

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定奶粉中的糖皮质激素

LCMSMS-006

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用快速测定奶粉中的糖皮质激素的方法。样品经提取后，用超高效液相色谱LC-30A分离，三重四极杆质谱仪LCMS-8030进行定量分析。7种样品在2分钟内得到快速分离和检测。7种样品在0.5 ~ 40 µg/L浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在0.999以上；对2 µg/L、10 µg/L和40 µg/L混合标准溶液进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在3.860%和0.583%以下，系统精密度良好；对于奶粉中的波尼松、波尼松龙、氢化可的松、地塞米松、倍氯米松和甲基波尼松，方法定量限为0.4 µg/kg；对于乙酸氟氢可的松方法定量限为1.0 µg/kg。

关键词： 糖皮质激素 奶粉 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

糖皮质激素(Glucocorticoid)，学名叫做“肾上腺皮质激素”，是由肾上腺皮质分泌的一类甾体激素，具有调节糖、脂肪、蛋白质的生物合成和代谢的作用，还具有抗炎作用，可用于一般的抗生素或消炎药所不及的病症，如SARS、败血症等。称其为“糖皮质激素”是因为其调节糖类代谢的活性最早为人们所认识。最近在国内发生的奶粉疑致“婴儿性早熟”事件成为继2008年三聚氰胺以来乳制品行业又一热点食品安全事件。2002年我国农业部第235号公告中已经禁止使用群勃龙等化学合成类激素物质，并规定在动物性食品中不得检出。同时欧盟第96/22/EC指令、美国食品药品监督管理局(FDA)、日本肯定列表也禁止在动物源性食品中使用激素类药物。本文根据《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》，使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用，建立了快速准确测定奶粉中糖皮质激素的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A与三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用系统。具体配置为LC-30AD×2输液泵，DGU-20A5在线脱气机，SIL-30

AC自动进样器，CTO-30AC柱温箱，CBM-20A系统控制器，LCMS-8030三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D.×50 mm L., 1.6 µm

流动相：， A - 0.1%甲酸水；B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 µL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为60%，时间程序见表1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	70
2.01	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.51	Pumps	Pump B Conc.	60
3.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8030

离子源: ESI(-)

离子源接口电压: -3.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氦气

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 10 ms

延迟时间: 3 ms

MRM参数: 见表2

表2 MRM参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	波尼松	403.15	327.20	14.0	15.0	21.0
			357.20 *	14.0	10.0	25.0
2	波尼松龙	405.20	329.15	14.0	20.0	22.0
			359.25 *	14.0	15.0	24.0
3	氢化可的松	407.20	331.20	15.0	20.0	22.0
			361.15 *	15.0	10.0	25.0
4	地塞米松	437.20	361.20	16.0	20.0	23.0
			391.25 *	16.0	15.0	27.0
5	倍氯米松	453.20	377.15	10.0	15.0	25.0
			407.15 *	10.0	15.0	28.0
6	乙酸氟氢可的松	467.25	421.25	17.0	15.0	28.0
			349.20 *	17.0	25.0	24.0
7	甲基波尼松	419.30	343.15	15.0	16.0	23.0
			294.50 *	15.0	44.0	29.0

*表示定性离子

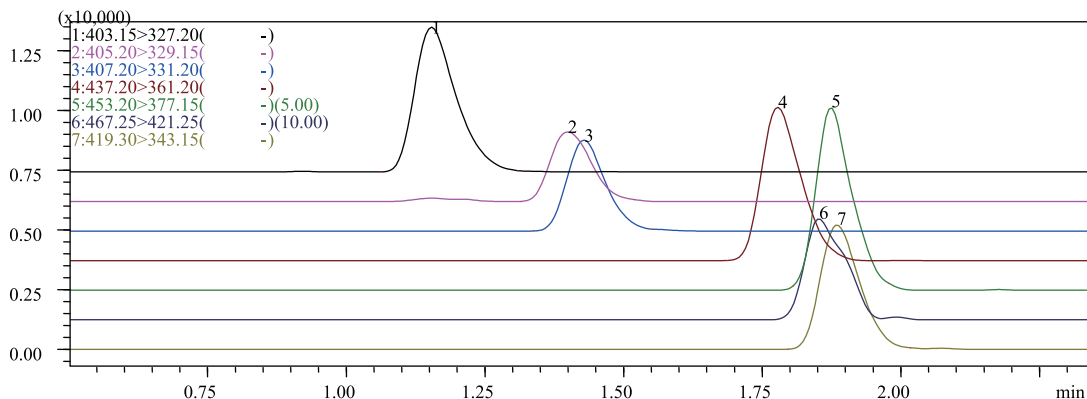
1.3 样品制备

标准溶液配制: 用乙腈配制100 µg/L的混合标准中间溶液, 用50%乙腈水稀释成浓度为0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40 µg/L的标准工作液。

