

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2011.01.010

高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 玉米赤霉醇类激素药物残留量

钱卓真^{1,3}, 刘智禹¹, 邓武剑², 魏博娟²

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021;
3. 厦门大学材料学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 文章建立用高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 测定水产品中玉米赤霉醇类激素药物残留量的方法。用乙腈提取水产品中6种玉米赤霉醇类药物, 正己烷脱脂, 氨基固相萃取柱净化。采用电喷雾电离, 负离子扫描, 选择反应监测模式 (SRM) 监测, 外标法定量。该法对6种玉米赤霉醇类药物标准曲线的线性回归系数均在0.99以上, 线性范围 $0 \sim 25 \mu\text{g kg}^{-1}$, 方法定量限 $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ 。6种玉米赤霉醇类激素药物回收率 75.9% ~ 103.8%, 相对标准偏差 3.90% ~ 13.5%。该法简单、灵敏, 结果可靠, 可满足实验室批量样品分析的需求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 玉米赤霉醇; 水产品; 残留

中图分类号: TS 207.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2011)01-0062-07

HPLC-MS/MS determination of zearanol residues in aquatic products

QIAN Zhuozhen^{1,3}, LIU Zhiyu¹, DENG Wujian², WEI Bojuan²

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China; 2. Biological Engineering College, Jinji University, Xiamen 361021, China; 3. College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract We developed a method for determining zearanol residues such as α -zearanol, β -zearanol, α -zearelenol, β -zearelenol, zearalanone and zearelenone by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The samples were extracted with acetonitrile, degreased with hexane and purified with an ino solid-phase extraction column. In addition, with electrospray ionization in negative mode, we monitored the samples with selected reaction monitoring (SRM) and quantified them with external standard method. For the 6 zearanols, it shows good linear regression coefficient in the standard curve (all > 0.99); the linear range is $0 \sim 25 \mu\text{g kg}^{-1}$; the limit of detection is $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$; the average recovery is 75.9% ~ 103.8%, and the relative standard deviation is 3.90% ~ 13.5%. The method, which is simple, sensitive and reliable, can be used to identify and quantify zearanol residues in aquatic products.

Key words high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); zearanols; aquatic products; residues

玉米赤霉醇 (zearanol) 和玉米赤霉烯醇 (zearelenol) 属于玉米赤霉菌素, 是玉米赤霉菌中

二羟苯甲酸内酯的衍生物, 为玉米赤霉菌在生长过程中产生的次生代谢产物——玉米赤霉烯酮

收稿日期: 2010-03-23 修回日期: 2010-04-14

资助项目: 福建省海洋渔业局项目“2008年制修订省地方标准渔业计划项目”

作者简介: 钱卓真 (1981-), 女, 助理研究员, 博士研究生, 从事水产品中兽药、农药残留、有毒有害物质检测方法及标准的开发。

E-mail: qianzhuozhen@126.com

(zearalenone) 的还原产物, 属于雷索酸内酯类非甾体类同化激素^[1], 是具有雌激素的合成激素。玉米赤霉醇曾作为生长促进剂应用于动物生长, 具有促进蛋白质合成、提高饲料转化率的作用。随着人们对同化激素的深入认识, 动物性食品中同化激素残留的安全性问题引起人们广泛关注, 近年来许多研究机构开始对玉米赤霉醇的危害进行研究。研究发现, 玉米赤霉醇在动物组织中的残留会影响人类健康, 轻则引起人体性机能紊乱, 重则影响第二性征的正常发育, 在外部条件诱导下, 这类物质可能致癌^[2]。此类药物排出动物体外后, 还可经饮水和食物造成二次污染及环境污染^[3]。欧盟于 1998 年明确禁止将玉米赤霉醇、己烯雌酚等激素类药物应用于畜禽养殖。2002 年国家农业部也明确规定玉米赤霉醇类激素药物禁止用于所有食品动物, 在所有食用组织不得检出。

