

气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱法溯源分析 黄油中 5 种类固醇激素

赵超敏¹, 古淑青¹, 曲栗¹, 韩丽¹, 肖陈贵², 邓晓军¹, 岳振峰², 王传现¹, 房克艳^{1,3}

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

(2. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广东深圳 518045) (3. 上海大学生命科学学院, 上海 200444)

摘要: 建立了黄油中雌酮、 α/β -雌二醇、雌三醇和孕酮 5 种类固醇激素的气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱 (GC/C/IRMS) 溯源方法。样品经乙酸乙酯-环己烷 (1:1, V/V) 提取, 经凝胶渗透色谱 (GPC) 净化和半制备液相色谱 (Pre-HPLC) 纯化, 纯化液经 HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μ m) 柱分离, GC/C/IRMS 溯源分析和气相色谱-质谱 (GC/MS) 定性和定量分析。黄油中外源性激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值 <-30‰, 内源性激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值 >-27‰, 其中黄油中外源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值 = -30.59‰±0.12‰, 内源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围在 -26.83‰±0.25‰ 与 -23.80‰±0.33‰ 之间, 单因素方差分析 (p 值 = 0.009 < 0.05) 显示内源性孕酮和外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在显著差异性。经模拟实验显示, 实际样品中引入外源性激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与外源性激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有同源性。方法灵敏度为 15~100 ng, 方法批内精密密度为 0.11‰~0.17‰, 批间精密密度为 0.16‰, Pre-HPLC 的馏分接收是同位素分馏现象发生和影响测定准确性的主要阶段。结果表明, 本方法准确性和特异性好, GC/C/IRMS 是鉴别激素来源的有效工具。

关键词: 内源性激素; 外源性激素; 黄油; 气相色谱/燃烧炉/同位素比质谱; 溯源

文章编号: 1673-9078(2019)02-270-278

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.038

Traceability of Five Steroid Hormones in Butter Investigated by Gas Chromatography-combustion-isotope Ratio Mass Spectrometry

ZHAO Chao-min¹, GU Shu-qing¹, QU Li¹, HAN Li¹, XIAO Chen-gui², DENG Xiao-jun¹, YUE Zhen-feng²,
WANG Chuan-xian¹, FANG Ke-yan^{1,3}

(1. Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China) (2. Food Inspection Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China) (3. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: A gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry method was developed for investigating the traceability of five steroid hormones (estrone, α/β -estradiol, estriol and progesterone) in butter. The samples were first extracted by ethylacetate/cyclohexane (1:1, V/V). The sample was extracted with ethyl acetate-cyclohexane (1:1, V/V), purified by gel permeation chromatography (GPC) and semi-preparative liquid chromatography (Pre-HPLC), separated through a HP-5MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μ m), before traceability analysis by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) and qualitative and quantitative analyses by GC/MS. The $\delta^{13}\text{C}$ values of the exogenous hormones in butter were <-30‰ while the $\delta^{13}\text{C}$ values of endogenous hormones were >-27‰, among which the $\delta^{13}\text{C}$ value of exogenous progesterone in butter was -30.59‰±0.12‰ and the $\delta^{13}\text{C}$ value of endogenous progesterone ranged from -26.83‰±0.25‰ to -23.80‰±0.33‰. One-way analysis of variance (p -value=0.009<0.05) indicated a significant difference in the $\delta^{13}\text{C}$ values between the endogenous and exogenous progesterone. The simulation experiments showed that the $\delta^{13}\text{C}$ value of the sample spiked with an exogenous hormone was homologous with the $\delta^{13}\text{C}$ value of the exogenous hormone. The sensitivity of the method for the five hormones was in the range of 15~100 ng. The within-batch precision of the method ranged from 0.11‰ to 0.17‰ and the between-batch precision was 0.16‰.

收稿日期: 2018-08-28

基金项目: 上海市科委科研项目 (16142201500; 17DZ2293700; 18DZ2201200; 17DZ2201100); 长三角科技合作项目 (17395810102); 中央引导地方科技发展专项 (YDZX20173100004528)

作者简介: 赵超敏 (1979-), 女, 博士, 工程师, 研究方向: 食品掺假溯源

通讯作者: 邓晓军 (1977-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 分析化学; 岳振峰 (1973-) 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全

The step of Pre-HPLC fraction collection was critical for isotopic fractionation and analysis accuracy. The obtained results showed that the established method is accurate and specific, and GC/C/IRMS is an effective tool for investigating the origin of steroid hormones.

Key words: endogenous hormone; exogenous hormone; butter; gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry; traceability

类固醇激素作为促生长剂常被违禁用于畜牧业和养殖业^[1-4]。动物源性食品中残留激素可通过食物链进入人体,造成一系列健康危害^[5,6]。我国^[7]和欧盟^[8]等国家明令禁止合成类固醇激素在食品动物中应用。目前,评价动物源性食品中类固醇激素滥用的唯一途径是检测其生理学浓度^[9-11],利用气相色谱-质谱法(GC/MS)^[12,13]或液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[14,15]检测衍生型激素(如己烷雌酚等)可判定其滥用情况。然而,当违禁使用的合成类固醇激素或其代谢物与动物自然产生的内源性类固醇激素(如雌二醇等)一致时,利用传统检测技术(GC/MS、HPLC-MS/MS)仅根据其生理学浓度,难以判定其是由动物自身产生还是在动物养殖过程中违禁用药产生,还可能会提供一个有争议的结论而导致贸易争端。

气相色谱/燃烧炉/同位素质谱法(GC/C/IRMS)是国际上鉴别物质来源的有力工具^[16,17],由质谱仪测定组分高温燃烧CO₂中稳定同位素(¹³C/¹²C)比值和国际标准物质的同位素质值的差异性,它反映了样品和国际碳酸盐标准物质PDB(Pee Dee Belemnite)之间碳同位素质值的相对差异:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{样品}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \right] \times 1000$$

