doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2022.09.06

高效液相－串联质谱法测定猪、牛和羊尿液中18 种同化激素的含量

侯 轩,罗成江,王 彬,黄 娟,吴望君,任玉琴,陈 洁*

(浙江省动物疫病预防控制中心,杭州 310000)

[收稿日期] 2022－03－31　[文献标识码]A　[文章编号]1002－1280 (2022) 09－0038－09　[中图分类号]S859.83

[摘　要]　建立了高效液相色谱－串联质谱(HPLC－MS/MS)检测动物尿液 18 种同化激素的方法。动物尿液在 37 ±0.5 ℃下酶解 16 h 后,调节 pH =7.0(±0.5),C_{18} 固相萃取柱净化,用 HPLC－MS/MS 进行检测。18 种同化激素在 1 ~ 500 μg/L 浓度范围内线性关系良好(r^2≥0.99),回收率在 70.9% ~112%之间,日内变异系数范围为 1.2% ~ 13.1%,日间变异系数范围为 3.5% ~16.7%,检测限为 0.5 μg/L,定量限为 1.0 μg/L。本方法操作简便,灵敏度高,适用于动物尿液中 18 种同化激素的同时测定。

[关键词]　同化激素;动物尿液;高效液相色谱－串联质谱法

Determination of 18 Anabolic Hormones in Animal Urine by HPLC－MS/MS

HOU Xuan, LUO Cheng－jiang, WANG Bin, HUANG Juan, WU Wang－jun, REN Yu－qin, CHEN Jie*

(*Zhejiang Animal Disease Control and Prevention Center, Hangzhou* 311100, *China*)

Corresponding author: CHEN Jie, E－mail: hx881007@sina.com

Abstract: A method for the determination of 18 anabolic hormones in animal urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC－MS/MS) was established. The animal urine was enzymolysis for 16 h at 37 ℃ (±0.5 ℃), adjusted the pH to 7.0 (±0.5), and purified by solid phase extraction column and detected by HPLC－MS/MS. The linear relationship of 18 anabolic hormones was good in the concentration range of 1 ~500 ng / mL(r^2≥0.99), the recovery was 70.9% ~112%, the intra day coefficient of variation was 1.2% ~ 13.1%, the inter day coefficient of variation was 3.5% ~16.7%, and the detection limit was 0.5 μg/L, limit of quantitation was 1.0 μg/L. The method is simple, sensitive and suitable for the simultaneous determination of 18 anabolic hormones in animal urine.

Key words: anabolic hormone; animal urine; HPLC－MS/MS

基金项目: 浙江省农业重大技术协同推广计划(2021XTTGXM03－4);浙江省重点研发计划项目(2020C02032)

作者简介: 侯 轩,硕士,兽医师,从事兽药、饲料与畜产品质量安全检测相关工作。

通讯作者: 陈 洁,E－mail:hx881007@sina.com

同化激素(Anabolic hormones)属于具有环戊烷并多氢菲母核的甾体激素类药物,由于其具有提高饲料转换率,加快动物蛋白质的沉积,促进畜禽生长的功效[1-3],可以快速产生显著直接的经济效益,在畜牧业养殖中常常存在违规使用的情况。但该类药物在畜禽体内易蓄积残留[4],人体摄入后会造成不同程度的危害[5-6]。自 20 世纪 90 年代开始,欧盟等西方发达国家对同化激素类药物残留进行了严格的限制[7],为保障人民的身体健康和生命安全,保障畜牧业的健康持续发展,我国农业部 176 公告已经明确左炔诺孕酮、苯丙酸诺龙等同化激素类药物禁止在饲料和动物饮用水中使用。目前,国内外关于动物组织和尿液中同化激素检测方法研究已有报道,检测方法主要为气相色谱 - 串联质谱法[8-9]、液相 - 串联质谱法[10-12]等。本研究通过对仪器条件及前处理方法进行优化,拟建立可同时测定猪尿、牛尿、羊尿中 18 种同化激素 HPLC - MS/MS 检测方法,为保障畜产品质量安全提供有力的技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂　18 种同化激素标准品(群勃龙、诺龙、勃地酮、雄烯二酮、睾酮、孕酮、雄烯醇酮、美雄酮、甲睾酮、甲氢睾酮、左炔诺孕酮、康力龙、丙酸诺龙、氟甲睾酮、达那唑、丙酸睾酮、醋酸甲羟孕酮和苯丙酸诺龙)、3 种同化激素内标标准品(D_3 - 甲睾酮、D_9 - 孕酮、D_3 - 睾酮标准品)均购于 Witega 公司,纯度≥90.0%;甲酸、甲醇、乙腈(色谱纯,默克公司);乙腈(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);C_{18}固相萃取小柱 (500 mg/6 mL,Waters 公司)。

