

鹿茸保健品中 11 种性激素的气相色谱-串联质谱法分析

芦春梅, 王明泰*, 牟 俊, 卢利军, 周 晓

(吉林出入境检验检疫局, 吉林 长春 130062)

摘要: 建立了气相色谱-串联质谱法测定鹿茸保健品中 11 种性激素的分析方法。鹿茸中的性激素经固相萃取富集和净化, 经七氟丁酸酐衍生处理。采用 DB-5 色谱柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)、非线性梯度升温程序分离, 在串联质谱多反应监测(MRM)模式下检测, 外标法定量, 实现了 11 种性激素的有效分离。11 种性激素的检出限为 1.0 ~ 5.0 μg/kg, 线性相关系数为 0.991 6 ~ 0.999 9, 平均回收率为 67.4% ~ 99.1%, 相对标准偏差为 2.6% ~ 13%。该方法准确、可靠, 可满足鹿茸保健品中性激素含量的测定和确证。

关键词: 气相色谱-串联质谱; 性激素; 鹿茸; 保健品

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2011)06-0558-05

Simultaneous determination of eleven sex hormones in antler velvet health products by gas chromatography-tandem mass spectrometry

LU Chunmei, WANG Mingtai*, MU Jun, LU Lijun, ZHOU Xiao

(Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of 11 sex hormones in antler velvet health products by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was developed. The sex hormones in antler velvet were enriched and purified by solid phase extraction and derivatized with heptafluorobutyric acid anhydride (HFBA). A DB-5 column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) with nonlinear gradient program was used in GC separation. The sex hormones were determined in the multiple reaction monitoring mode. The method realized the complete separation of 11 sex hormones. The limits of detection of this method were from 1.0 to 5.0 μg/kg for the 11 sex hormones. The correlation coefficients were between 0.991 6 and 0.999 9. The recoveries were in the range of 67.4%–99.1% with relative standard deviations (RSDs) of 2.6%–13%. This method is accurate and reliable for the determination of the sex hormones in antler velvet health products.

Key words: gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS); sex hormones; antler velvet; health products

鹿茸, 又名斑龙角, 是梅花鹿或马鹿的雄鹿未骨化而带茸毛的幼角, 它是名贵药材, 性温而不燥, 因含有磷脂、激素、脂肪酸、氨基酸、蛋白质及钙、磷、钠等成分而具有生精补髓、益血助阳、增强男女性能力、提高人体免疫力、延缓人体衰老的功效。鹿茸保健品是以鹿茸为原料的一种营养品, 因此其性激素的含量是产品质量非常重要的指标。

对鹿茸保健产品中性激素的研究, 国内外鲜有

报道。关于性激素的检测技术, 几十年来世界各国研究者始终坚持不懈地进行着广泛深入的研究, 其检测技术也随着分析仪器的的发展而发展。由于性激素种类繁多, 相对分子质量大, 主要的检测方法为毛细管电泳法^[1-2]、高效液相色谱法^[3-4]、气相色谱-质谱法^[5-7]、液相色谱-串联质谱法^[8-12]和气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)^[13, 14]。本研究采用 GC-MS/MS 进行检测, 建立了鹿茸保健品中的快雌醇、

* 通讯联系人: 王明泰, 研究员, 国务院特殊津贴获得者, 主要从事食品中农药残留的检测。E-mail: wangmt@jlciq.gov.cn.

基金项目: 国家质检总局科研项目(项目编号: 2007IK157)。

收稿日期: 2011-01-06

雌二醇、诺龙、雌三醇、睾酮、雄酮、 17β -雌二醇、雌酮、 17α -羟基黄体酮、甲孕酮和孕酮11种性激素的同时检测方法。针对鹿茸保健品中性激素的含量进行了分析,对市售鹿茸保健品的真伪鉴别提供了重要的参考价值。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

气相色谱-串联质谱仪 配有电子轰击源的四极杆质量选择检测器(Varian 450/320,美国)。食品捣碎机(DS-1,上海标本模型厂制造)。均质器(Heidolph diax 900,美国)。旋转蒸发器(Eyela, coolace cca-1100,日本)。超声波清洗器(Turvoper, zymark, 美国)。旋涡混合器(H1型,日本)。天平:感量 ± 0.1 mg。氮吹仪(Turvoper, zymark, 美国)。离心机(Anke, 上海安亭科学仪器厂)。净水器(Milli-Q, millipore, 美国)。