不同来源化合物,其¹³C与¹²C的含量比值不同。食品动物自身产生的内源性类固醇激素的碳稳定同位素质比值(¹³C/¹²C)取决于动物不同来源的营养物质中的碳稳定同位素质,如C3(如干草、大豆等)和C4(玉米、甘蔗等)植物混合物^[18,19],而作为药物用的外源性合成类固醇激素主要提取于纯的C3植物(如薯蓣属或大豆植物),其同C4植物相比具有相对较低的碳稳定同位素质比值^[20],因此通过检测类固醇激素¹³C/¹²C可以鉴别其来源,从而监管类固醇激素的滥用。

目前,国内外对于动物源性食品中残留激素的来源鉴别研究还很少。本文作者曾研究发现,黄油样品中激素含量水平明显高于牛奶和牛肉样品^[15,21,22]。因此本文选择全自动凝胶渗透色谱(GPC)净化技术、半制备液相色谱(Pre-HPLC)纯化技术、GC/MS定性定量技术与GC/C/IRMS相结合,建立黄油中5种类固醇激素(图1)的溯源方法,前处理净化、纯化效果好,测定结果准确性和特异性好,满足溯源分析要求,该法填补了类固醇激素溯源技术空白。

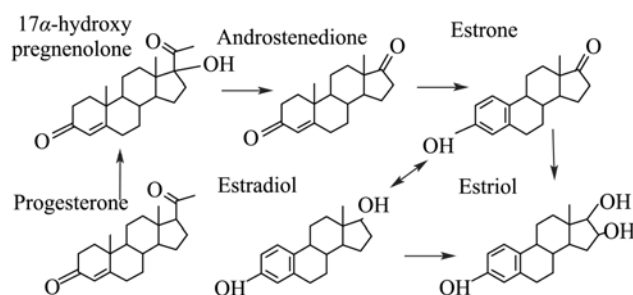


图1 5种类固醇激素的代谢和生物合成途径

Fig.1 Biosynthesis pathways and metabolism of five steroid hormones

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

同位素质谱仪(IsoPrime 100),英国 IsoPrime 公司;配 GC-5 燃烧界面和气相色谱仪(7890A),美国 Agilent 公司;半制备高效液相色谱仪配紫外检测器(DAD, 1200 型),美国 Agilent 公司;气相色谱仪(6890N 型)配质谱仪(5975 型),美国 Agilent 公司;全自动凝胶净化系统(GPC Vario),德国 LCtech 公司;漩涡振荡器,德国 Heidolph 公司;低温离心机,美国 Sigma 公司;往复振荡器,日本 Yamato 公司;超声清洗器(S300H),德国 Elma 公司;全自动氮吹仪,美国 Caliper 公司;恒温干燥箱(ED115),德国 Binder 公司。

类固醇激素标准物质:17 α / β -雌二醇(α / β -E)、雌三醇(E3)、雌酮(E1)、孕酮(P)(纯度 \geq 98%)购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;甲醇、环己烷、乙酸乙酯和乙腈(HPLC 级)购自美国 TEDIA 公司。

黄油样品:购自生产商,并确保在生产过程中无外源性激素使用。

人造黄油:购自超市,无激素检出,用以方法确认和质控。

1.2 GPC 条件

柱类型:GPC 40010(300 mm \times 20 mm);填料:24 g Bio-Beads SX-3 凝胶,柱床高 24 cm;流动相:乙酸乙酯/环己烷(1:1, V/V);流速:4.7 mL/min;柱预洗时间:10 s;前运行时间:10.5 min;主收集时间:33 min;尾洗时间:4 min;溶剂交换周期:3 次;定

量环: 5.0 mL, 浓缩至 2 mL。检测波长: 254 nm。

1.3 Pre-HPLC 条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C18 (21.2×250 mm, 7 μm); 流动相: 水 (A) 和乙腈 (B); 柱温: 室温; 梯度洗脱程序: 0.0 min (40% B) → 15.0 min (80% B) → 25.0 min (100% B) → 30.0 min (100% B); 流速: 15 mL/min; 进样量: 500 μL; 检测波长: 200 nm 和 242 nm。

1.4 GC/MS 条件

色谱条件: 色谱柱: Agilent HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样模式: 不分流; 进样量: 2 μL; 前样口温度: 280 °C; 离子源温度: 230 °C; MS 四级杆温度: 150 °C; 辅助通道温度: 280 °C; 柱流量: 1 mL/min; 柱升温程序: 初始温度 80 °C, 保持 1 min, 以 15 °C/min 升至 250 °C, 保持 2 min, 以 2 °C/min 升至 272 °C, 保持 5 min; 溶剂延迟时间为 3 min。

质谱条件: 电子轰击 (EI) 能量: 70 eV; 载气: 氦气 (纯度 99.999%); 全扫描 (Scan) 质量范围: 50~500 m/z , 选择离子扫描 (SIM) 参数如表 1; 离子驻留时间: 50 ms。

表 1 5 种类固醇激素衍生物的 MS 采集参数

Table 1 Optimized mass spectrometer parameters of five steroid hormone derivatives

化合物	缩写	保留时间/min	特征离子/(m/z)	定量离子/(m/z)
孕酮	P	21.601	124/229/244/272/314 (M^+)	124
雌酮醋酸酯	E1Ac	19.730	146/172/185/270/312 (M^+)	270
17 α -雌二醇醋酸酯	α -EAc	21.638	146/160/172/314/356 (M^+)	314
17 β -雌二醇醋酸酯	β -EAc	22.029	146/160/172/314/356 (M^+)	314
雌三醇醋酸酯	E3Ac	27.180	160/252/313/372/414 (M^+)	372