1.2　仪器与设备　高效液相色谱仪(1290 Infinity, Agilent 公司)串联三重四极杆质谱仪(QTRAP 5500, ABSCIEX 公司);电子天平(XS - 205, Mettler 公司);电子天平(SL502 N,上海民桥精密科学仪器有限公司);氮吹仪(N - EVAP, Organomation 公司);冷冻离心机(3 - 18k, Sigma 公司);振荡器(ZD - 8500,华立达公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　仪器条件

1.3.1.1　色谱条件　用十八烷基键合硅胶色谱柱(Waters C18 3μ m 3.0 ×150 mm),柱温 30 ℃,进样量 5 μL,0.2% 甲酸水溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min。

表 1　HPLC - MS/MS 流动相条件

Table 1　Mobile Phase Conditions of HPLC - MS/MS

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.0	60	40
5.0	5	95
10.0	5	95
10.10	60	40
20.00	60	40

1.3.1.2　质谱条件　电喷雾源正离子模式(ESI +),多反应监测模式(MRM);离子源电压:4500 V,辅助加热气温度:500 ℃,气帘气流速:10 L/h;离子源气流流速:Gas1 为 45 L/h,Gas2 为 45 L/h;18 种同化激素类化合物及 3 种内标的 MRM 条件参数见表 2。

1.3.2 标准溶液及标准曲线工作溶液配制

1.3.2.1　标准贮备液及内标贮备液配制(1.0 mg/mL)　分别精密称取 18 种激素类药物及 3 种内标药物标准品约 10 mg(准确至 0.01 mg),置 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,分别配制成 1.0 mg/mL 的激素类药物标准及内标贮备液。-20 ℃保存,有效期 6 个月。

1.3.2.2　混合标准中间液配制(1.00 μg/mL)　分别吸取适量的 18 种激素类药物的贮备液,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,使之成 1.00 μg/mL 的混合标准中间液。4 ℃保存,有效期 3 个月。

1.3.2.3　混合内标中间液配制(1.00 μg/mL)　分别吸取适量的 3 种内标贮备液,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,使之成 1.00 μg/mL 的混合内标中间液。4 ℃保存,有效期 3 个月。

1.3.2.4　标准曲线工作溶液配制　分别吸取适量的混合标准中间液,用 50% 乙腈溶液稀释成浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、200.0 和 500.0 μg/L 的标准曲线溶液,临用新配。

表 2　18 种同化激素和 3 种内标多反应监测条件参数

Tab 2　Retention time and MS parameters for analysis of 21 target compounds

药物名称	定性离子对(*m/z*)	定量离子对(*m/z*)	保留时间/min	去簇电压/V	碰撞室入口电压/V	碰撞能量/eV	碰撞室出口电压/V
康力龙	329.2/81.0	329.2/81.0	6.07	121	7	85	11
	329.2/121.1			121	7	50	14
睾酮	289.2/97.1	289.2/97.1	6.21	121	8	27	16
	289.2/109.1			121	8	33	12
雄烯二酮	287.3/97.1	287.3/97.1	6.56	85	8	30	12
	287.3/109.1			85	8	30	12
甲睾酮	303.1/109.0	303.1/109.0	6.62	100	10	39	14
	303.1/97.1			100	10	39	14
苯丙酸诺龙	407.3/105.1	407.3/105.1	10.12	125	5	53	17
	407.3/257.2			125	5	24	24
醋酸甲羟孕酮	387.1/327.3	387.1/327.3	7.73	95	9	25	10
	387.1/285.4			95	9	25	10
丙酸睾酮	345.2/97.1	345.2/97.1	9.36	106	7	31	17
	345.2/109.1			106	7	44	18
勃地酮	287.1/121.1	287.1/121.1	5.60	90	10	27	15
	287.1/135.2			90	10	27	15
左炔诺孕酮	313.3/109.1	313.3/109.1	6.82	80	6	40	17
	313.3/245.2			80	6	22	25
甲氢睾酮	305.2/269.3	305.2/269.3	7.29	100	10	20	10
	305.2/173.2			100	10	35	8
群勃龙	271.2/199.2	271.2/199.2	5.46	84	8	32	17
	271.2/253.2			84	8	28	22
诺龙	275.2/109.1	275.2/109.1	5.81	98	5	36	14
	275.2/257.2			98	5	24	25
丙酸诺龙	331.2/109.1	331.2/109.1	8.91	123	8	35	16
	331.2/145.2			123	8	32	10
雄烯醇酮	291.1/255.3	291.1/255.3	6.97	80	10	20	15
	291.1/273.2			80	10	14	15
达那唑	338.3/91.0	338.3/91.0	7.46	100	7	80	14
	338.3/310.3			100	7	27	26
美雄酮	301.3/121.1	301.3/121.1	5.95	90	8	35	10
	301.3/283.4			90	8	35	14
孕酮	315.3/97.0	315.3/97.0	7.90	86	8	29	16
	315.3/109.0			86	8	31	17
氟甲睾酮	337.3/241.4	337.3/241.4	4.98	80	7	30	10
	337.3/131.3			80	7	40	8
D3 – 甲睾酮	306.1/109.0	306.1/109.0	6.56	100	10	39	14
D9 – 孕酮	324.4/100.1	324.4/100.1	7.83	80	10	28	16
D3 – 睾酮	292.2/97.1	292.2/97.1	6.09	121	8	27	16

