

液相色谱-串联质谱同时测定牛奶中 10种蛋白同化激素的残留

吴彩霞¹, 陈建新¹, 刘雅红¹, 陈杖榴¹, 刘嘉亮², 王力清²

(1. 华南农业大学兽医学院, 农业部(国家)兽药残留基准实验室, 广东 广州 510642;

2. 广东省产品质量监督检验中心, 广东 佛山 528300)

Simultaneous Determination of 10 Anabolic Steroids Contaminations in Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WU Cai-xia¹, CHEN Jian-xin¹, LIU Ya-hong¹, CHEN Zhang-liu¹, LIU Jia-liang², WANG Li-qing²

(1. College of Veterinary medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;

2. Guangdong Test Center of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

Abstract: A liquid chromatographic/tandem mass spectrometric (LC/MS/MS) multiresidue method for the simultaneous determination of 10 anabolic steroids (ASs) in whole milk were developed. Milk samples were extracted with methanol and the samples were then subjected to a clean-up procedure using liquid-liquid extraction (LLE) methods. The samples were analysed by LC/MS/MS. The limits of detection (LOD) of LC/MS/MS method used for testing the 10 ASs in whole milk ranged from 0.06 to 0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the limits of quantification (LOQ) were from 0.12 to 0.54 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Experiments on spiked samples of whole milk showed that at addition levels of 1.0, 2.0, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ the average recoveries of the ASs were 24% to 86%, 25% to 91%, 31% to 71%, with relative standard deviations (RSDs) ranged from 12% to 37%, 5% to 20%, 10% to 16%, respectively.

Key words: simultaneous determination; anabolic steroids; liquid chromatography tandem mass spectrometry

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2008) 增刊-160-03

蛋白同化激素(anabolic steroids, ASs)是一类在结构及活性上与人体雄性激素睾酮相似的化学合成衍生物。这类药物能促进蛋白质合成、增进食欲、增长肌肉、促进钙磷在骨组织中沉着,临床上可用于治疗严重的营养缺乏和骨质疏松症等疾病,但它同时也是使用频率最高的一类运动兴奋剂,国际奥委会规定运动员所有场合(包括赛内和赛外)都禁用ASs^[1]。在畜牧生产上,这类药物被非法用作促生长剂以获取更高的饲养报酬。

国际奥委会规定的蛋白同化激素检测标准是采用GC/MS来分析尿样^[2]。蛋白同化激素大都含有羟基、羰基,需经过复杂的衍生化步骤后才能用GC/MS测定。而应用LC/MS/MS检测时无需进行衍生化,简单、省时,且LC/MS/MS具有分离效能高、选择性好和灵敏度高等优点,特别适用于人和动物组织中超痕量ASs的测定。本研究建立了LC/MS/MS检测牛奶中10种ASs的定量分析方法,该方法具有前处理简单、灵敏度高、专属性好等优点。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1200 LC/3200 Q Trap 高效液相色谱-质谱联用仪: 美国应用生物系统公司产品;

SUPELCO Discovery C₁₈ 液相色谱柱 (150 mm×2.1 mm×5 μm)。

群勃龙、勃地酮、诺龙、美雄酮、睾酮、甲睾酮、司坦唑醇、氘代睾酮、丙酸诺龙、丙酸睾酮、苯丙酸诺龙标准品: 美国 Sigma 公司产品; 甲醇、叔丁基甲醚、乙腈、甲酸为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂为分析纯。将 10 种蛋白同化激素标准品用甲醇配制成 10 mg·L⁻¹ 混合标准溶液, 备用。

1.2 色谱质谱条件

1.2.1 色谱条件 流动相 A: 水, 含 0.1% 的甲酸; 流动相 B: 乙腈; 采用梯度洗脱程序: 0~5 min, 50% A, 50% B; 5~10 min, 5% A, 95% B; 10~13 min, 50% A, 50% B。流速: 300 μL·min⁻¹; 进样体积: 10 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾 (-) ESI 离子源, 正离子检测, MRM 扫描; 气帘气(CUR): 103.5 kPa; 雾化气(GS1): 276.0 kPa; 辅助气(GS2): 415.0 kPa; 离子源电压(IS): 5 500 V; 离子源温度(TEM): 500 °C。表 1 为 AAS 的 LC/MS/MS 参数, 选用两对母离子 Q1/子离子 Q3 进行定性, 第一对 Q1/Q3 为定量离子对, 各离子对的驻留时间均为 80 ms。

表 1 ASs 的 LC/MS/MS 参数

Table 1 Retention time, precursor and most abundant daughter ions and their optimal ESI (+) MS-MS conditions for anabolic steroids (ASs)

