

UPLC-MS/MS 同时测定红糖中 9 种雌性激素

Simultaneous determination of nine female-steroid hormones
in brown sugar by UPLC-MS/MS韩 智^{1,2} 王会霞^{1,2} 龚 蕾^{1,2} 朱晓玲^{1,2}HAN Zhi^{1,2} WANG Hui-xia^{1,2} GONG Lei^{1,2} ZHU Xiao-ling^{1,2}曹 琦^{1,2} 王 彬^{1,2} 张 苗^{1,2}CAO Qi^{1,2} WANG Bin^{1,2} ZHANG Miao^{1,2}

(1. 湖北省食品质量与安全监督检验研究院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430070, China;

2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and
Safety Test, Wuhan, Hubei 430070, China)

摘要:建立了红糖中 9 种雌性激素的超高效液相色谱—串联质谱法测定方法。样品经水溶解后,用乙腈提取,经 HLB 固相萃取柱净化,采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱分离,以乙腈—2 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相进行梯度洗脱,分别在电喷雾离子源正、负离子模式下以多反应监测模式(MRM)扫描检测,外标法定量分析。结果表明:9 种化合物在相应的质量浓度范围内线性良好,相关系数 R 均大于 0.99,检出限为 0.2~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 92.2%~113.2%,相对标准偏差为 1.6%~6.8%。该方法快速、简便、灵敏,适合红糖中激素的检测。

关键词: 红糖;超高效液相色谱—串联质谱;雌激素;孕激素

Abstract: A ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of female-steroid hormones in brown sugar. Brown sugar samples were dissolved in water, and extracted by acetonitrile, then cleaned-up using an HLB column. The analytes were separated on a ACQUITY UPLC HSS T3 column with acetonitrile-water (containing 2 mmol/L ammonium acetate) as mobile phase by gradient elution. The mass spectrometer was detected in multiple reaction monitoring mode(MRM)

using positive-ion and negative-ion electrospray ionizations(ESI), respectively. The quantitative analysis was carried out by external standard method. The results showed that the calibration curves had good linearity for 9 female-steroid hormones in the tested concentration ranges, with correlation coefficients of more than 0.99. The average recoveries at three spiked levels were 92.2%~113.2%, and the precisions expressed as relative standard deviations (RSDs) were 1.6%~6.8%. The limits of detection (LOD) were 0.2~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method proved to be accurate, rapid, sensitive with repeatability and suitable for rapid detection of female hormone in brown sugar.

Keywords: brown sugar; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); estrogen; progesterin

红糖富含氨基酸、多酚类化合物、有机酸及微量元素,具有益气养血、健脾暖胃、祛风散寒、活血化瘀等功效,深受中国人群特别是女性和老年人的青睐^[1]。2016 年,“新余市糖姑娘贸易有限公司疑似非法添加雌激素”事件把红糖的食品安全推向风头浪尖^[2],暴露出食糖存在的食品安全风险。雌性激素对维持女性正常生殖功能十分重要,具有促进性器官发育的功能,还能促进第二性征发育等。红糖中添加雌性激素可能有缓解痛经等功能,但有研究^[3-4]表明过多的激素进入人体内可能引起内分泌失调,导致机体代谢紊乱,甚至导致肿瘤等疾病。欧盟等国际组织及国家均对动物源性食品中激素的残留作出了严格的要求,中国也有相关法律法规^[5]禁止一些

基金项目:国家重点研发计划资助(编号:2018YFC1604000)

