

高效液相色谱—串联质谱法测定猪可食性组织中烯丙孕素残留

Determination of altrenogest residue in pig edible tissue by a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

倪香艳¹ 孙念霞² 于寒冰¹ 方芳¹ 孙志文¹

NI Xiang-yan¹ SUN Nian-xia² YU Han-bing¹ FANG Fang¹ SUN Zhi-wen¹

(1. 北京市农产品质量安全中心, 北京 102629; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012)

(1. Beijing Agricultural Product Quality and Safety Center, Beijing 102629, China;

2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China)

摘要:目的:测定猪可食性组织(肌肉、肝脏、脂肪)中烯丙孕素残留。方法:试样经 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶酶解,乙腈提取,PRiME HLB固相萃取柱净化。以乙腈—0.1%甲酸水溶液作为流动相,经Waters UPLC BEH C₁₈反相色谱柱分离后于电喷雾正离子模式下检测,基质匹配外标法定量。结果:烯丙孕素在1~50 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范围内线性良好,线性相关系数 $R^2 > 0.99$;该方法在猪肌肉、肝脏、脂肪组织中检测限为0.5 $\mu\text{g/kg}$,定量限为1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。在3个添加水平下(1.0, 2.0, 10.0 $\mu\text{g/kg}$),平均回收率为60.9%~89.8%,日内变异系数为0.8%~7.1%,日间变异系数为2.5%~11.6%。结论:该方法操作简便,适用于猪可食性组织中烯丙孕素残留的定性与定量分析。

关键词:高效液相色谱—串联质谱法;猪肌肉;猪肝脏;猪脂肪;烯丙孕素;残留检测

Abstract: Objective: To determine the residues of altrenogest in porcine edible tissues (muscle, liver, fat), a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was established. **Methods:** The samples were hydrolyzed with β -glucuronidase/arylsulfase, extracted by acetonitrile (ACN), purified by PRiME HLB solid phase extraction column. LC separation was performed with Waters UPLC BEH C₁₈ reversed-phase chromatography with a linear gradient elution of acetonitrile (ACN)-0.1% formic acid (FA) as the mobile phase. The samples were detected by electrospray in positive ion mode.

基金项目:安徽省高等学校科学研究项目(编号:KJ2021A0593)
作者简介:倪香艳,女,北京市农产品质量安全中心兽医师,硕士。
通信作者:孙志文(1976—),男,北京市农产品质量安全中心高级兽医师,硕士。E-mail: Sunzw673@163.com

收稿日期:2022-06-21 **改回日期:**2022-10-28

Results: The pregnancin in tissues were quantified in the range of 1~50 $\mu\text{g/L}$ with good linearity and high linear correlation coefficient ($R^2 > 0.99$). The limit of detection (LOD, $S/N=3$) and the limit of quantification (LOQ, $S/N=10$) were as low as 0.5 $\mu\text{g/kg}$ and 1.0 $\mu\text{g/kg}$ separately. Under three different concentrations (1.0, 2.0, 10.0 $\mu\text{g/kg}$), the average recoveries were 60.9%~89.8%, the intra-day coefficient of variation was 0.8%~7.1%, and the inter-day coefficient of variation was 2.5%~11.6%. **Conclusion:** The method is simple and suitable for the qualitative and quantitative analysis of altrenogest residue in porcine edible tissues.

Keywords: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; pig muscle; pig liver; pig fat; altrenogest; residue detection

烯丙孕素是一种人工合成的甾类促孕孕酮^[1-2]。临床上欧盟和美国已批准将烯丙孕素用于对猪和马的同期发情的调控^[3],其作用机理是通过与黄体酮的受体结合,抑制机体内促性腺相关激素的生成^[4],降低其在血浆中的浓度,进而调控母畜发情周期^[5]。非洲猪瘟背景下,种猪的繁殖性能是育种成功的关键所在,作为人工合成的甾类促孕孕酮的烯丙孕素在中国母猪批次化生产过程中,也成为应用最为广泛的外源性孕激素之一^[5-6]。但动物试验表明孕激素会增加死胎率,且有致畸作用^[7],人体长期摄入烯丙孕素药物超标的动物产品会破坏机体内激素平衡,引起癌变,还会导致婴幼儿身体发育异常^[8-9]。为避免烯丙孕素在动物可食性组织中的残留,农业农村部规定烯丙孕素在猪肌肉、肝脏、脂肪中的最高残留限量(试行)分别为1, 2, 4 $\mu\text{g/kg}$ 。