1.3.3　样品前处理　取试样 5.0 mL,置于 10 mL 离心管中,加入 β－盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 50 μL,37.0 ℃(±0.5 ℃)下酶解 16 h,取出冷却至室温后,用盐酸溶液(2.0 mol/L)或氢氧化钠溶液(2.0 mol/L)调节 pH 值至 7.0(±0.5),于 10000 r/min 离心 5 min,取上清液为备用液。

C_{18}固相萃取柱依次用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化,取全部备用液过柱,控制流速在 1.0 mL/min 以下,用淋洗液 5 mL 淋洗,抽干。用 8 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,40 ℃水浴条件下,氮气吹干,用 50% 乙腈水溶液适量溶解残余物,取适量溶液经 0.22 μm过微孔滤膜,上机测定。

1.3.4　样品添加回收率、准确度和精密度测定　分别对猪、牛和羊尿液进行 1.0、2.0、10.0 μg/L 的 18 种同化激素空白添加回收实验,按 1.3.3 项前处理后进行 HPLC－MS/MS 检测。每个浓度设 5 个平行,连续做 3 d,计算添加回收率、日内变异系数和日间变异系数。

2　结果与分析

2.1　质谱条件的优化　同化激素属于脂溶性化合物,弱极性或中等极性,采用电喷雾电离(ESI)离子源,以 0.1% 甲酸水:乙腈:甲醇＝1:1:1($V/V/V$)为基准流动相,采用流动注射泵连续进样,对 18 种同化激素药物的质谱条件进行优化,在正离子模式下进行全扫描,以选择适当的分子离子峰和电离方式,确定了 18 种同化激素在多反应监测模式下信号采集的特征离子对(表 2)。

2.2　液相条件的优化　由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态电离,因此流动相的组成和配比不但影响目标化合物的色谱行为,还会影响到目标化合物的离子化效率,从而影响灵敏度。本实验选择 Waters C_{18}柱(2.1 mm×150 mm,3.5 μm)为分离柱,在正离子模式下,流动相中加入 0.2% 甲酸溶液,有利于化合物的离子化,通过梯度洗脱,确定了流动相比例和梯度条件。采用正离子模式监测 18 种同化激素类药物,并对离子源和气体的相关参数进行了优化,得到空白猪尿总离子流图,见图 1;空白猪尿加标样品选择离子色谱图,见图 2。由图 1、图 2 中可以看出待测药物出峰的位置没有杂质干扰,18 种同化激素实现了良好的基线分离及响应。

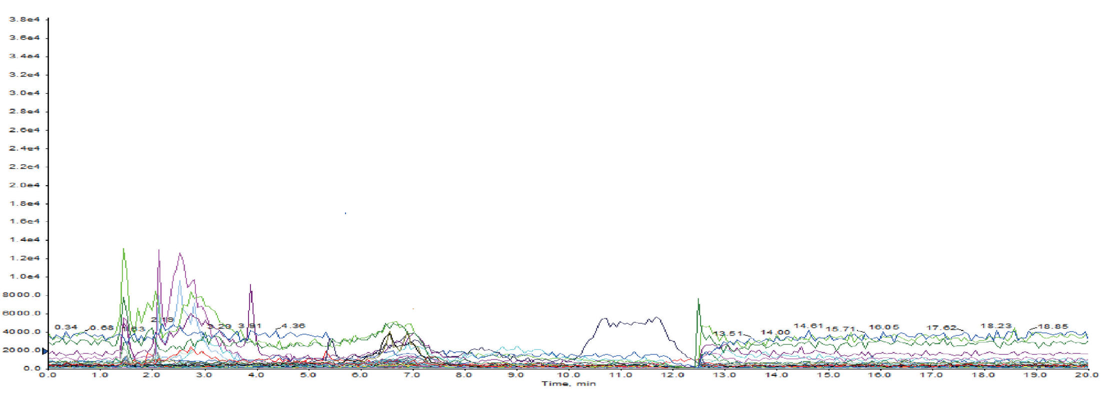

图 1　空白猪尿总离子流图

Fig 1　TIC of blank pig urine

2.3　固相萃取柱选择　在动物尿液试验中,由于同化激素极性较弱,在动物尿液检测同化激素方法中,选择反相固相萃取柱净化,并对以下两种萃取小柱进行试验比较:1、HLB(亲脂性二乙烯苯和亲水性 N－乙烯基吡咯烷酮大孔共聚物)规格:500 mg/6 mL;2、C18(烷基键合硅胶)规格:500 mg/6 mL。用以上两种小柱分别进行猪尿液回收率试验,添加浓度 2.0 μg/L,5 个平行样。经实验证明(表 3)C_{18}回收率整体水平较高,尤其是苯丙酸诺龙、丙酸诺龙回收率高于 HLB,故采用 C_{18}小柱。

