

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0152-06

羊肉中 10 种雄激素及同化激素残留量的测定

热孜万古力·赛买提,高旭东,乌拉木别克·对谢喀德尔,刘斯汝,陈士恩*

西北民族大学 生命科学与工程学院 兰州 730124

摘要:通过液相色谱-串联质谱法研究羊肉中 10 种雄激素及同化激素残留量,建立一个简单,快速的检测方法。用乙腈作为提取剂,运用 QuEChERS 技术萃取,添加净化粉净化,采用液相色谱-串联质谱法测定。通过色谱条件优化得到,最佳色谱条件为:以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱,流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 30°C ,进样量为 $5 \mu\text{L}$,10 种雄激素及同化激素峰形尖锐,灵敏度高。该方法的检出限为 $1 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$,定量限为 $100 \sim 300 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, R^2 大于 0.999,线性关系良好,平均回收率在 $51.68\% \sim 91.34\%$,RSD 均在 3% 以下。并用此方法对兰州屠宰场的羊肉进行测定,未检出这 10 种雄激素及同化激素,养殖过程中比较严格,此方法简单,快速,灵敏度高,能定量定性分析各种激素。

关键词:液相色谱-串联质谱法;羊肉;雄激素;同化激素**中图分类号:**TS251.7**文献标识码:**A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.022

Determination of Ten Androgens and Assimilation Hormones in Beef by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Reziwanguli SAIMAITI, GAO Xu-dong, Wulamubieke DUXIEKADEER, LIU Si-ru, CHEN Shi-en*

Northwest Minzu University, School of Life Sciences and Engineering, Lanzhou 730124, China

Abstract: A simple and rapid detection method was established by liquid chromatography-tandem mass spectrometry to study the residues of 10 androgen and assimilation hormones in mutton. Acetonitrile was used as the extractant, extracted by QuEChERS technique, purified by purification powder, and determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Optimized by chromatographic conditions, the best chromatographic conditions were: gradient elution with acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase, flow rate of $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column temperature of 30°C , injection volume of $5 \mu\text{L}$, 10 species The androgen and anabolic hormone peaks are sharp and sensitive. The detection limit of this method is $1 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, the limit of quantification is $100 \sim 300 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, R^2 is greater than 0.999, and the linear relationship is good. The average recovery is $51.36\% \sim 91.34\%$, and the RSD is below 3%. This method was used to measure the mutton of Lanzhou Slaughterhouse. The 10 kinds of androgen and assimilation hormones were not detected, indicating that the breeding process is strict, the method is simple, rapid, sensitive, and can quantitatively and qualitatively analyze various hormones.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mutton; androgen; anabolic hormone

近年来,人工合成的甾体激素运用在畜牧业看,其中,雄激素及同化激素运用比较广泛,科学家根据下丘脑-垂体-性腺轴的正负反馈对雌激素或雄激素生物制剂进行动物接种,促进卵泡的生长,从而提高繁殖效率^[1,2]。在临幊上发,雄激素和同化激素能治疗前列腺癌和蛋白质同化和吸收不足^[3,4]。同化

激素主要用于伤口愈合^[5]及老年骨质疏松等疾病,在治疗老年固执同化激素运用在动物育肥^[6],降低脂肪含量,促进蛋白质沉淀,提高饲料的利用率^[7],但滥用同化激素对人和动物健康,对社会和生态环境都会造成直接或潜在的危害^[8]。但是我国农业部我国农业部相关法律上明确规定,动物饲料中严禁添加蛋白同化激素类药物^[9,10],所以建立快速、简单、准确的分析肉中雄激素及同化激素的方法及其重要。

目前,我国定量分析激素的方法主要有免疫分析法^[11-14]、色谱法^[15-18]、毛细电泳法^[19,20]及 PCR

收稿日期:2018-07-27 接受日期:2018-11-02

基金项目:科技部援助项目资助(KY201501005);国家民委专项综合改革试点(10019141);甘肃省科技计划资助(17YF1WA166);西北民族大学“双一流引导专项”(10018704)