目前有关孕激素等激素类药物残留的检测方法有液

相色谱法^[9-10]、气相色谱—串联质谱法^[11]、液相色谱—串联质谱法^[12-13]等。液相色谱法的抗干扰能力较差、灵敏度低^[10]；气相色谱法样品需衍生化,不适用于激素类等挥发性较低的药物检测^[11]；高效液相色谱—串联质谱方法具有特异性强、灵敏度高等优点^[13],已成为兽药残留痕量药物检测的发展趋势。目前国内外有关烯丙孕素药物的研究主要集中于其对母猪发情性能的影响机理等方面^[3],对其在动物体内的残留检测关注度较少且仅限于肌肉、饲料、肝脏等单一组织^[3,14],未见有肌肉、肝脏、脂肪等多个靶组织同时检测的多残留分析方法；部分检测方法存在前处理过程中未进行酶解导致定量不准确、提取液未净化^[14]导致仪器污染等问题。研究拟建立一种猪肌肉、肝脏、脂肪中烯丙孕素药物残留检测的高效液相色谱—串联质谱方法,采用多种水解酶进行酶解、乙腈提取猪组织中残留的烯丙孕素,旨在为猪可食性组织中烯丙孕素残留分析检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

烯丙孕素标准品:纯度 $\geq 98.0\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

β -葡萄糖醛苷酸酶/芳基硫酸酯酶: $>10\,000$ U/mL,美国 Sigma 公司;

乙腈、甲酸:质谱级,德国 Merck 公司;

PRiME HLB 固相萃取柱:200 mg, 6 mL, 美国 Waters 公司;

乙酸钠、氯化钠:分析纯,北京化工厂。

1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱—串联质谱仪:Waters Xevo TQ-S 型,配备 MassLynx V4.1 软件处理系统,美国 Waters 公司;

电子天平:BSA6202S 型,上海诺萱科学仪器有限公司;

高速冷冻离心机:CR30NX 型,德国 Eppendorf 公司;

氮吹仪:TTL-DCII 型,上海标卓科技仪器有限公司;

旋涡振荡器:Vortex 3000 Elite 型,维根技术北京有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 称取匀浆后猪肌肉、肝脏、脂肪样品 (2.00 ± 0.01) g,依次加入 8 mL 乙酸钠缓冲溶液 $(0.2\text{ mol/L}, \text{pH } 5.2)$ 、20 μL β -葡萄糖醛苷酸酶/芳基硫酸酯酶,涡旋混匀 2 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 振荡酶解 2 h。分别加入 3 g 氯化钠、10 mL 乙腈溶液,涡旋混匀 10 min,8 000 r/min 离心 5 min。上清液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻除脂 20 min,冷冻后提取液于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 5 min,弃去脂肪层。取 5 mL 提取液直接过 PRiME HLB 固相萃取柱,洗脱液直接收集于离心管中,45 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干,加入 0.5 mL 20%

乙腈水溶液溶解,上清液过 0.22 μm 滤膜,净化后复溶液供仪器检测分析。

1.2.2 液相色谱条件 色谱柱为 Waters UPLC BEH C_{18} 柱 $(50\text{ mm} \times 2.1\text{ mm})$,填料粒径 1.7 μm ;流动相 A 为乙腈溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液,按表 1 进行梯度洗脱;流速 0.3 mL/min;上样体积 10 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 烯丙孕素高效液相色谱梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of altrenogest by high performance liquid chromatography

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	50	50
0.5	50	50
2.0	80	20
2.1	50	50
3.0	50	50

1.2.3 质谱条件 参照李建等^[14]的方法。电喷雾正离子源;MRM 质谱多反应监测信号采集方式;毛细管电离电压 3.00 kV;源温度 150 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂温度 400 $^{\circ}\text{C}$;锥孔气流速 150 L/h;脱溶剂气流速 700 L/h。

1.2.4 标准曲线的制备 空白阴性样品按 1.2.1 处理得空白样品提取液,稀释标准品,得到系列基质匹配标准溶液,以待测药物浓度作为横坐标,对应的药物峰面积作为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.5 检测限和定量限 在空白阴性试验样品中添加待测药物,按 1.2.1 处理后进行分析。按照待测药物色谱峰信号响应的信噪比 $S/N > 3$ 确定检测限; $S/N > 10$ 确定定量限。

