

液相色谱-串联质谱法快速测定婴幼儿配方奶粉中 39种激素残留量

祝伟霞, 刘亚风*, 袁萍, 杨冀州

(河南出入境检验检疫局, 河南 郑州 450003)

摘要 :建立了液相色谱-串联四极杆质谱同时测定婴幼儿配方奶粉中17种糖皮质激素、11种孕激素、3种雄性激素和8种雌激素残留的快速确证方法。采用乙腈提取奶粉中待测组分,提取液经冷冻离心与正己烷除脂、亲水-亲脂平衡固相萃取柱净化、甲醇洗脱。分别在正、负电喷雾离子化多反应监测模式下检测39种激素。正离子模式下的流动相为乙腈-0.1%甲酸,色谱柱为普通硅胶基质的 C_{18} 柱;负离子模式下的流动相为乙腈-0.1%氨水,色谱柱为能耐受宽pH范围的超高效 C_{18} 柱。在该优化条件下,39种激素定量限($S/N \geq 10$)为0.02~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,方法回收率为59.5%~117.9%,相对标准偏差(RSD)为6.4%~16.3%。经测定多种市售婴幼儿配方奶粉,表明该方法操作简单、测定结果准确,可用于婴幼儿配方奶粉中多种内源性、与化学合成类激素残留的快速测定。

关键词 :液相色谱-串联质谱;固相萃取;冷冻除脂;激素;婴幼儿奶粉

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1031-07

Quick determination of 39 hormones residues in infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHU Weixia, LIU Yafeng*, YUAN Ping, YANG Jizhou

(Henan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhengzhou 450003, China)

Abstract : A quick confirmative method was developed for determining the residues of 17 glucocorticoids, 11 progesterones, 3 androgens and 8 estrogens in infant formula by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS). The sample was extracted with acetonitrile at first. Then the lipid substances were removed by centrifugation under freezing condition and liquid-liquid extraction with hexane of the extract. The purification was carried out on hydrophilic-lipophilic solid-phase extraction columns and methanol was used as the eluted solvent. The detection of 39 analytes was carried out in the positive or negative multi-reaction monitoring (MRM) mode, separately. Acetonitrile-0.1% formic acid was used as the mobile phase and an ordinary silica gel C_{18} column was selected to separate the analytes in the positive mode. Acetonitrile-0.1% aqueous ammonia as mobile phase and the separation was carried out on an ultra-performance C_{18} column with a wide pH range in the negative mode. The limits of quantification (LOQ, $S/N \geq 10$) were 0.02 - 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The overall recoveries varied from 59.5% to 117.9%, and the relative standard deviations (RSD) were between 6.4% and 16.3%. The real sample tests showed that the simple and accurate method can be used for determining the residues of multi-endogenous and chemically synthesized hormones in milk powders.

Key words : liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); solid-phase extraction (SPE); frozen delipidation; hormones; infant formula

最近在国内发生的奶粉疑致“婴儿性早熟”事件成为继2008年三聚氰胺事件以来乳制品行业面

临的又一重大食品安全事件。近年来奶粉事件危机频出,严重挫伤了消费者对奶粉质量的信心,不仅有

* 通讯联系人:刘亚风,高级工程师。Tel:(0371)65685872, E-mail:wzhu121@163.com.

基金项目:国家质量监督检验检疫总局行业标准制修订项目(No. B109-2004).

收稿日期:2010-08-26

损于奶粉业的发展,而且成为未来奶粉业发展的重要危机之一。从利益、动机的角度而言,商家虽然不会在奶粉加工过程中添加激素,但是在原料奶生产环节,养殖户为了提高奶牛产奶量,滥用抗生素和激素等不法行为却可能发生。2002年我国农业部第235号公告中已禁止使用乙烯雌酚、醋酸甲孕酮、甲基睾丸酮、群勃龙、玉米赤霉醇等化学合成类激素物质,并规定这些化合物在动物性食品中不得检出^[1]。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食品源性动物中使用激素类药物^[2]。为了有效地监督我国婴幼儿配方奶粉的质量,建立一种准确可靠的多种激素同时确证的分析方法是非常必要的。

奶粉中除了含有内源性孕激素、雌性激素与雄性激素外,其他所有化学合成类激素均属于禁用药物。对于禁用药物而言,降低检出限是开发检测方法的主要目标。目前国内外已有许多关于激素检测的标准与文献报道,主要采用液相色谱-质谱(LC-MS)^[3-6]与气相色谱-质谱(GC-MS)^[7,8]两种方法。尽管GC-MS测定激素时具有较高的灵敏度,但因甾体类激素结构中具有多个羟基和羰基,在测定时需要长时间硅烷化、酰化和脲化等衍生化过程^[3]。LC-MS测定激素时不仅具有较高灵敏度,而且不需要衍生就可以直接测定,提高了分析样品的工作效率,同时LC-MS也是国家标准测定动物源性食品中多种激素残留的方法^[9]。本方法在已有的标准与文献研究的基础上,优化了提取、酶解、净化、色谱测定等参数,成功地建立了固相萃取净化、LC-MS/MS测定婴幼儿奶粉中39种激素的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);API4000 串联四极杆质谱仪(美国 AB 公司);RX II Series 温控高速离心机(日本日立公司);39种激素标准品(纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma Aldrich 公司和德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);Oasis HLB 固相萃取柱(3 mL/60 mg,美国 Waters 公