样品前处理方法: 同国标《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》。

结果讨论

2.1 标准样品的MRM色谱图



(1: 波尼松; 2: 波尼松龙; 3: 氢化可的松; 4: 地塞米松; 5: 倍氯米松; 6: 乙酸氟氢可的松; 7: 甲基波尼松)

图1 10 µg/L标准样品的MRM色谱图

2.2 线性关系

将浓度为0.5, 1.0, 2.0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按1.2中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图2~8所示; 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表3。

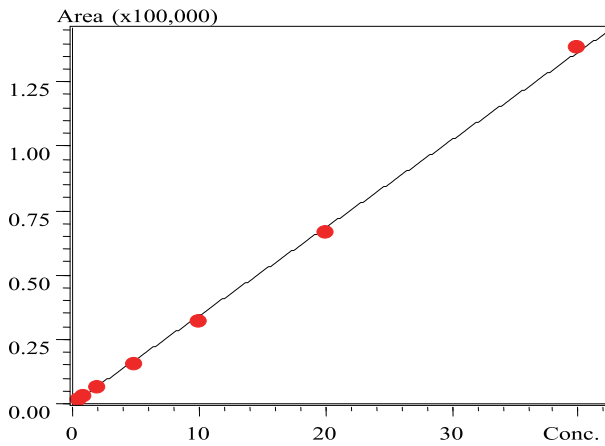


图2 波尼松的标准工作曲线

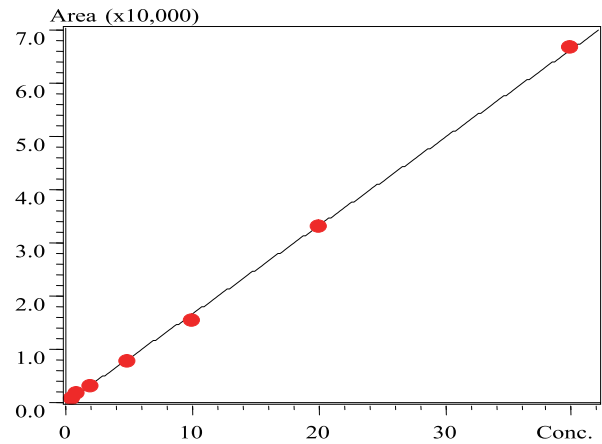


图3 波尼松龙的标准工作曲线

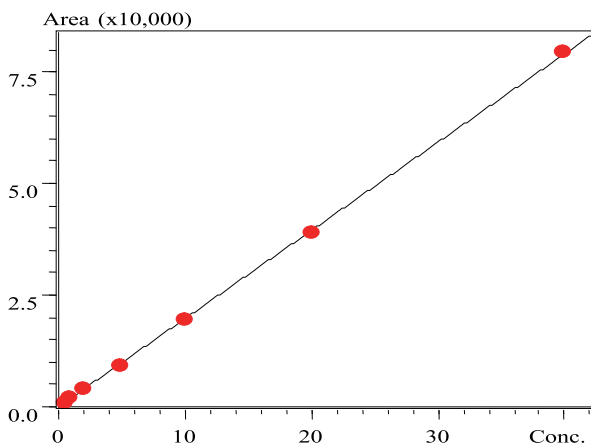


图4 氢化可的松的标准工作曲线

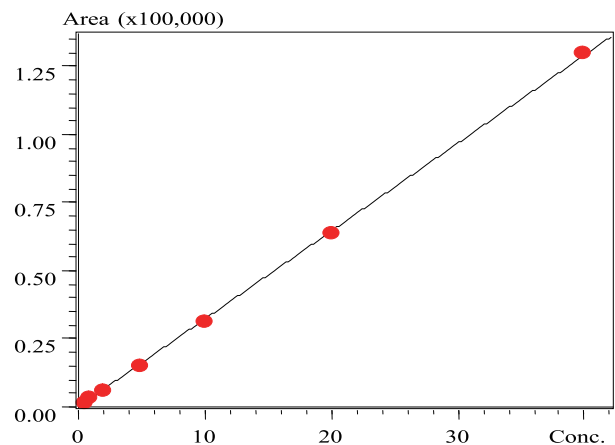


图5 地塞米松的标准工作曲线

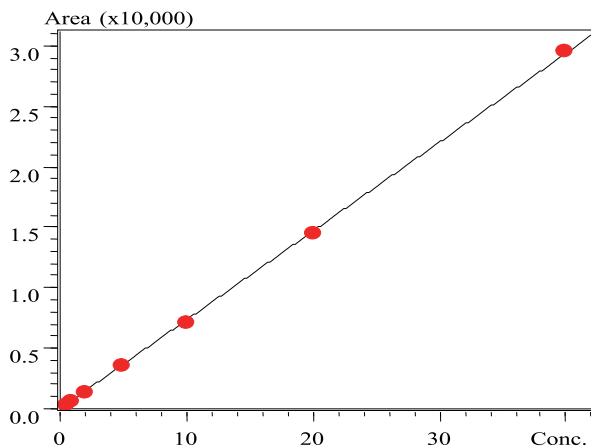


图6 倍氯米松的标准工作曲线

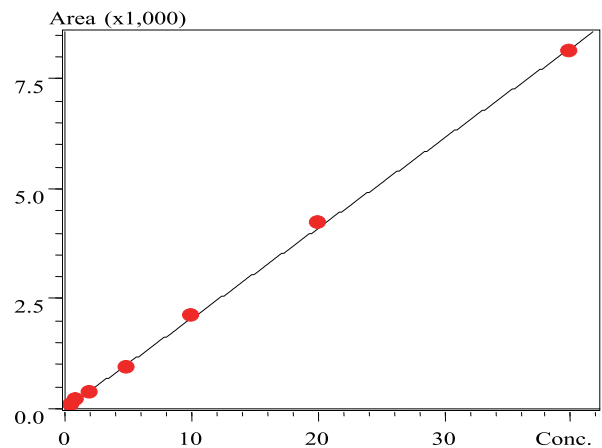


图7 乙酸氟氢可的松的标准工作曲线

