

液相色谱-串联质谱法测定水产品中的醋酸甲羟孕酮

张志刚, 施冰, 王根芳, 林立毅, 周昱

(厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012)

摘要:建立了快速、灵敏的液相色谱-电喷雾串联质谱测定水产品中醋酸甲羟孕酮的残留量的方法。样品用乙酸乙酯提取, 提取液用氮气吹干, 乙腈溶解, 正己烷初步除脂后, 中性氧化铝小柱净化, 浓缩定容。以 $V(\text{乙腈}) : V(0.1\% \text{甲酸}) = 70 : 30$ 的溶液为流动相, 采用 Symmetry Shield RP18 柱分离, 通过电喷雾-串联四极杆质谱仪以多反应监测(MRM)方式进行检测。该方法准确、稳定、灵敏度高, 在 $0.1 \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加范围内, 醋酸甲羟孕酮的回收率为 $92\% \sim 106\%$, 变异系数为 $3\% \sim 7\%$, 检出限为 $0.03 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量检出限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词:液相色谱-串联质谱; 水产品; 醋酸甲羟孕酮

中图分类号: O657.63; R977.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)01-36-04

Determination of Medroxyprogesterone Acetate in Aquatic Product by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection

ZHANG Zhi-gang, SHI Bing, WANG Gen-fang, LIN Li-yi, ZHOU Yu
(Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fujian Xiamen 361012)

Abstract: The method of determination of medroxyprogesterone acetate residue in aquatic product by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection is described. The compound was extracted with ethyl acetate and evaporated to dryness, dissolved with acetonitrile and defatted with *n*-hexane, followed purified with neutral alumina solid-phase extraction cartridges. Sample was chromatographed using an acetonitrile-0.1% formic acid (7:3, *v/v*) mobile phase on a Symmetry Shield RP18 column. Analyte determination was performed by ESI-MS-MS in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method was accurate and reproducible, at a spiking level from $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ to $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, recovery ranged from 92% to 106% , coefficient of variation ranged from 3% to 7% , the limit of detection was $0.03 \mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of quantitation was $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: liquid chromatography tandem mass spectrometry; aquatic product; medroxyprogesterone acetate

醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate, MPA), 又名安宫黄体酮, 是一种孕激素, 具有促进生长等作用。我国和欧美等国家都明文禁止在畜禽水产养殖中使用醋酸甲羟孕酮, 并规

定其在动物源性食品中不得检出。醋酸甲羟孕酮一般用药剂量小, 代谢速度快, 在动物体内残留水平低, 需要有高灵敏度的方法分析其残留量。

测定醋酸甲羟孕酮的方法有放射酶联免疫分析法(RIA)、气相色谱-质谱法^[1]和液相色谱-质谱法^[2-5]。RIA 法虽然灵敏度高、操作简单,但存在交叉反应等缺点,一般适合用于样品的初筛;气相色谱-质谱法测定样品需要衍生,灵敏度不高;而液相色谱-质谱法,尤其是液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),具有灵敏度高,抗基质干扰能力强等优点,已成功应用于血浆^[2,5]、肾脂^[3]和毛发^[4]样品的测定,但用于水产品的测定国内外均未见报道。本文旨在建立一种快速、灵敏的 LC-MS/MS 方法,测定水产品中醋酸甲羟孕酮的残留量,以满足出口水产品检测的要求。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

API3000 型液相色谱-串联四极杆质谱联用仪;美国 ABi 公司产品,配有电喷雾离子化源(ESI)以及 Analyst 1.3 数据处理系统;Agilent 1100 液相色谱仪;美国安捷伦公司产品;T18 型组织匀浆机;德国 IKA 公司产品;固相萃取仪;美国 Supelco 公司产品;TurboVap LV 氮气浓缩仪;美国 Zymark 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

醋酸甲羟孕酮;美国 Sigma 公司产品,纯度 $\geq 97\%$ (HPLC);中性氧化铝小柱(1 g/3 mL);美国 Supelco 公司产品;乙酸乙酯、乙腈、正己烷;德国 Merck 公司产品,均为色谱纯;实验用水为 Millipore 超纯水;其它试剂均为分析纯。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 Symmetryshield RP18 柱,150 mm \times 2.1 mm,3.5 μ m 粒径,美国 Waters 公司产品;流动相为 V(乙腈):V(0.1%甲酸) = 70:30 溶液;流速为 0.25 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 20 μ L。