司);NH₂ 固相萃取柱(3 mL/500 mg,北京振翔公司);甲酸(含量为96%,色谱纯,美国 Tedia 公司)和乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);实验用水为 Millipore 纯水系统制得的高纯水(电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$);其他试剂均为市售国产分析纯试剂。

1.2 标准溶液的配制

分别称取标准品 10 mg 于 100 mL 容量瓶中,加入乙腈溶解并定容,得到质量浓度为 100 mg/L 的单标准储备溶液,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。分别取上述储备液用乙腈-0.1% 甲酸(1:1, v/v)或乙腈-0.1% 氨水(1:1, v/v)稀释为 1 mg/L 的标准溶液用来优化质谱条件。分别取上述储备液用乙腈-水(1:1, v/v)配制成 1 mg/L 混合标准工作溶液。

1.3 LC-MS/MS 条件

正离子模式下的 LC 条件 色谱柱:Water Sunfire C₁₈ 柱(150 mm \times 2.1 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)与 0.1% 甲酸(B)。梯度洗脱程序:0 ~ 4 min, 15% A ~ 65% A; 4 ~ 8 min, 65% A ~ 80% A, 保持 2 min; 10 ~ 10.1 min, 80% A ~ 15% A, 保持 4 min; 流速:0.3 mL/min。柱温:30 $^\circ\text{C}$ 。进样量:10 μL 。Vaclor 六通阀操作:2.8 ~ 11 min \rightarrow 质谱; 0 ~ 2.8 min、11 min 后 \rightarrow 废液。

负离子模式下的 LC 条件 色谱柱:Water UP-LC BEH C₁₈ 柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)与 0.1% 氨水(B)。梯度洗脱程序:0 ~ 0.8 min, 10% A; 0.8 ~ 4 min, 10% A ~ 60% A, 保持 2.5 min; 6.5 ~ 6.6 min, 80% A ~ 10% A, 保持 3.5 min。流速:0.3 mL/min。进样量:10 μL 。柱温 30 $^\circ\text{C}$ 。Vaclor 六通阀操作:2 ~ 5.5 min \rightarrow 质谱; 0 ~ 2 min、5.5 min 后 \rightarrow 废液。

MS/MS 条件 电喷雾离子化(ESI),正或负离子电离(ESI⁺或ESI⁻);雾化气压力:310.3 kPa(45 psi);气帘气压力:172.4 kPa(25 psi);喷雾电压:500 V;去溶剂温度:550 $^\circ\text{C}$;去溶剂气压力:275.8 kPa(40 psi);碰撞气压力:69 kPa(10 psi);每个离子对驻留时间:10 ms;每种化合物的检测离子对、去簇电压(DP)、碰撞室出口电压(CXP)、射入电压(EP)、碰撞能量(CE)等质谱参数见表 1。

表 1 39 种激素的质谱检测参数

Table 1 MS parameters for the determination of 39 hormones

No.	Hormone	Ionization mode	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/eV	CXP/V	EP/V
1	triamcinolone	ESI ⁺	395.1	357.3 ⁺ ; 225.3	65; 70	20; 24	23; 15	10; 9
2	predisolone	ESI ⁺	361.3	147.2; 343.2 ⁺	50	33; 15	9; 23	10
3	hydrocortisone	ESI ⁺	363.3	121.3 ⁺ ; 309.2	110	32; 23	7; 20	13; 12
4	methylprednisolone	ESI ⁺	375.4	357.2 ⁺ ; 161.3	50	14; 28	24; 10	6; 6

