

LC-MS/MS 检测鱼肉中的 27 种性激素残留

LCMSMS-794

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定鱼肉中 27 种性激素残留量的方法。性激素在 2.0 $\mu\text{g/L}$ ~100.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.997 以上。在高、中、低三个浓度下，化合物的保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.03%~0.32% 和 0.33%~9.85% 之间，仪器精密度良好。加标浓度为 2 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 的样品，85% 以上的化合物回收率在 60%~120% 之间且重复性良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于水产品中性激素残留量的准确定量检测。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 鱼肉 性激素

技术特点：

- ❖ 一针法可同时分析水产品中的雌激素、孕激素和雄激素
- ❖ 使用自动进样器的同时注入预处理功能配制基质匹配标准曲线。

性激素是性腺分泌的一类甾体激素，包括雌激素、孕激素和雄激素，激素类药物可促进动物生长、有利于蛋白质的积淀、增加产量。水产品饲养中使用促进其生长的性激素行为已经成为全球性的食品安全问题，长期使用添加性激素的水产品会造成内分泌失调、肝功能紊乱、胆结石等，甚至有致癌的风险。《中华人民共和国农业农村部公告 第 250 号》已将己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚、甲基睾酮、群勃龙等激素列入食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单。

为了保障人们的食品安全，农业农村部首次发布了《GB 31656.14-2022 食品安全国家标准 水产品中 27 种性激素残留量的测定》。样品中残留的性激素用乙酸乙酯 - 甲基叔丁基醚混合溶剂和乙酸乙酯依次提取，提取液经浓缩、 C_{18} 固相萃取柱净化，用液相色谱 - 串联质谱仪测定，内标法定量。本文参考标准，建立了鱼肉中 27 种性激素的检测方法，该方法快速、简单、灵敏，可实现对水产品中 27 种性激素的有效检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	自动进样器：	SIL-40C X3
输液泵：	LC-40B	质谱仪：	LCMS-8045
柱温箱：	CTO-40S	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机：	DGU-405		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：	Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm \times 2.1 mm I.D, 1.9 μm) 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-31012-05
流动相：	A 相 -0.02% 氨水, B 相 - 甲醇
柱温：	30 $^{\circ}\text{C}$
流速：	0.3 mL/min
进样体积：	5 μL
洗脱方式：	梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 55%, 时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	85
6.10	Pumps	Pump B Conc.	97
8.20	Pumps	Pump B Conc.	97
8.21	Pumps	Pump B Conc.	55
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：	ESI, 正负离子模式	DL 管 温 度：	200°C
接口电压：	1.0 kV	加热模块温度：	450°C
雾化气：	氮气 3.0 L/min	接 口 温 度：	350°C
干燥气：	氮气 10 L/min	扫 描 模 式：	多反应监测 (MRM)
加热气：	空气 10 L/min	MRM 参 数：	见表 2
碰撞气：	氩气 (230 kPa)		

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	内标物	分子式	CAS No.	分子量	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	己二烯雌酚	Dienestrol	己烯雌酚-D ₈	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	84-17-3	266.3	265.1	236.1*	10.0	18.0	24.0
								249.1	19.0	23.0	28.0
2	己烯雌酚	Diethylstilbestrol		C ₁₈ H ₂₀ O ₂	56-53-1	268.4	267.1	237.1*	18.0	28.0	25.0
								251.1	15.0	25.0	27.0
3	己烷雌酚	Hexestrol	雌酮-D ₂	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	84-16-2	270.4	269.1	134.1*	18.0	14.0	13.0
								119.1	18.0	37.0	22.0
4	雌酮	Estrone		C ₁₈ H ₂₂ O ₂	53-16-7	270.4	269.1	145.1*	16.0	38.0	27.0
								159.2	16.0	34.0	18.0
5	雌二醇	β-Estradiol		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	50-28-2	272.4	271.2	183.2*	20.0	42.0	19.0
								145.1	19.0	43.0	26.0
6	雌三醇	Estriol	雌二醇- ¹³ C ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	50-27-1	288.4	287.2	145.1*	20.0	43.0	25.0
								171.1	20.0	37.0	17.0
7	炔雌醇	Ethinyl Estradiol		C ₂₀ H ₂₄ O ₂	57-63-6	296.4	295.2	159.1*	19.0	38.0	29.0
								145.1	19.0	42.0	27.0
8	苯甲酸雌二醇	β-Estradiol 3-benzoate		C ₂₅ H ₂₈ O ₃	50-50-0	276.5	377.2	135.1*	-27.0	-16.0	-25.0
								105.1	-14.0	-21.0	-18.0
9	17-α羟基孕酮	17A-acetoxyprogesterone	甲羟孕酮-D ₃	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	302-23-8	372.5	373.2	109.1*	-14.0	-33.0	-19.0
								97.1	-25.0	-28.0	-18.0
10	21-α羟基孕酮	Desoxycorticosterone		C ₂₁ H ₃₀ O ₃	64-85-7	330.5	331.2	109.1*	-23.0	-26.0	-20.0
								97.1	-12.0	-25.0	-18.0

