

同位素稀释高压液相色谱-串联质谱法测定 鱼虾中丙酸睾酮残留量

田良良^{1,2}, 林洪^{1*}, 曹立民¹, 蔡友琼², 王建华³, 黄冬梅², 史永富²

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部水产品质量监督检验测试中心(上海), 上海 200090; 3. 山东出入境检验检疫局技术中心, 青岛 266002)

摘要: **目的** 采用高压液相色谱-串联质谱(high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)快速检测鱼虾等水产品中丙酸睾酮残留。**方法** 向捣碎匀浆后的样品中加入内标诺龙-D₃混匀后, 叔丁基甲醚超声提取, -80 °C冷冻 30 min 后 12000 r/min 离心净化。以 Eclipse Plus C₁₈ 为色谱分离柱, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 流速为 0.3 mL/min, 采用三重四极杆质谱在正离子模式下进行选择反应离子监测。**结果** 丙酸睾酮在 0.5~100 ng/mL 范围内呈线性关系, 相关系数为 0.9989; 方法定量限为 0.5 µg/kg。当添加水平为 0.5~10.0 µg/kg 时, 平均回收率为 71.2%~104.5%, 相对标准偏差为 2.26%~5.65%。**结论** 该方法操作简单、快速、灵敏度高, 适用于快速检测水产品中丙酸睾酮的残留量。

关键词: 丙酸睾酮; 鱼虾; 低温冷冻; 高速离心; 高压液相色谱-串联质谱

Determination of testosterone propionate residues in fish and shrimp by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution

TIAN Liang-Liang^{1,2}, LIN Hong^{1*}, CAO Li-Min¹, CAI You-Qiong², WANG Jian-Hua³, HUANG Dong-Mei², SHI Yong-Fu²

(1. College of Food Science and Engineering of Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Fishery Products Quality Inspection and Test Centre (Shanghai), Ministry of Agriculture of China, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
3. Shandong Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective A rapid, specific and highly sensitive method for the determination of testosterone propionate residue in fish and shrimp was developed using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Homogenized tissue samples which were added with nandrolone-D₃ were extracted by tert-butyl ether under ultrasonication and cleaned up with freezing and high-speed centrifugation. The target compounds were separated on Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3 µm) using acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min, and detected qualitatively and quantitatively in selected reaction monitoring(SRM) under positive mode. **Results** The linearity ranged from 0.5 to

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD28B05)

Fund: Supported by the National Science and Technology Support Program (2012BAD28B05)

*通讯作者: 林洪, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: linhong@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LIN Hong, Professor, College of Food Science and Engineering of Ocean University of China, No.5, Yushan Road, Shinan District, Qingdao 266003, China. E-mail: linhong@ouc.edu.cn

100 ng/mL and correlation coefficient was 0.9989. The limit of quantitation (LOQ) was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. At the spiked levels of 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the average recoveries ranged from 71.2% to 104.5%. The relative standard deviations were between 2.26% and 5.65%. **Conclusion** The method is simple, sensitive and accurate for detecting the testosterone propionate in aquatic products.

KEY WORDS: Qingdao; trimethylamine *N*-oxide (TMAO); aquatic products; ion chromatography

1 引言

丙酸睾酮(testosterone propionate)是由天然雄性激素睾酮酯化衍生合成的产物,其作为一种性激素和蛋白质同化激素^[1]被应用在水产养殖中,残留的丙酸睾酮通过食物链进入人体后会干扰体内自然激素的平衡,影响肝脏功能,致女性男性化和性早熟^[1]等,欧盟指令 95/22/EC 规定禁止使用雄性激素兽药,2006 年日本实施的《日本肯定列表制度》把丙酸睾酮划为“一律标准”物质,2002 年中国农业部 193 号公告和 2004 年中国农业部 824 号公告都规定禁用丙酸睾酮,因此,针对水产品中的丙酸睾酮残留建立一个简单快捷的检测方法进行监控是十分必要的。

国外关于丙酸睾酮残留的检测主要集中在血^[2]、毛发^[3,4]、水^[5]等基质,未见对水产品的报道。国内有关水产品中丙酸睾酮残留检测的报道共 2 篇,即张爱芝等^[6]采用 HPLC-MS/MS 测定脱脂大黄鱼及烤鱼片中丙酸睾酮,该方法主要针对脂肪含量少的样品,具有应用局限性;本实验室^[7]采用气相色谱-质谱法检测水产品中的丙酸睾酮,检测时需要衍生,方法比较复杂。为了建立一个适用于水产品的操作简单方便、灵敏度高的检测方法,本研究对采用高压液相色谱-串联质谱测定水产品中丙酸睾酮的样品前处理、净化、仪器分析条件进行了研究。