目前, 玉米赤霉醇残留量的测定方法有薄层色谱法 (TLC)^[4-5]、酶联免疫法 (ELISA)^[6]、气相色谱-质谱法 (GC-MS)^[7-8] 和高效液相色谱法 (HPLC)^[9-11] 等。TLC 法成本低, 但灵敏度和选择性不高; ELISA 法虽然灵敏度很高, 但由于其有交叉反应特性, 相对而言选择性较差; GC-MS 法灵敏度和选择性均好, 但需要衍生化, 操作繁琐费时; HPLC 法虽可直接测定, 但选择性较差, 通常不能予以定性确证^[11]。该研究采用高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS), 通过 MS/MS 的选择反应检测模式 (SRM) 克服背景干扰, 显著提高信噪比, 建立了水产品中玉米赤霉醇类激素药物残留量测定的分析方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

α -玉米赤霉醇 (α -zearalanol), β -玉米赤霉醇 (β -zearalanol), α -玉米赤霉烯醇 (α -zearalenol), β -玉米赤霉烯醇 (β -zearalenol), 玉米赤霉酮 (zearalanone) 和玉米赤霉烯酮 (zearalenone) 购自 Sigma 公司 (纯度 > 99%)。乙腈、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、乙醚和甲酸均为色谱纯; 无水硫酸钠为化学纯; 氨基固相萃取柱 (500 mg 3 mL); 水为 Milli-Q 制备的超纯水。

Accela TSQ Quantum Access 液相色谱串联四级杆质谱联用仪 (美国 Thermo Fisher 公司出品);

SHA-BA 水浴恒温振荡器型 (常州国华电器有限公司出品); MS2 型旋涡混合器 (德国 KA 公司出品); 旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司出品); 氮吹仪 (广州智真生物科技有限公司出品); PL203 型电子分析天平、AB204-E 型电子分析天平 (Mettler Toledo 公司出品)。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 储备液 准确称取适量 α -玉米赤霉醇, β -玉米赤霉醇, α -玉米赤霉烯醇, β -玉米赤霉烯醇, 玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮标准品, 用色谱纯甲醇溶液定容于 50 mL 棕色容量瓶中, 溶液质量浓度为 $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, -18°C 下避光保存, 有效期为 12 个月。

1.2.2 混合标准储备液 分别准确吸取 1.0 mL 的 α -玉米赤霉醇, β -玉米赤霉醇, α -玉米赤霉烯醇, β -玉米赤霉烯醇, 玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮标准储备液至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释定容, 溶液质量浓度为 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, -18°C 下避光保存, 有效期为 6 个月。

1.2.3 混合标准工作液 根据检测要求, 用乙腈-水溶液 [$V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 20 : 80$], 稀释成相应的标准工作液, 以各组分的色谱峰面积对浓度作线性回归, 得定量标准曲线。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Thermo Scientific Hypersil GOLD ($2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 柱温为 35°C ; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈体系 (梯度洗脱程序见表 1), 流速 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

1.4 质谱条件

电喷雾离子源, 负离子检测模式, 喷雾电压 3500 V , 壳气压力 40 units , 辅气压力 8 units , 离子传输毛细管温度 350°C , 源内碰撞诱导解离电压 10 V , 选择反应监测 (SRM), 母离子、子离子和碰撞能量见表 2, $Q1$ 半峰宽 0.7 Da , $Q3$ 半峰宽 0.7 Da , 碰撞气压力为氩气 1.0 mTorr 。

1.5 样品前处理

称取均匀样品约 5 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 塑料离心管, 加入 3 g 无水硫酸钠, 涡旋振荡 20 s 后, 加入 15 mL 乙腈, 涡旋振荡 1 min , $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上层清液至另一离心管中。再加入 15 mL 乙腈重复提取 1 次, 合并 2 次提取液。在提取液中加入 15 mL 乙腈饱和正己烷, 剧烈

表 1 HPLC流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 HPLC mobile phase gradients

