

三重四极杆质谱法快速测定水产品中的多种激素残留

LCMSMS-070

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中多种激素残留的分析方法。鱼肉经样品前处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。采用外标法建立标准曲线，17 种激素具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9987~0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验，17 种激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.322% 和 5.82% 以下，系统精密度良好，检出限范围为 0.07~1.06 $\mu\text{g/L}$ 。采取鱼肉基质加标的方法计算回收率进行方法验证，17 种激素的回收率范围为 78.0%~115%，可以满足鱼肉中激素类药物的检测需求。

关键词：激素 水产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

激素，诸如雄激素、雌激素和孕激素等，在生命体中扮演了非常重要的角色。雄激素是主要的男性类固醇激素，是决定在胚胎发育过程和青春期性成熟过程当中男性特征显现的首要决定因素，通常用于恢复肌肉形状和力量的治疗中。众所周知，雌激素直接影响大脑中控制情绪和认知的区域。雌激素与孕激素的结合也通常被用于治疗更年期综合征。激素化合物能提高饲料转化率并促进动物生长而被广泛用于水产养殖行业。例如，生长激素能促进鱼类的生长发育；雌二醇、睾酮、孕酮三种性腺激素，其主要作用是调节鱼类的生殖行为，在水产养殖生产中，这些激素类药物常用于鱼类的性转变。通常地，激素比较稳定而且不易降解，然而残留在动物组织中的天然和合成激素当通过食物链进入人体后，仍具有很强的生物活性和潜在的致癌性，容易引发中性肥

胖、免疫缺陷和骨质疏松等疾病，已被许多国家限制或禁止其在食用性动物养殖中使用。但由于利益驱动，这些化合物仍然被滥用，因此，很有必要建立可靠的分析方法对水产品中激素残留量进行监控。通常 HPLC 只能采用常规方法，而不能进行特殊的检测；GC-MS 需要在色谱分离之前进行衍生化，因为多数组分本身具有热不稳定性、非挥发性或者极性特征。UHPLC-MS/MS 具有高的分离效率和鉴定准确率，目前已经成为分析测定激素的首选方法。

本文在结合国家标准 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》基础上，建立超高效液相色谱和三重四极杆质谱法联用法准确测定了水产品中多种激素的残留。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III

2.1 mm I.D. \times 50 mmL., 1.6 μm

流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液，B - 甲醇，

A/B=35%/65% (V/V)

流速：0.3 mL/min

洗脱方式：等度洗脱

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 1

表 1 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
雄烯二酮	287.05	97.00*	-15.0	-25.0	-20.0
	287.05	109.15	-15.0	-25.0	-23.0
勃地酮	287.10	121.05*	-26.0	-25.0	-26.0
	287.10	135.05	-26.0	-15.0	-15.0
达那唑	338.25	148.15*	-26.0	-30.0	-16.0
	338.25	120.00	-26.0	-35.0	-24.0
氟甲睾酮	337.15	241.15*	-13.0	-25.0	-18.0
	337.15	131.00	-13.0	-35.0	-28.0
睾酮	289.25	97.00*	-25.0	-25.0	-20.0
	289.25	109.05	-25.0	-25.0	-22.0
甲睾酮	303.25	109.15*	-25.0	-30.0	-21.0
	303.25	97.15	-25.0	-25.0	-19.0
美雄酮	301.25	121.15*	-26.0	-25.0	-13.0
	301.25	149.15	-26.0	-15.0	-16.0
诺龙	275.10	109.10*	-13.0	-30.0	-22.0
	275.10	257.20	-13.0	-15.0	-20.0
去甲雄烯二酮	273.10	109.15*	-10.0	-25.0	-23.0
	273.10	197.10	-10.0	-20.0	-15.0
群勃龙	271.20	253.15*	-27.0	-20.0	-19.0
	271.20	199.05	-27.0	-25.0	-15.0
乙酸甲地孕酮	385.10	267.15*	-23.0	-20.0	-20.0
	385.10	325.20	-23.0	-15.0	-25.0
甲羟孕酮	345.30	123.00*	-13.0	-25.0	-13.0
	345.30	97.20	-13.0	-25.0	-19.0
甲羟孕酮乙酸酯	387.30	123.00*	-15.0	-30.0	-13.0
	387.30	327.25	-15.0	-10.0	-25.0
甲基炔诺酮	313.25	109.15*	-12.0	-35.0	-24.0
	313.25	245.20	-12.0	-25.0	-18.0
氯地孕酮乙酸酯	405.05	345.20*	-24.0	-15.0	-18.0
	405.05	309.15	-24.0	-20.0	-23.0
炔诺酮	299.05	109.05*	-19.0	-35.0	-22.0
	299.05	91.15	-19.0	-25.0	-11.0
孕酮	315.15	97.15*	-12.0	-25.0	-20.0
	315.15	109.00	-12.0	-30.0	-21.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

将浓度为 100 mg/L 的 17 种激素, 用超纯水依次稀释至 1000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标样。将 1000 $\mu\text{g/L}$ 的 17 种激素混合标样, 用水逐级稀释成不同浓度点的标准工作液用于建立标准曲线 (见表 2)。

表 2 混合标准工作液中各标准物质的浓度($\mu\text{g/L}$)

编号	名称	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5	浓度6
1	去甲雄烯二酮	1	2	10	20	50	100
2	群勃龙	2	5	10	20	50	100
3	勃地酮	2	5	10	20	50	100
4	诺龙	1	2	5	20	50	100
5	雄烯二酮	1	5	10	20	50	100
6	美雄酮	2	5	10	20	50	100
7	睾酮	1	2	10	20	50	100
8	甲睾酮	1	2	10	20	50	100
9	甲羟孕酮	1	2	10	20	50	100
10	乙酸甲地孕酮	1	2	10	20	50	100
11	甲羟孕酮乙酸酯	0.5	2	10	20	50	100
12	孕酮	1	2	10	20	50	100
13	炔诺酮	2	5	10	20	50	100
14	甲基炔诺酮	1	5	10	20	50	100
15	氯地孕酮乙酸酯	0.5	2	10	20	50	100
16	氟甲睾酮	2	5	10	20	50	100
17	达那唑	1	5	10	20	50	100