1.2.6 准确度和精密度 在空白阴性试验样品中添加待测药物,对试验方法开展方法学考察。空白样品中添加水平为 1.0, 2.0, 10.0 $\mu\text{g/kg}$ 药物,每个药物水平设 5 个重复,连续测定 3 d,根据检测结果计算待测药物的回收率、日内变异系数和日间变异系数等。

1.2.7 数据处理 使用 MassLynx V4.1 对化合物的定量离子进行数据处理得到样品溶液浓度数据,并使用定性离子进行辅助定性。

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

2.1.1 提取条件 烯丙孕素药物多以与硫酸和葡萄糖醛酸结合形成结合型的轭合物形态存在^[15]。试验采用 β -葡萄糖醛苷酸酶/芳基硫酸酯酶进行酶解,药物检测过程中将其结合态水解成游离形式的化合物进行测定。考虑到提取效率和安全等因素,选用乙腈作为前处理提取试剂。由图 1 可知,10, 15 mL 乙腈对烯丙孕素提取的回收率接近且高于 5 mL 乙腈的,因此采用 10 mL 乙腈提取液对药

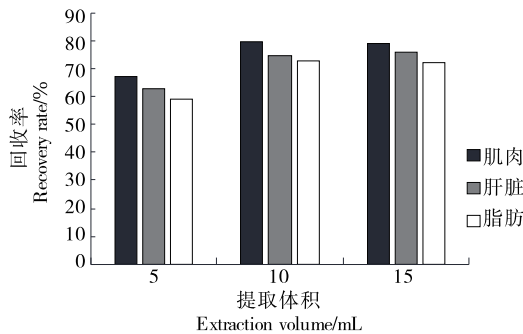


图 1 乙腈提取体积对药物回收率的影响

Figure 1 Effects on sample recovery of acetonitrile extraction volume

物进行提取。

2.1.2 净化方式 待测样品中的杂质主要有蛋白质、脂类物质和一些小分子的极性物质^[16]。蛋白质等大分子杂质、小分子极性物质等在有机溶剂提取药物过程中可以有效去除,脂类等大分子物质可以通过正己烷去除或者在低温冷冻下除脂。而烯丙孕素药物的极性较小,在正己烷中会有一定的溶解性^[17],因此采用低温冷冻去除脂类,使提取液的净化效果能够满足要求^[18]。

由图 2 可知,HLB、C₁₈固相萃取柱需活化,过程较繁琐且对待测物质吸附强,药物损失较大;PRiME HLB 固相萃取柱处理样品方便、简单,不需要活化固相萃取柱,提取液直接流经固相萃取柱后进行浓缩、复溶即可检测,极大提升了样品前处理效率。

2.2 色谱条件优化

激素类药物分离多采用 C₁₈反相色谱柱^[19-20],研究选用柱长为 50 mm,柱内径为 2.1 mm,粒度为 1.7 μm 的色谱柱时,色谱柱对待测组分与干扰杂质间的分离效果能满足检测要求。由图 3 可知,流动相采用乙腈—0.1% 甲酸水进行梯度洗脱时,色谱峰型好,信号响应高,烯丙孕素能有效分离。

2.3 质谱条件优化

试验表明,在负离子模式下直接进样进行测定,采集

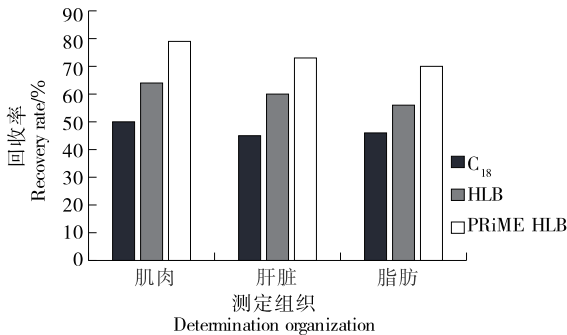
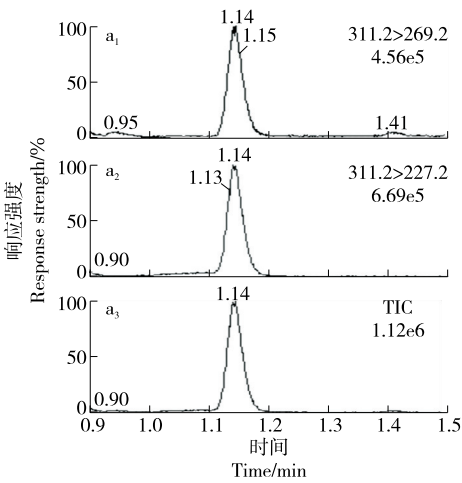