时间 /min time	0.1% 甲酸水溶液 0.1% formic acid in water	w(乙腈) % acetonitrile	流速 / $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ flow rate
0	70	30	250
5	70	30	250
8	10	90	250
12	10	90	250
12.1	70	30	250
14	70	30	250

表 2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

Tab. 2 Optimization parameters of SRM of the analytes

化合物 compounds	母离子 / (m/z) parent ion	子离子 / (m/z) product ion	碰撞能量 /eV collision energy	保留时间 /min retention time	离子丰度 % abundance of product ion
α -玉米赤霉醇 α -zearalanol	321	277 [*] 303	22 25	9.02	20.0
β -玉米赤霉醇 β -zearalanol	321	277 [*] 303	22 25	8.56	18.5
α -玉米赤霉烯醇 α -zearalenol	319	275.2 [*] 301	24 30	9.15	26.2
β -玉米赤霉烯醇 β -zearalenol	319	275 [*] 301	24 30	8.66	10.0
玉米赤霉酮 zearalenone	319	275 [*] 205	23 29	9.61	36.2
玉米赤霉烯酮 zearalenone	317	175 [*] 273	28 21	9.64	88.6

注: * . 定量碎片离子

Note * . quantitative fragment ion

振荡 1 min, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去上层正己烷, 再加入 10 mL 乙腈饱和正己烷重复脱脂 1 次。下层乙腈溶液转移至 100 mL 鸡心瓶中, 50 °C 旋转蒸发至干, 加入 5 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 1 min, 静置 30 s, 上清液转移至 50 mL 离心管。鸡心瓶中加入 10 mL 乙腈饱和正己烷, 涡旋振荡 30 s, 静置 30 s, 上清液转移至同一离心管。再用 10 mL 乙腈饱和正己烷洗涤鸡心瓶 1 次, 合并 3 次残余物溶解液, 备用。

将氨基固相萃取柱用 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 正己烷预淋洗活化。取上述备用液过柱 (流速不超过 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 再依次用 5 mL 正己烷、5 mL 正己烷-乙酸乙酯 [V(正己烷) : V(乙酸乙酯) = 60 : 40] 淋洗, 4 mL 正己烷-乙酸乙酯 [V(正己烷) : V(乙酸乙酯) = 20 : 80]、4 mL 乙酸乙酯洗脱。

洗脱液于 50 °C 下氮气吹干, 1 mL 乙腈-水溶液 [V(乙腈) : V(水) = 20 : 80] 定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 滤液待测。

2 结果与分析

2.1 色谱及质谱条件优化

玉米赤霉醇脂溶性较好, 因此在反相 C_{18} 色谱柱上有良好的保留性质。笔者用 Hypersil GOLD (2.1 mm \times 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈和 0.1% 甲酸水溶液为流动相, 流速 0.25 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 6 种分析物得到良好的分离。以乙腈作为有机修饰剂, 对于 MS 检测的灵敏度和稳定性无明显影响, 而甲酸的加入可提高分析物离子化效率, 显著增强 MS 响应。但随着甲酸浓度的增加, 灵敏度反而下降。通过多次试验, 当甲酸的体积分数为 0.1% 时

可获得较好的保留时间、峰形和离子强度。该研究采用 SRM 检测方式, 在一级全扫描质谱图中, 6 种玉米赤霉醇类化合物都观察到清晰的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 然后进行相应的子离子 Q3 全扫描, 选取 2 个丰度较高的子离子作为定性和定量离子, 选择结果见表 2。定性分析选择 1 个母离子及 2 个子离

子, 并依据子离子相对丰度比和化合物保留时间定性, 符合欧盟委员会指令 2002/657/EC 对定性分析的要求。保留时间和离子相对丰度见表 2。HPLC-MS/MS 标准品色谱图见图 1, 加标样品图见图 2。

