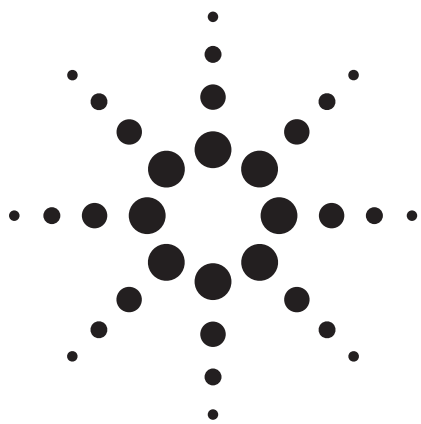




液相色谱/质谱/质谱方法测定牛尿中的 20-羟基 蜕皮酮及代谢物

用于家畜可能的滥用药物控制

应用报告

食品安全

作者

Blandine Destrez, Gaud Pinel, Fabrice
Monteau, and Bruno Le Bizec
Laboratoire d'Etude des Résidus
et Contaminants dans les Aliments
(LABERCA), Ecole Nationale Vétérinaire
de Nantes (ENVN),
BP 50707, 44307 NANTES, Cedex 3,
France

摘要

蜕化类固醇(Ecdysteroids), 是存在于无脊椎动物和植物中的甾体激素, 它可能被用于饲料中的蛋白同化制剂。蜕化类固醇的滥用控制依赖于生物基质样品中微量 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 激素有效检测方法的建立。本文介绍了双固相萃取柱(C_{18} 和 SiOH)前处理和液相/电喷雾-质谱/质谱技术测定尿样中 20-羟基-蜕化素及代谢物的分析方法。串联质谱的高灵敏度和特异性特别适合内标样品和阳性样品中的痕量激素成份。所有被检测的化合物, 在 0.12 ng 至 12 ng 柱上量范围内, 具有良好的线性。



Agilent Technologies

前言

蜕化类固醇(Ecdysteroids),是存在于无脊椎动物(主要是节肢动物)和植物(菊科植物,石竹科及水龙骨科)中的甾体激素。对于菊科植物,蜕化类固醇的作用是脱毛,而这些分子被认为是保护植物防止非适应性的食素昆虫的侵袭。原型蜕化类固醇是20-羟基蜕化素。几项表明它对动物(鼠、猫和日本鹌鹑)包括禽畜和人具有促生长作用^[1-3]。临床研究表明20-羟基-蜕化素比美雄酮(methandrostanolone)具有更强的蛋白同化作用,而且传统激素的雄化或其它副作用^[4]。然而,尽管它们具有生长促进作用,但是只有少数的方法用于生物样品中20-羟基-蜕化素的检测,而且对于其代谢物在禽畜中的有关信息没有报道^[5]。在本应用中,建立了一种可以定性和定量牛尿中痕量水平(ppb)20-羟基-蜕化素及代谢物的分析方法^[6]。此方法可以用于牛服用20-羟基-蜕化素之后,在牛尿样品中20-羟基-蜕化素的含量及药物在体内去除的动力学的研究。

实验部分

Compound Standards

22S-23S-高油菜素内酯(属于油菜素类固醇,一种蔬菜类固醇),购自Sigma-Aldrich;20-羟基蜕化素、14-去羟基、20-羟基蜕化素、20,26-二羟基蜕化素来自Lafont教授的友好支持。

样品前处理

25毫克的22S,23S-高油菜素内酯作为内标物(IS),加入到牛尿样品中,在3500转下离心15分钟,然后用C18固相萃取柱净化。固相萃取柱分别用10毫升甲醇、10毫升水活化,然后上样。分别用6毫升水/甲醇(80/20)淋洗固相萃取柱,蜕化类固醇用10毫升甲醇被洗脱出来。被收集的洗脱液在氮气流下吹干。用50微升乙醇和150微升环己烷溶解。然后用SiOH固相萃取柱进行进一步净化(之前用25毫升环己烷活化)。用6毫升乙酸乙酯/环己烷(80/20),目标化合物用10毫升氯仿/甲醇/丙酮(6/2/1)洗脱出来。洗脱液用氮气吹干,再溶于50微升甲醇/0.5%醋酸水溶液(30/70)。10微升样品进入液质联用仪。

仪器

液相色谱:

色谱柱:

GEMINI C₁₈, Phenomenex
(3 μm, 110 Å, 50 × 2 mm)/Agilent
equivalent: ZORBAX Extend-C18 3.5 μm,
2.1 mm × 50 mm (p/n 735700-902)

柱温: 40 °C

流动相:

A: MeOH

B: 0.5% 醋酸水溶液

流速: 0.3 mL/min

梯度:

