

解决方案

动物源性食品中糖皮质激素的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；糖皮质激素

介绍

糖皮质类激素为类固醇类化合物，由肾上腺皮质分泌，与机体的生命活动有着重要关系。它具有调节糖代谢，促进蛋白质转化为糖，提升血糖浓度，调节水盐代谢等作用。由于糖皮质类激素能提高饲料转化率，促进畜禽生长，因而常用于畜牧生产中。然而动物生长过程中过量使用这些激素则会导致激素在动物源性食品中的残留，影响人类健康。从体外大量摄入糖皮质类激素会造成体内激素的比例失调、糖代谢和无机盐代谢紊乱，可能会引起肥胖、多毛、血糖升高、高血压、骨质疏松、胎儿畸形缺陷及流产等不良症状。因此，不同国家对动物源性食品中糖皮质类激素的最大残留量都做了规定。

对于糖皮质激素的检测现主要是依据农业部1031号公告-2-2008，主要检测泼尼松、泼尼松龙、氢化可的松、甲泼尼松、地塞米松、倍他米松、倍氯米松、醋酸氟氢可的松等8种糖皮质激素。

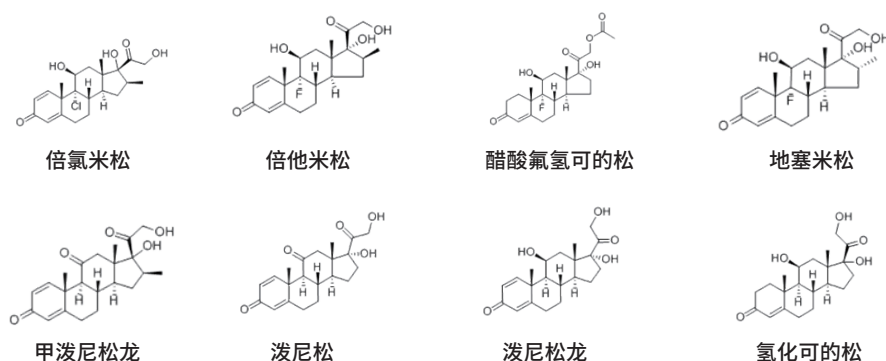


图-1.八种糖皮质激素的结构式

本方法参考上述标准，样品用乙酸乙酯提取，硅胶柱净化，最后用20%的乙腈水溶液复溶，经高效液相色谱-串联质谱进行检测。

1. 仪器和耗材

Raykol AH-30 全自动均质器
Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪
Raykol Auto EVA-20Plus 全自动平行浓缩仪
高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410 或相当
硅胶固相萃取柱 (RayCure Silica, 500 mg/6 mL, RC-204-16844)

甲醇 (优级纯)
正己烷 (优级纯)
20% 乙腈水溶液: 将 20 mL 乙腈与 80 mL 水混合
0.1 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取 4.0g 氢氧化钠, 用水溶解, 稀释定容到 1000 mL
0.1% 甲酸水溶液: 移取 1 mL 甲酸于 1000 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度

2. 样品制备

动物组织样品提取

称取猪肉组织试样 2g (精确至 0.05g) 于 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 乙酸乙酯, AH-30 全自动均质器高速均质 3 分钟, 于 8000 r/min 离心 10 min. 移取上层乙酸乙酯于氮吹管中。残渣中加入 0.1 mol/L 净化

用 6 mL 正己烷活化硅胶固相萃取柱, 将提取液移入柱中, 用 6 mL 正己烷淋洗, 抽干后用 6 mL 正己烷-丙酮 (6:4, V:V) 进行洗脱, 收集洗脱液
固相萃取净化条件

氢氧化钠 10 mL, 混匀。再加入乙酸乙酯 20 mL, AH-30 全自动均质器高速均质 3 分钟, 于 8000 r/min 离心 15 min, 合并乙酸乙酯提取液于氮吹管中, 于 40 °C 氮吹浓缩至近干, 加 6 mL 正己烷混匀。于氮吹管中, 于 40 °C 氮吹至近干。加 20% 乙腈水溶液 1 mL 溶解残渣, 过 0.22 μ m 滤膜后用 LC-MS/MS 分析。具体的固相萃取方法见图 3。

全自动固相萃取仪	睿科Fotector Plus.
固相萃取柱	Silica (RayCure, 500mg/6mL)
活化	正己烷
洗脱	正己烷: 丙酮=6: 4