2.2 样品前处理条件优化

玉米赤霉醇类激素药物为脂溶性物质, 不溶于

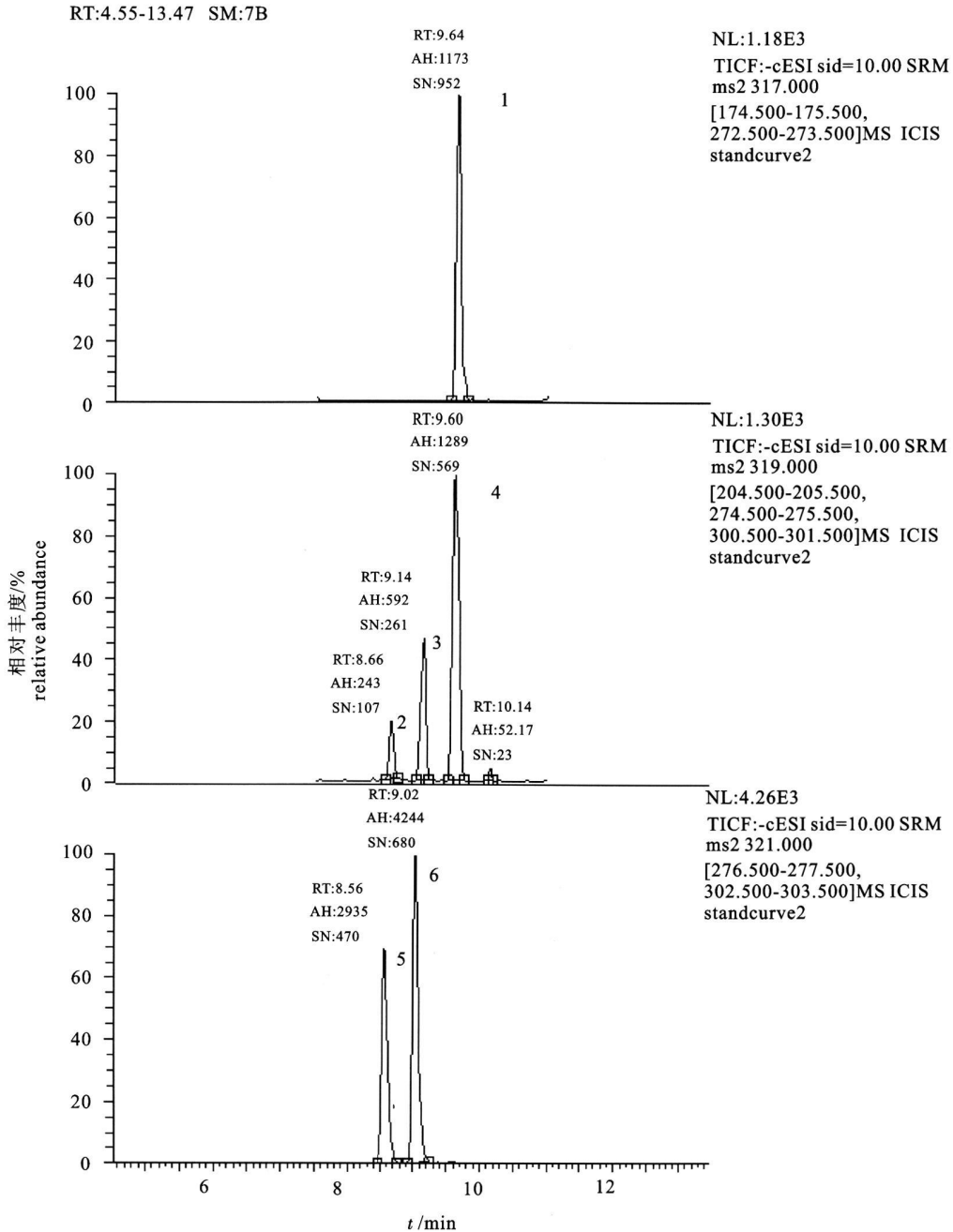


图 1 6种玉米赤霉醇类激素药物标准品色谱图

1. 玉米赤霉烯酮; 2. α -玉米赤霉烯醇; 3. β -玉米赤霉烯醇; 4. 玉米赤霉酮; 5. α -玉米赤霉醇; 6. β -玉米赤霉醇 (后图同此)