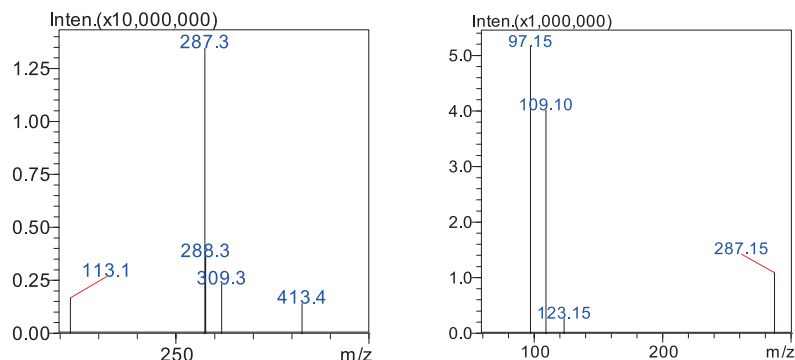
1.3.2 样品前处理方法

称取 5.0 g 试样, 置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 加入 20 mL 乙腈 - 甲酸 (含 0.1%) 溶液, 用均质器均质 1 min, 然后于离心机上以 4000 r/min 的速率离心 5 min, 将上清液移入另一个 60 mL 聚四氟乙烯离心管中, 将离心残渣用 20 mL 乙腈 - 甲酸 (含 0.1%) 溶液再提取一次, 合并上清液。

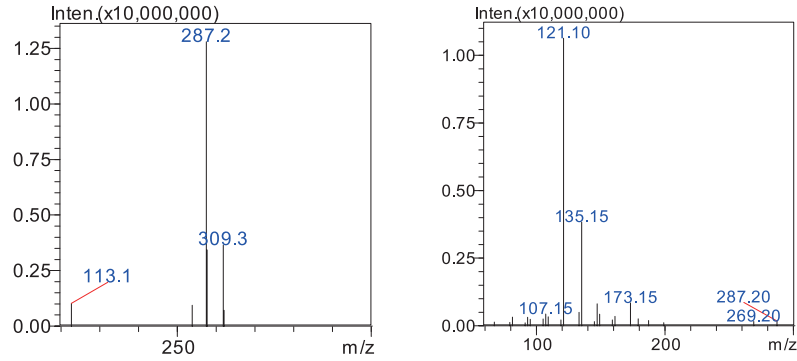
将上清液转移到 125 mL 分液漏斗中, 于上清液中加入 25 mL 乙腈饱和的正己烷, 振荡 2 min, 弃去上层溶液, 将下层溶液移至 100 mL 棕色鸡心瓶中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至近干, 用氮气流吹干, 准确加入 1.0 mL 乙腈 - 甲酸 (含 0.1%) 溶液溶解残渣, 涡流混匀后, 用一次性注射式过滤器过滤至样品瓶中, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

结果讨论

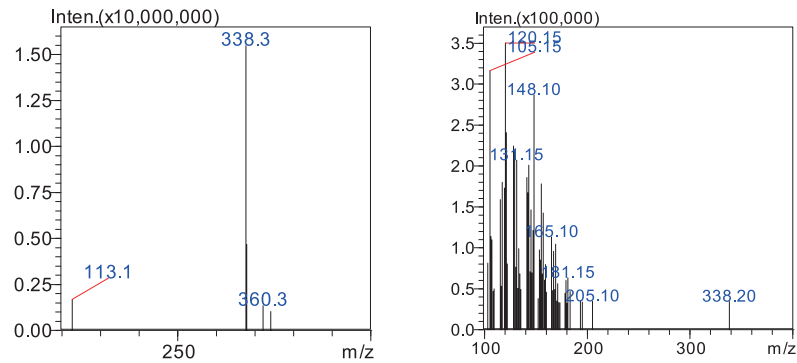
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



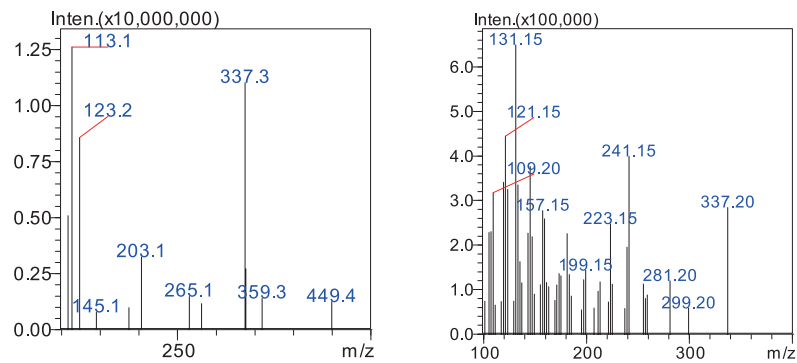
1. 雄烯二酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-22V)(右图)



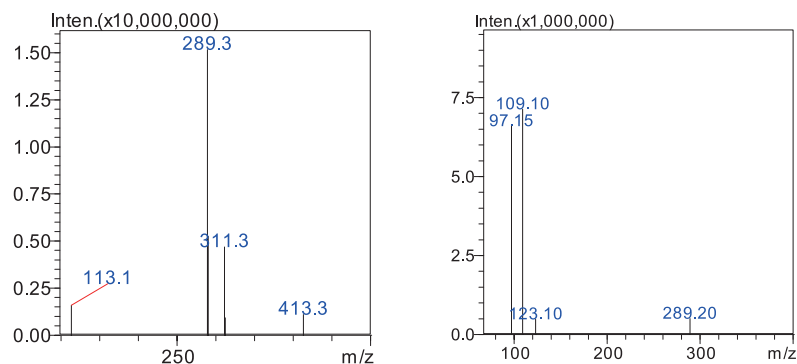
2. 勃地酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-21V)(右图)