11	醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone Acetate		$C_{24}H_{34}O_4$	71-58-9	386.5	387.3	123.1*	-14.0	-29.0	-21.0
								327.3	-14.0	-13.0	-22.0
12	醋酸氯地孕酮	Chlormadinone Acetate		$C_{23}H_{29}ClO_4$	302-22-7	404.9	405.2	309.3*	-15.0	-16.0	-21.0
								301.2	-11.0	-22.0	-20.0
13	醋酸甲地孕酮	Megestrol Acetate	甲羟孕酮-D ₃	$C_{24}H_{32}O_4$	51154-23-5	384.5	385.3	267.2*	-14.0	-19.0	-18.0
								224.2	-14.0	-26.0	-23.0
14	左炔诺孕酮	Levonorgestre		$C_{21}H_{28}O_2$	797-63-7	312.5	313.2	109.1*	-11.0	-27.0	-18.0
								245.2	-12.0	-18.0	-27.0
15	甲羟孕酮	Medroxyprogesterone		$C_{22}H_{32}O_3$	520-85-4	344.5	345.3	97.1*	-13.0	-24.0	-17.0
								123.1	-13.0	-24.0	-22.0
16	诺龙	Nandrolone		$C_{18}H_{26}O_2$	434-22-0	274.4	275.2	257.2*	-20.0	-16.0	-17.0
								239.2	-20.0	-16.0	-25.0
17	苯丙酸诺龙	Nandrolone phenylpropionate	甲基睾酮-D ₃	$C_{27}H_{34}O_3$	62-90-8	406.6	407.2	257.2*	-15.0	-17.0	-17.0
								105.2	-15.0	-28.0	-19.0
18	睾酮	Testosterone		$C_{19}H_{28}O_2$	58-22-0	288.4	289.2	97.2*	-21.0	-23.0	-18.0
								109.1	-10.0	-26.0	-19.0
19	勃地酮	Boldenone		$C_{19}H_{26}O_2$	846-48-0	286.4	287.2	121.1*	-10.0	-22.0	-21.0
								135.2	-10.0	-15.0	-13.0
20	孕酮	Progesterone	孕酮-D ₉	$C_{21}H_{30}O_2$	57-83-0	314.5	315.2	109.1*	-12.0	-24.0	-21.0
								97.1	-11.0	-23.0	-17.0
21	群勃龙	Trenbolone	甲基睾酮-D ₃	$C_{18}H_{22}O_2$	10161-33-8	270.4	271.2	199.1*	-19.0	-23.0	-20.0
								253.2	-19.0	-20.0	-17.0
22	甲基睾酮	17-Methyltestosterone		$C_{20}H_{30}O_2$	58-18-4	302.5	303.2	109.1*	-12.0	-28.0	-20.0
								97.1	-11.0	-25.0	-17.0
23	雄烯二酮	Androstenedione	甲基睾酮-D ₃	$C_{19}H_{26}O_2$	63-05-8	286.4	287.2	109.1*	-20.0	-25.0	-19.0
								97.1	-10.0	-24.0	-18.0
24	美雄酮	Methandrosterone		$C_{20}H_{28}O_2$	72-63-9	300.4	301.2	149.2*	-12.0	-15.0	-28.0
								121.1	-12.0	-26.0	-21.0
25	炔诺酮	Norethindrone	甲羟孕酮-D ₃	$C_{20}H_{26}O_2$	68-22-4	298.4	299.2	231.2*	-20.0	-19.0	-15.0
								109.1	-11.0	-28.0	-19.0
26	康力龙	Stanozolol		$C_{21}H_{32}N_2O$	10418-03-8	328.5	329.3	121.1*	-12.0	-39.0	-21.0
								81.1	-12.0	-50.0	-29.0
27	丙酸睾酮	Testosterone propionate	甲基睾酮-D ₃	$C_{22}H_{32}O_3$	57-85-2	344.5	345.3	97.1*	-13.0	-23.0	-17.0
								109.1	-13.0	-30.0	-19.0
28	己烯雌酚-D ₈	Diethylstilbestrol-d ₈		$C_{18}H_{12}D_8O_2$	91318-10-4	276.4	275.2	259.4*	19.0	26.0	17.0
29	雌酮-D ₂	Estrone-d ₂		$C_{18}H_{20}D_2O_2$	56588-58-0	272.4	271.2	145.1*	19.0	40.0	27.0
30	雌二醇- ¹³ C ₂	Estradiol- ¹³ C ₂		$^{13}C_2C_{16}H_{24}O_2$	82938-05-4	274.4	273.2	147.1*	19.0	41.0	28.0