图-2 Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	C6H14				2.8
2	活化	C6H14	有机废液	3	6	2.5
3	上样		有机废液	1	6	6.6
4	清洗样品瓶	C6H14	有机废液	60	2	2.7
5	淋洗	C6H14	有机废液	2	6	3.5
6	气推		有机废液	80	10	0.9
7	洗脱	C6H14+C3H6O (6:4)	收集	1	6	6.5
8	气推		收集	80	10	0.9
9	结束					
10						

图-3 Fotector Plus净化方法

3. 液质检测条件

液相色谱条件

液相色谱柱	Eclipse SB C18, 1.8 μ m \times 50mm \times 2.1mm (内径), 或类似色谱柱
平衡时间	5min

流动相流速	0.4mL/min
色谱柱温度	40℃
进样体积	5μL

流动相及洗脱条件见表 1

表 1. 流动相及梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (甲醇)	流动相 B (0.1%甲酸水溶液)
0.00	40%	60%
5.00	40%	60%
5.50	50%	50%
7.00	50%	50%
7.10	60%	40%
8.00	60%	40%
8.50	75%	25%
9.00	100%	0%
11.00	100%	0%

质谱仪器参数

离子源	电喷雾源
电离模式	多离子反应监测（负）模式
喷雾针压力	45 psi
喷雾加热区电压	1500V
干燥气（氮气）温度	325 °C
干燥气流速	5L/min
鞘气温度	350℃
鞘气流速	10L/min
毛细管电压	4000V
增益电压	600V

MRM 参数

序号	化合物名称	母离子	子离子	离子监测时间	裂解电压	碰撞能量
1	醋酸氟氢可的松	467.3	421.2 *	50	115	4
			349.3	50	115	19
2	倍氯米松	453.3	407.1 *	50	110	5
			377.2	50	110	9
3	倍他米松	437.3	391.1	50	105	3
			361.2 *	50	105	11
			307.3	50	105	23

4	地塞米松	437.3	361.3 *	50	110	10
			307.3	50	110	31
5	甲泼尼松龙	417.3	371.3	50	100	0
			341.3 *	50	100	7
			299.3	50	100	28
6	氢化可的松	407.3	331.2 *	60	105	11
			297.3	60	105	29
7	泼尼松龙	405.3	359.3	60	105	4
			329.3 *	60	105	12
			295.3	60	105	29
8	泼尼松	403.3	357.3	60	100	0
			327.3 *	60	100	7
			299.3	60	100	21

4. 结果与讨论

为了验证该方法的回收率，本实验向猪肉组织样品（2 g）中加入上述 8 种糖皮质激素标准品进行加标回收验证（n=3）。数据如表-2 所示：8 种

糖皮质激素的加标回收率均在 90-120%之间，RSD 值控制在 10%以内。说明该方法能够很好地运用于动物肌肉组织样品中 8 种糖皮质激素的检测。

表-2. 动物肌肉组织样品中的加标回收率及 RSD 值

化合物	添加浓度 ug/L	回收率 (%) 样品-1	回收率 (%) 样品-2	回收率 (%) 样品-3	平均回收率 (%)	RSD (%)
氢化可的松	2.0	104.60	106.75	100.00	103.78	3.32
泼尼松	0.5	102.00	101.20	98.20	100.47	1.99
泼尼松龙	0.5	114.00	119.20	111.40	114.87	3.46
倍氯米松	1.0	106.20	119.90	111.10	112.40	6.18
倍地米松	0.5	117.80	116.40	118.20	117.47	0.80
地塞米松	0.5	107.40	113.20	119.00	113.20	5.12
醋酸氢化可的松	1.0	91.00	93.70	93.90	92.87	1.74
甲泼尼松龙	0.5	99.20	107.80	108.80	105.27	5.01

5. 总结

本文采用睿科 AH-30 全自动均质器搭配 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪，结合 Auto EVA-20Plus 全自动平行浓缩仪，优化建立动物源性食品中糖皮质激素的测定前处理方法。

AH-30 全自动均质器可取代手动均质的过程，快速完成样品均质；Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪可同时进行 6 个样品净化，连续自动处

理 60 个样品，做样通量高；可无人值守，提高实验人员工作效率。此外还可避免工作人员因操作失误导致的检测偏差，也可将实验人员更迭对检测结果的影响最小化。AutoEVA-20Plus 全自动平行浓缩仪可自动完成对小体积样品的快速，平行浓缩。

本解决方案能够高效便捷、自动化，真正实现批量的样品前处理，同时获得较好的加标回收率和

相对标准偏差。加标回收率均在 90-120%之间，RSD 值控制在 10%以内。



全自动均质器
均质



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 5 月版