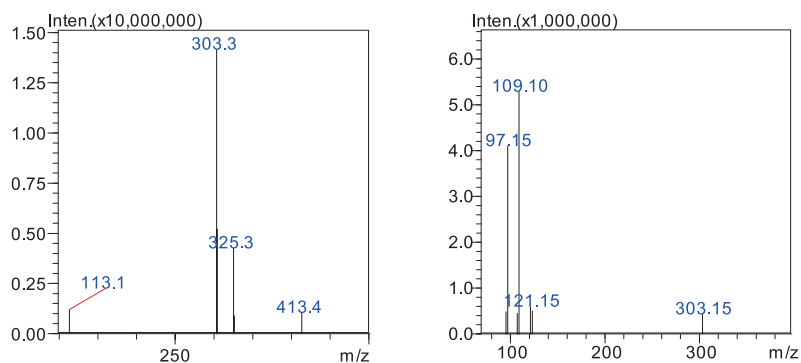
3. 达那唑的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-40V)(右图)



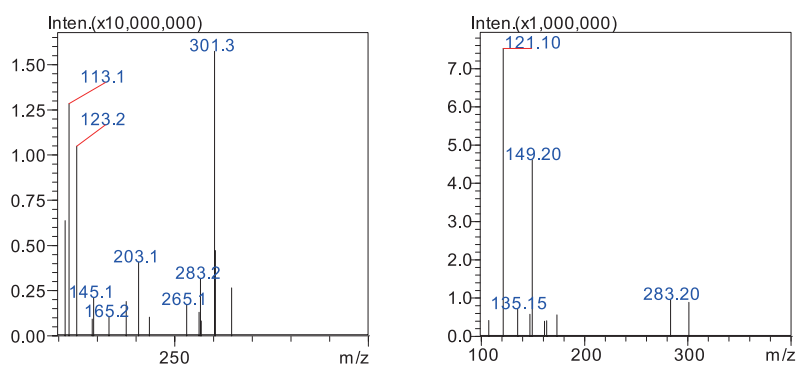
4. 氟甲睾酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-32V)(右图)



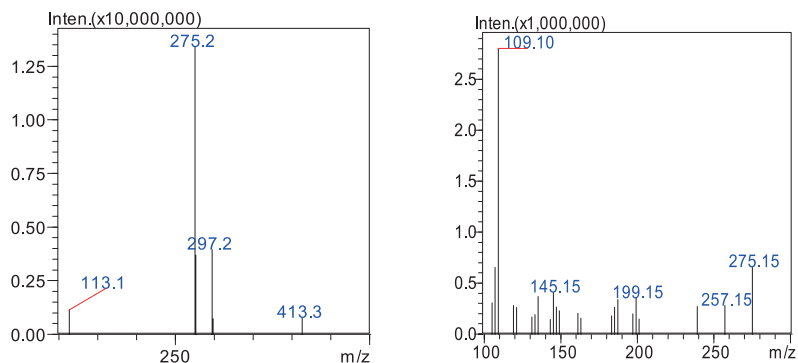
5. 睾酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-25V)(右图)



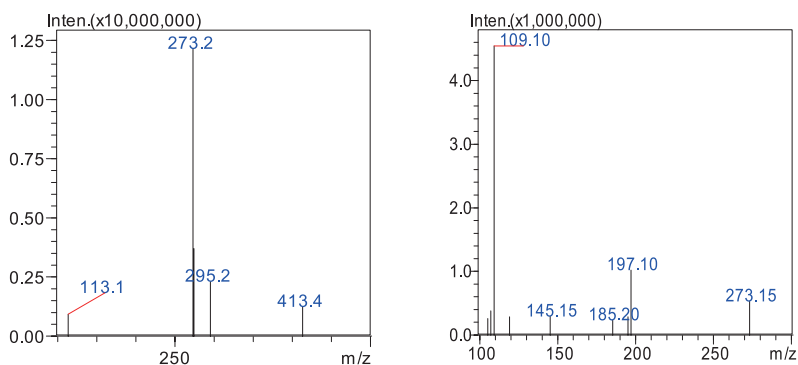
6. 甲睾酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-26V) (右图)



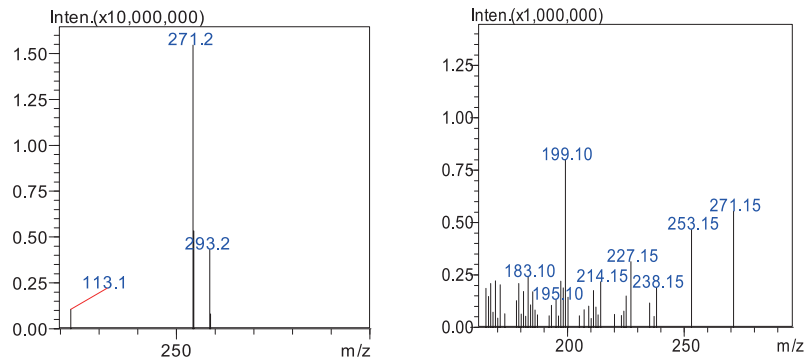
7. 美雄酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-18V) (右图)



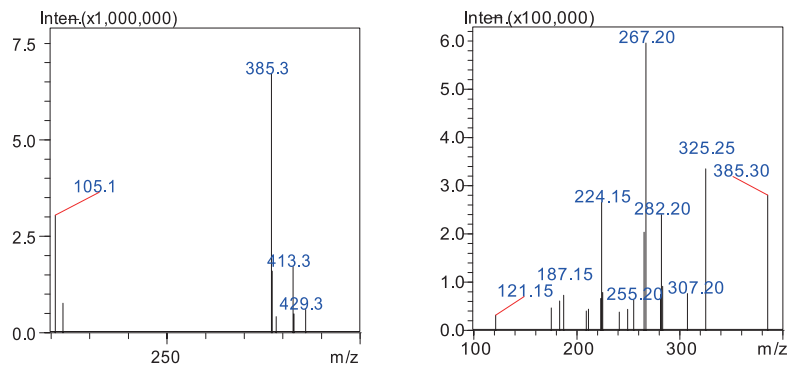
8. 诺龙的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-24V) (右图)