Time (min)	%B
0	90
8	0
10	0
12	90
16	90

进样量: 10 μL

质谱: G 6410A QQQ, Agilent Technologies

离子化模式: ESI (+)

碰撞电压: 120 V

质量范围: 100–500 amu

驻留时间: 300 ms

毛细管电压: 4000 V

雾化器压力: 35 psi

干燥气流速: 11 L/min

干燥气温度: 325 °C

每个目标化合物的多反应参数见表1。第一个离子是响应最强的离子。

结果与讨论

根据在实验部分描述的液质联用分析条件分析标准溶液,以获得20-羟基蜕化素、代谢物1、代谢物2和内标,相当于每个化合物的柱上进样量为5毫克(图1)。所有的组分都10分钟内流出,其色谱峰形和分离度都很好。

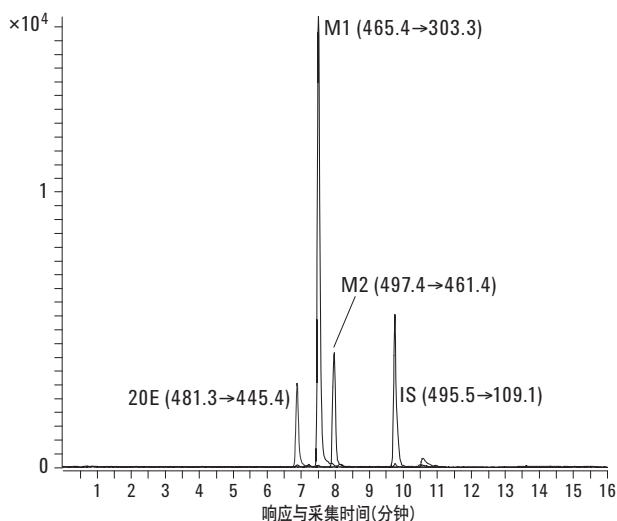


图1. 20-羟基蜕化素及代谢物最强离子的提取离子流图

表 1. 20-羟基蜕化素及代谢物的多反应监测的参数

被分析化合物	Transition 1	碰撞能量 (eV)	Transition 2	碰撞能量 (eV)	Transition 3	碰撞能量 (eV)	保留时间 (min ± 0.2)
22S,23S-homobrassinolide (IS)	495.5→109.1	20	495.5→127.1	10	495.5→459.1	5	9.8
20-羟基蜕化素	481.3→445.4	10	481.3→371.4	10	481.3→165.1	20	7.5
14-去羟基, 20-羟基蜕化素(M1)	465.4→303.3	20	465.4→285.3	25	—	—	7.9
20,26-二羟基蜕化素(M2)	497.3→461.4	5	497.3→351.1	15	497.3→371.2	20	6.8

为了评价方法的特定性, 空白尿样添加 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 20-羟基蜕化素。图 2 显示了空白样品的分析结果, 在 20E 的位置没有任何干扰峰, 表明分析方法具有优异的选择性。使用多反应监测模式分析添加 20-羟基蜕化素的样品。结果表明本方法具有优异的灵敏度和很好的信噪比。分析结果完全满足欧盟 2002/657 的要求, 此欧盟要求要求更多的鉴定点以提高确定度^[7]。

利用添加五个不同浓度 (0.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的尿样进行线性和重现性的评价。校正曲线的线性回归系数优于(R^2)0.99, 结果显示 20-羟基蜕化素具有优异的线性。

本方法成功地用于牛在服用 20-羟基蜕化素之后的尿中的激素的浓度水平, 一共分析了四天的样品。在服药 30 分钟之后就检测到尿中含有 20-羟基蜕皮酮, 而且浓度水平在 24 小时内持续上升。20-羟基蜕化素有两个代谢物, 分别是 14-去羟基、20 羟基蜕皮酮 (M1) 和 20, 26-二羟基蜕皮酮 (M2)^[8]。表 1 中是 LC/MS/MS 分析两个代谢物的参数。图 3 是 14-去羟基、20 羟基蜕皮酮 (M1) 在服药之前和两天之后的尿样的分析结果。

结果表明, 服药之前没有检测出 M1, 服药之后的四天还可以检测出 M1。根据四个鉴定点的分析原则, 在服药两天之后, 还依然可以检测 M1。由于在服药后可以长期检测出 M1, 因此可以监测蜕化类固醇的误用或滥用。

