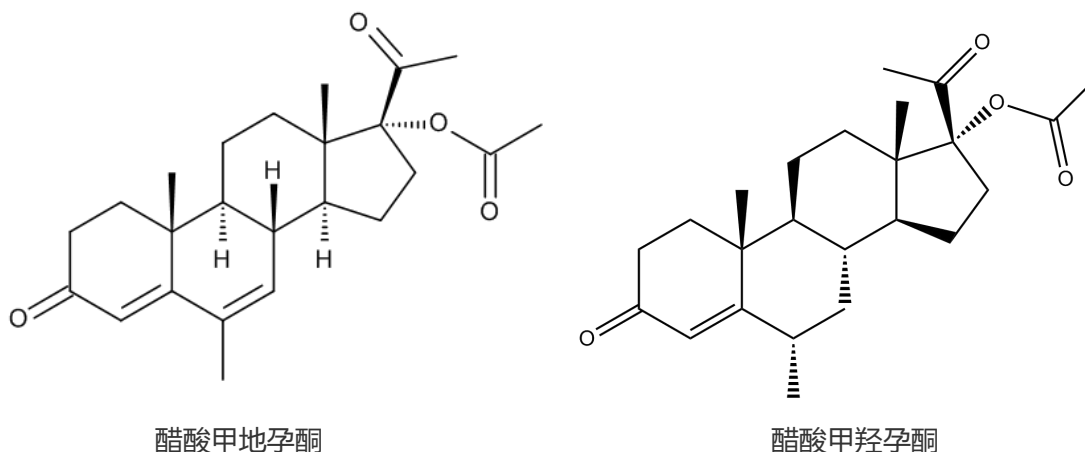


动物组织中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的残留检测

背景

醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮都为孕激素类药物，两者都可用于女性避孕或者治疗痛经、子宫内膜异位症等疾病。在畜牧业中，这两种药物也可以用作动物生长促进剂，目的是提高饲料转化率，减少成本。但是药物成分会残留在动物肌肉和组织中，经过人体食用并且长期累积后，会造成女性的内分泌紊乱，男性性功能衰退。2004年欧盟在一些成员国的猪饲料和一些软饮料里发现了禁用的激素醋酸甲羟孕酮，这是继疯牛病、口蹄疫和二噁英之后，又一次引发的食品安全危机。因此我国《动物性食品中兽药最高残留限量》明确规定，这两个成分在动物性食品中不得检出。国家近年来陆续发布了相关标准进行测定，如GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》对动物源性食品中的激素进行多残留检测，因该标准是在特定背景下推出，标准推出时间仓促，涉及范围太广，采用双柱联合的方式回收率不甚理想。2019年推出的GB 31660.4-2019《动物性食品中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，特别对这两个孕激素进行了残留检测，用的是混合模式强阳离子交换进行前处理，并采用醋酸甲地孕酮对应的氘代同位素内标物醋酸甲地孕酮-D3作为内标，进行定量计算，可以很好地消除在提取净化过程中带来的干扰和损失，保证了测定回收率。



适用范围

本方法（参考 GB 31660.4-2019）适用于猪、牛、羊肌肉、脂肪、肝脏、肾脏和牛奶中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的检测。

实验步骤

1、试剂准备

甲醇（ CH_3OH ）、乙腈（ CH_3CN ）、甲酸（ HCOOH ）、乙酸乙酯（ $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ）、正己烷（ C_6H_{14} ）、乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）、 β -盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶。

1.1、溶液配制

80%乙腈水溶液：准确量取 800 mL 乙腈和 200 mL 水，超声震荡摇匀；

50%甲醇水溶液：准确量取 50 mL 的甲醇，倒入 100 mL 的容量瓶中，用水溶液定容至刻度，摇匀；

30%甲醇水溶液：准确量取 30 mL 的甲醇，倒入 100 mL 的容量瓶中，用水溶液定容至刻度，摇匀；

0.2 mol/L 乙酸铵水溶液: 称取 15.4 g 乙酸铵, 用 900 mL 水溶解, 用乙酸调节 pH=5.2 后加水定容至 1000 mL;

