

Oasis HLB净化和ACQUITY UPLC/TQD

快速分析动物性食品中糖皮质类激素兴奋剂的含量

概要：本文应用沃特世（Waters®）Oasis® HLB固相提取技术和ACQUITY UPLC® 超高效液相色谱/TQD串联四极杆质谱系统测定分析动物性食品中糖皮质类激素兴奋剂。

前言

糖皮质激素（Glucocorticoids）的化学结构属于类固醇类化合物，具有调节糖代谢，促进蛋白转化为糖，提升血糖浓度，抗炎症、抗过敏作用，调节水盐代谢等作用。从体外大量摄入糖皮质类激素会造成体内激素比例失调，糖代谢和无机盐代谢紊乱；长期大量使用糖皮质类激素还会诱发或加重感染，出现心血管系统并发症、骨质疏松、肌肉萎缩、伤口愈合迟缓以及出现消化系统并发症，例如使胃酸、胃蛋白酶分泌增加，抑制胃粘液分泌，降低胃肠粘膜的抵抗力，甚至造成消化道出血或穿孔。糖皮质类激素对人体健康除了具有很多副作用外，也会影响运动员参加比赛时的身体状态，违背了体育比赛公平竞争的原则，所以此类药物属于国际奥委会宣布禁用合成类固醇类兴奋剂。近年来在一些供运动运动员食用的保健类食品、营养补充剂及部分动物性食品中检出含有糖皮质类激素类的事件屡有发生，由于误食此类被污染的食品，使很多运动员出现不必要的阳性结果。2008年北京奥运会除对参赛运动员进行严格的兴奋剂检测外，同样要对供运动员食用的各类食品进行严格的监测。本文采用沃特世HLB固相提取净化技术和UPLC®/TQD系统建立动物性食品中糖皮质类激素的快速、高通量筛查及确证技术，为此类食品的兴奋剂监测提供了全方案的技术支持。

实验方法

1.1 试剂和材料

20孔真空提取装置，旋转蒸发仪，Oasis HLB（500mg，6cc）：乙腈，甲醇，甲酸，乙酸乙酯均为色谱纯，实验用水为超纯水，无水硫酸钠。糖皮质类激素标准品：泼尼松，泼尼松龙，氢化可的松，可的松，甲基泼尼松，倍他米松，地塞米松，倍氯米松，氟氢可的松，纯度≥98%。

2.1 分析条件 液相色谱条件

LC系统：	沃特世ACQUITY UPLC
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1mm × 50mm, 1.7μm
柱温：	30°C
流速：	500μL/min
流动相A：	水
流动相B：	乙腈
梯度：	时间0 min 20%B 时间5 min 25%B 时间5.3 min 50%B 时间5.5 min 60%B 时间5.6 min 20%B 时间6.5 min 20%B 总分析时间6.5 min
进样量：	10 μL

质谱条件

质谱系统：	沃特世ACQUITY® TQD检测器
电离模式：	ESI(-)
毛细管电压：	2.8 kV
去溶剂气温度：	400°C
去溶剂流速：	800 L/h
离子源温度：	130°C
数据采集：	多反应监测（MRM）
碰撞气体：	氩气3.2 × 10 ⁻³ mba

调节ACQUITY TQD使得母离子和子离子在半峰宽的分辨率为0.7 Da以内。本实验的多反应监测(MRM)、驻留时间、锥孔电压和碰撞能量列表参见表1。标注下划线的离子对用于定量分析。

数据采集和处理方法

沃特世公司MassLynx™4.1 操作软件用于数据采集，TargetLynx™应用管理软件用于数据处理。

3.1 样品前处理

称取5g的处理均匀的猪肉样品，依次加入10g无水硫酸钠，20mL乙酸乙酯，混合均匀后均质1min，振荡提取10min，在10000 转/min下离心5min。上清液转移至浓缩瓶中，再向残渣中加入10mL乙酸乙酯重复上述操作一次，合并两次提取液，在40℃下旋转蒸发至干。浓缩后样品用5mL 30%甲醇水溶液溶解。Oasis HLB预先依次用3mL甲醇，6mL水活化。将上述提取液全部通过柱，依次用5 mL水，5mL 50%甲醇水溶液淋洗后抽干。用10mL甲醇/乙腈（1: 1）洗脱并接收，洗脱液在40℃下氮气吹干后，用乙腈/水（2: 8）溶解定容至1mL，过0.2μm滤膜后上机分析测定。