2 材料与方 法

2.1 仪器试剂与材料

液相色谱-串联质谱仪(Agilent 6430 Triple Quad LC/MS(QQQ)),配 ESI 离子源;色谱柱, Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 粒径 3.5 μm); Hei-Vap 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); 3K15 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); MTN-2800D 氮吹仪(北京华博仪器制造有限公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 电子分析天平(精度 0.1 g, TE601-2, 德国赛多利斯公司); 电子分析天平(精度 0.0001 g, BS-224-S, 德

国赛多利斯公司); 一次性无菌注射器(1 mL, 侯马市康福莱医疗器械医疗设备厂); 一次性有机系针头过滤器(尼龙, 0.22 μm , 天津市津腾实验设备有限公司)。丙酸睾酮(testosterone propionate, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 纯度 $\geq 97\%$; 诺龙-D₃ (nandrolone-D₃, 美国 Sigma 公司), 纯度 $\geq 97\%$; 叔丁基甲醚(色谱纯, 德国 CNW 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司)。

实验用凡纳滨对虾、蓝点马鲛购于山东省青岛市南山水产品市场; 市场抽检样品鲫鱼、鲤鱼、蓝点马鲛、刀额新对虾、南美白对虾购于上海市铜川水产批发市场。

2.2 标准溶液配制

用甲醇分别配制丙酸睾酮和诺龙-D₃ 标准储备溶液为 100 mg/L, -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光存放。临用前, 分别用甲醇稀释成一系列浓度梯度的丙酸睾酮标准工作溶液和 0.4 mg/L 的诺龙-D₃ 内标标准工作溶液。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理^[8]

鱼: 去鳞, 去皮, 取肌肉; 虾: 去头, 去壳, 去肠腺, 取肌肉部分。将肌肉组织用组织捣碎机捣碎并匀浆后, 于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。准确称取 5.00 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入 100 μL 诺龙-D₃ 内标标准工作溶液, 混匀, 加叔丁基甲醚 20 mL, 振荡提取 5 min, 超声 10 min, 振荡 5 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 8000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至 50 mL 梨形瓶, 再用 15 mL 叔丁基甲醚提取一次, 合并于梨形瓶, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至近干, 氮气吹干, 用 1 mL 乙腈-0.1% 甲酸水溶液(9:1, v/v)复溶, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 30 min^[9], 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12000 r/min 离心 8 min, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜入进样瓶, HPLC-MS/MS 测定。

2.3.2 标准工作曲线的制备

准确吸取一定量的丙酸睾酮标准溶液, 用乙腈-0.1% 甲酸水溶液(9:1, v/v)稀释, 配制成浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 丙酸睾酮标

准系列, 每个标准溶液中含 20 ng/mL 诺龙-D₃ 内标, HPLC-MS/MS 测定。

2.4 色谱和质谱条件

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 粒径 3.5 μm); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 流动相 A 为含 0.1%甲酸的水溶液, 流动相 B 为乙腈; 流动相线性梯度洗脱: 0~6 min, 由 50% A 线性降至 10% A; 6~8 min, 由 10% A 线性升至 50% A。

2.4.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测; 喷雾电压: 4500 V; 离子传输毛细管温度: 350 °C; 源内碰撞诱导解离电压: 10 V; 雾化气流速: 8 L/h; 辅助气流速: 1.7 L/h; 喷雾压力: 45 psi; 母离子、子离子和碰撞能量见表 1。

3 结果与讨论

3.1 质谱条件的优化

丙酸睾酮结构中有羰基, 羰基是多电子基团, 适合在 ESI 源的正模式下进行检测, 形成[M+H]⁺母离子。采用丙酸睾酮标准溶液进行质谱条件的优化, 先通过一级质谱母离子全扫描确定化合物的准分子离子, 在选择离子检测模式下优化适合丙酸睾酮的锥孔电压和碰撞电压使获得的目标物[M+H]⁺离子信号最大。然后在优化好的条件下, 对母离子进行碎片离子全扫描, 获得碎片离子信息, 选择丰度较高的两个特征子离子, 再优化碰撞能量使得特征子离子的信号最大, 从而获得了丙酸睾酮的两个 SRM 的离子及质谱参数, 见表 1。