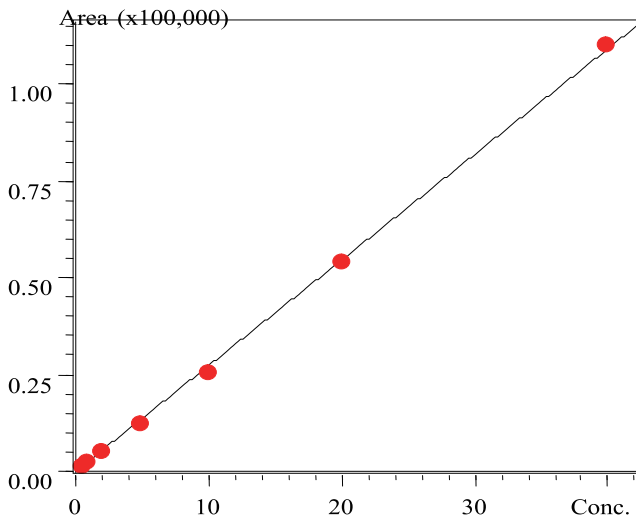


图8 甲基波尼松的标准工作曲线

表3 7种糖皮质激素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r
1	波尼松	$Y = (3416.53)X + (0)$	0.9996
2	波尼松龙	$Y = (1657.36)X + (0)$	0.9998
3	氢化可的松	$Y = (1975.28)X + (0)$	0.9998
4	地塞米松	$Y = (3228.82)X + (0)$	0.9999
5	倍氯米松	$Y = (734.315)X + (0)$	0.9999
6	乙酸氟氢可的松	$Y = (205.149)X + (0)$	0.9996
7	甲基波尼松	$Y = (2729.61)X + (0)$	0.9998

2.3 精密度实验

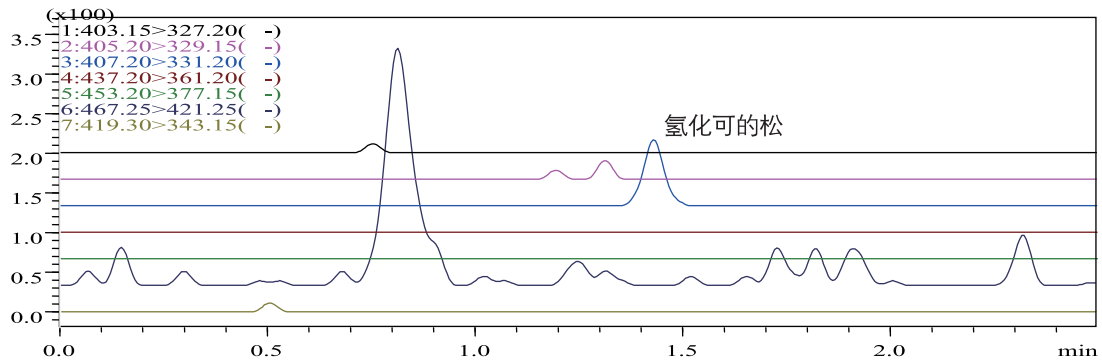
对2、10、40 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液连续测定6次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重现性结果如表4所示。结果显示：3个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在1.496 %~3.860 %和0.102 %~0.583 %之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重现性结果(n=6)