31	甲羟孕酮-D ₃	Medroxyprogesterone-d ₃	C ₂₄ H ₃₁ D ₃ O ₄	162462-69-3	347.5	348.3	126.2*	-13.0	-27.0	-22.0
32	孕酮-D ₉	Progesterone-d ₉	C ₂₁ H ₂₁ D ₉ O ₂	15775-74-3	323.5	324.3	100.2*	-12.0	-23.0	-18.0
33	左炔诺孕酮-D ₆	Levonorgestrel-d ₆	C ₂₁ H ₂₂ D ₆ O ₂	-	318.5	319.3	251.2*	-11.0	-18.0	-27.0
34	甲基睾酮-D ₃	Methyltestosterone-d ₃	C ₂₀ H ₂₇ D ₃ O ₂	96425-03-5	305.5	306.2	109.2*	-11.0	-27.0	-20.0

* 表示定量离子

■ 样品前处理和标准溶液配制

2.1 样品前处理

参考《GB 31656.14-2022 食品安全国家标准 水产品中 27 种性激素残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》中 8.1 和 8.2 样品提取与净化的方法。

2.2 标准溶液配制

准确量取各标准储备液（100 μg/mL）适量，用甲醇稀释成 A 组（己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、群勃龙、诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、21α- 羟基孕酮、17α- 羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲羟孕酮）浓度为 1 μg/mL；B 组（己烷雌酚、雌二醇、左炔诺孕酮、炔诺酮、苯甲酸雌二醇和康力龙）浓度为 2 μg/mL；C 组（雌三醇和炔雌醇）浓度为 4 μg/mL 的混合标准中间液。

准确量取内标储备液（100 μg/mL）适量，用甲醇稀释配制浓度为 1 μg/mL 的混合内标溶液。

■ 结果与讨论

3.1 27 种性激素标准溶液谱图

配制 2 ng/mL 的性激素混合标准溶液（以 A 组浓度计，内标浓度为 30 ng/mL），上机分析，得到 27 种性激素标准溶液的 MRM 色谱图，详见图 1，色谱峰形良好，通道无干扰。