3.2 流动相组成的选择

由于电喷雾离子化的电离过程是在溶液状态下进行的, 流动相所用溶剂的种类、组成和添加物不仅对目标化合物的色谱行为会产生影响, 还会对目标

化合物的离子化效率产生影响, 从而对检测灵敏度产生影响^[10,11]。通过查阅文献, 选择对比了甲醇-水(9:1, v/v)、乙腈-水(9:1, v/v)、甲醇-0.1%甲酸水溶液(9:1, v/v)、乙腈-0.1%甲酸水溶液(9:1, v/v)对丙酸睾酮的检测灵敏度, 结果发现乙腈-0.1%甲酸水溶液(9:1, v/v)的检测信号最高, 所以选用为乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相的组成。有文献报道^[10,12,13]雄性激素用甲醇作为流动相能够提供足够的质子, 有利于其质子化, 在正离子模式下可以得到较高的响应值; 雌性激素则用乙腈作为流动相有利于去质子化, 在负离子模式下其可以得到更高的响应值。但是通过实验测定发现对于丙酸睾酮用乙腈作为流动相的检测信号略高, 所以采用乙腈作为流动相。有文献^[10,13]报道在正模式下加入一定量的甲酸、乙酸、三氟乙酸等可以增加目标化合物的响应值, 但也有文献^[12]认为添加物与目标物混合后产生离子掩蔽抑制离子电离效率而产生负效果, 造成这种不一致结论的可能是添加物的量对于电离效率有很大影响, 本文实验发现在乙腈-0.1%甲酸溶液(9:1, v/v)时相对于乙腈-水(9:1, v/v)时产生正效果, 与第一种文献报道得出相同的结论。实验优化了色谱流动相洗脱梯度, 结果显示, 在 2.4.1 节条件下的效果最好, 图 1 为在该条件下获得的标准溶液和样品加标色谱图。

3.3 提取方法的确定

因为丙酸睾酮极性较小, 采用乙腈、甲醇等极性较大的溶剂进行提取时回收率相对较低, 且提取液中含有一定量的水, 浓缩时间较长; 正己烷、乙酸乙酯提取的脂类较多, 净化繁琐; 叔丁基甲醚作为提取溶剂回收率较高, 且含有的杂质相对较少, 所以选用其作为提取溶剂。

由于盐溶液对提取效果及净化有一定的影响, 所以考察了加入饱和氯化钠溶液、10%碳酸钠溶液、不加盐溶液三种提取方式的效果, 结果发现加入饱

表 1 丙酸睾酮和诺龙-D₃ 质谱条件

Table 1 MS parameters of testosterone propionate and nandrolone-D₃

化合物	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	保留时间/min	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
丙酸睾酮	345.3	96.8*, 109.1	8.8	109	22
				109	30
诺龙-D ₃	278.1	109.2*, 83.1	3.2	100	30
				100	30

*定量离子

和氯化钠溶液的提取液杂质较多,且存在干扰峰干扰目标物的定量定性测定;加入 10%碳酸钠溶液的提取液不存在干扰峰,但对回收率也无影响;不加盐溶液直接采用叔丁基甲醚提取的结果无杂质干扰且回收率可达到 80%以上,所以采用直接叔丁基甲醚提取的方法。

3.4 净化方法的优化

比较了中性氧化铝柱、硅胶柱^[7]和-80℃冷冻后

高速离心三种净化方法。结果见表 2。

综合以上不同方法的净化效果,选用-80℃冷冻后高速离心的方法作为净化方法。该方法既可以达到无杂峰干扰目标物的要求又可以简化前处理步骤。与其他净化方法相比,采用超低温冷冻后高速离心的净化方法在节省净化材料费用的同时,也明显缩短了前处理时间,简化了前处理程序,使得方法更简单便捷易操作。