1.3.2 质谱条件 离子源:ESI 源;雾化气 7 mL/min,帘气 10 mL/min,辅助加热气 N₂ 8 L/min,加热温度 480 $^{\circ}$ C,喷雾电压 5 500 V;去集簇电压(DP)33 V;聚焦电压(FP)133 V;入口电压(EP)11 V;碰撞气(CAD)6 mL/min;碰撞能(CE)和出口电压(CXP)见表 1;扫描方式:多反应监测(MRM),正离子,驻留时间(dwelling time)200 ms,监测离子对见表 1。

1.4 样品前处理

准确称取 2 g 均匀样品于 50 mL 玻璃离心管中,加入 5 g 无水硫酸钠和 15 mL 乙酸乙酯,均质提取 2 min(10 000 r/min),离心 3 min(3 000 r/min),取上层有机相,残渣再用 10 mL

乙酸乙酯提取一次,合并提取液于 50 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干。向残留物中加入 2 mL 乙腈,2 mL 正己烷,涡流混合 1 min,静置,待分层后,用尖嘴吸管吸取上层溶液并弃去。将下层溶液加到预先用 3 mL 乙腈活化的中性氧化铝小柱(1 g/3 mL),再用 6 mL 乙腈淋洗小柱,收集全部过滤液和洗脱液,于 50 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干。准确加入 1 mL V(乙腈):V(水) = 50:50 溶液溶解残渣,过 0.45 μ m 滤膜,待测。

表 1 醋酸甲羟孕酮的 MRM 离子对、CE 和 CXP 值

Table 1 Selected MRM transitions for medroxyprogesterone acetate

| Parent ion <i>m/z</i> | Daughter ion <i>m/z</i> | CE U/V | CXP U/V |
|--------------------------|----------------------------|-----------|------------|
| 387.3 | 327.4 | 22 | 11 |
| 387.3 | 285.3 | 28 | 9 |
| 387.3 | 123.3 | 35 | 12 |
| 387.3 | 97.2 | 41 | 9 |

2 结果与讨论

2.1 样品提取和净化条件的选择

醋酸甲羟孕酮属于脂溶性物质,在样品中主要富集于皮脂层,而肌肉组织中含相对较少^[6]。实验表明,样品用乙酸乙酯提取比用乙腈或甲醇提取回收率高,但乙酸乙酯提取的油脂较多,需净化除油脂。采用乙腈和正己烷液液分配可除去大部分的油脂,残余的小部分油脂和其它干扰物可进一步用中性氧化铝吸附除去。实验结果表明,该方法净化效果好,回收率高。

2.2 质谱条件优化

以母离子与子离子组成监测离子对,母离子选择[M+1]峰,对母离子进行二级质谱全扫描(见图 1),找出 4 个信号较强的特征碎片离子作为子离子,其可能的裂解途径见图 2。以 MRM 定性和定量分析,同时优化各种质谱条件,其中 CE 的优化过程见图 3。信号最强的离子对往往为定量提供了高灵敏度,而其它离子对则能辅助定性。采用上述优化后的测定条件,罗非鱼空白样品添加 1 μ g/kg 标准的提取离子流图见图 4。

2.3 二级质谱子离子的相对丰度

根据欧盟《2002/657/EC》^[7]的规定,选取 5 μ g/L 的标准溶液,测定 6 次,计算各离子对的相对丰度,取平均值;同法测定并计算添加水平 1 μ g/kg(测定溶液相当于 2 μ g/L)的加标样品

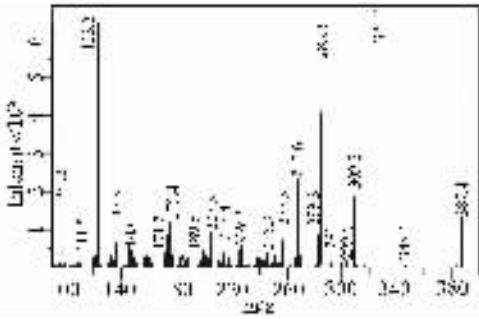


图 1 醋酸甲羟孕酮的二级质谱全扫描图
(母离子 m/z 387, CE 30V)

Fig. 1 Product ion spectrum of medroxyprogesterone acetate

各离子对的相对丰度,取平均值;计算两者相对偏差,结果见表 2。实验表明,各离子对的相对丰度偏差均 $\leq 10\%$,符合欧盟《2002/ 657/ EC》要求小于 20%的规定。