图 2 净化方式对回收率的影响

Figure 2 Effect on recovery of purification methods



a₁、a₂为子离子 MRM 色谱图;a₃为总离子 MRM 色谱图

图 3 烯丙孕素标准溶液离子色谱图

Figure 3 Ion chromatogram of altrenogest standard

到的烯丙孕素母离子信号响应值较低;在正离子模式下直接进样进行测定,烯丙孕素母离子信号响应良好。故试验在酸性条件下进行,采用正离子模式电离检测待测药物。由表 2 可知,全扫描得到的准分子离子峰([M+H]⁺)为 311.2。调节毛细管电压,使其丰度最大,进行二级质谱分析,优化毛细管电压、脱溶剂气流速及碰撞能量,进行子离子扫描,选择响应最高的两个离子碎片为待测药物定量离子和定性离子,最佳质谱参数条件:定量离子对 311.2>227.2,锥孔电压 22 V,碰撞电压 24 V;定性离子对 311.2>269.2,锥孔电压 22 V,碰撞电压 18 V。

2.4 方法学考察

2.4.1 基质效应 试验表明,烯丙孕素在猪可食用性组织中存在较强的基质抑制效应,故采用基质匹配标准溶液来消除基质效应。

2.4.2 线性范围 由表 2 可知,烯丙孕素在 1~50 μg/L 的质量浓度范围内线性良好,相关系数 R² 在 0.99 以上。

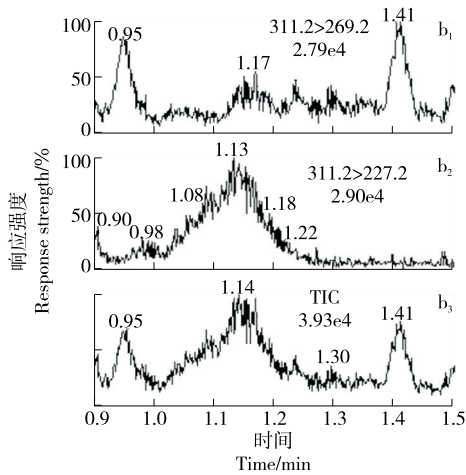
2.4.3 检测方法灵敏度 由图 4 可知,在对应的保留时间内,空白试样中基质对待测药物无明显干扰。

当猪可食性组织中烯丙孕素添加量为 0.5,1.0 μg/kg 时,信噪比>3,当烯丙孕素添加量为 1.0 μg/kg 时,信噪比>10。因此,烯丙孕素检测限(LOD)为 0.5 μg/kg,定量限(LOQ)为 1.0 μg/kg。

表 2 不同基质烯丙孕素线性方程

Table 2 Linear equation of different matrix altrenogest

组织	线性范围/ (μg · L ⁻¹)	线性方程	相关系数 R ²
肌肉	1~50	Y=30 132X+47 967	0.996 9
肝脏	1~50	Y=28 586X+32 100	0.992 6
脂肪	1~50	Y=24 354X+65 103	0.990 6