注: M^+ : 分子量。

1.5 GC/C/IRMS 条件

色谱柱: Agilent HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样模式: 不分流; 进样量: 5 μL; 进样口温度: 250 °C; 柱流量: 1 mL/min; 柱升温程序: 初始温度 80 °C, 保持 1 min, 以 15 °C/min 升至 250 °C, 保持 2 min, 以 2 °C/min 升至 272 °C, 保持 5 min, 最后以 2 °C/min 速度升至 275 °C, 保持 5 min。

质谱条件: 电子轰击 (EI) 能量: 100 eV; 燃烧炉温度: 850 °C; 燃烧界面温度: 350 °C。载气: 氦气 (纯度 99.999%); 参考气: 二氧化碳 (纯度 99.999%); 校准物质: 咖啡因 (IAEA-600, $\delta^{13}C = -27.771\%$)。

1.6 样品处理

称取 2 g 样品 (精确到 0.01 g) 于 15 mL 具塞离心管中, 加入 8 mL 乙酸乙酯/环己烷 (1:1, V/V) 涡旋 1 min, 45 °C 下水浴超声 5 min 和往复振荡提取 10 min, 于 9000 r/min 下离心 5 min, 收集上清液至 GPC 样品瓶中, 经 GPC 净化、浓缩, 收集 2 mL 浓缩液于收集瓶中。合并 50×2 mL 浓缩液于旋转蒸发鸡心瓶中, 于 40 °C 旋转蒸发至约 5 mL, 移入 15 mL 具塞离心管中, 40 °C 下氮气吹至尽干, 浓缩物用 1 mL 乙腈水溶液 (40:60, V/V) 溶解, 涡旋 1 min, 过 0.22 μm 有机滤膜于 Pre-HPLC 进样瓶中, 经 Pre-HPLC 纯化、浓缩, 分段接收分析物馏分于接收试管中, 合并各分析物的

分段馏分于旋转蒸发鸡心瓶中, 40 °C 旋转蒸发至近干, 用 2 mL 甲醇分两次溶解浓缩物, 移入 2 mL 进样瓶中, 40 °C 下氮气吹至尽干, 孕酮用 200 μL 环己烷定容后过 0.22 μm 有机滤膜待测, 其余物质依次用 400 μL 乙酸酐和 400 μL 吡啶溶解残留物, 涡旋约 1 min, 于 70 °C 恒温干燥箱衍生化 50 min, 取出冷却至室温, 40 °C 下氮气吹至尽干, 用 200 μL 环己烷定容, 过 0.22 μm 有机滤膜, 供 GC/MS 定性定量分析和 GC/C/IRMS 测定。

1.7 分析方法评价

分析方法的灵敏度、精密度直接决定类固醇激素 $\delta^{13}C$ 值的准确性, 同时, 样品前处理过程也可能引起同位素分馏现象, 导致 $\delta^{13}C$ 值准确性和特异性差, 所以, 对方法的可行性进行评价。

1.7.1 灵敏度

方法的灵敏度通过类固醇激素衍生物不同进样量 (1~100 ng) 的 $\delta^{13}C$ 值及其信号强度来评价分析。

1.7.2 精密度

空白人造黄油样品中添加两个浓度水平的雌酮标准溶液, 以测定雌酮醋酸酯批内和批间精密度, 批次的两个浓度水平被两个操作者 (A、B) 在两个不同的时间平行测定 6 次, 根据其标准偏差 (SD) 评价分析精密度。

1.7.3 特异性

通过对样品中类固醇激素的 GC/MS 质谱图和峰纯度与对应激素标准溶液的质谱图进行分析比较, 来确保类固醇激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定的特异性。

1.7.4 同位素分馏

在 GC/C/IRMS 分析过程中, 同位素分馏现象是主要的误差来源。同位素分馏现象可能会出现在样品的前处理过程, 如 Pre-HPLC 过程。通过测定类固醇激素标准溶液 Pre-HPLC 分段馏分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分析浓缩纯化过程中同位素分馏现象。

1.8 数据统计分析

Thermo isodat 3.0 软件用于质谱仪自动获取和计算数据。绘图软件采用 Origin 8.0 进行绘制。

2 结果与讨论

2.1 提取和净化条件的确定

黄油含脂量高, 类固醇激素脂溶性强, 有效去除油脂干扰是提取黄油中激素的关键。在前期研究的基础上可知^[21], GPC 是有效去除油脂和色素等大分子物质的有效方法。根据 GPC 净化效果好、加标回收率高, 选择乙酸乙酯/环己烷 (1:1, V/V) 为黄油中激素的提取溶剂和 GPC 的流动相, 流速为 4.7 mL/min 时, 柱预洗时间为 10 s, 前运行时间为 10.5 min, 主收集时间为 33 min, 检测波长为 254 nm。

2.2 浓缩和纯化条件的确定

样品基质中类固醇激素残留为痕量水平, 样品浓缩倍数大, 且 GC/C/IRMS 对待测物的纯度要求非常高。尽管 GPC 净化技术可去除大部分色素和油脂, 但是仍有一些分子量与待测物相似的基质共提物存在粗提物中, 因此, 在 GC/C/IRMS 测定前增加 Pre-HPLC 纯化、浓缩过程。

分别选择甲醇-水、乙腈-水为流动相, 选择 C18 色谱柱, 采用不同流动相、流速、检测波长分析结果。结果表明, E1、E3、 α/β -E 在 200 nm、P 在 242 nm 时获得最大紫外吸收, 而 E1、E3、 α/β -E 在 242 nm 时紫外吸收较弱, 但 P 在 200 nm 具有明显紫外吸收, 因此, 选择二元波长 (200 nm、242 nm) 扫描, 而分析物馏分接收时间根据 200 nm 扫描时色谱图来确定。色谱柱选择 Agilent Eclipse XDB-C18 (21.2×250 mm, 7 μm) 柱, 此柱可耐大流速、高压和进样量, 分析速度快, 分离度高。甲醇粘度相对较大, 二元泵在大流速下长时间检测易在泵内产生气泡, 造成检测过程基线波动大和检测稳定性降低, 导致目标分析物馏分接