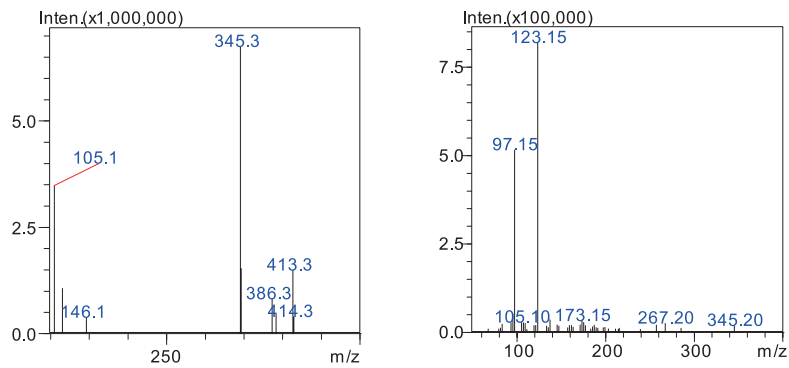
9. 去甲雄烯二酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-25V) (右图)



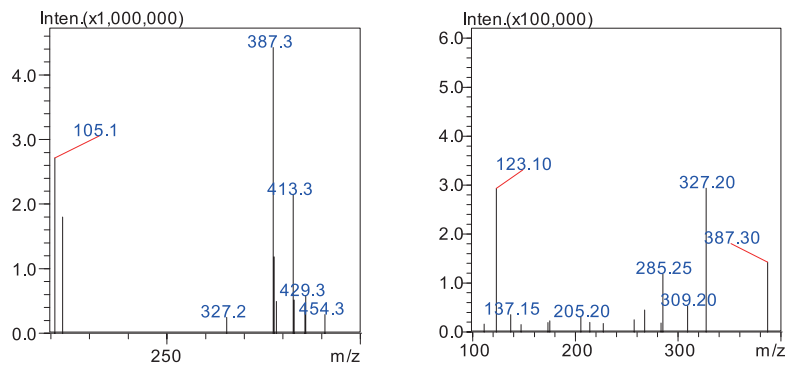
10. 群勃龙的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-30V) (右图)



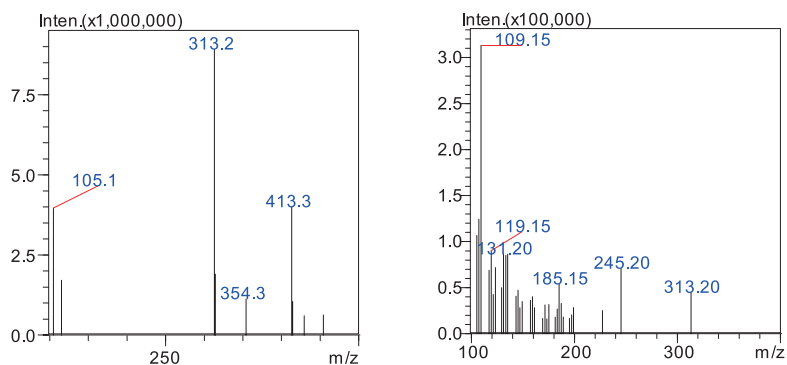
11. 乙酸甲地孕酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-19V) (右图)



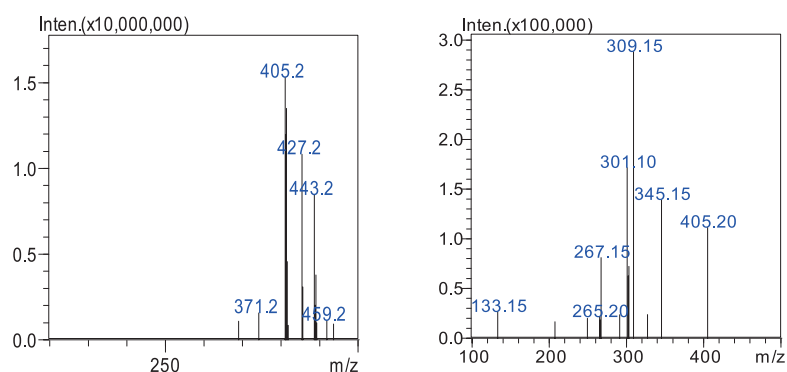
12. 甲羟孕酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-29V) (右图)



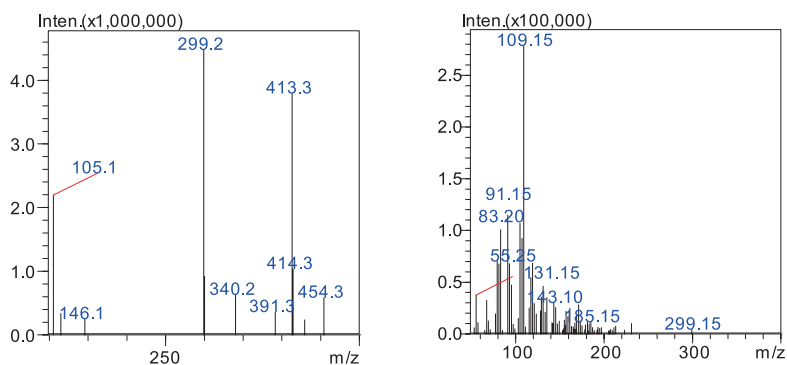
13. 甲羟孕酮乙酸酯的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-20V) (右图)



