	318
相对丰度 Relative abundance/%	100	31	61	12

2.3 方法的线性和检出限

取 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 工作液 10、20、50、100、200 μL , 用 HPFA 衍生, 测定后得到标准曲线为 $Y = -13\ 744 + 786\ 388X$, 相关系数 $r = 0.999$, 由此确定方法的线性范围为 $1.0 \sim 20.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本方法以添加回收的方式确定其定量检出限为

$1.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.4 方法的回收率和精密度

取鸡肉、鸡肝、猪肾三种空白基质样品, 每种基质分 3 组, 每组 6 个, 按低、中、高三个不同水平添加, 以 SIM 方式进行数据采集, 保留时间为 35.34 min, 空白及添加样品的选择离子色谱图

见图 4、5。采用外标法计算回收率和精密度,结果见表 2。从表 2 中可以看出,在这三种基质中,19-去甲睾酮的回收率为 82%~93%,变异

系数 < 10%,完全可以满足兽药残留分析的要求。

表 2 方法的回收率和精密度

Table 2 Recovery and precision of the method

基质 Matrix	添加水平 Added level/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	实测平均值 Average value determined/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率 Recovery /%	变异系数 CV /%
鸡肉 Chicken	1.00	0.826	82.6	4.5
	3.00	2.77	92.3	7.0
	5.00	4.56	92.0	4.5
鸡肝 Liver of chick	1.00	0.814	81.4	7.2
	3.00	2.56	85.3	6.5
	5.00	4.21	84.2	8.0
猪肾 Kidney of pig	1.00	0.830	83.0	8.2
	3.00	2.74	91.3	7.9
	5.00	4.65	93.0	6.2

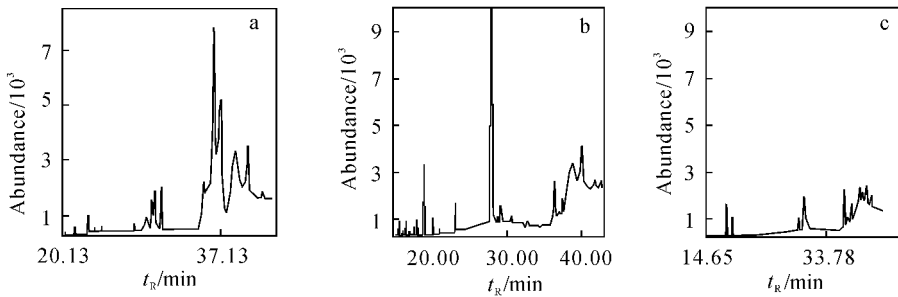


图 4 鸡肉(a)、鸡肝(b)和猪肾(c)空白样品的选择离子色谱图

Fig. 4 SIM chromatograms of blank sample of (a) chicken; (b) liver of chicken; (c) kidney of pig

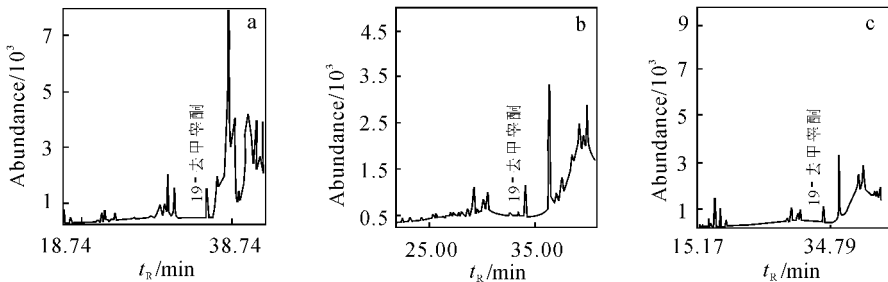


图 5 鸡肉、鸡肝和猪肾加标样品($1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的选择离子色谱图

Fig. 5 SIM chromatograms of added standard ($1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) sample of (a) chicken; (b) liver of chick; (c) kidney of pig

2.5 19-去甲睾酮的两种构型

本方法主要检测外源性作兽药使用的 19-去甲睾酮,即 $17\beta\text{-OH}$ 型,因为 $17\beta\text{-OH}$ 型在体内是无活性的。本文没有对内源性的 19-去甲

睾酮作深入的研究,因此不做讨论。

3 结论

建立的动物组织中 19-去甲睾酮的提取分

析方法所用的有机溶剂少,回收率和重现性均满足进出口动物源食品中兽药残留监测分析方法的要求。

参考文献:

[1] WASCH K D, BIZEC B L, BRABANDER H D, et al. Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15: 1 442-1 447.

[2] 竺心影. 药理学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 282-284.

[3] PETERSON H W, CHRISTENSEN F, VAD M. Method validation in relation to accuracy and precision for the gas chromatography-mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone in urine with heptafluorobutyric anhydride and N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide[J]. *Analyst*, 1994, 119: 2 627-2 630.

[4] DUBOIS M, TAILLIEU X. GC-MS determination of anabolic steroids after multi-immunoaffinity

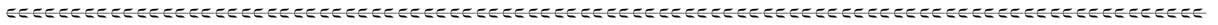
purification [J]. *Analyst*, 1998, 123: 2 611-2 616.

[5] HARTMANN S, STEINHART H. Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chrom B*, 1997, 704: 105-117.

[6] 国家质量监督检验检疫总局食品安全局. 动物和动物源食品中兽药残留物分析方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 127-135.

[7] ROBERT H S, DJERASSI C. Elucidation of the course of the electron impact induced fragmentation of α , β -unsaturated 3-keto steroids[J]. *J Am Chem Soc*, 1980, 102(2): 810-817.

[8] BOER D D, BENSINK S N, BORGGREVE A R, et al. Profiling 19-Norsteroids-tandem mass spectrometric characterization of the heptafluorobutyryl ester and pentadnorbenzyloxime heptafluorobutyryl ester derivatives of 19-nortestosterone using collisionally activated dissociation [J]. *J Mass Spectrom*, 1995, 30: 497-504.



欢迎订阅 2007 年《药学学报》

《药学学报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870)是由中国药学会主办、中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目:述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来,一直报道药学领域原始性、创新性科研成果,旨在促进国内外学术交流。刊登研究论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药化学等。

《药学学报》为我国自然科学核心期刊,据中国科学引文数据库的数据库的统计数据,在中国科技核心期刊排行表中,《药学学报》名列前茅,在医药卫生期刊中居首位;本刊已被世界主要检索系统收录,为我国药学界高水平的学术刊物,在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”,2001 年入选中国期刊方阵“双高”(高知名度、高学术水平)期刊;2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”,并获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖;2002~2004 年荣获“百种中国杰出期刊”称号。

本刊为 96 页,月刊,A4 开本。每期定价 15 元,全年定价 180 元。国内邮发代号:2-233,国外代号:M105。欢迎广大作者踊跃投稿,欢迎广大读者订阅,可采用的订阅方式如下:

1. 通过当地邮局
2. 通过 E-mail(yxxb@imm. ac. cn)或上网下载订阅单(<http://www.imm.ac.cn/acta.asp>)
3. 通过本刊编辑部;联系人:李淑芬、张晓晔
电话:86-10-63035116, 传真:86-10-63026192
编辑部地址:北京市先农坛街 1 号《药学学报》编辑部(邮编:100050)