收的准确性差, 乙腈与水混合的压力较低, 在大流速下色谱柱承受压力小, 选择乙腈-水为流动相。E3 的极性稍强于其他激素, 在乙腈<60%时, 在 C18 色谱柱上才有保留, 经优化初始流动相选择 40%乙腈。优化流速 (10、15、20 mL/min) 显示, 在 15 mL/min 时分离度好。改变柱温 (20、30 和 35 $^{\circ}\text{C}$) 对目标分析物的分离度影响不大, 因此柱温选择室温。结果显示, 所建纯化条件分析物获得良好的峰型和分离度(图 2)。

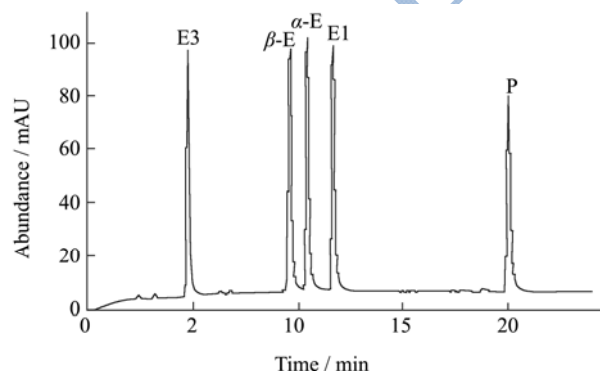


图2 激素混合标准溶液的 Pre-HPLC 色谱图

Fig.2 Pre-HPLC chromatograms of hormones in mixed standard solution

注: 添加水平: 100 mg/L; 进样量: 50 μL ; 波长: 200 nm; 馏分接收如竖线所示

2.3 GC/C/IRMS 条件的确定

由于类固醇激素具有弱挥发性和热不稳定性, 且含有羟基和酮基等官能团, 极性较大, 沸点较高, 直接分析, 灵敏度较低, 峰形较宽、拖尾, 所以, 需衍生化以提高检测灵敏度和改善色谱峰型, 有利于 GC/C/IRMS 集成软件识别目标峰的起始位置和结束位置, 以提高 $\delta^{13}\text{C}$ 测定的重复性和精确性。

常用的衍生化方法主要有硅烷化法和酰化法。经优化, 酰化法不仅引入更少的外源性碳原子, 且衍生物不易堵塞色谱柱末端或反吹毛细管, 降低氧化反应管的损坏。因此, 选择乙酸酐为酰化试剂, 吡啶为催化试剂。优化衍生化温度 (60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$)、时间 (40 min、50 min 和 60 min) 显示, 随着衍生化温度的增加和衍生化时间的延长, 分析物的响应值增加, 当 70 $^{\circ}\text{C}$ 衍生化 50 min 时效果最好。同时, 采用非极性 HP-5MS 色谱柱分析目标物, 分离度和峰型良好, 目标峰起始位置和终止位置明确。色谱柱程序升温太快或较高温度下检测分析, 虽然大大缩短了检测时间且分离度良好, 但是稳定性差, 基线波动大, 并易产生大的且无规律的干扰峰, 造成检测灵敏度降低和重复性差。经优化, 除了 α -EAc 和 P, 其他分析物

分离度良好, 无交叉干扰, 峰型窄而无拖尾, 且峰对称(图3)。因为 α -EAc 与 P 的气相色谱性质相似, 即使优化色谱柱升温程序和柱流速, 也无法获得良好的分离度, 但是, 利用 Pre-HPLC 浓缩纯化粗提物时, α -EAc 与 P 的分离度良好, 馏分接收纯净无相互交叉干扰, 因此, 目标分析物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定具有良好的准确性和特异性, 所建方法满足 GC/C/IRMS 测定分析要求。

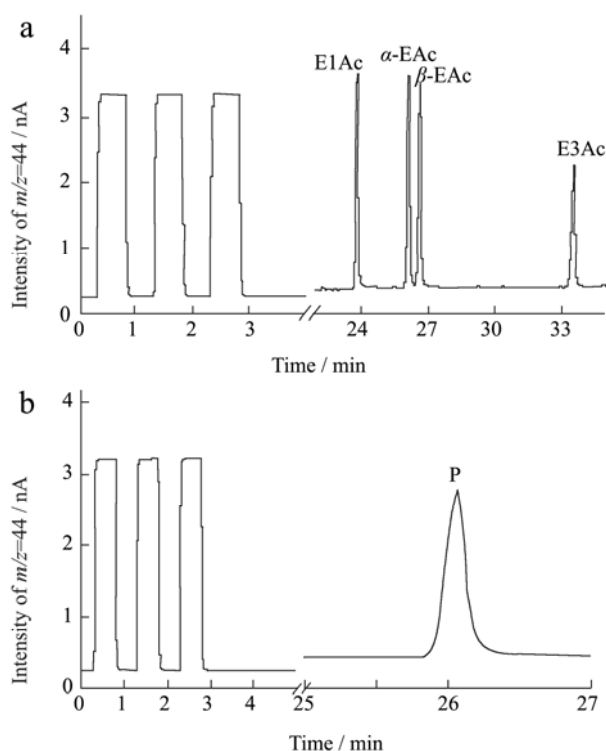


图3 类固醇激素衍生物的GC/C/IRMS 色谱图 (m/z 44)

Fig.3 Chromatograms of GC/C/IRMS (m/z 44) of steroid hormone derivative

2.4 $\delta^{13}\text{C}$ 值的分析

类固醇激素衍生化后, 实际上直接测定的为类固醇激素衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 衍生化时会引入外源性酰化试剂的碳原子, 因此, 采用如下修正公式以获得未衍生化类固醇激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值^[16]:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{DOH}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{DOAc}} + 2m \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{DOAc}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{DAc}}}{n}$$