Fig 1 Chromatogram of 6 zearanol standard solution

1. zearalenone 2. α -zearalenol 3. β -zearalenol 4. zearalenone 5. α -zearanol 6. β -zearanol (the same case in the following figure)

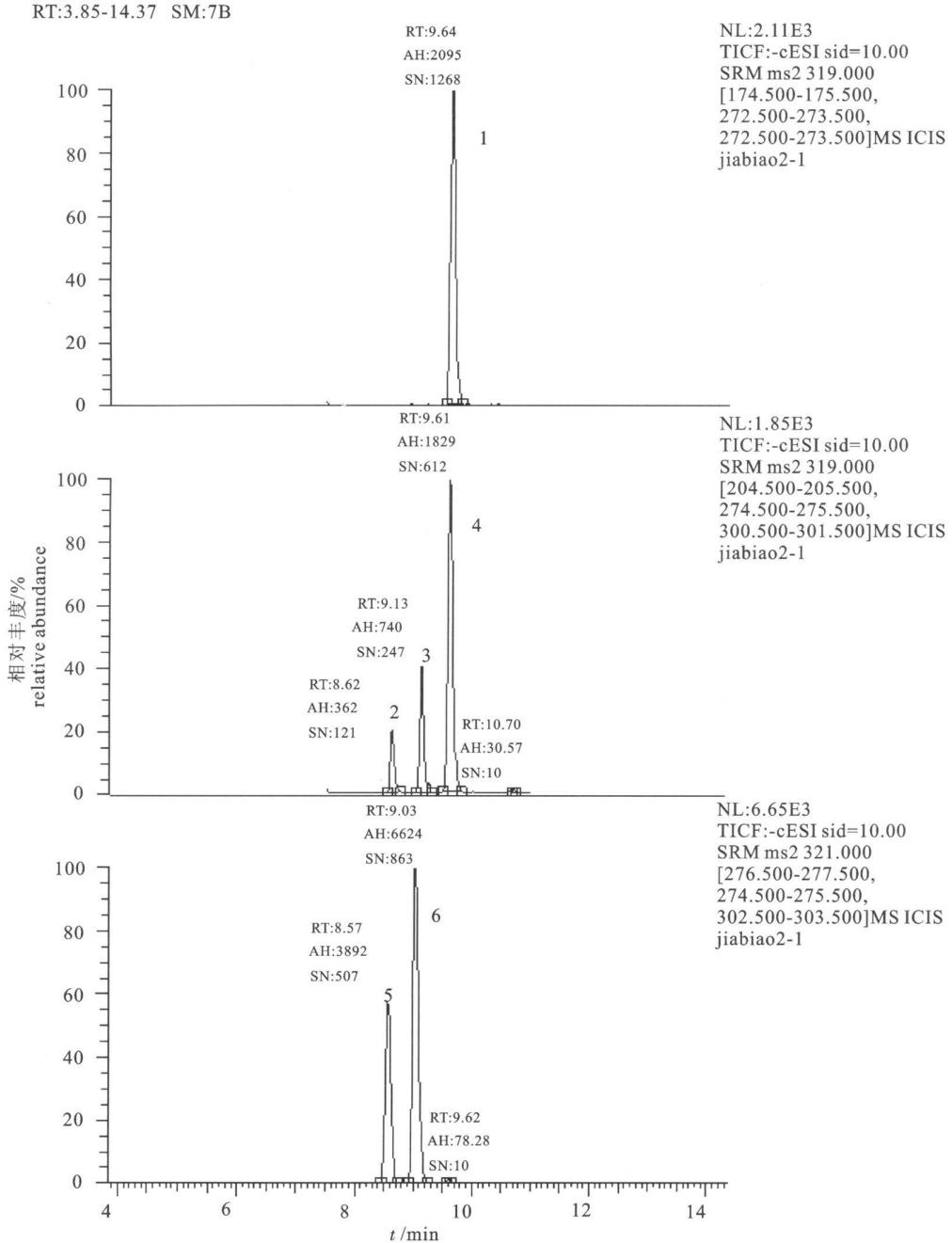


图 2 加标色谱图

Fig 2 Chrom atogram of spiked tissue

水，溶于多种有机溶剂和碱性溶液。样品前处理过程中提取剂的提取能力有很大差异，该试验分别比较了乙腈、甲醇、乙醚和乙酸乙酯 4 种提取溶剂的提取效果和提取效率，综合考虑后决定采用乙腈作为提取溶剂，这不仅提高提取效果，而且保证这 6 种玉米赤霉醇类激素药物在氨基固相萃取柱上的保留能力不受影响。

2.3 标准曲线、线性范围、检出限和定量限

用空白样品制备样品空白提取液，用该提取液将标准液稀释成 1、5、10、15、20 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 溶液，以各组分浓度与其色谱峰面积进行线性回归，呈良好线性关系(表 3)。以 3 倍信噪比(S/N)计算， α -玉米赤霉醇， β -玉米赤霉醇， α -玉米赤霉烯醇， β -玉米赤霉烯醇，玉米赤霉酮和玉米赤霉烯

酮检出限为 $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$; 以 10 倍信噪比 (S/N) 计算, α -玉米赤霉醇, β -玉米赤霉醇, α -玉米赤霉烯醇, β -玉米赤霉烯醇, 玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮定量限为 $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ 。

2.4 方法回收率和精密度

在添加 $1.0 \sim 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ 水平范围内, 测得 6 种玉米赤霉醇类激素药物的平均回收率为 75.9% ~ 103.8% ($n = 6$), 相对标准偏差为 3.90% ~ 13.5% (表 4), 表明该法稳定性强、重现性好,