b₁、b₂为子离子 MRM 色谱图;b₃为总离子 MRM 色谱图

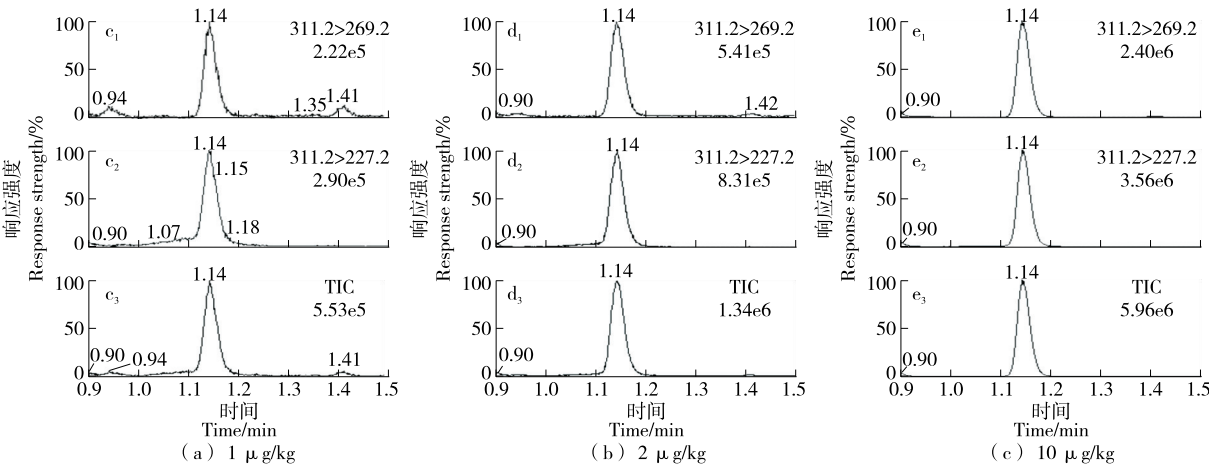
图 4 空白肝脏烯丙孕素离子色谱图

Figure 4 Ion chromatogram of altrenogest in blank liver

表 3 烯丙孕素不同添加量猪可食性组织中的回收率和变异系数

Table 3 Recovery and variation coefficient of altrenogest in pig edible tissue with different levels of allgestrelin ($n=5$)

添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	肌肉				肝脏				脂肪			
	日内		日间		日内		日间		日内		日间	
	回收 率/%	变异系 数/%	回收 率/%	变异系 数/%	回收 率/%	变异系 数/%	回收 率/%	变异系 数/%	回收 率/%	变异系 数/%	回收 率/%	变异系 数/%
1	67.3	6.2	70.2	6.3	71.4	5.5	69.4	5.2	68.1	7.1	68.9	5.7
	75.3	5.3			67.7	3.5			73.1	4.2		
	68.1	4.0			69.2	5.7			65.4	3.3		
2	79.3	3.4	79.5	5.5	77.1	2.6	77.5	2.5	78.5	2.2	75.7	9.7
	74.3	3.0			79.0	0.8			81.8	6.8		
	73.5	2.1			76.4	2.6			66.8	0.9		
10	89.7	0.9	87.4	2.8	86.1	0.8	80.0	11.6	83.2	1.6	78.4	5.5
	87.5	2.2			84.6	3.1			80.5	2.3		
	85.0	2.0			69.3	2.4			74.7	3.4		



c₁、c₂、d₁、d₂、e₁、e₂为子离子 MRM 色谱图;c₃、d₃、e₃为总离子 MRM 色谱图

图 5 烯丙孕素肝脏添加离子色谱图

Figure 5 Ion chromatogram of altrenogest with quality control sample

2.4.4 检测方法准确度和精密度 选取阴性肌肉、肝脏、脂肪样品进行添加回收试验,以肝脏组织为例,烯丙孕素添加离子色谱图如图 5 所示,方法学考察该方法的准确度和精密度。由表 3 可知,3 个添加水平下,平均回收率为 68.9%~87.4%;日内变异系数为 0.8%~7.1%,日间变异系数为 2.5%~11.6%,方法回收率及精密度满足残留检测要求。

3 结论

试验建立了一种快速检测猪肌肉、肝脏、脂肪多种可食性组织中烯丙孕素药物残留检测的高效液相色谱—串联质谱方法。结果表明,试验方法的前处理过程快速准确,净化效果显著且对仪器无污染。该方法线性关系良好,灵敏度高,重现性好,适用于猪肌肉、肝脏、脂肪多种组织中烯丙孕素残留批量快速检测。但试验未对更多的样品中烯丙孕素残留量进行测定,今后可以进一步对各