* 通信作者 E-mail:chshien@163.com

法^[21-23]等。其中液相色谱-串联质谱法运用比较广泛, 液相色谱-串联质谱法是目前比较常用的分析各种激素的分析仪, 具有灵敏度高, 杂质对分析结果的影响较小, 能有效的分离多种激素, 净化要求相对其他方法低^[24]。J. Stevens^[25]等用液相色谱-串联质谱法检测小鼠血浆中的瑞莫派特, 此方法快速、准确、回收率高。WANG^[26]等用 HPLC-MS/MS 同时检测血浆中的类固醇, 线性关系良好, 精密度和准确度较高。该方法分离出 10 种雄激素及同化激素, 快速、准确。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(1200, 美国安捷伦公司)、三重四级杆质谱(6410A, 美国安捷伦公司)、超纯水机(RM-220, 四川沃特尔水处理设备有限公司)、数控定时超声波清洗机(SQ1000D, 上海声彦超声波仪器有限公司)、微型台式真空泵(GL-802, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)等。

甲醇(纯度 98%)、乙腈(纯度 98%), 甲酸(纯度 98%)、PSA(25 g, 美国安捷伦公司)。

睾酮、群勃龙、勃地龙、甲基睾酮、醋酸群勃龙、诺龙、丙酸诺龙、丙酸睾酮(纯度大于 98%, Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)、美雄酮(纯度 99%, LGC GmbH 公司)、苯丙酸诺龙(纯度 99.5%, 中国食品药品检定研究院)。其中睾酮和丙酸睾酮为雄激素, 其余为同化激素。

1.2 样品的处理

样品常温下解冻后取适量去骨剪碎放入匀浆瓶, 10000 rpm 条件下匀浆 10 min。50 mL 离心管中加入 5.0 g 样品和 8.00 mL 超纯水, 采用混匀仪涡旋 1 min 后加入 15.00 mL 乙腈, 再次涡旋 2 min 后加 5.00 g QuEChERS 盐析剂。涡旋 1 min 后冰水浴冷却, 4 000 rpm 条件下离心 10 min, 取上清, 待净化。

在上清液中加入 QuEChERS, 涡旋 1 min 后离心 5 min(4 000 rpm)。取 5.00 mL 上清液于具塞试管中, 45 °C 水浴条件下氮吹浓缩至近干后加入乙腈-水溶液(3:7)复溶, 超声 30 s、涡旋 1 min 后过 0.22 μm 滤膜。

1.3 分析条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm × 2.1

mm × 3.5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水-乙腈; 流速: 0.25 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 梯度洗脱条件见表 2。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The process of gradient elution

时间 Time	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0.0	55	45
3.0	55	45
6.0	85	15
8.0	88	12
13.0	92	8
14.0	92	8
15.0	30	70
18.0	30	70
18.5	55	45

1.3.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(ESI); 扫描方式为正离子模式; 检测模式为多反应监测模式(MRM)。

1.4 样品的检测

在兰州不同地区的屠宰场采集了 30 份羊肉, 选择的部位为背部肌肉, 采用上述方法进行处理并检测, 计算肉中 10 种雄激素与同化激素的检出率。

2 结果与讨论

2.1 10 种雄激素及同化激素的色谱图

按上述色谱及质谱条件进行测定混标溶液, 20 min 内完成分离, 分离度良好, 色谱图见图 1。

2.2 线性关系、定量限与检出限

配置 1、5、10、20、50、100、300 ng · mL⁻¹ 的标准工作液, 横坐标为浓度, 纵坐标为定量分析的峰面积, 绘制标准曲线, 结果表明, 10 种激素在 1 ~ 300 ng · mL⁻¹ 线性关系良好, 相关系数在 0.999 1 ~ 0.999 8, 检出限为 1 ng · kg⁻¹, 定量限 100 ~ 300 ng · kg⁻¹, 线性关系及 RSD 见表 2。

2.3 精密度与加标回收率

配置 1、5、10 ng · kg⁻¹ 三种浓度的 10 种雄激素及同化激素的混合标准溶液进行加标回收率实验, 每个添加水平重复三次。结果表明, 10 种雄激素及同化激素的平均回收率在 51.68% ~ 91.34%, RSD 均小于 3%, 回收率和精密度良好, 满足正常检测要求, 回收率和精密度见表 3。