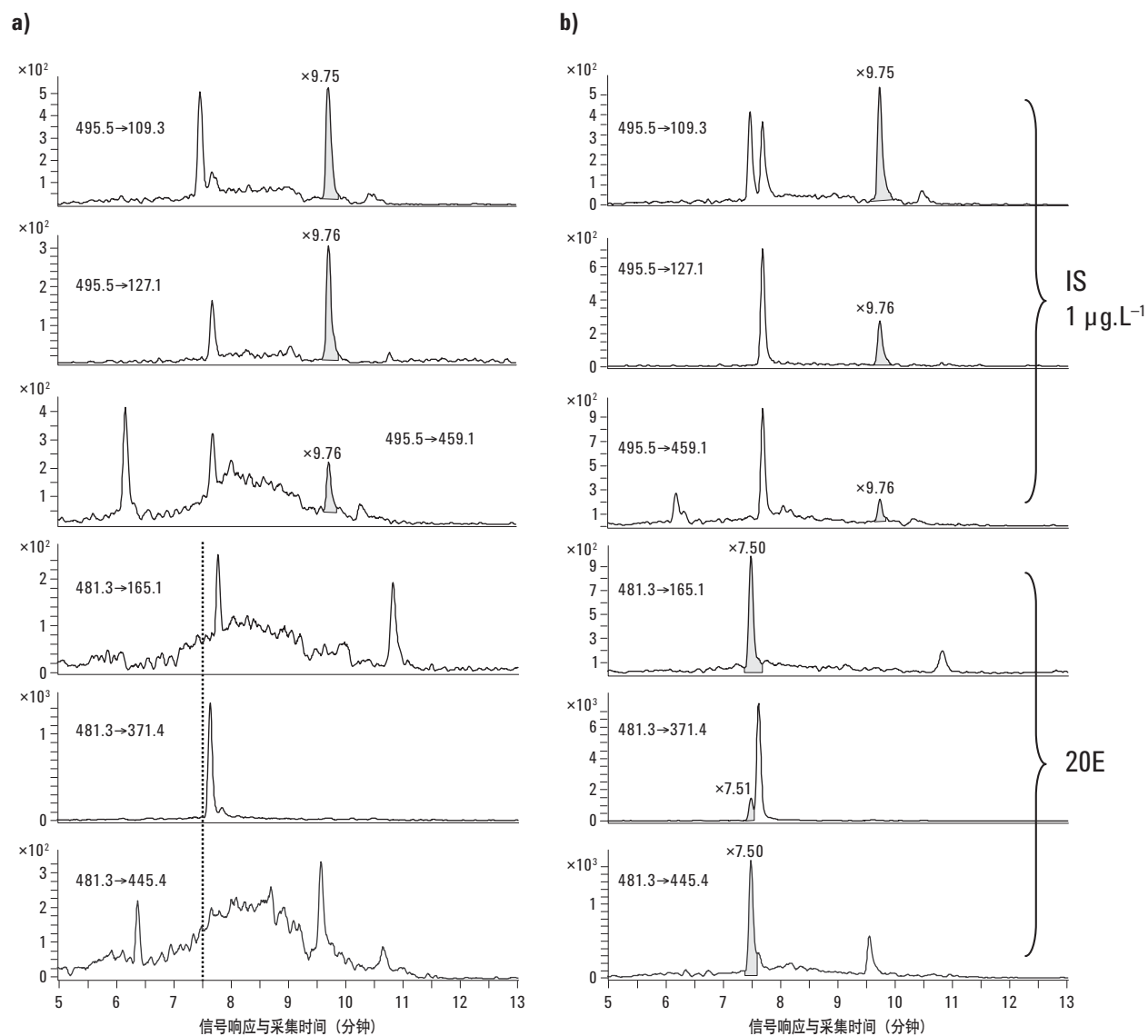


图2. 选择离子监测的离子流图 a) 空白尿样和 b) 标样添加样品 ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$). LC-(ESI+)-MS/MS