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

No.	Hormone	Ionization mode	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/eV	CXP/V	EP/V
5	betamethasone	ESI ⁺	393.3	355.2 ; 373.2 *	60	19 ; 13	23 ; 25	9
6	dexamethasone	ESI ⁺	393.2	237.1 ; 355.1 *	50	25 ; 16	15 ; 24	8 ; 7
7	flumethasone	ESI ⁺	411.2	253.2 * ; 335.2	70	21 ; 17	17 ; 21	9 ; 10
8	triamcinolone acetonide	ESI ⁺	435.5	213.2 * ; 225.1	60	38 ; 29	14 ; 14	7 ; 11
9	fluocinolone acetonide	ESI ⁺	453.5	121.3 * ; 337.1	70	49 ; 20	23	7 ; 13
10	hydrocortisone acetate	ESI ⁺	405.4	309.3 ; 327.3 *	80	25 ; 23	17 ; 23	10
11	fludrocortisone acetate	ESI ⁺	423.3	239.3 * ; 343.3	100	35 ; 30	16 ; 21	13 ; 14
12	prednisone acetate	ESI ⁺	401.2	147.2 ; 295.4 *	65	36 ; 20	9 ; 19	11 ; 9
13	cortisone acetate	ESI ⁺	403.4	163.3 * ; 343.2	110	35 ; 26	10 ; 23	11 ; 9
14	dexamethasone acetate	ESI ⁺	435.3	309.3 * ; 337.3	50	19 ; 18	20 ; 23	9
15	17 α -hydroxycorticosterone	ESI ⁺	373.3	109.3 * ; 331.2	100	37 ; 25	21	7
16	beclomethasone	ESI ⁺	521.3	503.2 * ; 319.3	60	17 ; 24	13 ; 20	11
17	norethisterone	ESI ⁺	299.3	109.3 ; 231.3 *	110	36 ; 25	6 ; 15	10
18	mifepristone	ESI ⁺	430.3	134.3 ; 372.4 *	80	42 ; 29	8 ; 9	8 ; 7
19	norgestrel	ESI ⁺	313.4	109.3 ; 245.2 *	90	38 ; 27	21 ; 16	8 ; 10
20	dydrogesterone	ESI ⁺	313.3	97.2 * ; 211.2	80	41 ; 32	19 ; 13	6 ; 11
21	17 α -hydroxyprogesterone acetate	ESI ⁺	373.3	313.3 * ; 271.4	70	21 ; 24	20 ; 17	8 ; 5
22	megestrol acetate	ESI ⁺	385.4	267.3 * ; 224.3	70	26 ; 33	18 ; 14	8
23	chlormadinone acetate	ESI ⁺	405.3	309.4 * ; 267.3	70	20 ; 30	21 ; 17	7 ; 11
24	progesterone	ESI ⁺	315.3	109.3 * ; 297.3	70	35 ; 24	6 ; 19	12 ; 11
25	melengestrol acetate	ESI ⁺	397.3	279.3 * ; 337.3	70	27 ; 19	17 ; 21	12 ; 9
26	medroxyprogesterone acetate	ESI ⁺	387.4	123.2 * ; 327.3	70	38 ; 20	23 ; 22	7 ; 10
27	17 α -hydroxyprogesterone caproate	ESI ⁺	429.4	313.3 * ; 271.4	70	22 ; 27	20 ; 18	10 ; 7
28	testosterone	ESI ⁺	289.3	109.3 * ; 253.3	80	35 ; 24	20 ; 16	11 ; 10
29	17-methyltestosterone	ESI ⁺	303.3	109.3 * ; 227.3	80	39 ; 28	20 ; 15	10 ; 13
30	trenbolone Acetate	ESI ⁺	313.3	253.2 * ; 271.2	100	27 ; 26	16 ; 18	9 ; 11
31	zearalenone	ESI ⁻	317	175.1 ; 131.1 *	110	33 ; 40	12 ; 10	10
32	estriol	ESI ⁻	286.9	144.9 * ; 171.0	100	55 ; 50	13 ; 10	5
33	zeranol	ESI ⁻	321.1	277.0 * ; 90.9	100	31 ; 48	12 ; 9	9
34	estradiol	ESI ⁻	271	144.9 * ; 182.9	100	55 ; 54	7 ; 11	10 ; 13
35	estrone	ESI ⁻	269.1	145.0 * ; 159.0	100	16 ; 31	17 ; 8	10
36	diethylstilbestrol	ESI ⁻	266.9	237.0 * ; 250.9	85	39 ; 35	16	9 ; 8
37	dienestrol	ESI ⁻	264.9	92.9 * ; 248.9	80	35 ; 34	8 ; 5	3 ; 4
38	hexoestrol	ESI ⁻	269.3	134.1 ; 119.1 *	70	20 ; 45	20 ; 18	11
39	halcinonide	ESI ⁻	453.2	433.2 * ; 397.1	100	40 ; 50	15 ; 22	13 ; 15

* quantification ion.

1.4 样品前处理

称取 5.0 g 奶粉样品置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈,涡旋混匀 1 min,于 40 °C 下超声 20 min,在 0 °C 下以 8 000 r/min 离心 10 min,移去上清液,奶粉残渣中再加入 7 mL 乙腈,涡旋混匀后低温离心,合并上清液。待提取液冷却至室温后加入 10 mL 乙腈饱和的正己烷,液-液分配平衡后离心,弃去正己烷层,下层溶液于 50 °C 用氮气吹扫浓缩至干。加入 4 mL 30% 甲醇水溶液溶解残渣,并将其加载至已依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化过的 HLB 柱中,依次用 3 mL 水、3 mL 30% 甲醇水溶液淋洗,最后用 5 mL 甲醇洗脱。将洗脱液过 NH₂ 柱,然后用 3 mL 甲醇淋洗柱体,收集洗脱液并于 50 °C 水浴中用氮气吹扫浓缩至干。用 1 mL 乙腈-水(2:8, v/

v)溶液溶解残渣,经 0.22 μ m 滤膜过滤,滤液供 LC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 萃取溶剂的选择