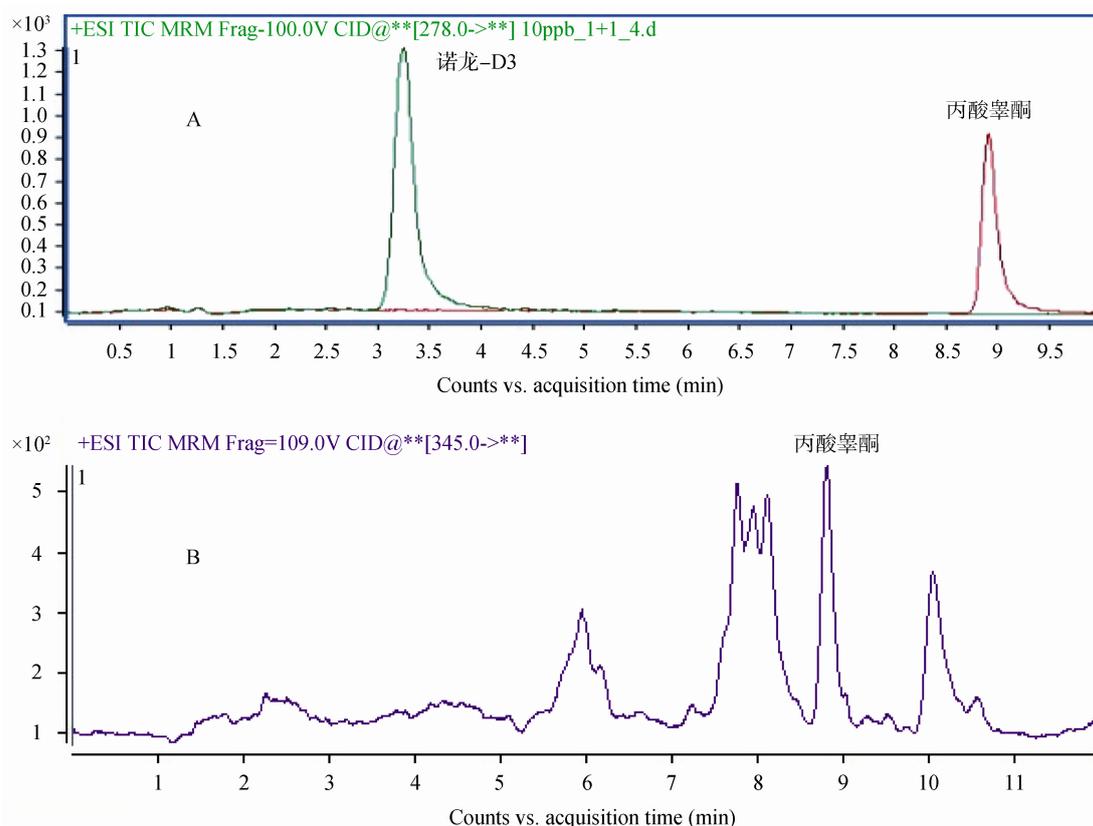


图 1 丙酸睾酮标准 SRM 色谱图(A)及加标蓝点马鲛样品 SRM 色谱图(B)

Fig. 1 HPLC-MS/MS SRM chromatograms of testosterone propionate standard (A) and a spiked blue point mackerel sample (B)

表 2 不同方法净化效果的比较

Table 2 Comparison of purifying effect with different methods

编号	净化方法	净化效果
1	中性氧化铝柱	存在杂峰干扰
2	硅胶柱	不存在杂峰干扰
3	-80℃冷冻后高速离心	不存在杂峰干扰,且比采用硅胶柱净化杂峰更少
4	-80℃冷冻高速离心与硅胶柱净化结合	不存在杂峰干扰,相比于仅采用-80℃冷冻后高速离心的净化效果,该方法并没有使杂峰减少

表 3 丙酸睾酮在鱼和虾肌肉组织中的回收率($n=6$)
Table 3 Recoveries of testosterone propionate in muscle tissue matrices of fishery and shrimp ($n=6$)

样品	添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
蓝点马鲛	0.5	0.482	96.5	5.48
	1	0.975	97.5	2.98
	2	1.86	93.0	3.71
	10	7.12	71.2	4.86
凡纳滨对虾	0.5	0.498	99.5	4.84
	1	0.891	89.1	3.85
	2	2.09	104.5	2.26
	10	7.56	75.6	5.65

3.5 方法学评价

基质效应是药物残留检测中普遍存在的现象, 本文采用空白蓝点马鲛和凡纳滨对虾基质标准溶液与溶剂标准溶液进行对比实验, 结果发现所测得的响应值几乎相同, 说明对于蓝点马鲛与凡纳滨对虾基本不存在基质效应, 为了消除在检测过程中不同鱼和虾基质差异的影响保持检测结果的稳定性, 采用内标法进行检测。本文标准曲线采用内标标准曲线法定量, 以丙酸睾酮定量离子峰面积与诺龙-D₃ 定量离子峰面积比值为纵坐标, 以丙酸睾酮浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 计算相关系数, 得到内标工作曲线方程。结果表明, 丙酸睾酮在 0.5~100 ng/mL 的范围内呈线性关系, 回归方程为 $Y=0.9964X-0.0356$, 相关系数 R^2 为 0.9989。