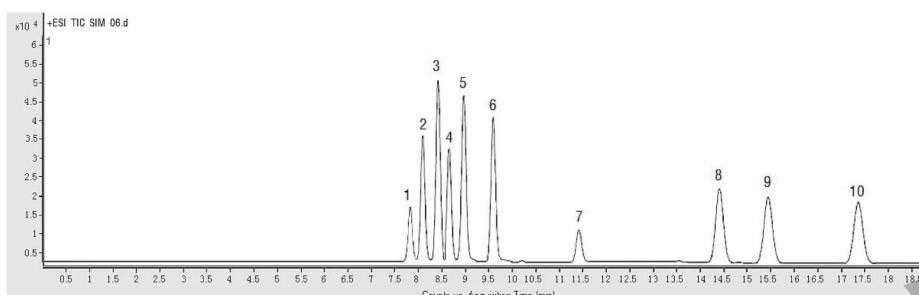


图 1 10 种雄激素及同化激素的液相色谱-串联质谱图

Fig. 1 Liquid chromatography tandem mass spectrometry of 10 kinds of androgens and anabolic steroids

表 2 10 种雄激素及同化激素的相关系数、检出限、定量限

Table 2 Correlation coefficient of 10 kinds of androgen and anabolic hormone, detection limit and limit of quantification

激素名称 Hormone name	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (ng · mL ⁻¹)	检出限 Limit of detection (ng · kg ⁻¹)	定量限 Limit of quantitation (ng · kg ⁻¹)
睾酮 Testosterone	$y = 321.07x + 351.25$	0.9993	1 ~ 300	1	150
群勃龙 Ternbolone	$y = 165.87x - 60.443$	0.9991	1 ~ 300	1	300
勃地龙 Boldenone	$y = 164.48x + 52.005$	0.9997	1 ~ 300	1	150
甲基睾酮 Methyltestosterone	$y = 180.65x + 182.92$	0.9996	1 ~ 300	1	150
醋酸群勃龙 Acetic acid ternbolone	$y = 166.54x + 131.60$	0.9997	1 ~ 300	1	300
诺龙 Nandrolone	$y = 187.02x + 22.246$	0.9996	1 ~ 300	1	100
丙酸诺龙 Propionic acid nandrolone	$y = 359.54x - 170.68$	0.9991	1 ~ 300	1	200
丙酸睾酮 Propionic acid testosterone	$y = 128.47x + 8.5719$	0.9998	1 ~ 300	1	200
美雄酮 Methandienone	$y = 137.24x - 52.459$	0.9991	1 ~ 300	1	200
苯丙酸诺龙 Durabolin	$y = 366.80x + 185.10$	0.9996	1 ~ 300	1	250

表 3 10 种雄激素及同化激素的加标回收率

Table 3 The recoveries of 10 kinds of androgens and anabolic steroids

激素名称 Hormone name	添加水平 Add level ng · kg ⁻¹	回收率 Recovery rate(%) (n=6)						平均回收率 average recovery rate(%)	RSD(%)
		1	2	3	4	5	6		
睾酮 Testosterone	1	51.95	51.6	52.35	54.61	53.89	56.08	53.41	0.97
	5	72.87	74.24	73.71	74.12	75.88	71.79	73.77	1.57
群勃龙 Ternbolone	1	55.67	57.05	58.17	55.39	55.16	56.18	56.27	1.91
	5	73.23	73.56	74.11	73.69	73.81	72.09	73.42	1.21
勃地龙 Boldenone	10	77.12	76.21	76.78	77.31	74.03	75.94	76.23	2.49
	1	53.65	53.12	53.62	52.98	53.89	51.98	53.21	0.78
甲基睾酮 Methyltestosterone	5	71.08	67.98	69.36	68.58	71.25	70.16	69.74	1.92
	10	78.75	79.53	77.89	79.03	77.05	79.35	78.60	1.20
	1	51.17	52.26	52.61	50.98	51.21	54.38	52.10	0.73
	5	56.69	57.12	57.36	57.98	57.21	57.64	57.33	1.33

续表 3(Continued Tab. 3)