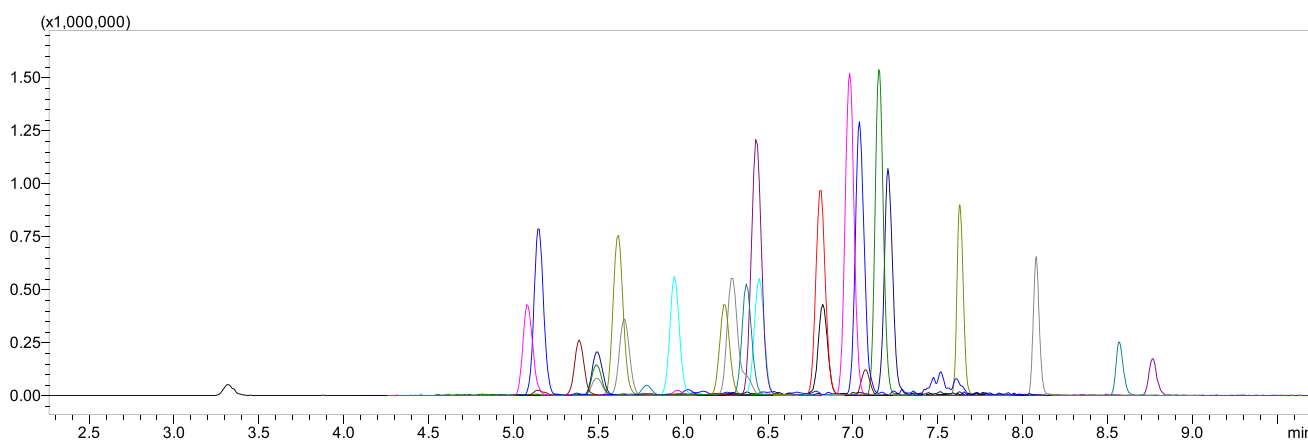


图 1 2 ng/mL 27 种性激素标液的 MRM 色谱图（以 A 组计，内标浓度为 30 ng/mL）

3.2 校准曲线和检出限

校准曲线分析采用自动进样器的同时注入预处理功能（Co-injection），进样时自动进样器先吸出 5 μL 经前处理的空白样品萃取液作为基质溶液，之后吸出等量 5 μL 的各浓度混合标准溶液（2、5、10、20、50 和 100 μg/L），同时注入两种溶液，供液相色谱 - 串联质谱测定，内标法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示（部分）。27 种性激素校准曲线及检测限、定量限的结果见表 3。