式中: $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOH}}$: 未衍生化的类固醇激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值; $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOAc}}$: 类固醇激素衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值; $\delta^{13}\text{C}_{\text{DAc}}$: 衍生试剂的 $\delta^{13}\text{C}$ 值; n: 类固醇激素含有的碳原子个数; m: 类固醇激素中含有的待衍生化的羟基数。

选择孕酮标准品 ($\delta^{13}\text{C} = -30.67\text{‰}$) 为质控标准, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值通过 GC/C/IRMS 和 EA-IRMS 校准测定, 每个样品测定前, 质控标准被平行测定 6 次以判断系统稳定性; 样品平行测定 6 次, 其标准偏差 (SD) 应

$< 0.5\text{‰}$ 。由表 2 可知类固醇激素衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和修正后类固醇激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 外源性类固醇激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值均 $< -30\text{‰}$ 。

表 2 类固醇激素衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和修正后类固醇激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值

Table 2 $\delta^{13}\text{C}$ values of steroid hormone derivatives and $\delta^{13}\text{C}$ corrected values of steroid hormones

激素	衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值/ ‰	修正后的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值/ ‰
孕酮 ^a	-30.67	-30.67
雌酮	-32.14	-32.77
β -雌二醇	-33.37	-34.90
α -雌二醇	-31.30	-32.37
雌三醇	-34.96	-37.79

注: a 表示未衍生化。

图 4 为 4 个黄油样品中内源性孕酮的 GC/C/IRMS 色谱图。结果显示, 孕酮色谱图干净且没有干扰物质, 说明样品前处理方法的可行性和孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定的有效性。表 3 为 4 个黄油样品含有的孕酮和空白基质中加标孕酮 ($10 \mu\text{g/g}$) 和孕酮标准溶液 ($20 \mu\text{g/mL}$) 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 结果显示, 黄油中内源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值在 $-26.83\text{‰} \pm 0.25\text{‰}$ 和 $-23.80\text{‰} \pm 0.33\text{‰}$ 之间, 空白加标样品中外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值 ($-30.59\text{‰} \pm 0.12\text{‰}$) 与孕酮标准溶液的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 ($-30.73\text{‰} \pm 0.05\text{‰}$) 具有一致性, 单因素方差分析 (ANOVA, p 值 = 0.009 < 0.05) 显示内源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和外源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间存在显著差异性, 尽管其中有 2 个黄油样品的内源性孕酮 $\delta^{13}\text{C}$ 值低于文献推荐的牛自然产生的内源性激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围 (-15‰ 与 -26‰ 之间)^[23], 但是, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值与另一个文献参考值 ($> -28\text{‰}$) 一致^[24], 研究显示, 黄油中内源性孕酮的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 $> -27\text{‰}$ 。尽管其他内源性激素在实际样品中未检测到, 经研究和参考文献显示, 所建方法和内源性激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围也适合其他激素。

事实上, 当食品动物被外源性引入合成激素时, 实际样品中残留类固醇激素为内外源性激素混合物, 但是, 由于基质中残留内源性类固醇激素为痕量, 外源性引入激素的含量水平远高于内源性类固醇激素的残留水平, 通过混合不同比例 (1:1~1:100, ng/ng) 内源性孕酮和外源性孕酮进行模拟实际样品试验, 结果显示, 测定的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 -28.61‰ ~ -30.61‰ 之间, 此范围与文献推荐的外源性类固醇激素的范围 (-28‰ ~ -34‰ 之间)^[23] 一致, 因此, 实际样品中类固醇激素混合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与外源性引入类固醇激素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有同源性, 因此, 所建方法也适合分析实际