39 种待检测化合物的极性范围广,其油水分配系数的对数值($\log K_{ow}$)在 0.63 ~ 4.31 之间^[4],大多甾体类与二苯乙烯类激素在弱极性或中等极性有机溶剂中有较高的溶解性,常用的萃取溶剂包括乙醚、叔丁基甲醚、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈和甲醇。奶粉中含有较多的蛋白质与脂肪类化合物,采用弱极性试剂易溶解样品中的脂类干扰物,不利于仪器分析和净化。实验分别比较了乙腈、叔丁基甲醚、甲醇等作为提取溶剂时可溶性杂质的含量与

提取效率。可溶性杂质的测定方法:将 10 g 奶粉加入 30 mL 提取溶剂,于 40 °C 下超声提取。重复提取 3 次。离心过滤后浓缩,于 105 °C 下恒重。实验结果表明,采用上述 3 种溶剂提取时可溶性杂质的含量为叔丁基甲醚(11.0%) > 甲醇(9.9%) > 乙腈(9.1%),同时乙腈提取多种激素时的回收率为 81% ~ 95%。故本文选用乙腈作为提取溶剂。

2.2 提取温度和超声时间的选择

奶粉中残留的激素类药物与样品基质中弱极性或中等极性物质之间有较强的范德华作用力,直接加入乙腈提取,一些糖皮质与二苯乙烯类激素回收率仅为 30% 左右,采用超声提取法后,回收率增加。分别考察了提取温度和超声时间对提取效率的影响,实验数据表明在 40 °C 下超声 20 min 时提取效率最高,故本文选择在此条件下进行提取。

2.3 酶解与不酶解处理奶粉对测定结果的影响

尿和血浆中激素代谢物主要以葡萄糖与硫酸酯结合态存在^[6]。为获得游离态的分析物,分析时需进行酶水解。Shao 等^[4,10]研究了动物组织中激素-葡萄糖与硫酸酯结合物的情况,表明肌肉中睾丸酮可解离的结合态 < 20%, 17 β -雌二醇 < 5%。Yang 等^[4]也分别在无酶解或酶解条件下测定了肌肉、虾、牛奶中的内源性激素,表明两种条件下的测定结果没有差异。为了验证奶粉中激素代谢物分析时加入酶解步骤的有效性,实验选用 10 个奶粉样品与 10 个牛奶样品进行比较测定,分别采用酶解与不酶解两种方法测定了内源性激素雌二醇与孕酮,结果证明其测定值没有明显差异(相对标准偏差(RSD) < 11.5% (n = 6))。为了节省分析时间,实现实验室内批量样品的快速测定,本方法在样品前处理中没有加入酶解步骤。

2.4 脂类与其他干扰物的去除

奶粉中脂肪含量约为 4%。提取时一些脂类干扰物会溶于乙腈,干扰固相萃取与质谱电离。为了去除基质中的脂肪类干扰物,本文采用冷冻离心除脂法,在低温状态下将脂肪析出,高速离心使其漂浮或沉淀于样液中。实验结果表明该方法能去除 40% 的脂类与常温下能溶解的杂质。对于乙腈提取液中残存的其他脂类溶解物,采用乙腈饱和的正己烷除脂。经过冷冻离心与正己烷萃取两个步骤后能完全去除样液中的脂类干扰物。

2.5 固相萃取净化条件的选择

采用 HLB 固相萃取净化时,上样溶液的组成既影响回收率又影响净化效果。甲醇比例太大,淋洗强度高,一些相对强极性目标物不能保留在固相萃

取柱上;甲醇比例太小,弱极性杂质易被保留,柱容量超载,目标物不能定量保留。本实验分别用 100% 甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇、40% 甲醇、30% 甲醇、20% 甲醇、10% 甲醇和水溶解样品残渣后采用固相萃取柱净化,结果表明,上样溶液中甲醇含量为 0 ~ 30% 时,39 种激素能完全保留在固相萃取柱中;甲醇含量 \geq 40% 时,一些孕激素与二苯乙烯类激素首先被洗脱。为了保证所有目标物均能保留在 HLB 柱中,选用 30% 甲醇作为上样液。文献报道采用 C₁₈ 或 HLB 柱净化激素类药物时常用甲醇、乙腈、丙酮-甲醇、乙酸乙酯等有机溶剂作洗脱液^[4-6]。通过实验得到不同有机溶剂洗脱 39 种激素的淋洗曲线,结果表明,甲醇不仅洗脱回收率高,净化效果也好。本方法选用 5 mL 甲醇作为 HLB 柱洗脱剂。

洗脱液经氮气吹干后进行质谱测定时基质抑制率高,其中己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚的基质影响达 60%。为了减少基质效应,将洗脱液再过 NH₂ 柱净化,强极性表面活性物质保留于 NH₂ 柱中。该净化液经浓缩后,其基质抑制率降低(\leq 25%)。