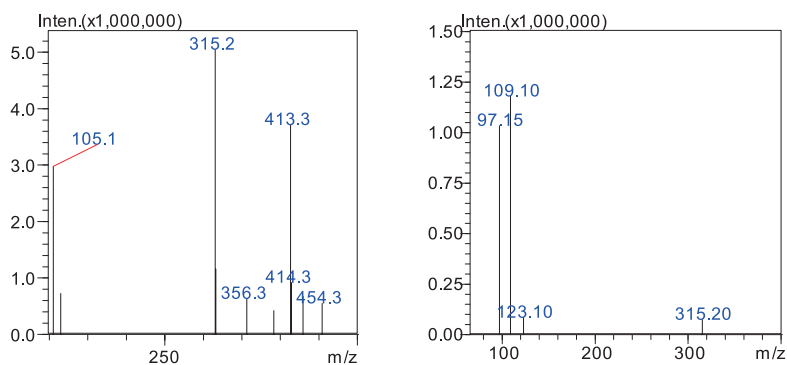
14. 甲基炔诺酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-26V) (右图)



15. 氯地孕酮乙酸酯的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-18V) (右图)



16. 炔诺酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-32V) (右图)



17. 孕酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为-25V) (右图)

图 1 17 种激素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

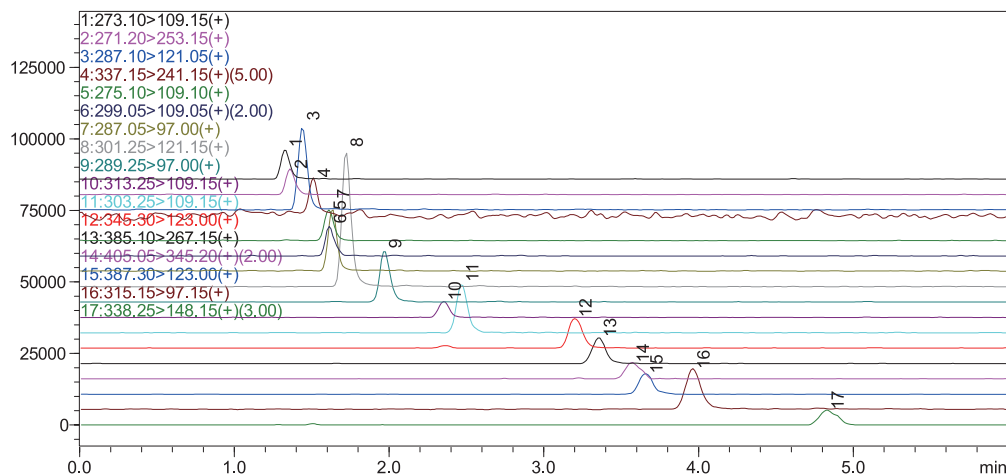
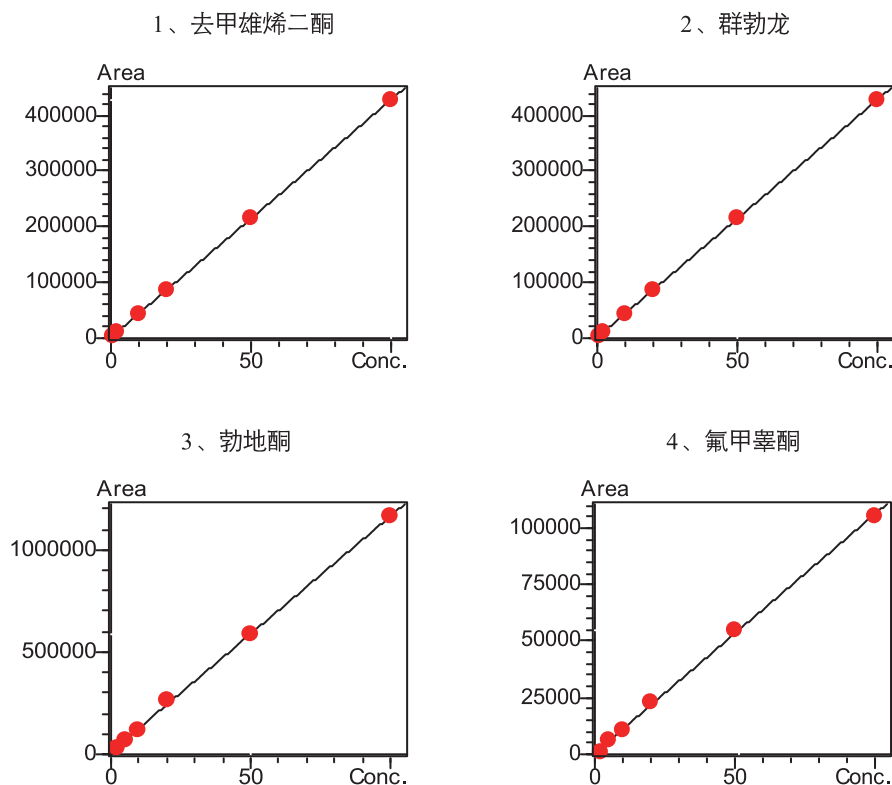


图 2 标准样品 10 µg/L 混标的 MRM 色谱图

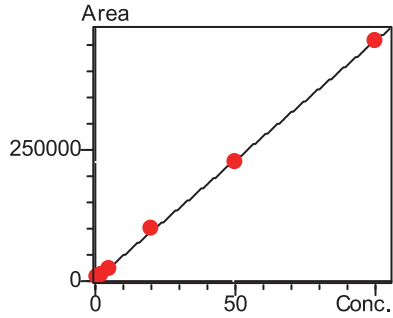
峰归属: 1、去甲雄烯二酮; 2、群勃龙; 3、勃地酮; 4、氟甲睾酮; 5、诺龙; 6、炔诺酮; 7、雄烯二酮; 8、美雄酮; 9、睾酮; 10、甲基炔诺酮; 11、甲睾酮; 12、甲羟孕酮; 13、乙酸甲地孕酮; 14、氯地孕酮乙酸酯; 15、甲羟孕酮乙酸酯; 16、孕酮; 17、达那唑