样品中的混合物，也进一步验证了建立的溯源技术具有可行性和有效性。

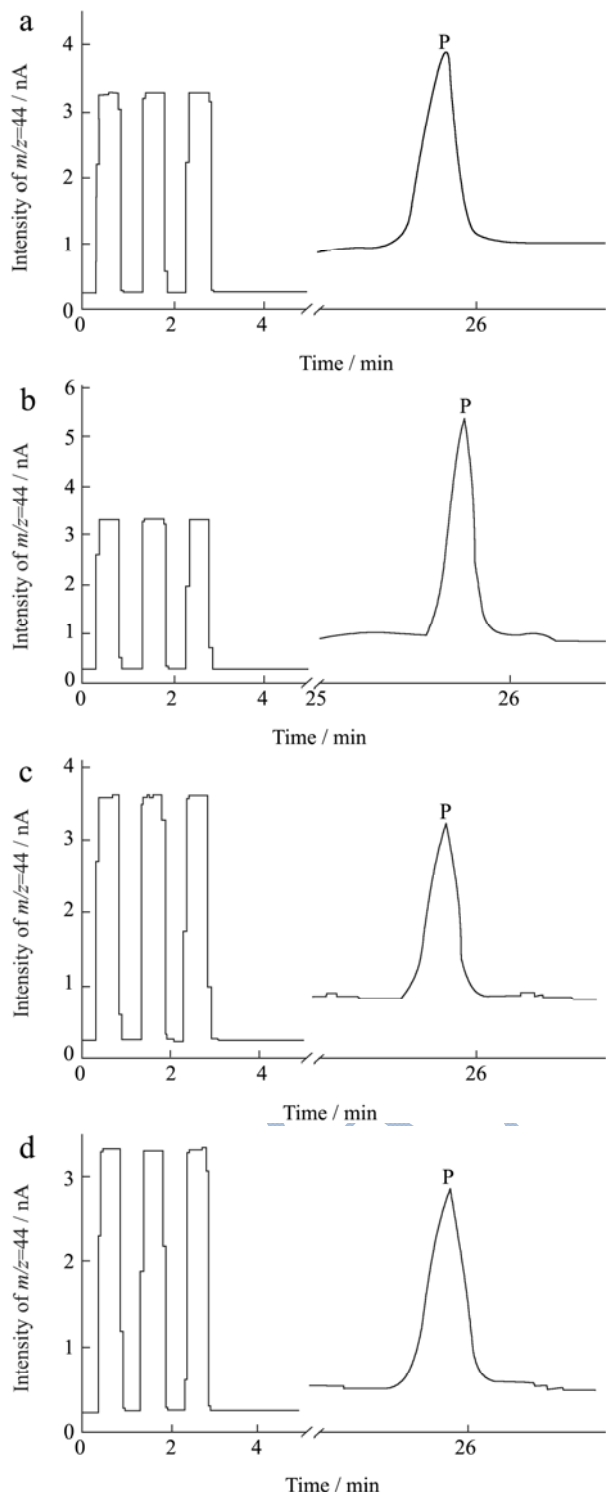


图4 4个黄油样品(a)、(b)、(c)、(d)中孕酮的GC/C/IRMS 色谱图 (m/z 44)

Fig.4 Chromatograms of GC/C/IRMS (m/z 44) of progesterone in four butter samples (a), (b), (c), (d)

表3 黄油样品、空白人造黄油加标样品中和标准溶液孕酮的 $\delta^{13}C$ 值

Table 3 $\delta^{13}C$ values of progesterone in butter samples, spiked blank margarine samples and progesterone standard solution

(n=6)		
样品	$\delta^{13}C$ 平均值/ ‰	标准偏差/ ‰
黄油 1	-23.80	0.33
黄油 2	-25.75	0.11
黄油 3	-26.83	0.25
黄油 4	-26.62	0.15
孕酮加标空白人造黄油	-30.59	0.12
孕酮标准溶液	-30.73	0.05

2.5 分析方法的评价

2.5.1 灵敏度

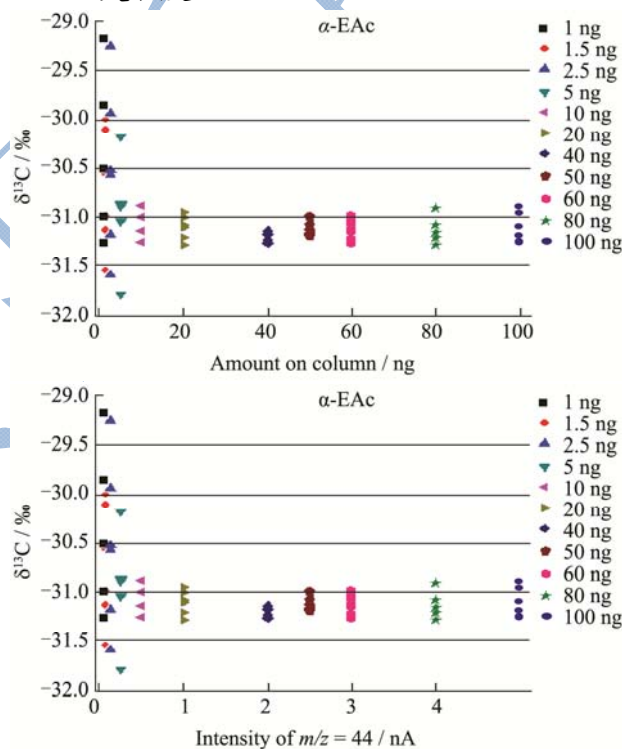


图5 不同进样量的 α -EAc 的 $\delta^{13}C$ 值和信号强度

Fig.5 $\delta^{13}C$ values (expressed in ‰) of α -EAc versus the corresponding amounts and peak intensities

注： $\delta^{13}C$ 值以 ‰ 表示，信号强度以 nA 表示，进样量为 1、1.5、2.5、5、10、20、40、50、60、80 和 100 ng, n=6。

类固醇激素衍生物的不同进样量 (1~100 ng) 的 $\delta^{13}C$ 值及其信号强度如图 5 (α -EAc) 所示。 α -EAc 的进样量 ≤ 5 ng 时，其 $\delta^{13}C$ 值在 -31.78 ‰ 和 -29.17 ‰ 之间波动大 (SD>0.5 ‰)；当进样量在 10~100 ng 之间时，

其 $\delta^{13}\text{C}$ 值稳定在平均值 $-31.09\text{‰} \pm 0.11\text{‰}$ 附近, 对应的 m/z 44 信号强度在 $0.4\sim 5\text{ nA}$ 之间。同时, P、E1Ac 和 β -EAc 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值稳定时, 进样量和信号强度范围与 α -Eac 相同。E3Ac 的进样量在 $15\sim 100\text{ ng}$ 之间时, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值稳定, 对应的 m/z 44 信号强度在 $0.4\sim 3\text{ nA}$ 之间。当进样量 $> 200\text{ ng}$ 时, 色谱柱超载, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值准确性差。因此, 选择进样量为 $15\sim 100\text{ ng}$, m/z 44 = $0.4\sim 5\text{ nA}$ 时的 $\delta^{13}\text{C}$ 值用于溯源分析, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值的准确性、稳定性和精密度良好, 超过此范围, 检测分析结果的精密度和准确性将受影响。

2.5.2 精密度

不同操作者在不同时间测定空白人造黄油样品中两个添加浓度水平获得的 E1Ac 的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值和 SD 如表 4。结果显示, 批内精密度 (重复性) 在 $0.11\text{‰}\sim 0.17\text{‰}$ 之间, 批间精密度 (重现性) 为 0.16‰ , SD 均 $< 0.5\text{‰}$, 满足 GC/C/IRMS 检测分析要求。

表 4 两位不同操作者在两个不同时间测定的人造黄油样品中两个浓度水平 ($10\text{ }\mu\text{g/g}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/g}$) 的 E1Ac 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值的精密度 ($n=6$)