作者简介:韩智,男,湖北省食品质量与安全监督检验研究院助理工程师,硕士。

通信作者:王会霞(1973—),女,湖北省食品质量与安全监督检验研究院高级工程师,硕士。E-mail: 972567848@qq.com

收稿日期:2018-11-27

激素在动物性食品中检出。

近年来,激素的检测技术得到国内外研究者的普遍关注,开发出的检测方法准确度高、检出限低,目前食品中激素残留的测定方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱—串联质谱法(GC-MS)和液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS),GC-MS或HPLC分离一般需要衍生处理,过程较为繁琐,激素具有沸点高、挥发性低的特点,一般不宜采用GC-MS法直接测定^[6]。LC-MS/MS是目前激素检测的主要方法,相关国家标准或行业标准也采用LC-MS/MS法,如GB/T 21981—2008、SN/T 1980—2007、SN/T 2533—2010,检测对象为动物性食品及化妆品。而以食糖基质为分析对象的相关研究少有报道,在“糖姑娘”^[2]事件发生后,曾三妹等^[6]利用LC-MS/MS检测食糖中的雌二醇,样品经水溶解后,用碱化乙腈提取,经HLB固相萃取柱净化,HPLC-MS/MS检测,雌二醇定量限为0.1 μg/kg。高裕锋等^[7]用乙腈提取红糖样品中的雌二醇,经QuEChERS方法净化,用HPLC-MS/MS检测,雌二醇的检出限为0.7 μg/kg。这些检测方法的建立为食糖的食品安全监管工作的开展提供一定的技术支持。相比于食糖基质,肝肾组织^[8]、水体^[9-10]、水产^[11]、饲料^[12]、乳制品^[13-14]等基质已开发出同时检测多激素残留的方法,但食糖中仅有雌二醇的检测方法。红糖作为一款热销产品,深受消费者喜爱,但其安全问题不容忽视,特别是非法添加雌性激素问题值得关注。

本试验拟对红糖中可能非法添加的9种雌性激素为研究对象,包括4种雌激素(雌酮、己烯雌酚、雌二醇、雌三醇),5种孕激素(醋酸甲羟孕酮、甲孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、孕酮),建立同时检测这9种物质的方法,对已有检测方法进行有效补充,旨在完善激素残留检测体系,并对实际样品进行系统检测,以期为食糖安全生产和健康风险的评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雌酮(99.5%)、己烯雌酚(99.5%)、雌二醇(96.6%)、雌三醇(98.8%)、孕酮(99.2%)、甲孕酮(99.0%)、醋酸氯地孕酮(99.6%)、醋酸甲地孕酮(99.0%)、醋酸甲羟孕酮(99.0%);德国Dr. Ehrenstorfer公司;

甲醇、乙腈:HPLC级,美国Merck公司;

乙酸铵:HPLC级,美国Thermo Fisher公司。

1.2 仪器与设备

三重四级杆质谱仪:Qtrap 6500型,美国ABSCIEX公司;

超高效色谱仪:Ultimate 3000型,美国Thermo Fisher公司;

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3型,100 mm×

2.1 mm,1.8 μm,美国Waters公司;

超纯水器:Milli-Q型,法国密理博公司;

孔径滤膜:0.22 μm,天津市津腾实验设备有限公司;

涡旋振荡器:YALBOYS型,上海安谱科学仪器有限公司;

高速离心机:Avanti JXN 30型,美国Beckman Coulter公司;

HLB固相萃取柱:60 mg,3 mL,美国Waters公司;

电子天平:ME204型,梅特勒—托利多仪器有限公司;

氮吹仪:N-EVAP 116型,上海安谱科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 相关溶液的配制

(1) 2 mmol/L 乙酸铵溶液配制:准确称取0.154 0 g 乙酸铵,用超纯水溶解,并定容至1 L。

(2) 标准溶液配制:孕酮、甲孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、己烯雌酚用乙腈溶解并定容,配制成浓度为1 000 mg/L的标准储备液;雌二醇、雌三醇、雌酮先用少许二甲亚砷溶解,再用乙腈定容至刻度,配制成浓度为1 000 mg/L标准储备液。根据需要用50%乙腈—水溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液。标准储备液均在一18℃冰箱中保存。混合标准工作液在4℃冷藏保存。

1.3.2 样品前处理 称取红糖样品约2.0 g,于50 mL具塞离心管中加入8 mL水,涡旋振荡使其充分溶解,加入8 mL乙腈,涡旋5 min,加入1 g无水硫酸钠,迅速振摇,涡旋振荡1 min,以4 500 r/min离心5 min,转移5 mL乙腈于15 mL离心管中,用氮吹仪在45℃下浓缩近干。加入体积分数为5%的甲醇—水溶液5 mL,涡旋混匀后通过HLB固相萃取小柱(经3 mL甲醇和3 mL水预活化),保持流速约为1 mL/min,然后用3 mL超纯水淋洗小柱。待淋洗液流尽,减压抽干3 min,用4 mL甲醇洗脱,收集洗脱液在45℃下氮吹至干,加入1 mL初始流动相溶解残留物,溶液经0.22 μm微孔滤膜过滤,滤液上机测定。