2.6 色谱条件的选择

糖皮质激素、孕激素、性激素属弱极性高分子质量化合物,在 C₁₈、C₈ 固定相中均有较好的保留。在优化液相色谱分离条件过程中,分别比较了多种商品化液相色谱柱的分离效果。在正离子模式下分离 30 种激素时,各种 C₁₈ 柱的保留行为为差别很小,其中 Sunfire C₁₈ 柱分离度与灵敏度相对最高,故在正离子模式下选择 Water Sunfire C₁₈ 柱进行分离,在 1.3 节的梯度洗脱条件下,目标物的保留时间在 3 ~ 8 min 之间。为了使二苯乙烯类激素电离完全,采用负离子电离模式对其进行测定。在流动相中加入 0.1% 氨水后流动相的 pH 为 10 左右,但在该 pH 条件下一般硅胶基质的 C₁₈ 柱均不能使用。BEH C₁₈ 柱属三键键合,具有较宽的 pH 应用范围(pH 1 ~ 12),且分离二苯乙烯类激素时柱效高。

在负离子模式下采用 1.3 节的色谱条件分离 9 种激素时,样品液中有机相的含量是影响分析物保留与峰形的主要因素。采用乙腈-水(3:1, v/v)作为提取物的溶解溶剂时,雌三醇、玉米赤霉烯酮与玉米赤霉醇出现前沿峰与双峰,雌二醇与哈西奈德的灵敏度低;采用与流动相组成相似的乙腈-水(2:8, v/v)为提取物的溶解溶剂时,9 种激素均获得对称的峰形,雌二醇与哈西奈德的灵敏度提高了 1 倍。

2.7 质谱条件的优化

大气压化学电离(APCI)与 ESI 是检测甾体类激素化合物常用的两种电离方式^[3,5]。通过比较糖

皮质激素与性激素在两种电离方式下的离子化效率发现 APCI 与 ESI 在测定激素时离子化效率相同,该结果与 Blasco 等^[3]报道的结果一致。采用 1 mg/L 单标准溶液以流动注射的方式在正、负离子模式下进行母离子全扫描,确定化合物的分子离子。该类化合物结构中没有强酸性或碱性基团,大多数化合物仅含有 1 个在 3 位或 17 位的羰基电离基团,其电离主要依靠羰基与氮原子结合力,结构中存在多电子结合体系或与氮环结合时易产生 $[M+H]^+$ 。对于其他的化合物,在正离子模式下信号很弱^[11],除哈西奈德外,所有的糖皮质激素、雄性激素、孕激素在正离子模式下均得到信号较强的母离子 $[M+H]^+$;对于雌性激素与糖皮质激素哈西奈德在负离子模式下才能获得准分子离子峰 $[M-H]^-$,己烯雌酚、双烯雌酚、雌二醇、雌三醇标准溶液中加入 0.1% 氨水 $[M-H]^-$ 峰信号强度提高 5 倍以上。

再分别以待测物的分子离子峰为母离子,进行子离子全扫描,选取丰度较强、干扰较小的两个子离子作为定性与定量离子,优化得到的质谱参数见表 1。

2.8 方法的检出限与线性关系

在奶粉样品中添加不同浓度的混合标准工作溶液,按上述方法处理后测定,以定量离子的峰面积对质量浓度进行线性回归计算,所得相关系数(r)均大于 0.99,线性方程见表 2。以信噪比(S/N) ≥ 10 为方法的定量限(LOQ),其 LOQ 值见表 2。

2.9 方法的回收率与精密度

取奶粉样品添加 3 个水平($1 \times LOQ$ 、 $1.5 \times LOQ$ 、 $2 \times LOQ$)的混合标准溶液进行回收率试验。每个添加水平测定 10 次,平均回收率及相对标准偏差(RSD)见表 2,内源性激素需扣除空白值。图 1 与图 2 分别为在正、负离子模式下测定奶粉中添加 39 种激素样品的色谱图。

表 2 39 种激素的线性关系、回收率、精密度及定量限

Table 2 Linear relationships, recoveries, relative standard deviations (RSDs) and limits of quantification (LOQ, $S/N \geq 10$) of 39 hormones