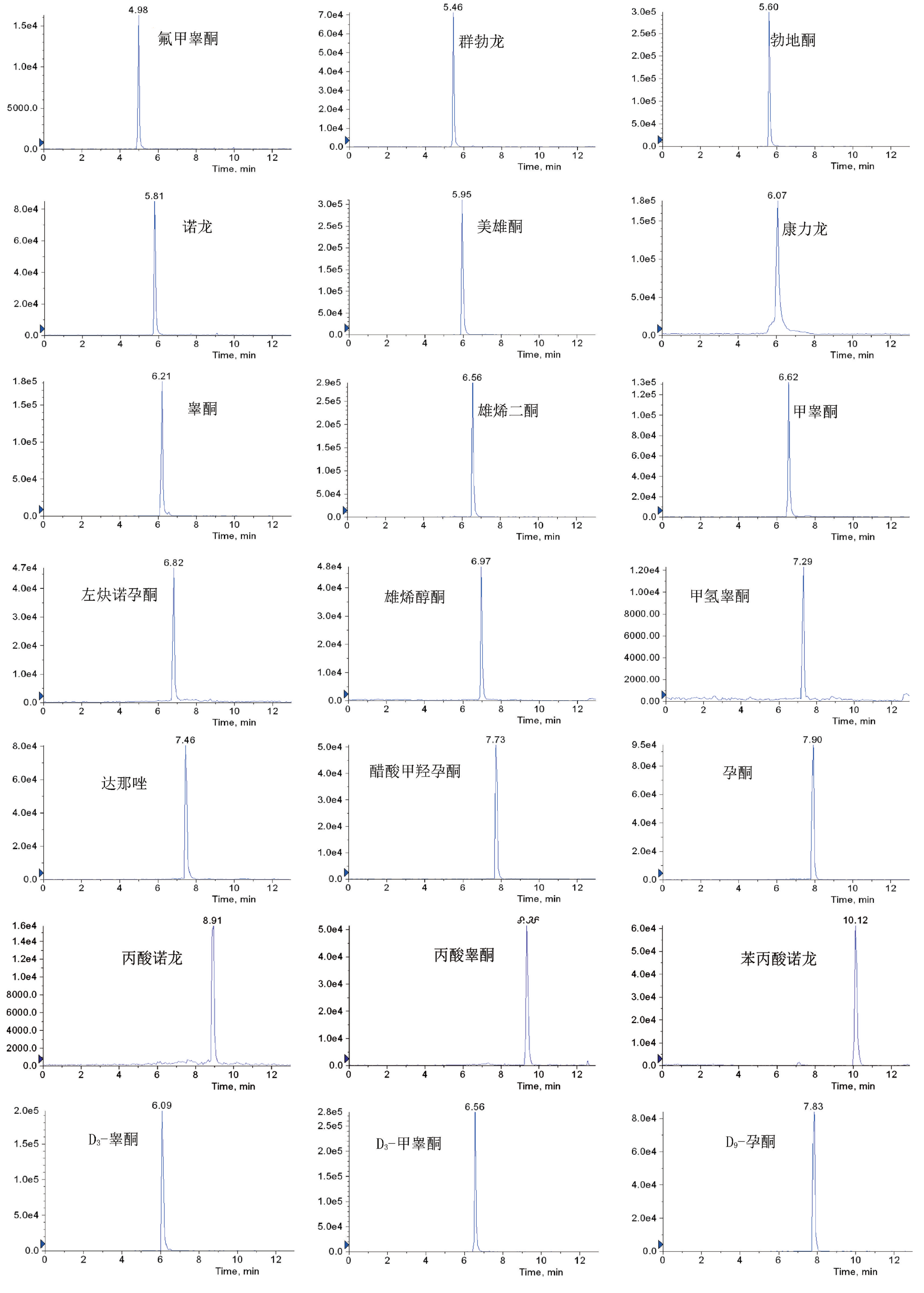

图 2　空白猪尿添加 18 种同化激素及 3 种内标选择离子流图

Fig. 2　EIC of 18 anabolic hormones and 3 internal standard added in blank pig urine