个环节中样品进行药物含量测定和分析,有利于今后开展畜禽产品中孕激素的风险评估数据积累。

参考文献

- [1] 夏良友, 李士洋, 李宇琛, 等. 烯丙孕素口服液对靶动物猪的安全性研究[J]. 中国兽医杂志, 2017, 51(10): 46-52.
XIA L Y, LI S Y, LI Y C, et al. Study on the safety of altrenogest oral solution to sows[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(10): 46-52.
- [2] ZIECIK A J, KLOS J, PRZYGRÓDZKA E, et al. Aberrant effects of altrenogest and exposure to exogenous gonadotropins on follicular cysts appearance in gilts[J]. Theriogenology, 2017, 89(2): 250-254.
- [3] 杨挺, 付岩, 吴银良. QuEChERS-液相色谱串联质谱法测定猪肝中烯丙孕素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2141-2146.
YANG T, FU Y, WU L Y. Determination of altrenogest residues in swine liver by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(9): 2141-2146.
- [4] VAN LEEUWEN J J J, MARTENS M R T M, JOURQUIN J, et al. Variation in LH pulsatility during 24 h after a postweaning altrenogest treatment in relation to follicle development in primiparous sows[J]. Animal Reproduction Science, 2011, 126(6): 101-107.
- [5] PENG C F, CHEN Y W, CHEN W, et al. Development of a sensitive heterologous ELISA method for analysis of acetylgestagen residues in animal fat[J]. Food Chemistry, 2008, 109(3): 647-653.
- [6] WILLMANN C, BUDIK S, WALTER I, et al. Influences of treatment of early pregnant mares with the progestin altrenogest on embryonic development and gene expression in the endometrium and conceptus[J]. Theriogenology, 2011, 76(7): 61-73.
- [7] ZHONG W, BAO S L, XIAO Y W, et al. Effects of altrenogest on reproductive performance of gilts and sows: A meta-analysis[J]. Animal Reproduction Science, 2018, 197(10): 10-21.
- [8] 张彩云, 赵兴鑫, 东贤, 等. 浅谈兽药残留对人体的危害[J]. 今日畜牧兽医, 2021, 37(11): 1-9.
ZHANG C Y, ZHAO X X, DONG X, et al. Discussion on the harm of veterinary drug residue to human body [J]. Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021, 37(11): 1-9.
- [9] 李涛, 杨潇, 孙桂芳, 等. QuEChERS-UPLC-Q/Orbitrap MS 法快速测定草鱼中 14 种糖皮质激素类药物残留[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 100-104.
LI T, YANG X, SUN G F, et al. Rapid determination of 14 glucocorticoids in grass carp using QuEChERS coupled with UPLC-Q/Orbitrap MS[J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 100-104.
- [10] 韩智, 龚丽, 王会霞, 等. UPLC-MS/MS 同时测定保健食品中洛伐他汀及其类似物[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 58-60.
HAN Z, GONG L, WANG H X, et al. Simultaneous UPLC-MS/MS analysis of lovastatin and its analogue for functional foods[J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 58-60.
- [11] LOZANO A, HERNANDEZ M D, UCLÉS S, et al. Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products [J]. Food Chem, 2019, 274(15): 61-70.
- [12] IMPENS S, COURTHEYN D, WASCH K D, et al. Faster analysis of anabolic steroids in kidney fat by downscaling the sample size and using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483(1): 269-280.
- [13] MORTENSEN S K, PEDERSEN M. Confirmatory analysis of acetylgestagens in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1/2): 217-222.
- [14] 李建, 倪香艳, 孙志文, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法检测猪肌肉组织中烯丙孕素残留[J]. 分析仪器, 2018(4): 57-62.
LI J, NI X Y, SUN Z W, et al. Determination of altrenogest in pork muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical Instrumentation, 2018(4): 57-62.
- [15] LOHMUS M, KENDER T. Determination of gestagens in kidney fat by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Aoac International, 2007, 586(1/2): 233-238.
- [16] 孙利东, 许秀丽, 袁飞, 等. 高效液相色谱—串联质谱法测定牛奶和鸡肉中 4 种激素本底值[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 291-297.
SUN L D, XU X L, YUAN F, et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of background values of 4 hormones in milk and chicken[J]. Food Science, 2017, 38(22): 291-297.
- [17] 方秋华, 黄显会, 郭春娜, 等. 高效液相色谱—串联质谱法检测羊奶中乙酰孕激素多残留研究[J]. 分析测试学报, 2018, 31(10): 1314-1318.
FANG Q H, HUANG X H, GUO C N, et al. Determination of acetylgestagens in ovine milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(10): 1314-1318.
- [18] SEO J, KIM H Y, CHUNG B C, 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]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067(1/2): 303-309.
- [19] 张念英, 嵇欢欢, 郭冰, 等. 畜禽肉及鸡蛋等动物源性食品中 44 种兽药残留检测超高效液相色谱—串联质谱法[J]. 农产品加工, 2018, 12(23): 57-59.
ZHANG N Y, ZHUO H H, GUO B, et al. Simultaneous determination of 44 veterinary drug residues of in animal products such as livestock and poultry meat and eggs ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Farm Products Processing, 2018, 12(23): 57-59.
- [20] 怀文辉, 李建, 倪香艳, 等. 液相色谱—串联质谱法检测猪肉中 20 种违禁药物残留的研究[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(11): 59-67.
HUA W H, LI J, NI X Y, et al. Multi-class residue analysis of 20 illicit drugs in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(11): 59-67.