能满足水产品中玉米赤霉醇类激素药物残留检测的要求。

3 结论

文章采用 HPLC-MS/MS 测定了水产品中玉米赤霉醇类激素药物的残留量。方法精密度高, 重现性好, 方法的检测限和定量限低, 能满足国家现行兽药残留检测分析的要求, 适用于水产品中玉米赤霉醇类激素药物残留的确证检测。

表 3 玉米赤霉醇类激素药物回归分析、检出限和定量限

Tab. 3 Regression analysis, limit of detection and limit of quantitation of zearanols

化合物 compounds	线性回归方程 linear regression equation	相关系数 (R^2) correlation coefficient	检出限 $\mu\text{g kg}^{-1}$ limit of detection	定量限 $\mu\text{g kg}^{-1}$ limit of quantitation
α -玉米赤霉醇 α -zearalanol	$Y = 7.37 \times 10^2 X - 7.69 \times 10^3$	0.992 1	0.5	1.0
β -玉米赤霉醇 β -zearalanol	$Y = 5.42 \times 10^2 X - 5.07 \times 10^3$	0.990 5	0.5	1.0
α -玉米赤霉烯醇 α -zearelenol	$Y = 1.26 \times 10^2 X - 2.81 \times 10^3$	0.990 1	0.5	1.0
β -玉米赤霉烯醇 β -zearelenol	$Y = 7.69 \times 10^1 X - 1.96 \times 10^3$	0.992 4	0.5	1.0
玉米赤霉酮 zearalanone	$Y = 1.85 \times 10^2 X - 1.64 \times 10^3$	0.996 4	0.5	1.0
玉米赤霉烯酮 zearelenone	$Y = 1.35 \times 10^2 X - 2.55 \times 10^3$	0.990 8	0.5	1.0

表 4 方法的添加回收率和精密度 ($n = 6$)