激素名称 Hormone name	添加水平 Add level $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$	回收率 Recovery rate(%) ($n=6$)						平均回收率 average recovery rate(%)	RSD(%)
		1	2	3	4	5	6		
醋酸群勃龙 Acetic acid termbolone	10	71.01	68.49	69.02	67.22	67.99	69.58	68.89	0.82
	1	54.11	53.87	52.88	52.38	53.47	53.24	53.33	1.06
	5	71.08	70.64	69.65	70.21	70.12	69.93	70.27	0.98
诺龙 Nandrolone	10	90.01	87.98	88.65	87.14	90.01	89.63	88.90	0.98
	1	52.64	52.03	51.89	52.06	52.33	53.02	52.33	0.78
	5	66.84	67.23	68.45	67.21	66.32	66.91	67.16	0.72
丙酸诺龙 Propionic acid nandrolone	10	85.21	85.15	83.98	84.26	83.12	83.65	84.23	0.99
	1	54.04	52.92	53.26	52.68	53.84	53.37	53.35	1.62
	5	71.25	70.81	70.65	71.12	69.81	70.21	70.64	0.86
丙酸睾酮 Propionic acid testosterone	10	79.58	77.92	78.62	78.91	79.21	78.69	78.82	1.94
	1	55.96	56.48	55.65	57.21	56.78	56.31	56.40	1.48
	5	71.45	69.68	71.45	72.32	69.92	69.61	70.74	0.65
美雄酮 Methandienone	10	81.85	81.65	79.96	81.23	81.46	81.75	81.32	1.57
	1	52.12	51.21	50.23	52.41	51.12	52.96	51.68	0.83
	5	66.53	66.45	67.23	67.48	69.08	68.11	67.48	1.10
苯丙酸诺龙 Durabolin	10	75.85	76.51	76.38	75.81	77.16	76.37	76.35	0.97
	1	57.96	56.98	56.75	58.49	56.45	56.21	57.14	1.57
	5	74.36	75.05	75.61	73.78	74.69	74.52	74.67	1.30
	10	91.78	90.69	91.56	92.75	89.82	91.56	91.36	1.91

2.4 30 份样品的检测

按上述色谱及质谱条件对 30 份样品进行检测发现, 未检出这 10 种雄激素及同化激素。

3 讨论

液相色谱-串联质谱法是目前比较常用的分析激素的方法, 此方法灵敏度高。选用不同的流动相进行比较, 发现水-甲醇为流动相的分离度较差, 出现拖尾现象, 流动相为水-乙腈 10 种激素有效分离, 但峰形不对称, 在基础上添加 0.1% 甲酸, 发现分离度良好, 改善了拖尾现象^[27]。

经过对流速进行分析, $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时的出峰时间相对于 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 早, 待测物出峰时间有所提前, 分离度小于 1.5。流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 10 种激素之间分离效果相对于 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 好, 峰形对称, 拖尾现象不明显^[28], 综上所述, 最终选择流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

柱温对样品出峰影响较大, 温度太低, 分离度较差, 温度太高, 会出现基线漂移的现象, 不能很好的

分离, 所以进行温度筛选^[29], 研究发现, 25 、 30 、 35 °C, 色谱峰都能分离, 但是分离时间有所不同, 30 、 35 °C 的出峰时间早于 25 °C。比较 30 、 35 °C 的峰高, 发现 30 °C 的峰值高于 35 °C, 所以选择柱温为 30 °C。

按上述方法对 30 份肉样进行测定发现未检出上述 10 种雄激素及同化激素, 说明养殖过程中未使用这 10 种激素, 比较严格, 符合标准。

4 结论

用液相色谱-串联质谱法检测羊肉中的 10 种雄激素与同化激素, 样品处理方法简单, 能够有效地检测 10 种激素, 样品的平均回收率在 51.36% ~ 91.34% 之间, RSD 低于 3% , 定量限为 100 ~ $300 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, 达到了检测标准, 并且对柱温, 流速, 流动相进行分析, 最终选择柱温为 30 °C, 流动相为 0.1% 甲酸水-乙腈, 流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。并且对兰州市 30 份肉样进行测定, 未检出上述 10 种雄激素及同化激素。该方法简单、快速、准确、灵敏度高等特点, 适用于多种激素的检测, 为实际样品你的检测提