激素名称	确证离子对 [M+H] ⁺ /Q3 (m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
群勃龙 Trenbolone	271.4/199.4	271.5/199.4	45	20	3.06
	271.4/253.3			20	3.06
勃地酮 Boldenone	287.6/121.0	287.6/121.0	25	15	3.23
	287.6/135.0			25	3.23
诺龙 Nandrolone	275.0/109.1	275.0/109.1	35	25	3.50
	275.0/257.2			15	3.50
美雄酮 Methandienone	301.2/121.1	301.2/121.1	25	25	3.71
	301.2/283.3			10	3.71
睾酮 Testosterone	289.2/97.1	289.2/97.1	35	25	3.98
	289.2/109.0			30	3.98
甲睾酮 Methyltestosterone	303.3/108.9	303.3/108.9	30	25	4.49
	303.3/96.9			25	4.49
司坦唑醇 Stanozolol	329.0/81.4	329.0/81.4	45	45	4.56
	329.0/121.4			35	4.56
氘代睾酮 D ₃ -Testosterone	292.3/109.0	292.3/109.0	25	20	11.10
	292.3/97.0			20	11.10
黄体酮 Progesterone	315.4/96.9	315.4/96.9	37	20	6.46
	315.4/108.9			23	6.46
丙酸诺龙 Nandrolone Propionate	331.3/109.0	331.3/109.0	25	20	8.03
	331.3/145.2			20	8.03
丙酸睾酮 Testosterone Propionate	345.3/109.1	345.3/109.1	30	20	8.54
	345.3/97.1			22	8.54
苯丙酸诺龙 Phenylpropionate	407.2/105.0	407.2/105.0	30	28	9.46
	407.2/257.3			15	9.46

1.3 样品预处理

向 5 mL 全脂奶样品中加入 5 mL $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸盐缓冲溶液, 调其 pH 值至 5.2, 加 30 mL 甲醇沉淀蛋白并超声提取 ASs 30 min, $6\ 600 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心去除沉淀, 提取液置入 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻过夜, 使脂肪析出, 离心除去脂肪。提取液旋蒸至约 10 mL, 加水至 20 mL, 用 40 mL 叔丁基甲醚分 2 次萃取 ASs, 用氨水调提取液 pH 值至 9.2, 再用 20 mL 叔丁基甲醚萃取 ASs, 合并萃取液, 旋蒸至醚约 20 mL, 用 40 mL 去离子水分两次洗涤萃取液, 上清醚层旋蒸挥干溶剂。1 mL 流动相 (V(A):V(B) = 50:50) 溶解样品, 滤膜过滤后上机测定。

2 结果与讨论

全脂奶中蛋白和脂肪含量较高, 醋酸盐加甲醇处理可有效除去牛奶中的蛋白, 但脂肪易被有机溶剂萃取, 对 ASs 的 LC/MS/MS 分析造成严重的基质干扰, 在溶剂提取 ASs 的同时如何去除脂肪是样品预处理的关键环节^[3]。冷冻可使牛奶中绝大部分脂肪析出而被除去, 而 ASs 仍保留在甲醇提取液中。试用正己烷萃取脱脂, 但同时部分 ASs 也被萃取, 特别是脂溶性较大的苯丙酸诺龙、丙酸睾酮和丙酸诺龙损失严重, 因此本文选用冷冻法脱脂。除去脂肪后, 叔丁基甲醚可有效萃取提取液中 ASs。再用去离子水洗涤萃取液, 进一步去除萃取物中的水溶性基质。作者比较了醚萃取后过 C_{18} 小柱净化和水洗净化 ASs 的回收率, 发现二者没有明显差异, 而水洗净化既省时又经济, 因此选用萃取后水洗的净化方法。

在一级全扫描质谱图中, 10 种 ASs 都能观察到清晰的 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 准分子离子峰, 没有其他的加合离子出现, 然后进行相应的子离子 Q3 全扫描, 以确定 MRM 特征诊断离子, 结果见表 1。MRM 模式是很适合的分析模式, 可以对比标准化合物的离子碎片进行确证, 也可以对色谱分离不开的组分进行准确定量分析。

在空白牛奶试样中添加不同浓度的 ASs 考察其分析线性范围, 结果在 $0.5\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性良好 ($r>0.99$)。该法的检出限为 $0.06\sim 0.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最低定量限为 $0.12\sim 0.54 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。向空白牛奶中分别添加 1、2 和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三个浓度水平的 ASs 标准溶液, 10 种 ASs 的加标回收率分别为 24%~86%、25%~91% 和 31%~71%。相对标准偏差分别为 12%~37%、5%~20% 和 10%~16%。

实验结果表明, 本方法简便快速、灵敏度高、专属性强, 适于在兴奋剂检测或药物残留分析中对牛奶中蛋白同化激素的分析。

参考文献:

- [1] 严慧, 向平, 王萌焯, 等. 液相色谱-串联质谱法测定头发中 10 种蛋白同化激素[J]. 分析化学, 2007, 35(7): 949-953.
- [2] WOLTERS B G, KRAAN G P B. Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids [J]. Journal of Chromatogr A, 1999, 843: 247-274.
- [3] SHERRI B T, WENDY C A, CHRISTINE M K, et al. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008(22): 1467-1480.