表 3　2 种 SPE 柱回收率比较

Tab 3　Comparison of recoveries of two SPE columns

药物名称	小柱类型	平均回收率/%	变异系数/%
康力龙 STA	HLB	98.2	5.6
	C_{18}	97.5	4.8
睾酮 TS	HLB	101	3.8
	C_{18}	104	5.2
雄烯二酮 AD	HLB	94.6	8.3
	C_{18}	93.1	7.2
甲睾酮 MTS	HLB	99.6	4.3
	C_{18}	98.3	3.9
苯丙酸诺龙 NAP	HLB	65.2	10.4
	C_{18}	71.6	8.9
醋酸甲羟孕酮 MPA	HLB	93.2	6.4
	C_{18}	89.7	5.8
丙酸睾酮 PTG	HLB	70.2	9.1
	C_{18}	72.3	10.4
勃地酮 BD	HLB	84.3	3.2
	C_{18}	93.7	6.7
左炔诺孕酮 LNG	HLB	89.6	8.6
	C_{18}	93.8	10.5
甲氢睾酮 MST	HLB	85.1	8.7
	C_{18}	86.5	8.4
群勃龙 TB	HLB	91.5	7.8
	C_{18}	95.8	5.8
诺龙 NT	HLB	90.2	7.3
	C_{18}	88.6	6.3
丙酸诺龙 PPNT	HLB	78.1	7.6
	C_{18}	86.1	8.1
雄烯醇酮 SAL	HLB	83.3	7.5
	C_{18}	80.4	6.9
达那唑 DAN	HLB	106	4.8
	C_{18}	94.6	3.5
孕酮 PE	HLB	102	7.3
	C_{18}	99.4	7.5
美雄酮 MD	HLB	93.6	2.1
	C_{18}	91.0	3.2
氟甲睾酮 FT	HLB	89.6	8.3
	C_{18}	91.5	7.8

2.4　标准曲线、检出限及定量限　按 1.3.3 项处理空白样品后，高效液相色谱串联质谱检测，以峰面积作为纵坐标，浓度为横坐标绘制标准曲线。由表 4 可知，在浓度为 1 ~ 500 μg/L 浓度范围内，线性关系良好，r^2 >0.99，取信噪比 S/N =3 的样品浓度为方法检出限(LOD)，取信噪比 S/N =10 的样品浓度为方法定量限(LOQ)。

表 4　18 种同化激素的线性方程相关相关系数

Tab 4　Linear equation correlation coefficients of 18 anabolic hormones

药物名称	线性方程	相关系数(r^2)	检测限/(μg · L^{-1})	定量限/(μg · L^{-1})
康力龙	$Y=74500x+29200$	0.9990	0.5	1.0
睾酮	$Y=87400x+50300$	0.9969		
雄烯二酮	$Y=96000x+76200$	0.9982		
甲睾酮	$Y=63500x-70000$	0.9979		
苯丙酸诺龙	$Y=68900x-4620$	0.9953		
醋酸甲羟孕酮	$Y=29900x+8060$	0.9961		
丙酸睾酮	$Y=49600x-8960$	0.9960		
勃地酮	$Y=98500x+114000$	0.9955		
左炔诺孕酮	$Y=20700x+10500$	0.9978		
甲氢睾酮	$Y=3480x+723$	0.9991		
群勃龙	$Y=29700x+24800$	0.9990		
诺龙	$Y=36300x+24100$	0.9988		
丙酸诺龙	$Y=13900x+4840$	0.9962		
雄烯醇酮	$Y=8110x+5730$	0.9992		
达那唑	$Y=38600x+22400$	0.9968		
孕酮	$Y=67600x+4200$	0.9968		
美雄酮	$Y=141000x+23100$	0.9961		
氟甲睾酮	$Y=10200x+12100$	0.9987		

2.5　方法的回收率、精密度　在 1.0、2.0、10.0 μg/L浓度添加水平下进行添加回收实验，每个浓度设 5 个平行，重复 3 次。计算添加回收率及变异系数，结果见表 5 ~ 表 7。

表 5　猪尿中 18 种同化激素的回收率(n=5)

Tab 5　Recovery rate of 18 anabolic hormones in pig urine (n = 5)