表 2 醋酸甲羟孕酮二级质谱子离子的相对丰度
Table 2 The peak-area ratios of the two product ions for medroxyprogesterone acetate

| Ion pares | 285/327 | 123/327 | 97/327 |
|--------------------------------|---------|---------|--------|
| Peak ratio of standard | 0.30 | 0.31 | 0.13 |
| Peak ratio of fortified sample | 0.30 | 0.33 | 0.12 |
| Relative deviation/% | 0.0 | 5.8 | 7.0 |

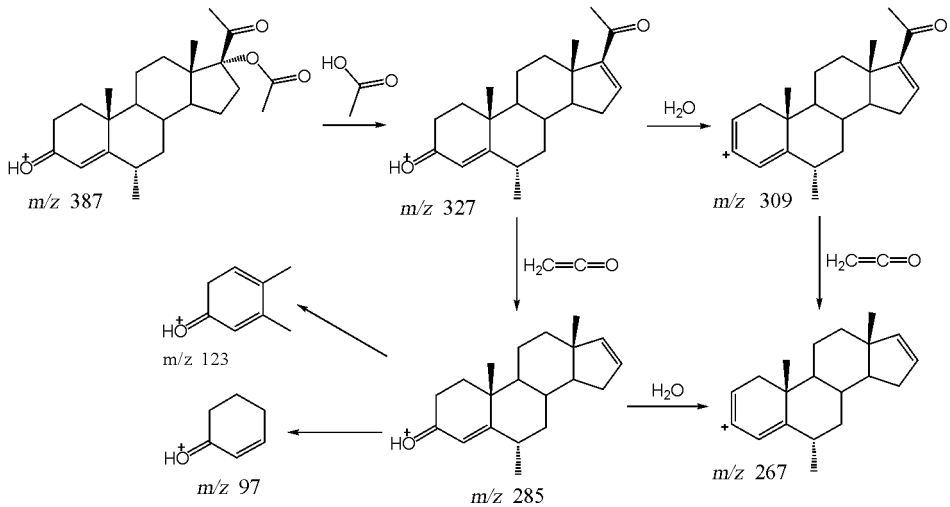


图 2 醋酸甲羟孕酮的裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathway of medroxyprogesterone acetate

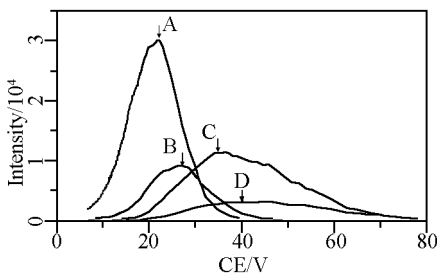


图 3 优化醋酸甲羟孕酮各 MRM 离子对 CE 值
Fig. 3 Optimizing CE value for the selected MRM ions of medroxyprogesterone acetate

A— m/z 387 \rightarrow m/z 327; B— m/z 387 \rightarrow m/z 285;
C— m/z 387 \rightarrow m/z 123; D— m/z 387 \rightarrow m/z 97

2.4 线性范围和检出限

测定浓度为 0.2、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的醋酸甲羟孕酮标准溶液,以峰面积(Y)对浓度(X , $\mu\text{g/L}$)绘制标准曲线,得线性方程 $Y =$

19 367 X , 相关系数 0.998。以阴性样品提取液配制同样系列的标准,测得的标准曲线与上述方程基本一致,表明样品基体抑制不明显。以阴性样品的 3 倍噪声计算检测限(LOD)为 0.03 $\mu\text{g/kg}$, 10 倍噪声计算定量检测限(LOQ)为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 4 方法的回收率和精密度

Table 4 Recovery and RSD in different Matrix

| Sample | Added / $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ | Recovery /% | RSD($n=6$) /% |
|--------------|---|----------------|--------------------|
| Java tilapia | 0.1 | 106 | 6.9 |
| | 1 | 94.5 | 5.0 |
| | 5 | 98.3 | 3.0 |
| | 10 | 92.5 | 3.2 |
| | 20 | 101 | 3.0 |
| Eel | 1 | 95.0 | 5.1 |