1.3.3 超高效液相色谱条件 色谱柱采用ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相A为乙腈,流动相B为2 mmol/L乙酸铵水溶液,洗脱梯度为:0.0~1.0 min,B相保持70%,2.0~4.0 min,B相70%~5%,4.0~7.0 min,B相保持5%,7.0~7.1 min,B相5%~70%,7.1~10.0 min,B相70%。柱温35℃;进样量2 μL;流速0.3 mL/min。

1.3.4 质谱条件 采用电喷雾离子源,正负离子同时扫描;多反应监测模式;电喷雾电压5 500 V(ESI+),4 500 V(ESI-);离子源温度300℃;气帘气压力 2.76×10^5 Pa;碰撞气压力为中等(Medium);雾化器压力 3.79×10^5 Pa;辅助气压力 3.44×10^5 Pa;入口电压10.0 V;碰撞室出口

电压 10.0 V。表 1 为 9 种目标化合物的定性、定量离子对及最优参数。

表 1 9 种化合物的质谱参数[†]

Table 1 Parameters of MS/MS for nine compounds

化合物名称	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压/ V	碰撞能量/ eV
孕酮	315.1	109.0 *	60	26
		97.0	60	24
甲孕酮	345.2	123.0 *	60	32
		97.0	60	31
醋酸氯地孕酮	405.0	309.1 *	60	20
		345.1	60	19
醋酸甲羟孕酮	387.1	327.1 *	60	18
		285.2	60	24
醋酸甲地孕酮	385.1	325.1 *	60	18
		267.1	60	26
雌二醇	271.0	183.0 *	-160	-48
		145.0	-160	-50
雌三醇	287.0	171.0 *	-160	-48
		143.0	-160	-63
雌酮	269.0	143.0 *	-160	-65
		145.0	-160	-48
己烯雌酚	267.1	237.0 *	-160	-37
		251.1	-160	-32

[†] * 定量离子。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

分别配制质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 的 9 种雌性激素的标准溶液,采用针泵直接进样方式进行质谱条件的优化。雌二醇、雌三醇、雌酮、己烯雌酚采用负离子获得母离子,孕酮、甲孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮采用正离子扫描模式,对母离子施加合适碰撞能量,使其产生子离子,选取丰度强且干扰少的 2 对子离子,并优化对应离子对的去簇电压(DP)、碰撞能(CE)、碰撞室出口电压(CXP)、碰撞室入口电压(EP)。综合所有离子对响应信号优化质谱离子源温度(TEM)、碰撞压力(Collision gas, CAD)、气帘气压力(Curtain gas, CUR)、雾化气压力(GS1)、去溶剂气压力(GS2)和离子源喷雾电压(Ion spray voltage, IS)。优化结果:TEM 为 300 $^{\circ}\text{C}$, CXP 为 10 V, EP 为 10 V,负离子模式 IS 为 -4 500 V,正离子模式 IS 为 5 500 V, CUR 为 2.76×10^5 Pa, GS1 为 3.79×10^5 Pa, GS2 为 3.44×10^5 Pa, CAD 为 Medium。在最优条件下,9 种雌性激素的 MRM 图如图 1 所示。

2.2 色谱条件优化

流动相的组成对色谱峰形、分离度及灵敏度产生影

响,LC-MS/MS 分析中正离子模式通过添加甲酸,负离子通过添加氨水或易挥发缓冲盐来提高离子化效率,通过改变流动相洗脱梯度来分离化合物。由于 9 种激素中无同分异构体,且离子对相互无干扰,本试验重点考察了水+乙腈、0.1%甲酸水溶液+乙腈、2 mmol/L 乙酸铵+乙腈、水+甲醇、0.1%甲酸水+甲醇、2 mmol/L 乙酸铵+甲醇作为流动相时,9 种目标化合物离子对的响应强度及色谱峰形。结果表明使用 2 mmol/L 乙酸铵+乙腈作为流动相时,9 种激素的响应最高,峰形尖锐且对称。还考察了流速为 0.2, 0.3, 0.4 mL/min 时的色谱图,发现 0.4 mL/min 时峰形最尖锐,但系统压力高,且灵敏度低于 0.3 mL/min 条件下的灵敏度,因此本试验采用 0.3 mL/min 流速。