结果与讨论

1.1 样品前处理条件的确定

糖皮质类激素属于一类脂溶性激素，在结构上都是环戊烷多氢菲衍生物。所以选择采用乙酸乙酯作为提取溶剂能够实现从动物组织中有效的提取此类药物。由于此类化合物具有较强的非极性，在HLB柱上有较强的非极性保留作用，所以实验采用低洗脱强度的甲醇/水溶解样品提取物转移上HLB柱，依次用水和50%甲醇水溶液洗除极性、中极性的样品基质杂质，再用甲醇/乙腈混合溶剂把糖皮质类激素药物洗脱下来，而部分动物油脂等非极性杂质保留在HLB上，从而实现了糖皮质类激素的有效净化富集。

表1 ACQUITY TQD MRM参数

	MRM 变化区间	保留时间 (min)	典型 离子比值	驻留时间 (s)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
泼尼松	403.2>327.2 403.2>357.2	2.65	2.7	0.05	20	15 8
泼尼松龙	405.2>329.2 405.2>359.2	2.68	9.8	0.05	28	17 11
氢化可的松	407.2>331.2 407.2>361.2	2.79	9.8	0.05	25	16 11
可的松	405.2>329.2 405.2>359.2	2.90	4.6	0.05	25	14 10
甲基泼尼松	419.2>343.2 419.2>373.2	4.59	13.0	0.05	28	15 11
倍他米松	437.2>361.2 437.2>391.2	4.76	28.5	0.05	26	17 11
地塞米松	437.2>361.2 437.2>391.2	5.00	11.0	0.05	28	16 11
倍氯米松	453.2>377.2 453.2>407.2	5.52	1.35	0.05	25	16 12
氟氢可的松	467.2>421.3 467.2>349.2	5.71	10.0	0.05	30	12 23

2.1 色谱条件的优化

由于9种糖皮质激素类化合物极性上存在一定差异，所以采用梯度方法在乙腈/水的流动相体系下实现分离，结果见图1。其中泼尼松龙和可的松（405.2>329.2，405.2>359.2），倍他米松和地塞米松（437.2>361.2，437.2>391.2）两组化合物的母离子和子离子完全一样，只是在结构上空间异构，在质谱上无法区分，所以必须通过色谱实现分离后定量定性分析，实验优化了梯度程序、色谱柱温及流速，使两组化合物实现了基线分离，从而能够准确定性和定量测定。

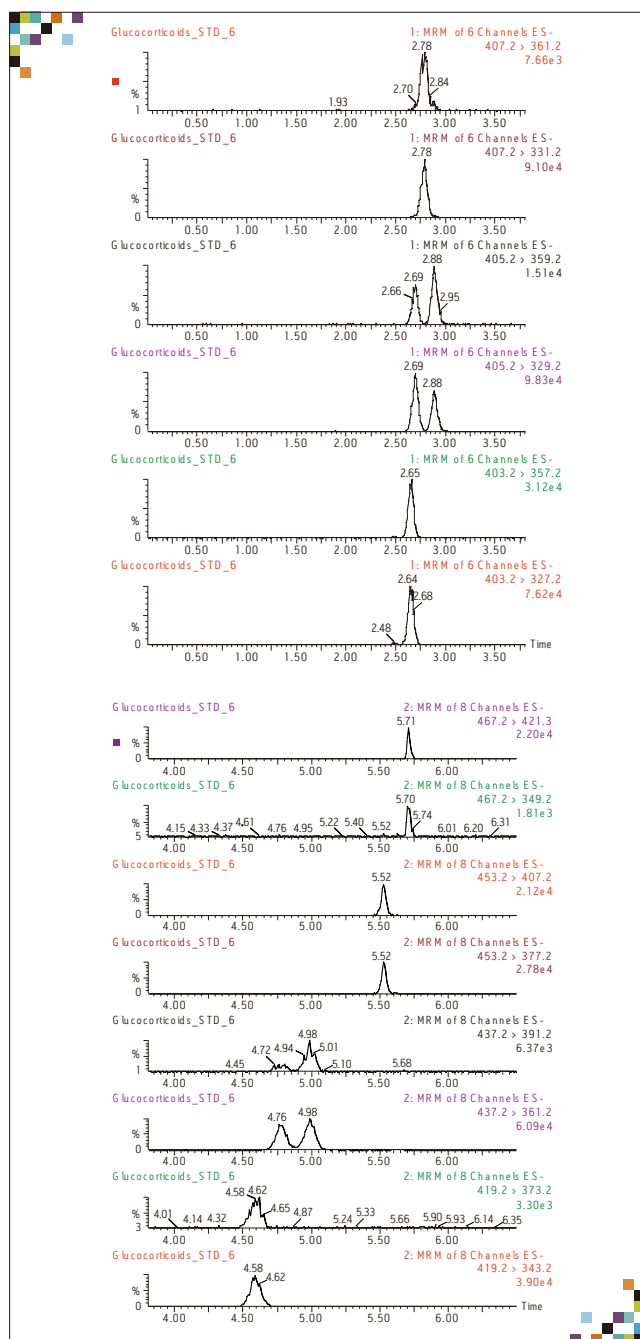


图1 糖皮质激素类混合标准品色谱图

3.1 质谱条件的优化

在ESI(-)模式下，糖皮质激素类化合物形成 $[M-H+HCOOH]^+$ 形式的分子离子峰，通过碰撞处理，子离子扫描进一步得到定量和辅助定性子离子碎片峰，进而采用MRM模式进行监测，MRM条件参见表1。实验分别对毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等参数进行了优化，使方法灵敏度和分辨率满足检测需要。