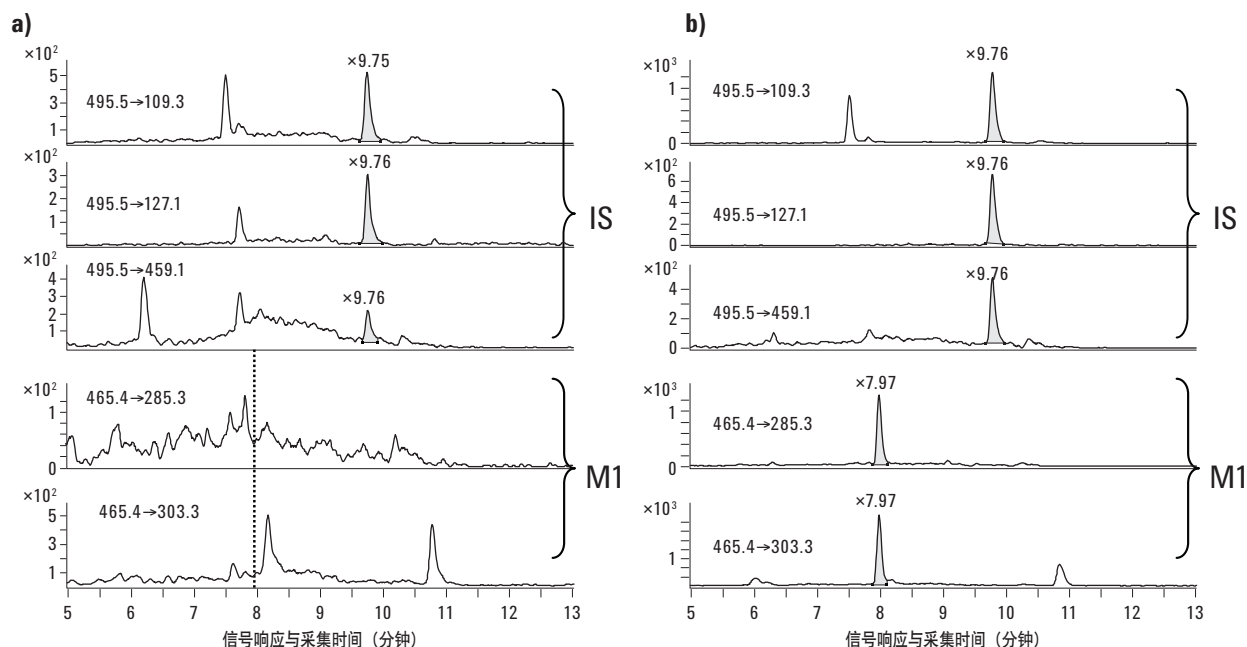


图 3. 尿样中内标和 M1 的多反应提取离子流图 a) 服用药物之前 b) 服用药物两天之后

结论

本方法的分析结果表明液相色谱/质谱/质谱技术是能够有效验证尿样中 20-羟基蜕化素及两个代谢物。这些化合物可以被用于动物是否发生 20-羟基蜕化素的误用或滥用的监测和控制。串联四极杆液质联用仪的多反应监测功能大大提高化合物的定量和确认可信度，完全满足欧盟 2002/657/EC 决议的规定。牛尿样品的成功检测建立了可靠的分析操作流程。本方法学也可以用于牛尿中 20-羟基蜕化素主要代谢物的一级消除动力学研究。

参考文献

1. W. J. Burdette and R. C. Richards, "Alteration of the Growth of Mammalian Cells In Vitro by Ecdysone Extract," *Nature*, 189, 666-668, (1961)
2. V. N. Syrov and A. G. Kurmukov, "On the Anabolic Activity of the Phytoecdysone-Ecdysterone Isolated from *Rhaponticum carthamoides*," *Farmakologiya i Toksikologiya*, 39(6), 690—693, (1976)
3. K. Slama, K. Koudela, J. Tenora, and A. Mathova, "Insect Hormones in Vertebrates: Anabolic Effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese Quail," *Experientia*, 52 (7): 702—6, (1996)
4. N. S. Chermnykh, N. L. Shimanovskii, G. V. Shutko and V. N. Syrov, "The Action of Methandrostenolone and Ecdysterone on the Physical Endurance of Animals and on Protein Metabolism in the Skeletal Muscles," *Farmakologiya i Toksikologiya*, 51, 57—60, (1988)
5. B. Le Bizec, J. P. Antignac, F. Monteau, and F. Andre, "Ecdysteroids: One Potential New Anabolic Family in Breeding Animals," *Analytica Chimica Acta*, 473, 89—97, (2002)

6. B. Destrez, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, R. Lafont, and B. Le Bizec, "Detection of 20-Hydroxyecdysone in Calf Urine by Comparative LC-HRMS and LC-MS/MS Measurements, Application to the Control of Their Potential Misuse," Rapid Com. Mass Spectrom., submitted 2008
7. Commission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, Off. J. Eur. Commun. 2002/657/EC, 2002
8. B. Destrez, G. Pinel, F. Monteau, R. Lafont, and B. Le Bizec, "Detection and Identification of 20-Hydroxyecdysone Metabolites in Calf Urine by LC-HRMSn Measurements and Establishment of Their Kinetics of Elimination After 20E Administration," Anal. Chim. Acta, submitted June 2008

更多信息

想了解有关产品和服务的更多的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn 或者联系 Lea Bonnington, 安捷伦科技有限公司, 德国。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误, 以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技版权所有, 2008 年
中国印刷
2008 年 9 月 9 日
5989-8879CHCN



Agilent Technologies