0.1%甲酸水: 取 1 mL 的甲酸加入 1000 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀。

2、样品提取

2.1 样品酶解

取试样 2 g(准确到±20 mg), 于 50 mL 离心管中, 加氘代醋酸甲地孕酮内标工作液 40 μL, 加 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液 4 mL, 涡旋混匀后加入β-盐酸葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 40 μL, 于 37 °C 下避光水浴低速振荡, 酶解 12 h。

2.1.1 肌肉、肝脏、肾脏组织

试样经酶解后, 加乙酸乙酯 10 mL, 于旋涡振荡器上剧烈振荡 10 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液至梨形瓶中。残渣加乙酸乙酯 10 mL 重复提取 1 次, 合并上清液, 50 °C 旋转蒸发至干。加乙腈 10 mL、正己烷 5 mL 使溶解, 转至 50 mL 离心管中, 低速涡旋 10 s, 3000 r/min 离心 2 min, 弃正己烷层, 下层液于 50 °C 旋转蒸发至干, 加 30%甲醇水溶液 3 mL, 溶解, 备用。

2.1.2 脂肪组织

试样经酶解后, 加乙腈 10 mL, 于旋涡振荡器上剧烈振荡 0.5 min, 50 °C 超声提取 10 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液移至另一 50 mL 离心管中。残渣加乙腈 10 mL 重复提取 1 次。合并上清液, 加正己烷 4 mL, 低速涡旋 10 s, 3000 r/min 离心 2 min, 弃正己烷层。加正己烷 4 mL, 再次除脂。下层 50 °C 旋转蒸发至干, 加入 30%甲醇水溶液 3 mL 溶解, 备用。

3、净化

SPE 柱: SelectCore MCX 固相萃取柱 (60mg/3mL)

活化: 依次用 3 mL 的甲醇和水活化;

上样: 加入提取好的全部上清液;

淋洗: 依次用水、50%甲醇溶液各 3 mL 进行淋洗, 淋洗结束后再减压抽干;

洗脱: 用 5 mL 甲醇溶液进行洗脱, 洗脱液在 50 °C 下用氮气吹干, 用 0.2 mL 乙腈 (80%) -0.1%甲酸溶液复溶后过 0.22 μm 有机滤膜, 上机。

4、液相色谱仪器条件

Column: ChromCore C18 1.8μm

Dimension: 2.1×50mm

Mobile phase: A) 0.1% Formic acid in D.I. Water (0.1%甲酸水溶液)

B) Acetonitrile (乙腈)

Gradient:

t (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	80	20
2	0.4	0	100
4.5	0.4	0	100
4.6	0.4	80	20
8	0.4	80	20

Temperature: 30 °C

Injection: 2 μL

5、质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 (Electrospray ionization, ESI) 负离子扫描

监测方式: 多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM)

电喷雾电压: 4000 V

干燥气: N₂ (11 L/min, 300 °C)