2.3 样品前处理优化

2.3.1 提取溶剂的选择 参考高裕峰^[7]的方法,在空白红糖中加标后考察不同试剂对目标激素的提取效果,试验结果与其相同,使用乙腈提取效果较好,但存在明显的基质效应。参考曾三妹等^[6]的方法,先用水溶解红糖,再用不同体积的乙腈提取,己烯雌酚回收率高于 140%,雌三醇回收率低于 60%,其他物质回收率较好,因此继续优化提取条件。比较了体积分数为 50% 乙腈—水溶液作为提取剂时,添加不同质量钠盐后的提取效果。往提取溶液中分别加入 0.1, 1.0, 5.0 g 的 Na_2CO_3 、 Na_2SO_4 、NaCl,涡旋振荡 1 min、4 500 r/min 离心 5 min,取上清液测定。结果表明使用 1.0, 5.0 g Na_2SO_4 时回收率效果最好。

2.3.2 固相萃取条件的优化 食糖的主要成分是蔗糖,含有较多色素^[15],这些色素会随着目标化合物一起被提取出来,可能会干扰色谱分析,污染色谱柱和离子源,简单有效的前处理显得尤为重要,本试验采用 SPE 方法对红糖进行净化。研究者^[8,16]常采用 HLB 或 C_{18} 固相萃取柱进行净化不同基质中的雌激素。与 C_{18} 反相萃取柱相比,HLB 固相萃取柱具有更好的稳定性和广泛的 pH 实用性,且净化过程中柱体干涸对其影响不大,操作性更好,因此本试验直接选用 HLB 进行净化。在考察其净化效果前,先验证 HLB 固相萃取柱对 9 种激素柱回收率。在 5 mL 水中加入 100 ng 激素标准储备液溶液,充分混匀,分别取 3 根固相萃取柱,每根柱上样量为 1 mL,经过上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干,乙腈—水复溶至 1 mL,定量测定 9 种激素的含量,结果表明 HLB 柱对 9 种激素的回收率为 98.8%~101.3%。在食糖中添加 10 $\mu\text{g/kg}$ 的激素,采取 1.3.2 的方法进行前处理及上机测定,9 种激素的回收率为 92.2%~113.2%。

2.3.3 基质效应 UPLC-MS/MS 是兽药残留检测常用的检测方法,但缺点是可能存在基质效应,造成定量结果不准确。本试验研究了红糖中 9 种雌性激素的基质效应,结果表明 9 种化合物的基质效应均为 80%~120%,