Table 4 Precision of $\delta^{13}\text{C}$ values (E1Ac) of spiked margarine sample at two levels ($10\text{ }\mu\text{g/g}$, $20\text{ }\mu\text{g/g}$), analyzed by different operator on different day ($n=6$)

操作者	添加浓度/ $(\mu\text{g/g})$	E1-Ac $\delta^{13}\text{C}$ 平均值 \pm SD/ ‰
A	10	-32.11 ± 0.17
B	20	-32.28 ± 0.11
总计		-32.19 ± 0.16

2.5.3 特异性

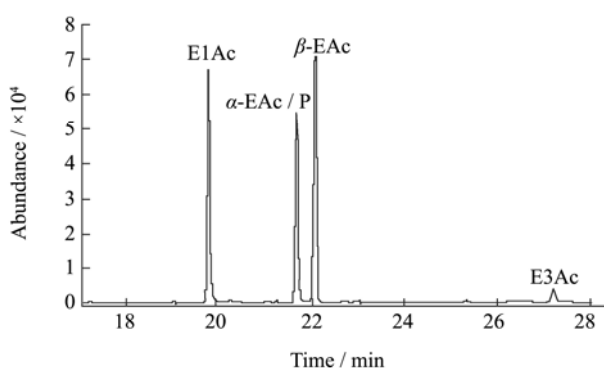


图 6 类固醇激素衍生物的 SIM 扫描总离子流色谱图 (TIC)

Fig.6 Total ion current (TIC) chromatograms of steroid hormone derivatives in selected ion monitoring (SIM) scan mode

注: 添加浓度: 5.0 mg/L , 进样 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。

利用 GC/MS 定性定量分析, 确保类固醇激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定的特异性。为避免基质共提物隐藏于分析物保留时间处, 导致对 $\delta^{13}\text{C}$ 值的错误评估, GC/MS 与 GC/C/IRMS 的检测条件一致, 利用质谱分析和峰纯度

分析以检测可能隐藏的干扰峰。由图 6 可知, 色谱峰分离度良好。图 7 为孕酮标准溶液、黄油样品中含有孕酮的质谱图, 结果显示, 二者质谱图基本相同, 因此, 待测物处没有干扰物存在; 同时, 样品中孕酮的峰纯度分析也显示组分为 1, 因此, 所建检测分析方法满足 GC/C/IRMS 的特异性要求。

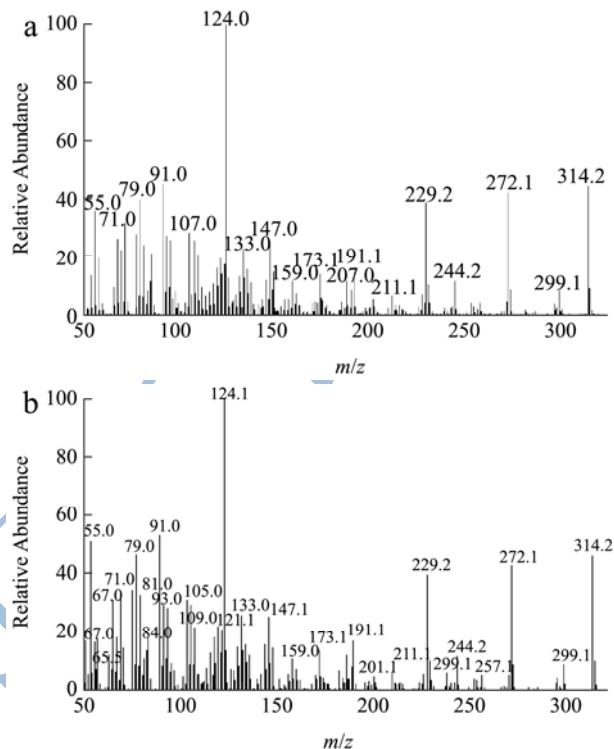


图 7 孕酮标准溶液 (a)、黄油 (b) 中孕酮的 GC/MS 质谱图

Fig.7 GC/MS spectra of progesterone in standard solution (a), butter sample (b)

2.5.4 同位素分馏

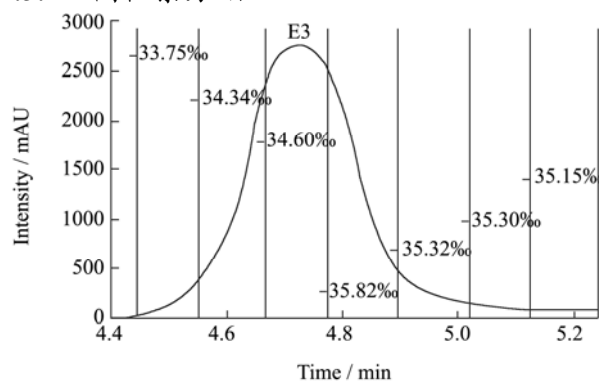


图 8 E3Ac 在反相 C18 色谱柱上的同位素分馏现象

Fig.8 Observation of isotopic fractionation of E3Ac on a RP18 column

注: 竖直线为分段馏分接收范围及其衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

类固醇激素馏分被分段收集为 6~8 部分, 除孕酮馏分, 其余目标物各分段馏分被衍生化后, 经 GC/C/IRMS 检测其 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 其分段馏分 $\delta^{13}\text{C}$ 值均先降低后增加, 说明经反相 C18 色谱柱洗脱过程中其同

位素比组成 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) 在变化, 存在碳同位素分馏现象。以 E3Ac 分段馏分测定结果为例 (图 8), 最先洗脱馏分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 (-33.75‰) 最高, 馏分最大和最小 $\delta^{13}\text{C}$ 值相差 2‰, 当合并分段馏分衍生物, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -35.00‰, 与不经过 Pre-HPLC 的对应标准溶液衍生物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值无差异性, 因此, 待测物经 Pre-HPLC 浓缩纯化时对类固醇激素馏分的准确和完整接收是影响其 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定准确性的关键因素, 所以, 在 Pre-HPLC 浓缩纯化时应尽可能去除基质共提干扰物的同时全部收集目标分析物的馏分。