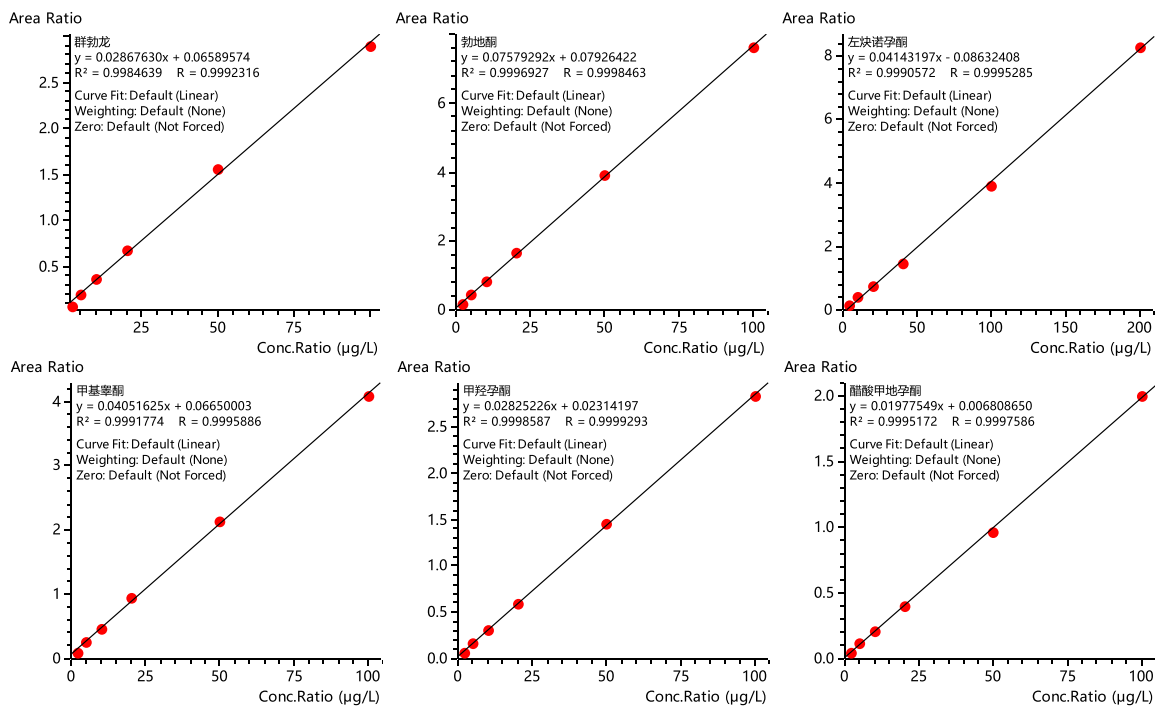


图 2 部分性激素的标准曲线

表 3 27 种性激素校准曲线及检测限、定量限

编号	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	群勃龙	$Y = (0.0286763)X + (0.0658957)$	0.9992	75.8~115.8	0.02	0.06
2	勃地酮	$Y = (0.0757929)X + (0.0792642)$	0.9998	81.5~109.8	0.07	0.21
3	雄烯二酮	$Y = (0.0581034)X + (0.116352)$	0.9992	78.9~109.6	0.05	0.15
4	诺龙	$Y = (0.0134754)X + (0.0125211)$	0.9994	84.5~107.2	0.35	1.07
5	炔诺酮	$Y = (0.0116608)X + (0.0199124)$	0.9987	82.6~120.5	0.41	1.25
6	美雄酮	$Y = (0.0757432)X + (0.215163)$	0.9979	71.5~113.6	0.03	0.10
7	21-a 羟基孕酮	$Y = (0.0200874)X + (0.0676297)$	0.9992	80.1~111.5	1.14	3.45
8	睾酮	$Y = (0.0610936)X + (0.105638)$	0.9990	80.2~110.2	0.06	0.17
9	左炔诺孕酮	$Y = (0.0414320)X + (-0.0863241)$	0.9995	90.6~111.0	0.93	2.83
10	17-a 羟基孕酮	$Y = (0.0146499)X + (0.0261651)$	0.9998	79.0~112.5	0.14	0.43
11	甲基睾酮	$Y = (0.0405162)X + (0.0665000)$	0.9996	80.6~108.6	0.07	0.21
12	甲羟孕酮	$Y = (0.0282523)X + (0.0231420)$	0.9999	85.7~106.8	0.26	0.78
13	醋酸甲地孕酮	$Y = (0.0197755)X + (0.00680865)$	0.9998	88.9~112.8	0.09	0.28
14	醋酸氯地孕酮	$Y = (0.0109172)X + (0.0108099)$	0.9999	79.2~110.6	0.23	0.69
15	醋酸甲羟孕酮	$Y = (0.0228917)X + (0.0140802)$	0.9999	86.7~115.1	0.10	0.29
16	孕酮	$Y = (0.0329618)X + (0.294889)$	0.9997	72.3~103.7	0.62	1.87
17	康力龙	$Y = (0.00787695)X + (0.0499746)$	0.9991	88.1~113.3	0.24	0.73
18	丙酸睾酮	$Y = (0.0124907)X + (0.00848029)$	0.9999	91.7~109.0	1.07	3.23
19	苯甲酸诺龙	$Y = (0.0718706)X + (-0.0108243)$	0.9998	79.3~114.0	0.03	0.09
20	苯甲酸雌二醇	$Y = (0.00318960)X + (-0.00164131)$	0.9996	94.2~113.2	0.36	1.10

21	雌三醇	$Y = (0.0130318)X + (-0.161255)$	0.9983	78.0~119.6	0.43	1.30
22	雌酮	$Y = (0.0246571)X + (0.0355047)$	0.9998	72.4~112.3	0.06	0.19
23	炔雌醇	$Y = (0.00987936)X + (0.0848164)$	0.9998	79.3~116.3	0.21	0.65
24	雌二醇	$Y = (0.0162429)X + (0.0666055)$	0.9997	74.3~114.2	0.18	0.53
25	己烯雌酚	$Y = (0.0644922)X + (-0.0526971)$	0.9997	86.1~113.0	0.04	0.12
26	己二烯雌酚	$Y = (0.0299950)X + (-0.0629520)$	0.9998	84.3~125.5	0.15	0.47
27	己烷雌酚	$Y = (0.112934)X + (0.211375)$	0.9994	79.6~124.8	0.01	0.02