Hormone	Linear equation	Linear range/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r	Recovery/%	RSD/%	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Triamcinolone	$y = 913x - 274$	0.2 - 20	0.9986	81.1 - 110.3	8.6	0.5
Predisolone	$y = 1970x - 741$	0.05 - 20	0.9997	72.0 - 98.4	10.2	0.1
Hydrocortisone	$y = 1040x - 310$	0.1 - 20	0.9994	87.8 - 103	8.1	0.25
Methylprednisolone	$y = 2710x + 944$	0.1 - 20	0.998	76.7 - 93.2	6.9	0.2
Betamethasone	$y = 6990x + 985$	0.05 - 20	0.9999	75.7 - 94.8	12.3	0.05
Dexamethasone	$y = 4400x - 873$	0.05 - 20	0.9997	69.0 - 92.3	9.3	0.05
Flumethasone	$y = 789x - 181$	0.2 - 50	0.9981	73.1 - 101	9.5	0.5
Triamcinoloneacetone	$y = 800x + 339$	0.1 - 10	0.9994	84.5 - 97.1	10.4	0.2
Fluocinolone acetone	$y = 487x - 25.7$	0.2 - 20	0.9949	66.4 - 99.2	13.7	0.5
Hydrocortisone acetate	$y = 574x - 473$	0.2 - 50	0.9991	70.0 - 101	12	0.25
Fludrocortisone acetate	$y = 569x - 242$	0.5 - 50	0.9987	76.1 - 97.3	8.9	1
Prednisone acetate	$y = 23.3x - 14.2$	2.0 - 50	0.9936	84.4 - 96.7	9.7	5
Cortisone acetate	$y = 829x - 204$	0.2 - 20	0.9991	72.7 - 104.5	10.6	0.5
Dexamethasone acetate	$y = 121x - 53.2$	0.2 - 20	0.9929	64.4 - 102.3	15.2	0.5
17 α -Hydroxycorticosterone	$y = 1840x + 1010$	0.2 - 20	0.9981	83.8 - 117.9	13.6	0.5
Beclomethasone	$y = 1570x - 1470$	0.5 - 50	0.9998	78.5 - 100	11.8	0.5
Norethisterone	$y = 909x - 598$	0.2 - 20	0.9965	80.2 - 98.3	7.6	0.5
Mifepristone	$y = 5890x - 1190$	0.05 - 20	0.9968	83.4 - 94.9	9.3	0.1
Norgestrel	$y = 8890x + 848$	0.1 - 20	0.9996	79.4 - 98.5	7.8	0.25
Dydrogesterone	$y = 2160x - 316$	0.25 - 50	0.9991	75.5 - 107.8	12.8	0.5
17 α -Hydroxyprogesterone acetate	$y = 1560x + 152$	0.1 - 20	0.9998	76.4 - 99.7	11.5	0.25
Megestrol acetate	$y = 4950x - 1450$	0.05 - 10	0.9997	62.9 - 96.2	12.9	0.05
Chlormadinone acetate	$y = 6540x - 2030$	0.25 - 20	0.9999	85.8 - 98.8	8.6	0.5
Progesterone	$y = 10900x + 148$	0.02 - 50	0.9999	94.5 - 105	6.4	0.02
Melengestrol acetate	$y = 1530x - 891$	0.1 - 20	0.9977	78.6 - 94.7	7.7	0.1
Medroxyprogesterone acetate	$y = 4560x - 289$	0.1 - 10	0.995	72.6 - 91.0	10.1	0.1
17 α -Hydroxyprogesterone caproate	$y = 9140x - 7330$	0.25 - 50	0.9998	63.1 - 86.7	9.5	0.5
Testosterone	$y = 8060x - 878$	0.05 - 10	0.9997	76.5 - 101.7	8.3	0.1
17-Methyltestosterone	$y = 7680x - 4240$	0.05 - 10	0.9995	86.1 - 102.5	6.2	0.1
Trenbolone Acetate	$y = 14600x - 992$	0.1 - 20	0.9988	81.1 - 100.2	9.3	0.1
Zearalenone	$y = 2460x - 476$	0.25 - 50	0.9998	85.8 - 99.4	11.6	0.5
Estriol	$y = 1300x - 147$	0.1 - 20	0.9995	75.3 - 104	9.7	0.2
Zeranol	$y = 9540x - 2110$	0.1 - 20	0.9999	71.4 - 91.8	10.3	0.2

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

Hormone	Linear equation	Linear range/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r	Recovery/%	RSD/%	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Estradiol	$y = 6370x - 5100$	0.25 - 20	0.9998	64.0 - 92.0	11.8	0.5
Estrone	$y = 10900x - 8480$	0.1 - 20	0.9983	77.0 - 106.2	9.9	0.2
Diethylstilbestrol	$y = 6830x - 5920$	0.5 - 50	0.9989	60.8 - 93.8	16.3	1
Dienestrol	$y = 5670x - 10.9$	0.5 - 50	0.9998	68.0 - 109.0	14.8	1
Hexoestrol	$y = 3510x - 371$	0.5 - 50	1	59.5 - 104.9	15.9	1
Halcinonide	$y = 3100x - 2300$	0.5 - 50	0.9996	71.8 - 90.8	8.5	0.5

y : peak area; x : content of the analyte, $\mu\text{g}/\text{kg}$.