样品名称	RSD% (2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (40 $\mu\text{g/L}$)	
	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T
波尼松	2.699	0.426	1.615	0.140	1.496	0.209
波尼松龙	2.652	0.535	1.932	0.105	2.389	0.130
氢化可的松	3.317	0.183	2.619	0.204	2.028	0.130
地塞米松	2.343	0.224	2.404	0.030	2.646	0.115
倍氯米松	3.826	0.139	2.509	0.137	3.704	0.154
乙酸氟氢可的松	3.860	0.583	2.095	0.364	2.832	0.212
甲基波尼松	2.690	0.209	2.826	0.417	2.165	0.102

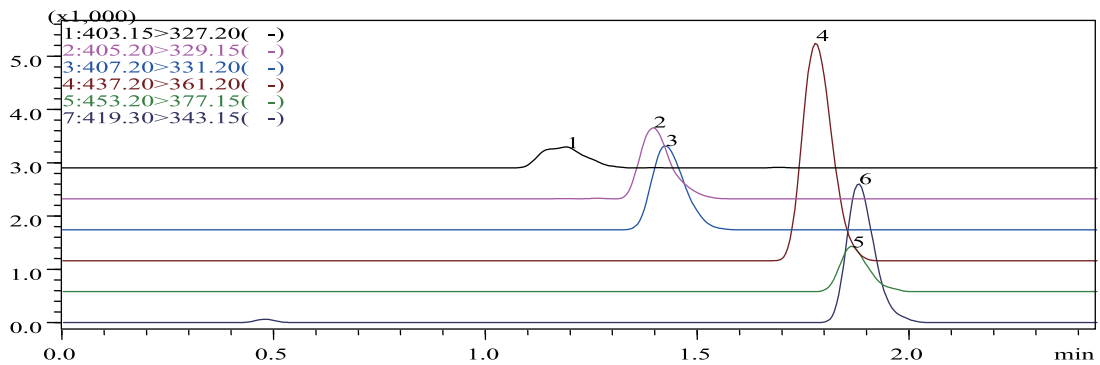
2.4 灵敏度实验

为了考察方法的灵敏度，在奶粉空白样品中添加0.4 $\mu\text{g/kg}$ 和1.0 $\mu\text{g/kg}$ 的混合标样，得到色谱图如图9~11所示。从图9可以看出奶粉样品检出微量的氢化可的松，浓度约为0.03 $\mu\text{g/kg}$ 。对于奶粉中的波尼松，波尼松龙，氢化可的松，地塞米松，倍氯米松和甲基波尼松方法定量限为0.4 $\mu\text{g/kg}$ ；对于乙酸氟氢可的松方法定量限为1.0 $\mu\text{g/kg}$ ，满足《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》中的要求。



(1: 波尼松; 2: 波尼松龙; 3: 氢化可的松; 4: 地塞米松; 5: 倍氯米松; 6: 乙酸氟氢可的松; 7: 甲基波尼松)

图9 奶粉样品的MRM色谱图



(1: 波尼松; 2: 波尼松龙; 3: 氢化可的松; 4: 地塞米松; 5: 倍氯米松; 6: 甲基波尼松)

图10 0.4 µg/kg奶粉加标样品的MRM色谱图

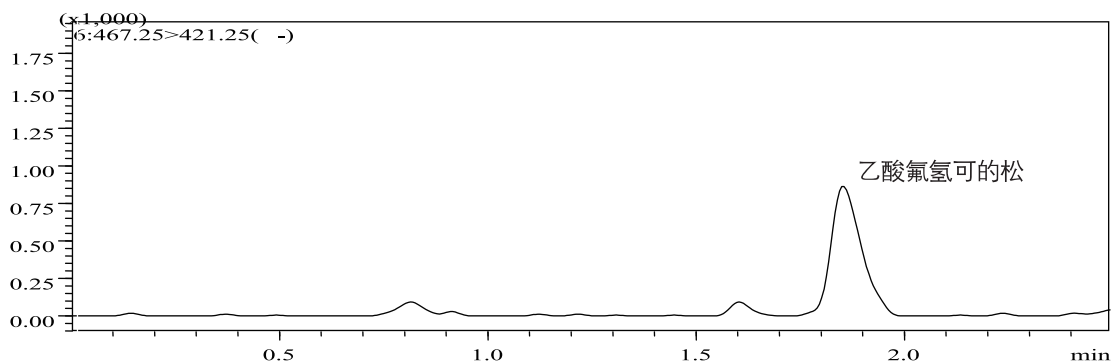


图11 1.0 µg/kg乙酸氟氢可的松加标样品的MRM色谱图

结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8030联用测定奶粉中7种糖皮质激素的方法。该方法分析速度快，精密度良好；校准曲线在0.5 ~ 40 µg/L范围内的相关系数均在0.999以上；对于奶粉中的波尼松，波尼松龙，氢化可的松，地塞米松，倍氯米松和甲基波尼松方法定量限为0.4 µg/kg；对于乙酸氟氢可的松方法定量限为1.0 µg/kg，满足《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》中的要求。