以空白样品加标, $S/N \geq 10$ 所对应的丙酸睾酮的浓度求得方法定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在空白鱼虾类肌肉组织基质(蓝点马鲛、凡纳滨对虾)中进行 4 个浓度水平 0.5、1、2、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加回收实验, 结果见表 3, 在此添加水平下平均回收率为 71.2%~104.5%, 相对标准偏差为 2.26%~5.65%, 说明此方法满足药物残留检测的要求。

3.6 样品分析

为考察本方法的适用性, 按上述实验方法对市售的鱼虾进行了抽检, 样品包括鲫鱼、鲤鱼、蓝点马鲛、刀额新对虾、南美白对虾。结果显示, 实验的鱼虾肌肉组织中均未检测出丙酸睾酮。

4 结 语

在以往有关水产品中丙酸睾酮检测的文献报

道^[6,7]中, 净化方法相对比较复杂, 要结合脱脂方法与 SPE 净化方法才可以满足检测要求, 成本较高; 而本方法采用低温冷冻和高速离心的方法进行净化即可达到检测要求, 方法简单、快速、便宜, 采用内标方法定量准确, 建立了适合于鱼和虾中丙酸睾酮残留量测定的高压液相色谱-串联质谱方法, 满足水产品中丙酸睾酮残留量测定的快速、定性、定量的要求。

参考文献

- [1] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
Li JS, Qiu YM, Wang C. Analysis of veterinary drug residue[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002.
- [2] Baba S, Fujioka M, Shinohara Y, *et al.* Determination of testosterone propionate in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr, 1985, (337): 205-212.
- [3] Boyer S, Garcia P, Popot MA, *et al.* Detection of testosterone propionate administration in horse hair samples[J]. J Chromatogr B, 2007, (852): 684-688.
- [4] Michel WF, Johan JP, Patrick PJ. Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2006, (830): 126-134.
- [5] Sun L, Liu Y, Chu XG, *et al.* Trace analysis of fifteen androgens in environmental waters by LC-ESI-MS-MS combined with solid-phase disk extraction cleanup [J]. Chromatogr, 2010, 71(5): 867-873.
- [6] 张爱芝, 王全林, 沈坚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼制品中残留的 7 种性激素[J]. 色谱 2010, 28(2): 190-196.
Zhang AZ, Wang QL, Sheng J, *et al.* Simultaneous determination of seven sex hormones in fish products using ultra-high perfor-

- mance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(2): 190–196.
- [7] 田良良, 曹立民, 王建华, 等. 水产品中丙酸睾酮激素的同位素稀释气相色谱-质谱法分析[J]. 中国渔业质量与标, 1(3): 55–61.
Tian LL, Cao LM, Wang JH, *et al.* Determination of testosterone propionate residues in fishery products by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chin Fish Qual Stan, 2011, 1(3): 55–61.
- [8] 田良良. 水产品中丙酸睾酮残留检测方法的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Tian LL. Studies on the determination of testosterone propionate residue in aquatic[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [9] Rossum HV. Analysis of a large number of anabolic compounds in animal tissues and urine by GC-MS/MS [Z]. SOP ARO/534 versie 1.
- [10] 张爱芝, 王全林. 超高效液相色谱-串联质谱多组分检测牛奶中外源性激素残留[J]. 食品科学, 2010, (6): 208–212.
Zhang AZ, Wang QL. Multi-component detection of exogenous hormone residues in milk using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Sci, 2010, 31(6): 208–212.
- [11] 陈慧华, 应永飞, 吴平谷, 等. 液相色谱-串联质谱同时测定动物组织中 22 种同化激素[J]. 分析化学研究报告, 2009, 37(2): 181–186.
Chen HH, Ying YF, Wu PG, *et al.* Multi-residue method for determination of 22 anabolic hormones in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2009, 37(2): 181–186.
- [12] Shao B, Zhao R, Meng J, *et al.* Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005, (548): 41–50.
- [13] 许婷婷, 戴军, 陈尚卫, 等. LC-MS/MS 法同时测定牛肉中 15 种同化激素类兽药残留[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 110–116.
Xu TT, Dai J, Chen SW, *et al.* Simultaneous determination of 15 anabolic hormones residues in beef by LC-MS/MS [J]. Food Fermn Ind, 2009, 35(8): 110–116.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



田良良, 硕士, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: liangliangjia@126.com



林洪, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: linhong@ouc.edu.cn