2.3 线性关系

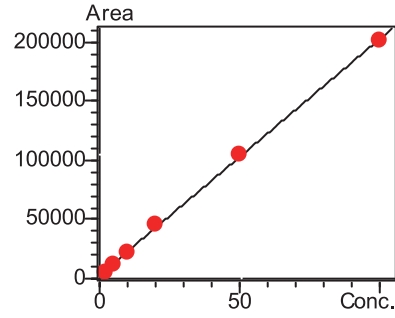
按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，按照表 2 线性浓度点，采用六点外标法建立校准曲线，如图 3 所示。17 种激素在各自的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均在 0.9987~0.9999 之间（见表 3）。



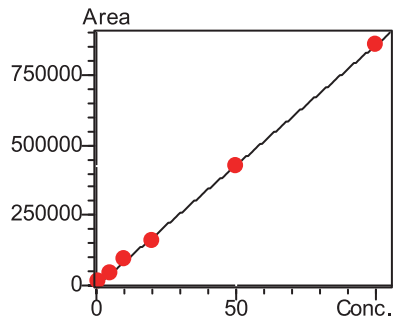
5、诺龙



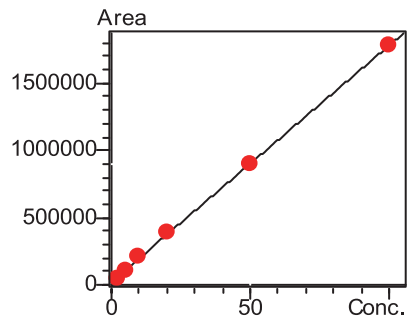
6、炔诺酮



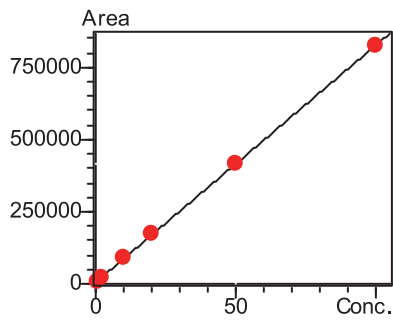
7、雄烯二酮



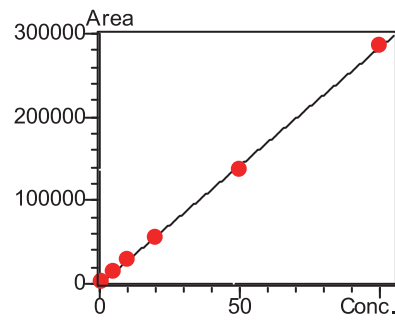
8、美雄酮



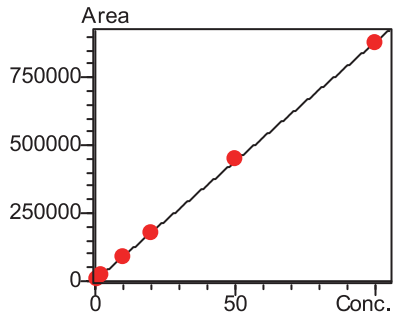
9、睾酮



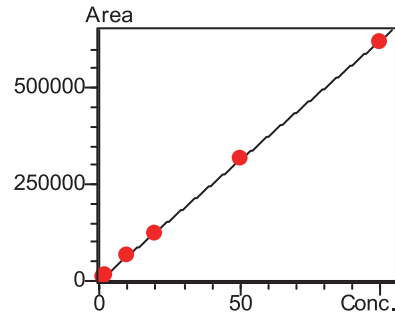
10、甲基炔诺酮



11、甲睾酮



12、甲羟孕酮



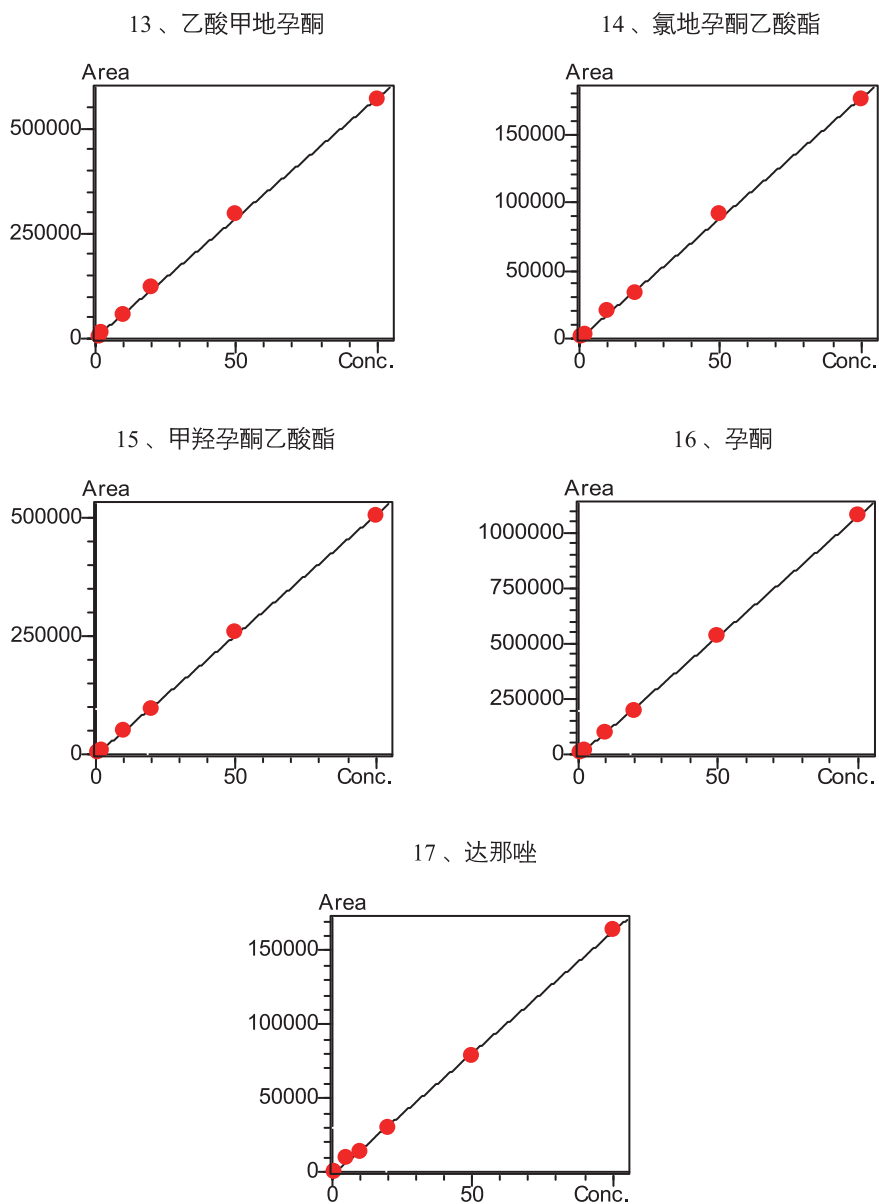


图 3 17 种激素的标准工作曲线

表 3 17 种激素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围($\mu\text{g/L}$)	相关系数(R)
1	去甲雄烯二酮	$Y = (4254.64)X + (1493.63)$	1~100	0.9999
2	群勃龙	$Y = (3379.96)X + (6893.91)$	2~100	0.9987
3	勃地酮	$Y = (11511.7)X + (12943.8)$	2~100	0.9998
4	氟甲睾酮	$Y = (1053.25)X + (632.811)$	2~100	0.9996
5	诺龙	$Y = (4550.24)X + (2929.70)$	1~100	0.9998
6	炔诺酮	$Y = (1992.13)X + (3128.01)$	2~100	0.9997
7	雄烯二酮	$Y = (8551.73)X + (-384.882)$	1~100	0.9998
8	美雄酮	$Y = (17580.0)X + (21981.1)$	2~100	0.9999
9	睾酮	$Y = (8203.99)X + (4305.48)$	1~100	0.9999
10	甲基炔诺酮	$Y = (2832.40)X + (-276.314)$	1~100	0.9997

11	甲睾酮	$Y = (8743.59)X + (3603.80)$	1~100	0.9999
12	甲羟孕酮	$Y = (6163.55)X + (3450.24)$	1~100	0.9999
13	乙酸甲地孕酮	$Y = (5674.36)X + (3494.83)$	1~100	0.9997
14	氯地孕酮乙酸酯	$Y = (1761.35)X + (153.117)$	0.5~100	0.9994
15	甲羟孕酮乙酸酯	$Y = (5053.94)X + (-1205.06)$	0.5~100	0.9998
16	孕酮	$Y = (10770.8)X + (-5643.77)$	1~100	0.9998
17	达那唑	$Y = (1640.93)X + (-1559.86)$	1~100	0.9997