供了检测依据。

参考文献

- 1 Corbin JM, Ruiz-Echevarría MJ. One-carbon metabolism in prostate cancer: The role of androgen signaling [J]. *Int J Mole Sci*, 2016, 17:1208.
- 2 Zhang XN, Yang YF, Chang T, et al. The role of estrogen and/or androgen in the follicle development and its application [J]. *Spe Wild Eco Ani & Plant Res*, 2017, 3:50-54.
- 3 Riis PT, Ring HC, Themstrup L, et al. The role of androgens and estrogens in hidradenitis suppurativa-A systematic review [J]. *Act Der Cro Ade*, 2016, 24:239.
- 4 Sanchez C, Chan R, Bajgain P, et al. Combining T-cell immunotherapy and anti-androgen therapy for prostate cancer [J]. *Pro Can Pro Dis*, 2013, 16:123-131.
- 5 Demling RH. The role of anabolic hormones for wound healing in catabolic states [J]. *J Burn & Wou*, 2005, 4(4):e2.
- 6 Woz'Niak B. Steroid hormones-properties, application, residues in food of animal origin [J]. *Med Wet*, 2010, 66:177-181.
- 7 Baudet ML, Rattray D, Sanders EJ, et al. Growth hormone: a survival agent in the developing chick retina [J]. *Gro Hor IGF Res*, 2004, 14:105-107.
- 8 Riedmaier I, Pfaffl MW, Meyer HH. The analysis of the transcriptome as a new approach for biomarker development to trace the abuse of anabolic steroid hormones [J]. *Drug Test & Ana*, 2011, 3:676-681.
- 9 Announcement No. 235 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China on the Maximum Residue Limits of Veterinary Drugs in Animal Foods [S]. China: The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2002.
- 10 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China No. 176, Catalogue of Drugs Prohibited for Use in Feed and Animal Drinking Water [S]. China: The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2002.
- 11 Li LY, Guo ZX, Wang Y, et al. Clinical value of chemiluminescence immunoassay in detection of thyroid hormone and antibody [J]. *Wor Lat Med Inf*, 2016, 9:110-111.
- 12 Stephen L, Guest PC. Multiplex immunoassay profiling of hormones involved in metabolic regulation [J]. *Met Mole Bio*, 2018, 1735:449.
- 13 Metcalfe SS, Kroon FJ, Beale DJ, et al. Development of a validation protocol of enzyme immunoassay kits used for the analysis of steroid hormones in fish plasma [J]. *J Exp Mar Bio & Eco*, 2018, 12:499.
- 14 Choi S, Hwang J, Lee S, et al. Quantitative analysis of thyroid-stimulating hormone (TSH) using SERS-based lateral flow immunoassay [J]. *Sen & Act B Che*, 2017, 240:358-364.
- 15 Gao XD, Shi YQ, Chen SE, et al. Simultaneous determination of jasminoidin, baicalin, berberine hydrochloride and emodin in Zhizi Jinhua pills by dual wavelength HPLC [J]. *J Int Pha ceu Res*, 2015, 29:27-33.
- 16 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]. *Ana Chi Acta*, 2005, 548(1-2):41-50.
- 17 Seo JG, Kim HY, Chung BC, et al. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chro A*, 2005, 1067:303-309.
- 18 Cao BY, Gong CX, Wu D, et al. Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry-based characterization of steroid hormone profiles in healthy 6 to 14-year-old male children [J]. *Chi Med J*, 2018, 131:862.
- 19 Veeranagamallaiah G, Sudhakar C. Determination of polyamines by dansylation, benzoylation, and capillary electrophoresis [J]. *Met Mol Bio*, 2017, 1631:313-323.
- 20 Kaneta, T. Determination of polyamines by capillary electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate as a derivatizing reagent [J]. *Ana Met*, 2018, 1694(11):61.
- 21 Dang Y, Wang F, Liu C. Real-time PCR array to study the effects of chemicals on the growth hormone/insulin-like growth factors (GH/IGFs) axis of zebrafish embryos/larvae [J]. *Chemos*, 2018, 207:365-376.
- 22 Cucuzza LS, Biolatti B, Divari S, et al. Development and application of a screening method of absolute quantitative PCR to detect the abuse of sex steroid hormone administration in male bovines [J]. *J Agric & F Chem*, 2017, 65:4866-4874.
- 23 Moulana FI, Priyani A, De MS, et al. BRAF-oncogene-induced senescence and the role of thyroid-stimulating hormone signaling in the progression of papillary thyroid carcinoma [J]. *Hor Can*, 2018, 9(1):1-11.
- 24 Gong XM, Ren YP, Dong J, et al. Determination of 18 mycotoxin contaminants in peanuts and oils by gel permeation chromatography and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Inst Ana*, 2011, 30(1):6-12.
- 25 Stevens J, Dj VDB, De RS, et al. Online solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to analyze remoxipride in small plasma-, brain homogenate-, and brain microdialysate samples [J]. *J Chro B AnaTec Bio Life Sci*, 2017, 878:969-975.