3.3 重复性实验

取 2、20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 4。

表 4 27 种性激素保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物	RSD% (2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (20 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	群勃龙	0.07	2.66	0.06	1.16	0.13	0.72
2	勃地酮	0.07	2.41	0.05	1.26	0.13	0.56
3	雄烯二酮	0.07	3.13	0.05	1.09	0.10	0.69
4	诺龙	0.08	4.22	0.05	2.16	0.09	1.09
5	炔诺酮	0.07	3.87	0.05	1.22	0.10	0.61
6	美雄酮	0.05	2.03	0.05	1.39	0.08	1.69
7	21-a 羟基孕酮	0.06	2.84	0.05	1.78	0.09	0.33
8	睾酮	0.07	2.40	0.05	1.62	0.07	0.84
9	左炔诺孕酮	0.06	3.09	0.06	1.47	0.05	1.95
10	17-a 羟基孕酮	0.05	4.86	0.05	1.96	0.06	1.16
11	甲基睾酮	0.06	3.59	0.05	0.81	0.06	1.04
12	甲羟孕酮	0.05	2.75	0.05	1.86	0.05	0.83
13	醋酸甲地孕酮	0.06	3.18	0.04	1.52	0.05	2.13
14	醋酸氯地孕酮	0.05	4.04	0.04	1.76	0.05	1.11
15	醋酸甲羟孕酮	0.05	1.84	0.05	1.67	0.05	1.52
16	孕酮	0.06	1.65	0.04	1.25	0.04	1.00
17	康力龙	0.03	1.67	0.04	1.23	0.03	1.00
18	丙酸睾酮	0.04	2.01	0.04	0.93	0.05	1.76
19	苯甲酸诺龙	0.03	0.85	0.04	2.22	0.04	0.95
20	苯甲酸雌二醇	0.03	2.79	0.05	1.18	0.03	1.29
21	雌三醇	0.15	3.37	0.08	1.06	0.32	1.85
22	雌酮	0.05	7.68	0.05	3.60	0.06	1.37
23	炔雌醇	0.09	8.75	0.07	2.69	0.06	1.11
24	雌二醇	0.08	3.32	0.06	2.74	0.05	2.05
25	己烯雌酚	0.10	5.73	0.05	3.40	0.05	2.47
26	己二烯雌酚	0.09	9.84	0.06	3.05	0.05	2.21
27	己烷雌酚	0.04	4.76	0.05	3.10	0.05	1.89

3.4 加标回收率

取空白鱼肉 5 g，加入混标工作液，使加标浓度为 2 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （以 A 组化合物计），样品经提取及净化后，按照 1.2 中的分析条件测定各种性激素的加标回收率，实际样品分析同样采用自动进样器的同时注入预处理功能，吸取水：甲醇 = 15：85（v/v）溶液替代混合标准溶液，平行测定 3 次。即使在 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标浓度下，85% 以上的化合物回收率在 60%~120% 之间。具体加标回收率结果及相对标准偏差见图 3 所示。由结果可知，该方法灵敏度高，准确率高，可以满足 27 种性激素的快速检测。

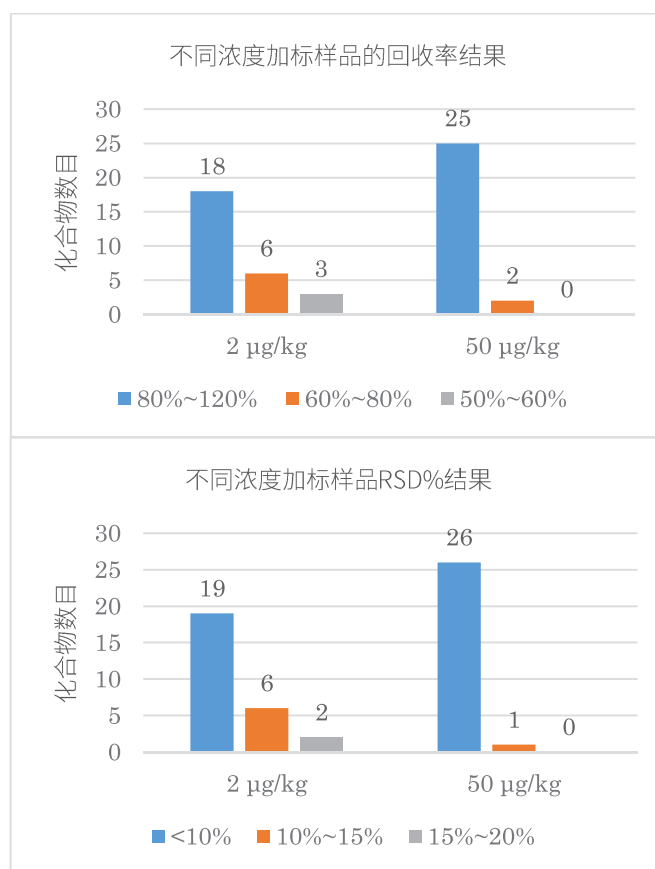


图 3 性激素的加标回收率及相对标准偏差结果

■ 结论

依据国家标准《GB 31656.14-2022 食品安全国家标准 水产品中 27 种性激素残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定鱼肉中性激素残留的方法。27 种性激素在 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.999 以上。在 2、20 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 三个浓度下，连续六针进样，化合物的保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.03%~0.32% 和 0.33%~9.85% 之间，仪器精密度高。加标浓度为 2 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品，85% 以上的化合物回收率在 60%~120% 之间且重复性良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于水产品中性激素残留量的准确检测。

岛津应用云