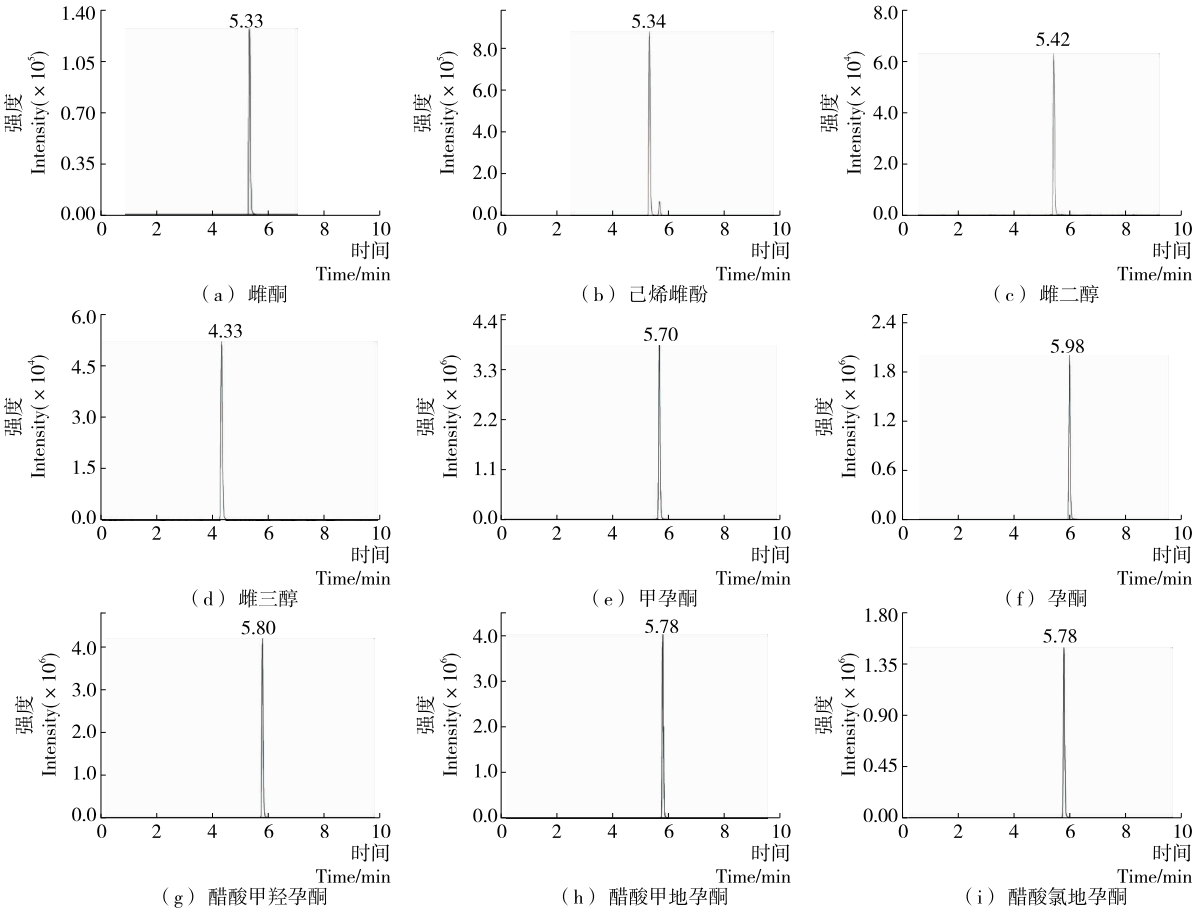


图 1 9 种激素的 MRM 图

Figure 1 Chromatograms of nine hormones in MRM mode

可忽略不计,因此本试验采用溶剂标准溶液直接进行定量分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性与检出限及定量限 配制一系列质量浓度的标准溶液在 1.3 的仪器分析条件下进行测定,以响应为纵

坐标,化合物质量浓度为横坐标,绘制线性方程,得出 9 种物质在一定线性范围内呈良好的线性关系,相关系数均>0.99,以 3 倍信噪比确定目标化合物的检出限,10 倍信噪比确定目标物的定量限,结果见表 2。

2.4.2 方法的回收率及精密度 按照定量限、2 倍定量

表 2 9 种激素的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients(R),limits of detection(LODs) and limits of quantification (LOQs) of the nine hormones (n=6)

化合物名称	线性范围/ (ng · mL ⁻¹)	线性方程	R	检出限 LOD/ (μg · kg ⁻¹)	定量限 LOQ/ (μg · kg ⁻¹)
雌酮	2.0~100.0	y= 8.6×10 ⁴ x-1.2×10 ⁴	0.998	1.0	3.0
己烯雌酚	2.0~100.0	y=2.8×10 ⁵ x-6.8×10 ⁴	0.999	1.0	3.0
雌二醇	2.0~100.0	y=1.6×10 ⁴ x+9.7×10 ³	0.996	1.0	3.0
雌三醇	2.0~100.0	y=1.3×10 ⁴ x+6.8×10 ³	0.995	1.0	3.0
孕酮	1.0~500.0	y=1.2×10 ⁵ x+5.1×10 ⁴	0.999	0.2	0.6
甲孕酮	1.0~50.0	y=1.8×10 ⁵ x+6.2×10 ⁴	0.999	0.2	0.6
醋酸氯地孕酮	1.0~50.0	y=9.6×10 ⁴ x+4.3×10 ⁴	0.999	0.2	0.6
醋酸甲地孕酮	1.0~50.0	y=1.1×10 ⁵ x+5.2×10 ⁴	0.998	0.2	0.6
醋酸甲羟孕酮	1.0~50.0	y=2.1×10 ⁵ x+1.2×10 ⁴	0.998	0.2	0.6

限、10 倍定量限共 3 个质量浓度水平对空白红糖进行添加回收率试验,每个添加水平平行测定 6 次,按照本方法进行检测,计算平均回收率及标准偏差。如表 3 所示,4 种雌激素平均回收率为 92.2%~113.2%,5 种孕激素平均回收率为 93.5%~105.6%,相对标准偏差均 $\leq 10\%$,该方法的回收率和相对标准偏差均具有较好的准确度和精密度,满足分析要求。

表 3 9 种激素的加标回收率及相对标准偏差

Table 3 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of nine hormones ($n=6$)