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表4），平行测定6次，17种物质的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.063%~0.322%和0.555%~5.82%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	样品名称	RSD% 2 (μg/L)		RSD% 20 (μg/L)		RSD% 100 (μg/L)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	去甲雄烯二酮	0.135	5.23	0.178	3.83	0.115	2.70
2	群勃龙	0.096	5.35	0.227	2.94	0.085	1.23
3	勃地酮	0.230	4.53	0.187	2.57	0.118	1.37
4	氟甲睾酮	0.242	4.98	0.205	4.78	0.105	3.69
5	诺龙	0.192	3.27	0.186	2.89	0.120	2.52
6	炔诺酮	0.310	5.12	0.269	3.46	0.117	2.13
7	雄烯二酮	0.199	2.83	0.186	3.71	0.117	1.71
8	美雄酮	0.176	4.97	0.201	1.44	0.133	0.555
9	睾酮	0.212	4.98	0.222	3.05	0.115	1.00
10	甲基炔诺酮	0.322	5.82	0.205	4.13	0.105	1.93
11	甲睾酮	0.220	5.42	0.120	3.67	0.122	1.52
12	甲羟孕酮	0.273	5.32	0.250	3.17	0.095	2.36
13	乙酸甲地孕酮	0.167	4.85	0.104	3.02	0.068	1.99
14	氯地孕酮乙酸酯	0.282	5.66	0.136	4.09	0.063	1.44
15	甲羟孕酮乙酸酯	0.268	3.69	0.137	3.33	0.073	2.14
16	孕酮	0.243	5.13	0.169	3.28	0.081	1.61
17	达那唑	0.285	5.63	0.227	3.51	0.098	2.13

2.5 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度，配制浓度为2 μg/L的混合标准测试样品1份（见表5），平行进样7次，色谱图如图4所示。由7次进样测定的信噪比平均值，按照信噪比的3倍和10倍分别计算检出限和定量限。测定结果如表5所示。

表 5 17 种激素的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限 (μg/L)	定量限 (μg/L)
1	去甲雄烯二酮	30.7	0.20	0.67
2	群勃龙	48.7	0.12	0.40
3	勃地酮	65.1	0.09	0.31
4	氟甲睾酮	18.9	0.32	1.06
5	诺龙	27.6	0.22	0.72
6	炔诺酮	30.3	0.20	0.67
7	雄烯二酮	22.2	0.27	0.90
8	美雄酮	86.7	0.07	0.23
9	睾酮	56.3	0.11	0.37
10	甲基炔诺酮	19.8	0.30	1.00
11	甲睾酮	45.5	0.13	0.44
12	甲羟孕酮	58.1	0.10	0.35
13	乙酸甲地孕酮	261.3	0.023	0.08
14	氯地孕酮乙酸酯	200	0.03	0.10
15	甲羟孕酮乙酸酯	277	0.022	0.07
16	孕酮	19.3	0.31	1.03
17	达那唑	110.4	0.05	0.18

2.6 基质加标实验

图 5 为鱼肉基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图。往鱼肉基质中添加 17 种激素标样，加标 MRM 色谱图如图 6 所示。鱼肉中 17 种激素检测与加标回收率结果见表 6。