4.1 方法的线性范围、准确度和精密度

9种糖皮质激素类混合标准品在1ng/mL~100ng/mL浓度范围内进样分析，得到线性方程和相关系数。采用空白样品添加10μg/kg水平下，平行6次，计算添加回收率及RSD，结果参见表2和图2。

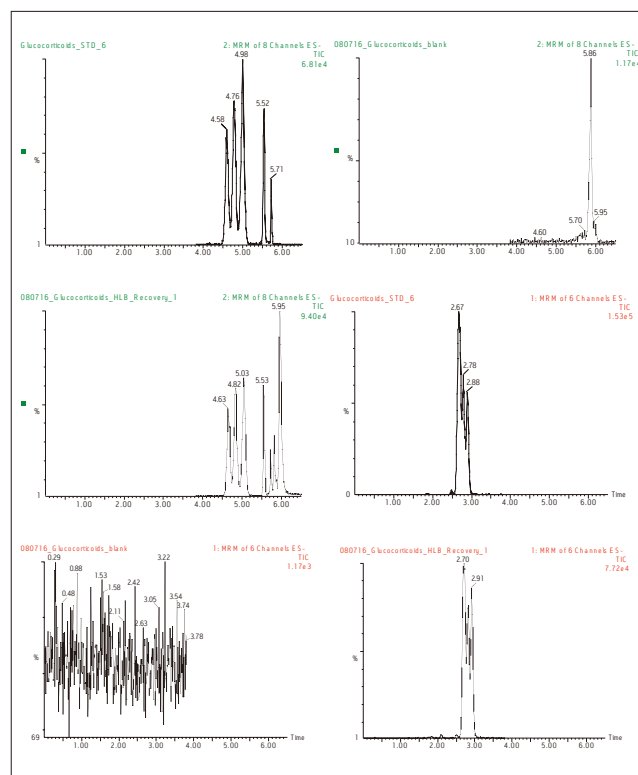


图2 糖皮质激素类标准品、空白样品、添加样品总离子流 (TIC) 色谱图

表2 糖皮质类兴奋剂测定方法线性方程、相关系数、相对标准偏差和回收率

	线性方程 Linear equation	相关系数 r	相对标准偏差 RSD %	回收率 Recovery %
泼尼松	$Y=55.1594x-107.197$	0.9994	3.27	73.4
泼尼松龙	$Y=65.9314x-113.202$	0.9994	2.79	75.4
氢化可的松	$Y=65.6897x-116.869$	0.9994	2.97	73.6
可的松	$Y=44.1831x-84.8531$	0.9993	4.03	80.2
甲基泼尼松	$Y=34.9512x-58.3879$	0.9995	3.83	95.5
倍他米松	$Y=38.7269x-74.6360$	0.9993	4.12	92.1
地塞米松	$Y=44.6788x-87.9209$	0.9994	3.84	98.8
倍氯米松	$Y=11.7621x-24.5895$	0.9992	4.26	90.6
氟氢可的松	$Y=5.63984x-7.93426$	0.9996	3.43	70.0

结论

本文采用HLB净化和UPLC/TQD系统建立了快速有效的监测动物性食品中9种糖皮质类激素的全分析方案。Oasis HLB能够有效地对动物性样品进行净化和富集，除去油脂、蛋白等基质干扰，提高了方法灵敏度，降低了基质效应；UPLC/TQD系统在6.5 min内实现了高效分离和快速测定，同时实现了准确定量和确证的目的。为奥运动物性食品中糖皮质类激素的监测提供了有力的技术支持和参考，也对其它类型食品的监测提供有意义的借鉴。

参考文献

- [1] Valerie A. Frerichs, Kathleen M. Tornatore. Journal of Chromatography B, 802(2004) 329-338.
- [2] O. Van den hauwe, F. Dumoulin, J. P. Antignac, M. P. Bouche, C. Elliott, C. Van Peteghem. Analytica Chimica Acta, 473(2002) 127-134.
- [3] Olivia Van den hauwe, Manuela Schneider, Ali Sahin, Carlos H. Van Peteghem. J. Agric. Food Chem, 51(2003) 326-330.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



©2012 沃特世公司

沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866

上海: 021 - 6156 2666

广州: 020 - 2829 6555

成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676

www.waters.com