药物名称	添加浓度/(μg·L^{-1})	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数
康力龙	1.0	99.7%	11.7%	4.7%
	2.0	96.0%	12.1%	3.2%
	10.0	78.1%	6.1%	2.6%
睾酮	1.0	99.8%	6.8%	5.4%
	2.0	102%	6.4%	4.0%
	10.0	96.5%	5.8%	4.2%
雄烯二酮	1.0	98.7%	5.7%	3.8%
	2.0	92.2%	6.6%	5.0%
	10.0	80.9%	4.5%	3.7%
甲基睾酮	1.0	99.0%	6.7%	5.0%
	2.0	97.3%	5.5%	4.0%
	10.0	89.8%	7.8%	5.6%
苯丙酸诺龙	1.0	72.1%	15.1%	7.7%
	2.0	71.5%	5.1%	3.9%
	10.0	83.4%	7.2%	7.1%
醋酸甲羟孕酮	1.0	91.0%	8.2%	4.7%
	2.0	107%	10.4%	6.9%
	10.0	105%	7.4%	8.5%
丙酸睾酮	1.0	73.5%	6.1%	4.7%
	2.0	76.9%	7.5%	2.5%
	10.0	79.2%	10.0%	5.4%
勃地酮	1.0	93.3%	7.1%	4.0%
	2.0	98.7%	6.9%	2.9%
	10.0	98.3%	6.2%	3.2%
左炔诺孕酮	1.0	94.3%	6.0%	3.6%
	2.0	93.1%	6.8%	5.8%
	10.0	83.8%	8.4%	5.2%
甲氢睾酮	1.0	93.4%	10.6%	9.7%
	2.0	108%	12.5%	13.1%
	10.0	105%	5.8%	3.0%
群勃龙	1.0	91.5%	7.8%	3.9%
	2.0	97.3%	8.8%	3.5%
	10.0	97.4%	9.6%	3.8%
诺龙	1.0	112%	8.8%	6.4%
	2.0	100%	7.3%	6.3%
	10.0	86.9%	6.6%	2.9%
丙酸诺龙	1.0	84.3%	10.9%	5.5%
	2.0	74.0%	6.9%	2.6%
	10.0	74.7%	5.5%	2.1%
雄烯醇酮	1.0	105%	13.9%	7.3%
	2.0	104%	13.7%	9.1%
	10.0	95.1%	12.8%	7.2%
达那唑	1.0	91.5%	7.1%	1.2%
	2.0	96.5%	8.0%	7.3%
	10.0	92.8%	9.0%	7.4%
孕酮	1.0	109%	8.5%	5.2%
	2.0	106%	13.0%	5.4%
	10.0	74.6%	9.2%	4.5%
美雄酮	1.0	92.7%	7.9%	5.5%
	2.0	96.5%	7.5%	2.0%
	10.0	91.6%	6.6%	2.0%
氟甲睾酮	1.0	110%	5.1%	4.5%
	2.0	97.8%	9.0%	1.9%
	10.0	77.0%	7.7%	3.8%

表 6　牛尿中 18 种同化激素的回收率(n=5)

Tab 5　Recovery rate of 18 anabolic hormones in cattle urine (n = 5)

药物名称	添加浓度/(μg·L^{-1})	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数
康力龙	1.0	88.8%	11.0%	10.1%
	2.0	92.3%	10.5%	2.7%
	10.0	82.9%	11.7%	4.9%
睾酮	1.0	96.0%	3.5%	3.2%
	2.0	104%	5.1%	7.0%
	10.0	90.6%	6.0%	7.3%
雄烯二酮	1.0	103%	10.3%	5.6%
	2.0	104%	11.8%	5.2%
	10.0	82.2%	8.6%	5.4%
甲基睾酮	1.0	102%	11.0%	3.4%
	2.0	106%	10.7%	4.1%
	10.0	91.9%	9.3%	6.7%
苯丙酸诺龙	1.0	75.1%	7.4%	6.1%
	2.0	76.2%	4.3%	2.1%
	10.0	78.3%	6.7%	5.5%
醋酸甲羟孕酮	1.0	86.4%	8.2%	6.6%
	2.0	98.9%	14.6%	11.9%
	10.0	89.1%	13.8%	10.2%
丙酸睾酮	1.0	71.1%	5.5%	7.3%
	2.0	74.0%	7.5%	7.4%
	10.0	73.5%	10.8%	6.3%
勃地酮	1.0	81.2%	14.4%	4.2%
	2.0	90.2%	16.7%	5.1%
	10.0	83.9%	10.1%	8.6%
左炔诺孕酮	1.0	103%	9.4%	3.9%
	2.0	107%	9.7%	4.7%
	10.0	96.7%	10.5%	7.4%
甲氢睾酮	1.0	98.2%	14.1%	8.2%
	2.0	99.0%	15.2%	10.9%
	10.0	80.1%	10.9%	10.8%
群勃龙	1.0	85.8%	4.7%	4.5%
	2.0	95.3%	16.5%	7.5%
	10.0	85.8%	16.3%	8.1%
诺龙	1.0	105%	6.3%	4.1%
	2.0	98.9%	7.3%	9.6%
	10.0	83.2%	6.2%	7.3%
丙酸诺龙	1.0	78.3%	7.7%	7.9%
	2.0	79.8%	7.8%	6.0%
	10.0	76.8%	9.2%	7.0%
雄烯醇酮	1.0	103%	12.5%	7.1%
	2.0	107%	8.7%	7.3%
	10.0	97.7%	8.6%	8.7%
达那唑	1.0	88.1%	12.4%	5.5%
	2.0	89.7%	11.7%	5.7%
	10.0	72.2%	7.8%	6.0%
孕酮	1.0	105%	8.2%	7.8%
	2.0	101%	8.4%	5.9%
	10.0	76.2%	10.0%	7.0%
美雄酮	1.0	88.0%	5.2%	3.5%
	2.0	97.2%	4.5%	3.4%
	10.0	85.6%	7.5%	7.4%
氟甲睾酮	1.0	99.7%	11.7%	7.1%
	2.0	107%	11.9%	3.0%
	10.0	77.7%	7.3%	6.2%