化合物名称	添加量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
雌酮	3.0	98.3	4.5
	6.0	97.8	3.2
	30.0	99.7	4.2
己烯雌酚	3.0	113.2	5.8
	6.0	108.6	4.1
	30.0	103.2	2.6
雌二醇	3.0	101.5	5.1
	6.0	99.4	4.5
	30.0	98.0	6.0
雌三醇	3.0	101.5	5.1
	6.0	99.4	4.5
	30.0	92.2	6.0
孕酮	0.6	100.3	3.2
	1.2	96.2	5.4
	6.0	95.4	3.3
甲孕酮	0.6	105.1	1.9
	1.2	102.3	3.4
	6.0	99.3	5.6
醋酸氯地孕酮	0.6	98.2	2.5
	1.2	93.5	6.5
	6.0	102.3	3.7
醋酸甲地孕酮	0.6	105.6	6.8
	1.2	103.2	5.4
	6.0	97.8	3.8
醋酸甲羟孕酮	0.6	102.3	5.8
	1.2	96.6	5.5
	6.0	98.3	1.6

2.5 实际样品检测结果

采用本试验所建立的方法对网售及市售 38 种红糖样品进行检测,9 种激素均未检出。

3 结论

本试验建立了 UPLC-MS/MS 同时测定红糖中 4 种雌激素和 5 种孕激素,方法简便、快速,系统的方法学评价结果表明本方法灵敏度高、定量准确、回收率良好、操作简便,能满足日常红糖中雌性激素的测定要求,但是该方法未覆盖更多的性激素,今后应在此研究基础上进一

步扩宽检测激素的种类,完善激素残留检测体系,以期为食糖安全生产和健康风险的评价提供参考。

参考文献

- [1] 保国裕, 蓝艳华, 朱绍熹. 甘蔗原汁红糖的活性营养物质与开发应用优势[J]. 甘蔗糖业, 2015(1): 30-36.
- [2] 江西省食品药品监督管理局. 因微信销售被举报 新余“糖姑娘黑糖”未检出违禁添加物[EB/OL]. (2016-03-14) [2019-01-31]. <http://www.jxfda.gov.cn/xwzx/mtbd/8892868.html>.
- [3] 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.
- [4] TOMŠÍKOVÁ H, AUFARTOVÁ J, SOLICH P, et al. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples[J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2012, 34(2): 35-58.
- [5] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号[EB/OL]. (2002-12-24) [2019-01-31]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/9/16144.html>.
- [6] 曾三妹, 徐敦明, 魏一婷, 等. 全自动固相萃取—高效液相色谱—串联质谱法测定食糖中的雌二醇[J]. 色谱, 2016, 34(7): 703-707.
- [7] 高裕锋, 甄振鹏, 张琳, 等. 高效液相色谱—串联质谱法测定红糖中雌二醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2016(9): 3 465-3 469.
- [8] 康海宁, 欧阳姗, 林黎, 等. 液相色谱—串联质谱法检测动物肝肾组织中 3 种雌激素[J]. 色谱, 2012, 30(10): 986-990.
- [9] SHEN Xiao-yan, CHANG Hong, SUN De-zhi, et al. Trace analysis of 61 natural and synthetic progestins in river water and sewage effluents by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Water Research, 2018, 133: 142-152.
- [10] 曾玉珠, 章勇, 董良飞, 等. 固相萃取—超高效液相色谱—三重四极杆质谱法同时测定不同水体中的 6 种雌激素[J]. 色谱, 2013, 31(12): 1 176-1 181.
- [11] 于慧娟, 张珊珊, 张晓玲, 等. 同位素稀释—液相色谱—串联质谱法同时测定水产品中雌激素、孕激素和雄激素[J]. 质谱学报, 2014, 35(2): 170-178.
- [12] 肖全伟, 吴文林, 杨万林, 等. 固相萃取—超高效液相色谱—串联质谱法同时测定饲料中的 3 种雌激素[J]. 色谱, 2014, 32(11): 1 209-1 213.
- [13] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 液相色谱—串联质谱法同时测定乳制品中 14 种雌激素及孕激素残留[J]. 分析实验室, 2012, 31(11): 76-81.
- [14] 赵超敏, 岳振峰, 吴晖, 等. 黄油中 8 种类固醇激素的液相色谱/串联质谱检测[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 360-366.
- [15] 保国裕, 蓝艳华. 红糖色源物的探讨[J]. 甘蔗糖业, 2017(1): 52-56.
- [16] BLUE S W, WINCHELL A J, KAUCHER A V, et al. Simultaneous quantitation of multiple contraceptive hormones in human serum by LC-MS/MS[J]. Contraception, 2018, 97(4): 363-369.