雾化气压力: 45 psi

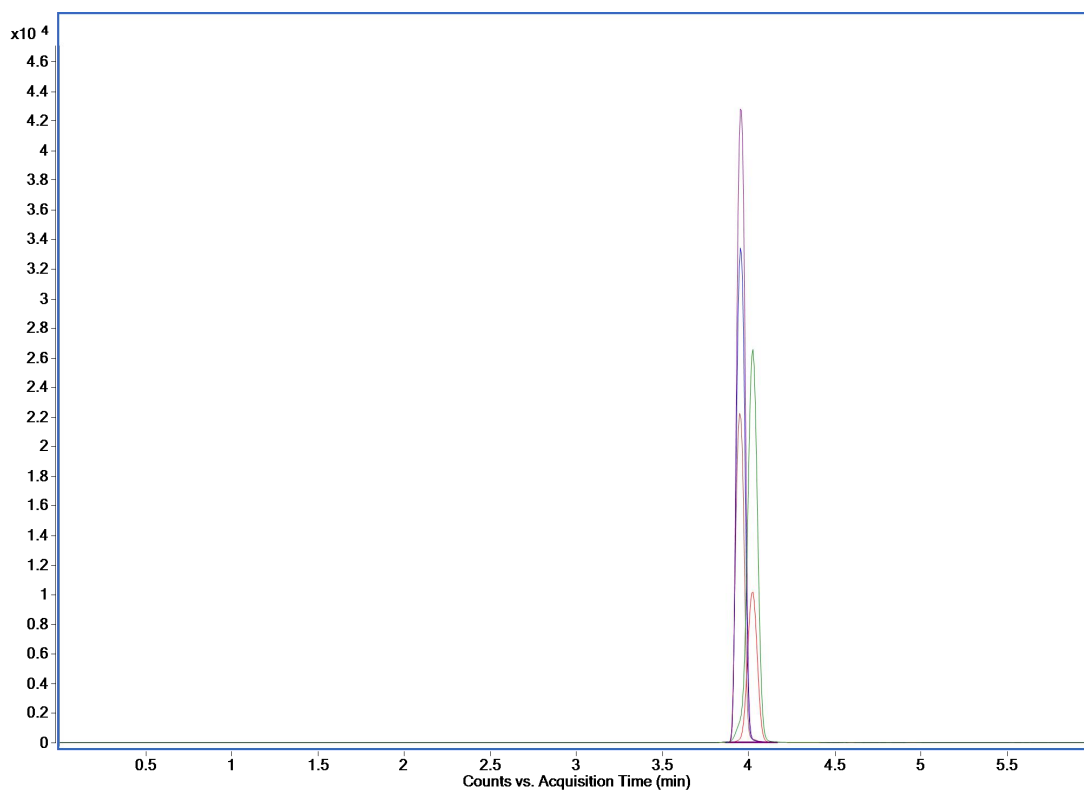


图 1: 50 ng/mL 醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮标准溶液的多重反应监测 (MRM) 色谱图