表 7　羊尿中 18 种同化激素的回收率(n =5)

Tab 6　Recovery rate of 18 anabolic hormones in sheep urine (n = 5)

药物名称	添加浓度/(μg · L^{-1})	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数
康力龙	1.0	110%	5.4%	7.6%
	2.0	90.3%	11.7%	8.9%
	10.0	82.9%	8.8%	3.7%
睾酮	1.0	105%	6.9%	6.5%
	2.0	88.6%	14.1%	10.8%
	10.0	90.5%	11.7%	4.4%
雄烯二酮	1.0	111%	5.8%	7.4%
	2.0	97.5%	11.2%	9.0%
	10.0	95.2%	5.9%	3.1%
甲基睾酮	1.0	109%	7.1%	7.5%
	2.0	91.4%	11.8%	10.6%
	10.0	93.8%	6.4%	4.9%
苯丙酸诺龙	1.0	75.6%	9.0%	7.2%
	2.0	75.9%	9.8%	4.1%
	10.0	76.4%	9.0%	5.1%
醋酸甲羟孕酮	1.0	89.9%	13.0%	8.5%
	2.0	97.2%	16.4%	11.7%
	10.0	103%	12.1%	9.7%
丙酸睾酮	1.0	74.2%	12.3%	10.4%
	2.0	79.0%	7.1%	4.3%
	10.0	70.9%	10.0%	6.4%
勃地酮	1.0	95.9%	10.5%	7.7%
	2.0	90.5%	16.6%	10.8%
	10.0	93.8%	13.7%	12.6%
左炔诺孕酮	1.0	108%	7.6%	3.6%
	2.0	90.1%	9.4%	6.9%
	10.0	98.7%	5.6%	6.9%
甲氢睾酮	1.0	107%	7.8%	7.1%
	2.0	90.6%	16.1%	11.9%
	10.0	99.7%	11.3%	5.0%
群勃龙	1.0	98.4%	9.8%	9.5%
	2.0	91.8%	13.3%	6.4%
	10.0	102%	14.5%	7.0%
诺龙	1.0	108%	6.5%	7.4%
	2.0	94.0%	15.9%	10.4%
	10.0	105%	10.5%	8.1%
丙酸诺龙	1.0	81.1%	11.1%	7.9%
	2.0	76.7%	5.5%	3.2%
	10.0	77.1%	8.9%	8.3%
雄烯醇酮	1.0	106%	6.1%	8.8%
	2.0	94.8%	10.1%	8.9%
	10.0	93.0%	8.7%	8.0%
达那唑	1.0	109%	11.8%	3.8%
	2.0	90.5%	11.8%	11.5%
	10.0	93.6%	10.6%	7.5%
孕酮	1.0	106%	7.5%	5.9%
	2.0	92.4%	13.3%	11.9%
	10.0	82.6%	10.1%	8.4%
美雄酮	1.0	106%	6.5%	7.9%
	2.0	95.3%	14.8%	8.2%
	10.0	91.8%	12.0%	9.0%
氟甲睾酮	1.0	109%	9.2%	7.1%
	2.0	91.0%	11.9%	9.3%
	10.0	85.5%	11.5%	5.2%

2.6　实际样品检测　应用建立的分析方法,对浙江省内 20 家养殖场采集的 50 份动物尿液进行测定,其中 1 批次牛尿检出孕酮,含量为 12.3 μg/L;3 批次羊尿检出睾酮,含量分别为 3.61、5.33、21.6 μg/L。该检测结果表明,本方法能满足对动物尿液中 18 种同化激素有效监控的需求。

3　讨论与结论

3.1　酶解条件的选择　同化激素在动物组织中常以原形药物存在,在动物尿液中部分同化激素却以葡萄糖醛酸结合的形态存在[13]。因此本研究采用 β – 葡萄糖苷酶/芳基硫酸酯酶在 37 ±0.5 ℃下酶解 16 h 进行处理,达到较好的效果。

3.2　样品前处理方法的优化　张怡[14]等针对猪血浆和尿液样品,采用乙酸乙酯提取、C_{18}固相萃取小柱净化,对 8 种同化激素开展同时测定,定量限为 1 ~1.5 μg/L,回收率在 71.5% ~92.3% 之间;曹玉萍[15]等采用叔丁基甲醚和三氯甲烷提取马尿中的同化激素,浓缩提取后,内标法定量,定量限为 0.5 ~50 μg/L,回收率在 68.74% ~120% 之间。本研究通过比较不同 pH 值和固相萃取柱对待测物回收率的考察,确定了样品调节 pH 值至 7.0(±0.5)直接过 C_{18}固相萃取柱的前处理方法,省去有机相提取步骤,减少了检测时间与成本,结果可见空白样品基线清晰,加标样品 18 种同化激素峰形锐利且无其他杂峰干扰,定量限为 1.0 μg/L,回收率在 79.2% ~94.5% 之间,满足检测要求。