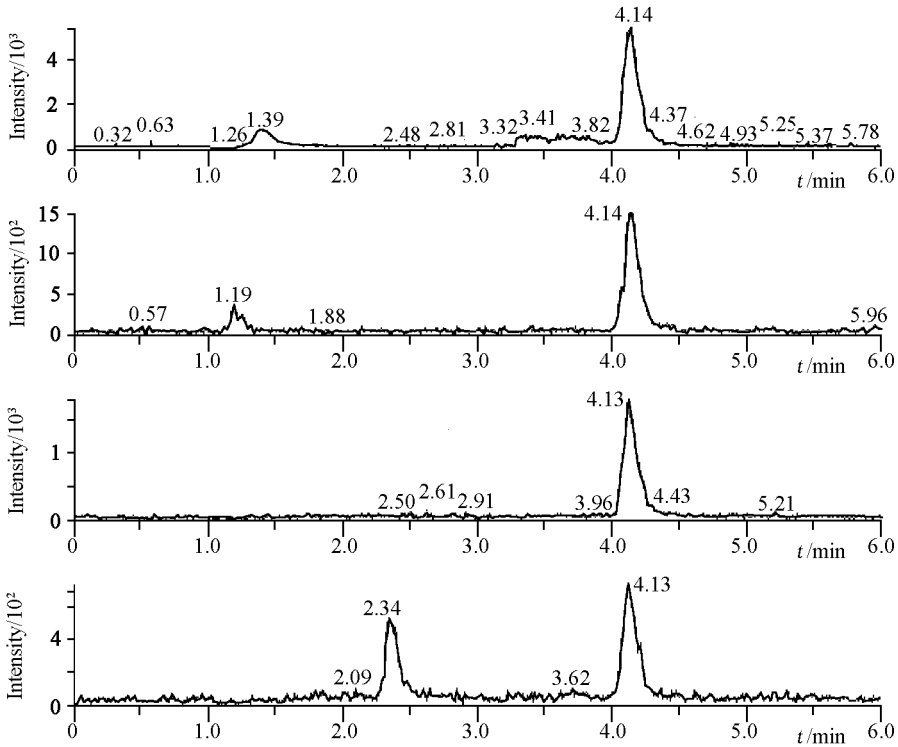


图 4 罗非鱼空白样品添加 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 醋酸甲羟孕酮的提取离子流色谱图

Fig. 4 Extracted chromatogram of all ions monitored for a spiked Java tilapia sample containing $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ medroxyprogesterone acetate

2.5 方法的回收率和精密度

样品的加标回收率见表 4, 由表 4 可以看出, 在 $0.1 \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围之内, 加标回收率 $92\% \sim 106\%$, 6 次测定的 RSD $3\% \sim 7\%$ 。方法的准确度和精密度均符合残留分析的要求。

3 结论

本方法针对水产品的基体特点, 采用乙酸乙酯提取, 中性氧化铝小柱净化, 操作简单, 回收率高, 重现性好, 背景噪音低。实验中建立了 4 个特征 MRM 监测离子对, 具有较高的灵敏度和选择性。

本方法适用于水产品中醋酸甲羟孕酮残留量的测定和确证。

参考文献:

- [1] Jorma Kärkkäinen, Ervo Vesterinen, Ulf-Håkan Stenman, et al. Comparison of Mass Spectrometry and Radioimmunoassay to Measure Medroxyprogesterone Acetate in Patients with Endometrial Cancer[J]. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1990, 26(9): 975-977.
- [2] Asko Järvinen, Petri Kainulainen, Minna Nissilä, et al. Pharmacokinetics of Estradiol Valerate and Medroxyprogesterone Acetate in Different Age

Groups of Postmenopausal Women[J]. *Maturitas*, 2004, 47:209-217.

- [3] Hooijerink H, van Bennekom E O, Nielen M W F. Screening for Gestagens in Kidney Fat Using Accelerated Solvent Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483: 51-59.
- [4] Lauriane Rambaud, Emmanuelle Bichon, Nora Cesbron, et al. Study of 17β -Estradiol-3-benzoate, 17α -Methyltestosterone and Medroxyprogesterone Acetate Fixation in Bovine Hair[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 532:165-176.
- [5] Seong-Mo Kim, Dong-Hyun Kim. Quantitative Determination of Medroxyprogesterone Acetate in Plasma by Liquid Chromatography-Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, 15:2 041-2 045.
- [6] Committee for Veterinary Medicinal Products-Medroxyprogesterone Acetate Summary Report. EMEA/MRL/0129/96-FINAL, 1996.
- [7] Commission of the European Communities. Commission Decision 2002/ 657/ EC implementing Council Directive 96/ 23/ EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results.