Tab. 4 Recoveries and precisions of HPLC-MS/MS

化合物 compounds	添加水平 $\mu\text{g kg}^{-1}$ added level	平均回收率 % average recovery	相对标准偏差 RSD %	化合物 compounds	添加水平 $\mu\text{g kg}^{-1}$ added level	平均回收率 % average recovery	相对标准偏差 RSD %
α -玉米赤霉醇 α -zearalanol	1	80.6	9.81	β -玉米赤霉烯醇 β -zearelenol	1	75.9	11.6
	5	88.2	6.22		5	77.7	7.54
	10	93.4	5.14		10	82.7	3.90
β -玉米赤霉醇 β -zearalanol	1	77.2	11.3	玉米赤霉酮 zearalanone	1	76.5	12.0
	5	79.1	7.61		5	78.2	5.57
	10	89.3	4.50		10	83.2	4.86
α -玉米赤霉烯醇 α -zearelenol	1	79.1	13.5	玉米赤霉烯酮 zearelenone	1	81.7	9.12
	5	82.8	6.45		5	93.2	5.39
	10	94.4	5.37		10	103.8	4.92

参考文献:

- [1] HEDY P H, BALDWIN R S, GREASHAM R L, et al. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities [J]. *Adv Appl Microbiol* 1977, 22: 59-82.
- [2] 吴永宁, 邵兵, 沈建忠. 兽药残留检测与监控技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 537.
- WU Yongning, SHAO Bing, SHEN Jianzhong. The technology of veterinary drug residue detection and monitoring [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 537. (in Chinese)
- [3] 蒋学之. 环境雌激素对人类健康的潜在影响 [J]. *中国公共卫生*, 1997, 13 (4): 251-252.
- JIANG Xuezhi. The potential impact of environmental estrogens to human health [J]. *Chinese J Public Health*, 1997, 13 (4): 251-252. (in Chinese)
- [4] MEDINA M B, SCHWARTZ D P. Thin-layer chromatographic detection of zearanol and estradiol in fortified plasma and tissue extracts with Fast Corinth V [J]. *J Chromatogr* 1992, 581: 119-128.
- [5] MEDINA M B, NAGDY N. Improved thin-layer chromatographic detection of diethylstilbestrol and zearanol in plasma and tissues isolated with alumina and ion-exchange membrane columns in tandem [J]. *J Chromatogr* 1993, 614: 315-323.
- [6] 贺艳, 郑文杰, 赵卫东, 等. 酶联免疫法检测动物源性产品中玉米赤霉醇残留 [J]. *食品研究与开发*, 2009, 30 (6): 124-127.
- HE Yan, ZHENG Wenjie, ZHAO Weidong, et al. Detecting zearanol residues in animal product using enzyme linked immunosorbent assay [J]. *Food Res Devel* 2009, 30 (6): 124-127. (in Chinese)
- [7] BAGNATI R, ORLUNDIM P, RUSSO V, et al. Determination of zearanol and β -zearanol in calf urine by immunoaffinity extraction and gas chromatography-mass spectrometry after repeated administration of zearanol [J]. *J Chromatogr* 1991, 564: 493-502.
- [8] 张伟, 王建平, 沈建忠, 等. 牛肉组织中玉米赤霉醇及相关物残留的气相色谱-质谱法测定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38 (5): 513-517.
- ZHANG Wei, WANG Jianping, SHEN Jianzhong, et al. Determination of residues of zearanol and related compounds in bovine muscle using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 2007, 38 (5): 513-517. (in Chinese)
- [9] MIYAZAKI T, HASHIMOTO T, MARUYAMA T, et al. Determination of anabolic agents in beef by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Hyg Soc Jpn* 1989, 30 (5): 384-389.
- [10] KIM H L, RAY A C, STEPANOVIC R D. Rapid separation and identification of urinary metabolites of zearanol by HPLC-UV spectrophotometry [J]. *J Agric Food Chem*, 1986, 34: 312-315.
- [11] 方晓明, 陈家华, 唐毅锋. 高效液相色谱法测定鸡肝中玉米赤霉醇的残留量 [J]. *色谱*, 2003, 21 (2): 158-161.
- FANG Xiaoming, CHEN Jiahua, TANG Yifeng. Determination of zearanol in chicken livers by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *Chromatogr* 2003, 21 (2): 158-161. (in Chinese)