本研究建立的动物尿液中 18 种同化激素 HPLC – MS/MS 检测方法,回收率在 70.9% ~112% 之间,日内变异系数范围为 1.2% ~13.1%,日间变异系数范围为 3.5% ~16.7%,检测限为 0.5 μg/L,定量限为 1.0 μg/L。本方法操作简便,灵敏度高,适用于动物尿液中 18 种同化激素的同时测定。该方法优化了前处理条件,操作简便,检测方法灵敏度高,重现性强,符合兽药残留分析性能要求,可用于日常样品分析。

参考文献:

[1]　Chang C, Saltzman A, Yeh S, *et al*. Androgen Receptor: An O-

verview[J]. Critical Review in Eukaryotic Gene Expression, 1995, 5(2):97 – 125.

[2] Dragica S, Jovana J, Nemanja J, *et al*. The Impact of Hippocampal Sex Hormones Receptors in Modulation of Depressive – Like Behavior Following Chronic Anabolic Androgenic Steroids and Exercise Protocols in Rats[J]. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2019, 13(000):19 – 19

[3] Kiani A. Plasma Levels of Anabolic Hormones in Suckling Lambs are Affected by Late Gestational Nutrition[J]. Iranian Journal of Applied Animal Science, 2013.

[4] 左晓磊, 付新城. 畜禽产品中的兽药品残留[J]. 动物医学进展, 2010, 31(Z1):237 – 240

Zuo XL, Fu X C. Progress on Veterinary Drug Residue Research in Animal Products[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(Z1):237 – 240

[5] Michele G, Giovanni C, Manuela C, *et al*. Simultaneous quantitation of 9 anabolic and natural steroidal hormones in equine urine by UHPLC – MS/MS triple quadrupole[J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1117(000):36 – 40

[6] Thiago G J, Basaria S. Abuse of anabolic steroids: A dangerous indulgence – ScienceDirect[J]. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 2019, 9:96 – 101.

[7] Commission of the European Communities. Council DirectiveI[S]. 96/23/EC Off J Eur Commun, 1996, LI25.

[8] 陈捷, 秦燕, 张美金. 气相色谱 – 质谱法检测动物肌肉组织中残留的甾类同化激素[J]. 色谱, 2006, 24(1):19 – 22.

Chen J, Qin Y, Zhang M J. Determination of Anabolic Steroid Hormones in Animal Muscle Tissues by Gas Chromatography/Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(1):19 – 22.

[9] Aman C S, Pastor A, Cighetti G, *et al*. Development of a multianalyte method for the determination of anabolic hormones in bovine urine by isotope – dilution GC – MS/MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 386(6):1869 – 1879

[10] 李佩佩, 张小军, 严忠雍, 等. 凝胶渗透色谱 – 超高效液相色谱 – 串联质谱法测定水产品中多种同化激素残留[J]. 理化检验:化学分册, 2014, 12:1539 – 1543.

Li P P, Zhang X J, Yan Z Y, *et al*. Determination of Anabolic Steroid Residue in Aquatic Products by GPC – UHPLC – MS/MS[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2014, 12:1539 – 1543.

[11] 蔡玮红, 何敏恒, 李秀英, 等. 高效液相色谱 – 串联质谱法快速测定乳与乳粉中 20 种同化激素[J]. 乳业科学与技术, 2014, 37(3):8 – 12.

Cai W H, He H M, L Y X, *et al*. Quick Determination of 20 Anabolic Hormones in Milk and Milk Powder by LC – MS – MS[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2014, 37(3):8 – 12.

[12] Matraszek Z I, Wozniak B, Sielska K, *et al*. Determination of selected testosterone esters in blood serum of slaughter animals by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Steroids, 2020, 163(5899):108723.

[13] Poucke C V, Detavernier C, Cauwenberghe R V, *et al*. Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1 – 2):35 – 42.

[14] 张怡, 李艳芹, 赖丽虹, 等. 液相色谱 – 串联质谱法测定猪血浆和尿液中 8 种同化激素的残留[J]. 动物医学进展, 2015, 36(6):5.

Zhang Y, Li YQ, Lai LH, *et al*. Determination of Eight Anabolic Steroids in Plasma and Urine of Swine by Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(6):5.

[15] 曹玉萍, 徐友宣. 液相色谱串联质谱法检测马尿中 32 种蛋白同化激素[J]. 中国运动医学杂志, 2015, 34(4):4.

Cao Y P, Xu Y X. Detection of 32 Anabolic Steroids in Horse Urine by LC – MS/MS[J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2015, 34(4):4.

(编 辑:侯向辉)