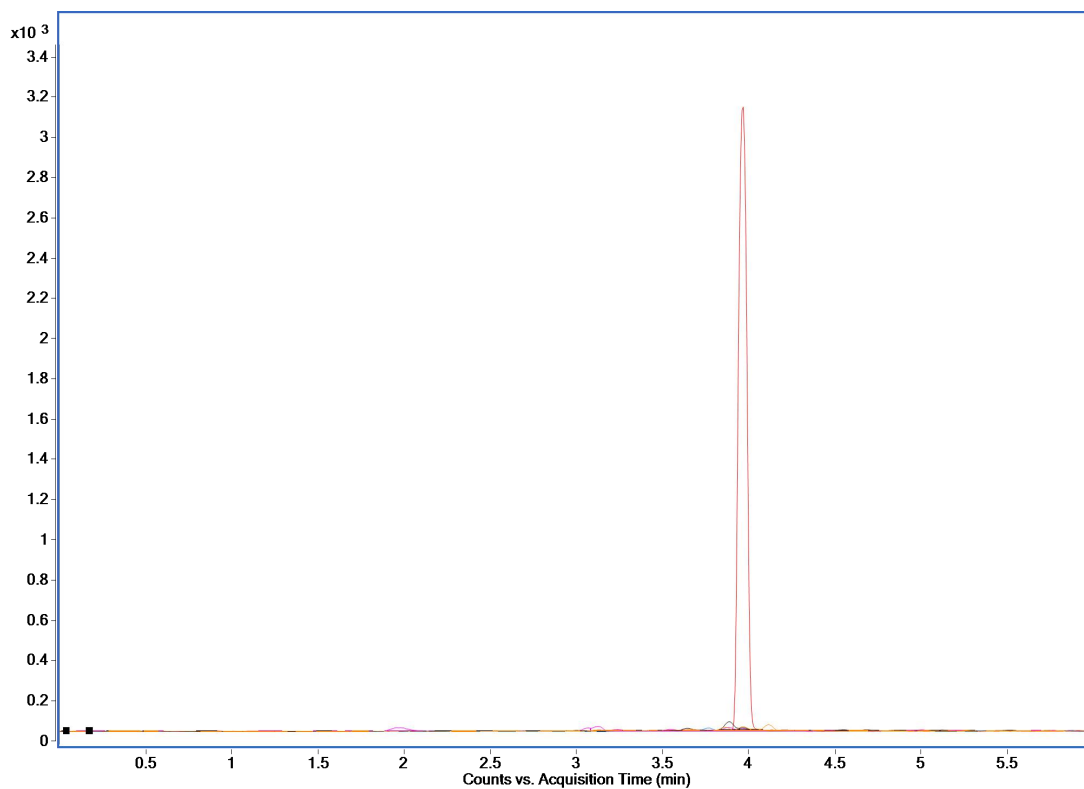


图 2：猪肉空白样品里的醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的多重反应监测（MRM）色谱图

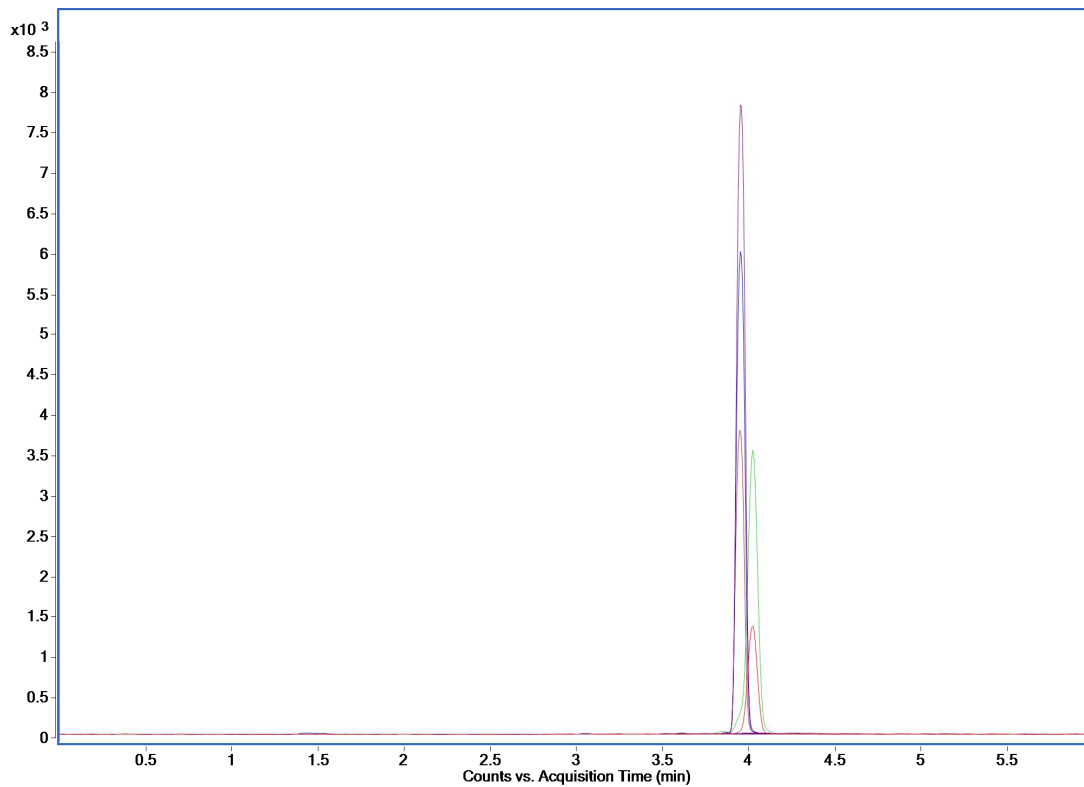


图 3：猪肉样品中添加量为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的多重反应监测（MRM）色谱图