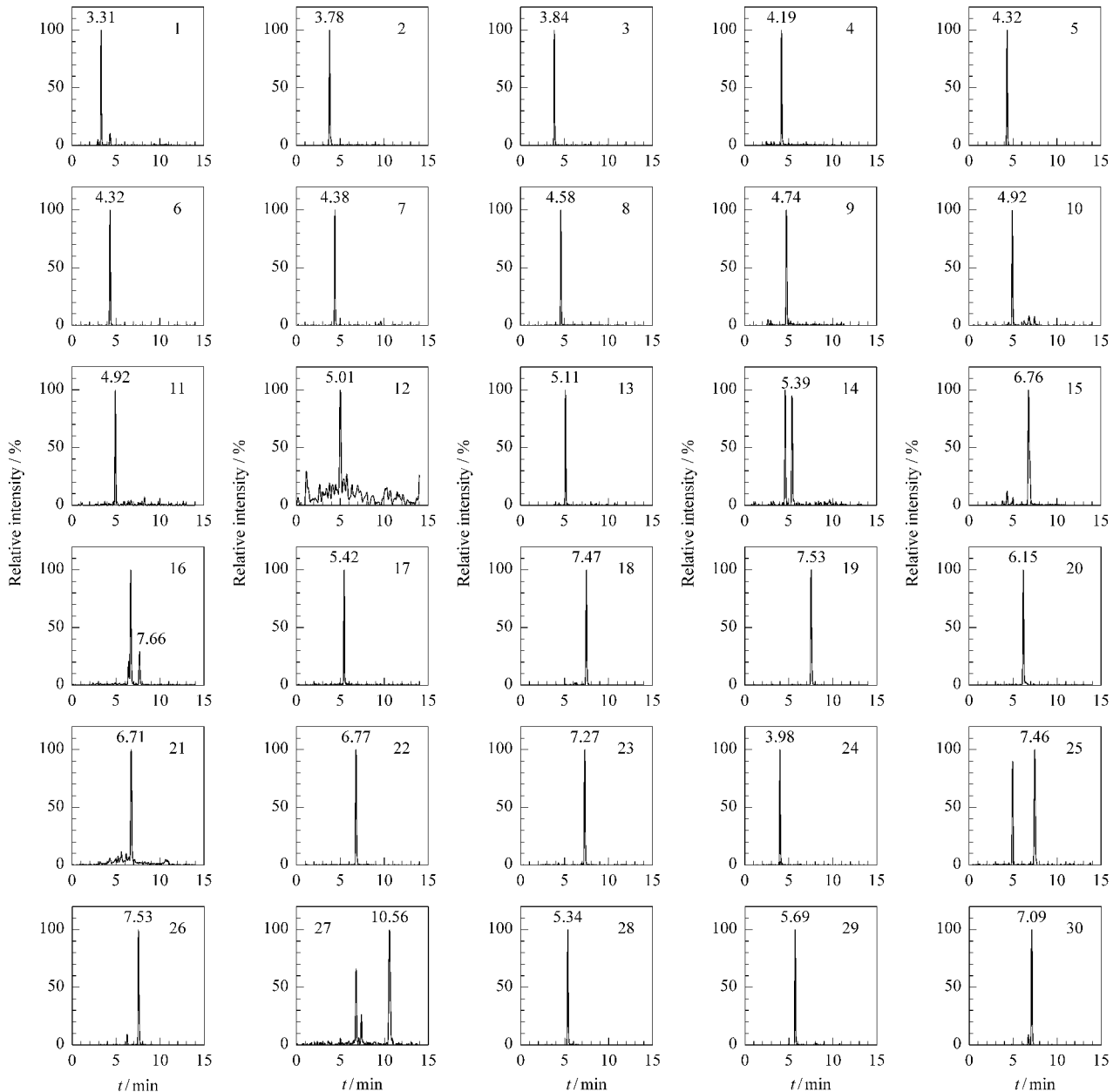


图 1 正离子模式下奶粉中添加 30 种激素(定量限水平)样品的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of a milk powder sample spiked with 30 hormones at LOQ level in ESI⁺ mode

1. triamcinolone; 2. prednisolone; 3. hydrocortisone; 4. methylprednisolone; 5. betamethasone; 6. dexamethasone; 7. flumethasone; 8. triamcinolone acetonide; 9. fluocinolone acetonide; 10. hydrocortisone acetate; 11. fludrocortisone acetate; 12. prednisone acetate; 13. cortisone acetate; 14. dexamethasone acetate; 15. 17α -hydroxycorticosterone; 16. beclomethasone; 17. norethisterone; 18. progesterone; 19. melengestrol acetate; 20. norgestrel; 21. dydrogesterone; 22. 17α -hydroxyprogesterone acetate; 23. megestrol acetate; 24. mifepristone; 25. chlormadinone acetate; 26. medroxyprogesterone acetate; 27. 17α -hydroxyprogesterone caproate; 28. testosterone; 29. 17-methyltestosterone; 30. trenbolone Acetate.