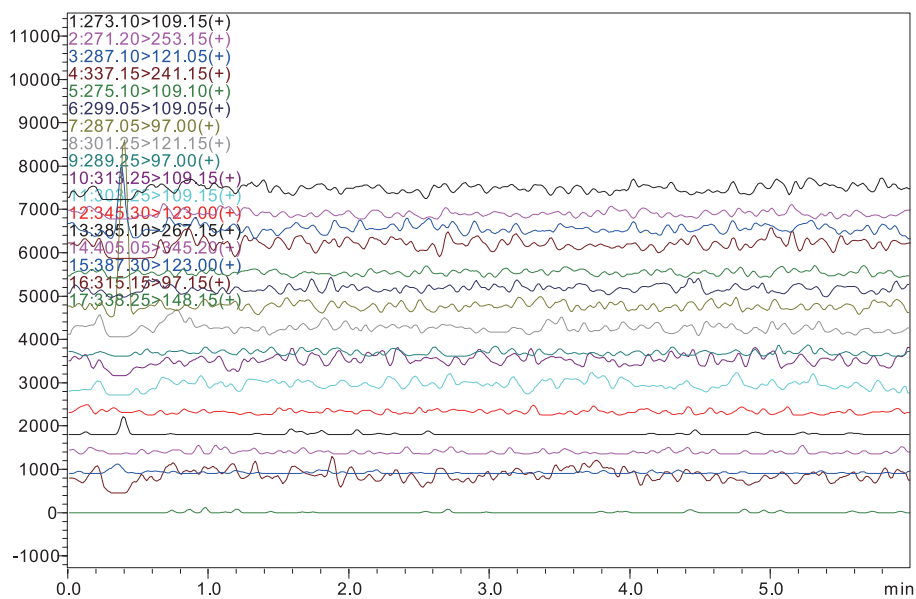


图 5 鱼肉基质的 MRM 色谱图

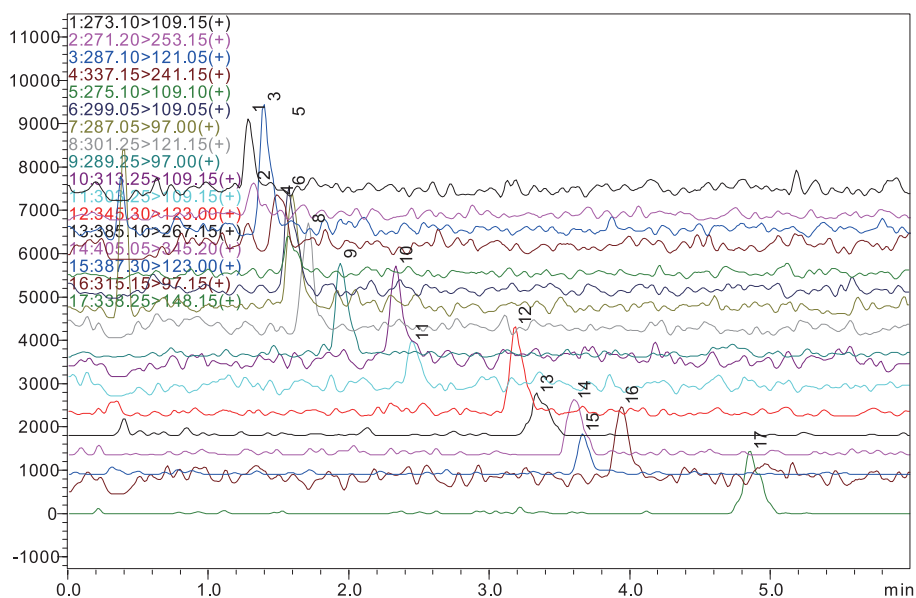


图6 鱼肉基质加标的MRM色谱图(加标浓度见表6)

峰归属: 1、去甲雄烯二酮; 2、群勃龙; 3、勃地酮; 4、氟甲睾酮; 5、诺龙; 6、雄烯二酮; 7、炔诺酮;
8、美雄酮; 9、睾酮; 10、甲基炔诺酮; 11、甲睾酮; 12、甲羟孕酮; 13、乙酸甲地孕酮;
14、氯地孕酮乙酸酯; 15、甲羟孕酮乙酸酯; 16、孕酮; 17、达那唑

表6 鱼肉中激素类药物检测与加标回收率结果

No.	名称	鱼肉检测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	鱼肉加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	去甲雄烯二酮	N.D.	0.4	0.424	106.0
2	群勃龙	N.D.	0.4	0.396	99.0
3	勃地酮	N.D.	0.4	0.372	93.0
4	氟甲睾酮	N.D.	2	2.27	113.5
5	诺龙	N.D.	0.4	0.424	106
6	雄烯二酮	N.D.	1	0.947	94.7
7	炔诺酮	N.D.	0.4	0.362	90.5
8	美雄酮	N.D.	0.4	0.380	95.0
9	睾酮	N.D.	0.4	0.320	80.0
10	甲基炔诺酮	N.D.	1	0.961	96.1
11	甲睾酮	N.D.	0.4	0.380	95.0
12	甲羟孕酮	N.D.	0.4	0.376	94.1
13	乙酸甲地孕酮	N.D.	0.4	0.458	114.5
14	氯地孕酮乙酸酯	N.D.	1	1.15	115
15	甲羟孕酮乙酸酯	N.D.	0.4	0.442	110.5
16	孕酮	N.D.	0.4	0.446	111.6
17	达那唑	N.D.	2	1.46	78.0

注: N.D.表示未检出

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定水产品中多种激素残留的分析方法。17 种激素线性范围宽，相关系数在 0.9987~0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.063%~0.322% 和 0.555%~5.82% 之间，仪器精密度良好。水产品基质加标回收率范围为 78.0%~115%。实验结果表明该方法灵敏度高，检出限低于国标 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》，可以满足水产品中激素类药物的检测需求。