3 结论

建立了黄油中 5 种类固醇激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值的 GC/C/IRMS 溯源分析方法。结果显示, 黄油中残留外源性类固醇激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 < -30‰, 内源性类固醇激素 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 > -27‰, Pre-HPLC 浓缩纯化过程是同位素分馏现象发生的主要阶段, 因此, 在浓缩净化时应尽可能去除基质共提干扰物的同时全部收集目标分析物的馏分。所建方法目标分析物分离度良好, 无交叉干扰, 满足 GC/C/IRMS 技术对测定目标分析物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的准确性和特异性要求, 确保了检测和鉴别不同来源类固醇激素技术的可行性和有效性。

参考文献

- [1] Courtheyn D, Le Bizec B, Brambilla G, et al. Recent developments in the use and abuse of growth promoters [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 473(1-2): 71-82
- [2] De Brabander H F, Le Bizec B, Pinel G, et al. Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals [J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42(8): 983-998
- [3] Sillence M N. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock [J]. *The Veterinary Journal*, 2004, 167(3): 242-257
- [4] Meyer H H D. Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production [J]. *APMIS*, 2001, 109(1): 1-8
- [5] Sun H W, Kang Z S, Li H. Determination of nine steroid hormone residues in beef samples by gel permeation chromatography-solid phase extraction-rapid resolution liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(9): 1272-1276
- [6] Kanimozhi S, Basheer C, Neveliappan S, et al. Investigation of bioaccumulation profile of oestrogens in zebrafish liver by

- hollow fibre protected liquid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometric detection [J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 909: 37-41
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 193 号, 2002
The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC 193, 2002
- [8] Commission Decision 96/23/EC, Official Journal of the European Communities, 1996, L125: 10
- [9] Scarth J, Clarke A, Hands J, et al. Validation of a quantitative multi-residue urinary assay for the detection of androgen, oestrogen and progestagen abuse in the bovine [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(3-4): 241-252
- [10] 段永生, 王炳玲, 艾连峰, 等. 在线净化液相色谱-串联质谱法快速测定牛奶中 6 种孕激素 [J]. *色谱*, 2014, 32(6): 647-652
DUAN Yong-sheng, WANG Bing-ling, AI Lian-feng, et al. Determination of six progesterones in milk by on-line cleanup liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(6): 647-652
- [11] 刘宏程, 李宁, 林涛, 等. 基质固相分散-超高效液相色谱-质谱检测器测定牛奶中 9 种类固醇激素残留 [J]. *色谱*, 2015, 33(11): 1163-1168
LIU Hong-cheng, LI Ning, LIN Tao, et al. Determination of nine estrogenic steroid in milk using matrix solid phase dispersion-ultra performance liquid chromatography with mass spectrometric detector [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(11): 1163-1168
- [12] Al-Ansari A M, Saleem A, Kimpe L E, et al. The development of an optimized sample preparation for trace level detection of 17α -ethinylestradiol and estrone in whole fish tissue [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(30): 3649-3652
- [13] Lu J, Wu J, Stoffella P J, et al. Analysis of bisphenol A, nonylphenol, and natural estrogens in vegetables and fruits using gas chromatography-tandem Mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(1): 84-89
- [14] 韩疏影, 俞慧敏, 宋易霖, 等. 基质固相分散萃取和固相萃取-高效液相色谱-三重四极杆-复合线性离子阱质谱同时测定奶制品中 6 种雌激素 [J]. *色谱*, 2018, 36(3): 285-291
HAN Shu-ying, YU Hui-min, SONG Yi-lin, et al. Simultaneous determination of six estrogens in dairy products by high performance liquid chromatography-triple quadrupole-ion trap mass spectrometry coupled with matrix solid-phase dispersion and solid phase extraction [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2018, 36(3): 285-291
- [15] Zhao C M, Yue Z F, Wu H, et al. Simultaneous determination

- of fourteen steroidhormone residues in beef samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(19): 8030-8038
- [16] Schipilliti L, Bonaccorsi I L, Mondello L. Characterization of natural vanilla flavour in foodstuff by HS-SPME and GC-C-IRMS [J]. *Foavour and Fragrance Journal*, 2017, 32(2): 85-91
- [17] Zhao C M, Yue Z F, Wu H, et al. Determination of the origin of progesterone in butter by gas chromatography/ combustion/ isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(17): 6760-6767
- [18] Balizs G, Jainz A, Horvatovich P. Investigation of the feeding effect on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005,1067(1-2): 323-330
- [19] Saudan C, Kamber M, Barbati G, et al. Longitudinal profiling of urinary steroids by gaschromatography/ combustion/ isotope ratio mass spectrometry: diet change may result in carbon isotopic variations [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 831(1-2): 324-327
- [20] Hebestreit M, Flenker U, Buisson C, et al. Application of stable carbon isotope analysis to the detection of testosterone administration to cattle [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(1-2): 2850-2858
- [21] 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
ZHAO Chao-min, YUE Zhen-feng, WU Hui, et al. Determination of eight steroid hormones in butter samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(3): 360-366
- [22] 赵超敏,岳振峰,吴晖,等.液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 4 种雌激素残留[J].*现代食品科技*,2014,30(6):244-249
ZHAO Chao-min, YUE Zhen-feng, WU Hui, et al. Determination of four estrogens residues in milk samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(6): 244-249
- [23] Noppe H, Le Bizec B, Verheyden K, et al. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(1): 1-16
- [24] Janssens G, Mangelinckx S, Courtheyn D, et al. Application of gas chromatography-mass spectrometry/ combustion/ isotope ratio mass spectrometry (GC-MS/C/IRMS) to detect the abuse of 17β -estradiol in cattle [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(30): 7242-7249