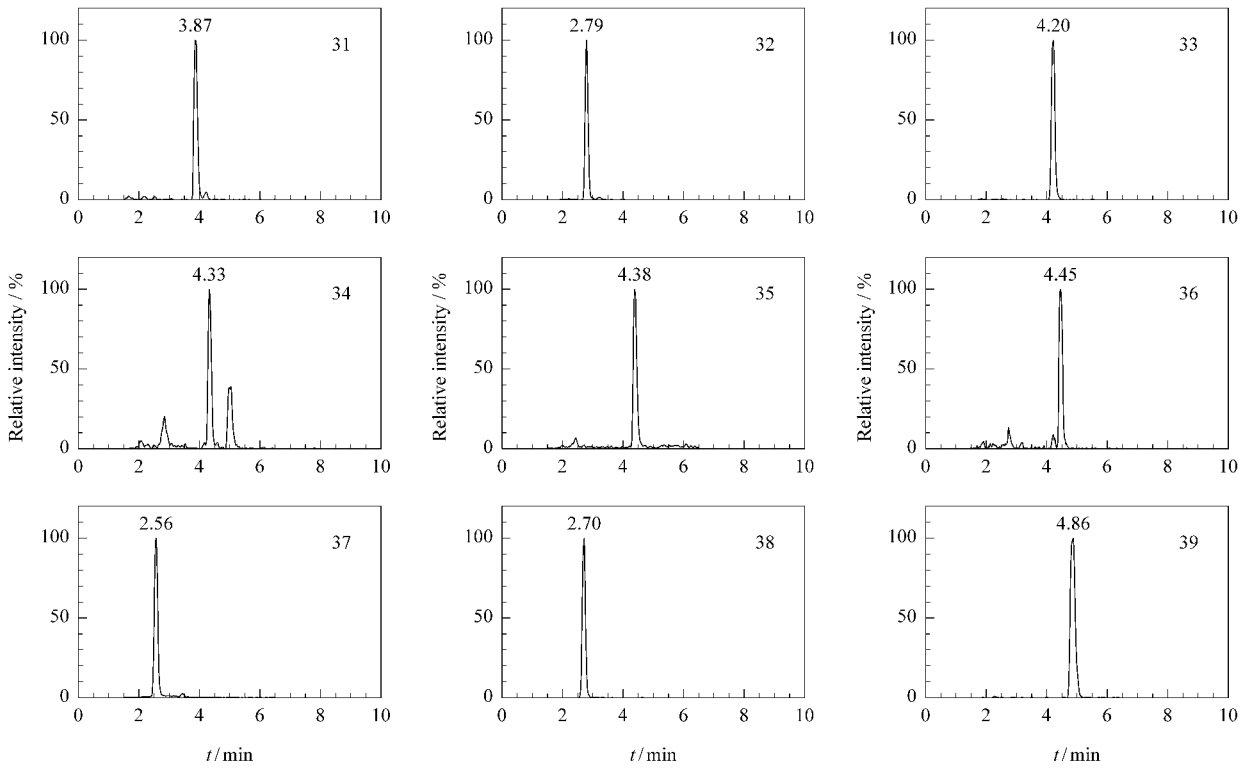


图 2 负离子模式下奶粉中添加 9 种激素(定量限水平)样品的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of a milk powder sample spiked with 9 hormones at LOQ level in ESI⁻ mode

31. estradiol ;32. estriol ;33. estrone ;34. diethylstilbestrol ;35. dienestrol ;36. hexoestrol ;37. zeranol ;38. zearalenone ;39. halcinonide.

2.10 实际样品的测定

为了验证本方法的有效性,对 20 种市售婴幼儿配方奶粉进行了激素含量的测定。经测定,选购的 20 个奶粉样本中均含有孕酮(1.4 ~ 27.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$),5 个样品中检出雌二醇和雌酮(0.6 ~ 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$),3 个样品检出睾丸酮(0.17 ~ 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$),其他激素均未检出。检测样品呈阳性的激素均属于内源性激素,检出结果与文献报道牛奶中内源性激素含量^[4,12]一致。同时采用国家标准方法对这些样品进行测定,测定值为孕酮 0.9 ~ 35.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌二醇和雌酮 0.1 ~ 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、睾丸酮 0.2 ~ 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其他激素均未检出。结果表明本方法测定结果与国家标准方法测定结果的 RSD 小于 17.1%。

3 结论

建立了一种可以准确测定婴幼儿配方奶粉中多种激素的分析方法,方法的各项参数经方法学验证后均符合相关法规要求。与已公布的标准方法或文献报道方法相比,本方法测定奶粉样品中 39 种激素的专属性强,特异性高。针对奶粉基质的特点,样品前处理依次采用冷冻离心除脂、正己烷液-液除脂、联合 HLB + NH_2 固相萃取净化等步骤,在进行测定

时样品基质影响小,定量准确。在当今食品安全备受重视的环境下,该方法能为奶粉中激素的监管与监督提供技术依据。

参考文献:

- [1] Cui X L, Shao B, Zhao R, et al. Chinese Journal of Chromatography (崔晓亮,邵兵,赵榕,等. 色谱), 2006, 24(3): 213
- [2] Xu H, Gu L, He J, et al. J Chromatogr B, 2007, 852: 529
- [3] Blasco C, Poucke C V, Peteghem C V. J Chromatogr A, 2007, 1154: 230
- [4] Yang Y, Shao B, Zhang J, et al. J Chromatogr B, 2009, 877: 489
- [5] Kaklamanos G, Theodoridis G, Dabalís T. J Chromatogr A, 2009, 1216: 8072
- [6] Kaklamanos G, Theodoridis G, Dabalís T. J Chromatogr B, 2009, 877: 2330
- [7] Impens S, Loco J V, Degroot J M, et al. Anal Chim Acta, 2007, 586: 43
- [8] Chen J, Qin Y, Zhang M J. Chinese Journal of Chromatography (陈捷,秦燕,张美金. 色谱), 2006, 24(1): 19
- [9] GB/T 21981-2008
- [10] Shao B, Zhao R, Meng J, et al. Anal Chim Acta, 2005, 548: 41
- [11] Pozo O J, Eeno P V, Deventer K, et al. Trends Anal Chem, 2008, 27(8): 657
- [12] Jouan P N, Pouliot Y, Gauthier S F, et al. Int Dairy J, 2006, 16: 1408