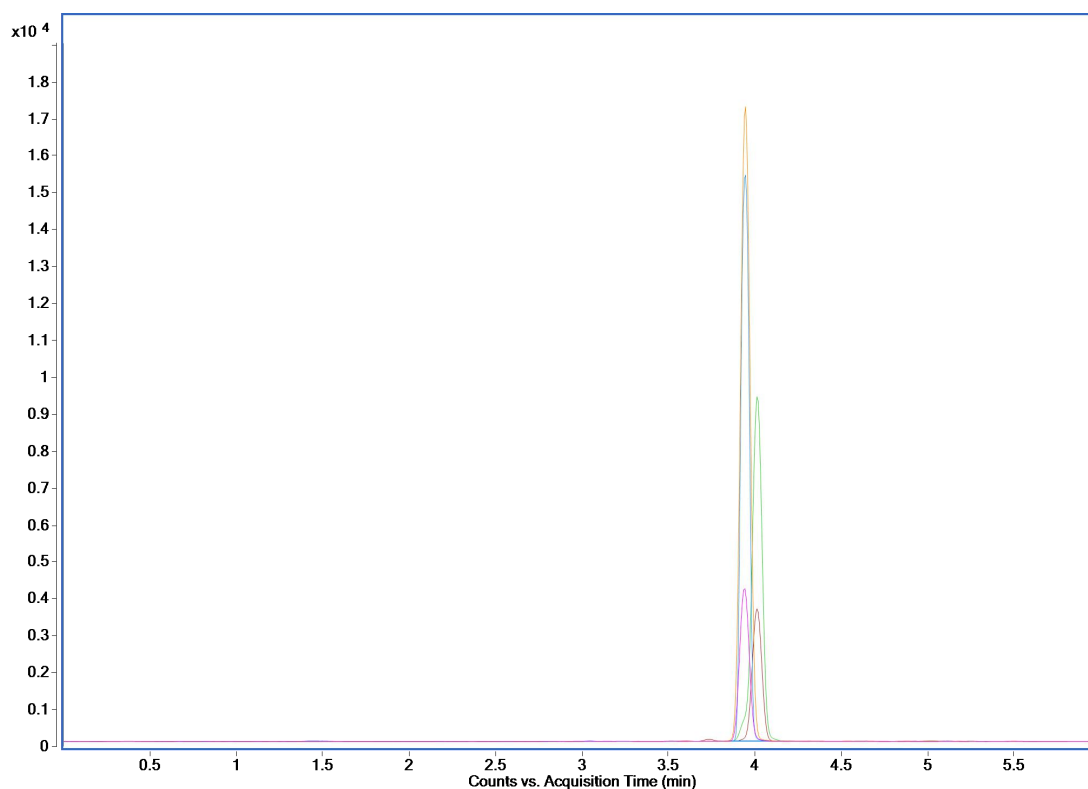


图 4: 猪肉样品中添加量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的多重反应监测 (MRM) 色谱图

样品加标回收率实验结果

化合物 (中文)	化合物 (英文)	加标量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率% n=6	保留时间 (min)
醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate	5	104.5%	3.952
醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone acetate	5	90.1%	4.025
醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate	10	107.9%	3.952
醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone acetate	10	92.1%	4.025

6、实验讨论

醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮属脂溶性化合物，难溶于水，易溶于有机溶剂，特别是在乙酸乙酯、氯仿、乙腈、二氯甲烷等有机溶剂中有较高的溶解度。本方法采用乙腈作为提取溶剂，提取液使用正己烷进行脱脂，过混合模式的强阳离子交换固相萃取柱，甲醇洗脱后氮气吹干，流动相复溶后过滤上液相色谱/串联质谱仪测定，试验发现该方法简便、快速、干扰少，是一种理想的检测方法。

7、实验结论

由实验图谱和数据可得，选择纳谱分析的 SelectCore MCX 60mg/3mL 固相萃取柱和 ChromCore C18

1.8 μm , 2.1 \times 50mm, 不同加标量的两组实验回收率高于 90%, 且目标物质出峰时间快, 峰形好, 符合国标检测要求。