丙酮、正己烷和甲醇(Tedia, 色谱纯),七氟丁酸酐(Sigma-Aldrich, 色谱纯)。标准品:炔雌醇(17α -ethinylestradiol, CAS: 57-63-6)、雌二醇(17α -estradiol, CAS: 50-28-2)、诺龙(19-nortestosterone, CAS: 434-20-0)、雌三醇(estriol, CAS: 50-27-1)、睾酮(testosterone, CAS: 58-22-0)、雄酮(androsterone, CAS: 53-41-8)、 17β -雌二醇(17β -estradiol, CAS: 57-91-0)、雌酮(estrone, CAS: 53-16-7)、 17α -羟基黄体酮(17α -hydroxyprogesterone, CAS: 68-96-2)、甲孕酮(medroxyprogesterone, CAS: 520-85-4)和孕酮(progesterone, CAS: 57-83-0),均购于Labor Dr. Ehrenstorfer-Schafers。 C_{18} 固相萃取柱:Envi-Carb, 3 mL, 500 mg。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取适量的性激素标准品,用少量甲醇溶解,再用甲醇配制成质量浓度为1 000.0 mg/L的标准储备液。该溶液在 $0\sim 4$ °C冰箱中保存。混合标准中间工作液的配制:分别准确移取一定体积的每种性激素标准储备液,用甲醇稀释成适用质量浓度的混合标准中间工作液。该溶液于 $0\sim 4$ °C保存。混合标准工作液的配制:分别准确移取一定体积的混合标准中间工作液,根据需要用甲醇稀释成适当质量浓度。该溶液在 $0\sim 4$ °C冰箱中保存。

1.3 样品处理

准确称取1.0 g混合均匀的样品于离心管中,加入10 mL甲醇,超声提取20 min。在4 000 r/min条件下离心4 min,取上清液,旋转蒸发至近干。加入5 mL甲醇溶解后,加入5 mL正己烷、1 mL水,

振荡分层后,离心4 min。弃去正己烷相,下层溶液旋转蒸发至近干,用5 mL 20% (v/v) 甲醇回溶。 C_{18} 固相萃取柱依次用10 mL甲醇、10 mL水和10 mL 20% (v/v) 甲醇活化,将回溶液注入已活化的 C_{18} 固相萃取柱中,用2 mL 20% (v/v) 甲醇淋洗,5 mL 100% 甲醇洗脱,收集洗脱液。洗脱液用氮气吹干,加入300 μ L七氟丁酸酐-丙酮(1:4, v/v)溶液,65 °C下衍生60 min,冷却后吹干,用1 mL丙酮定容,供测定。

1.4 气相色谱-串联质谱条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱:DB-5 MS 石英毛细管柱:30 m $\times$ 0.25 mm,膜厚0.25 μ m;色谱柱温度:100 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 200 °C (1 min) $\xrightarrow{15\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 280 °C (25 min);进样口温度:280 °C。在此条件下,11种性激素的标准色谱图见图1。

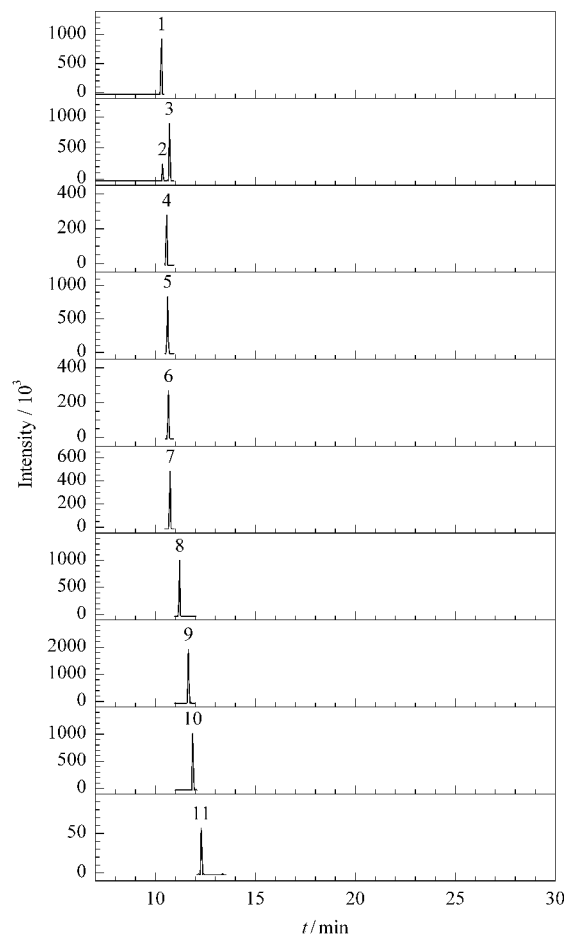


图1 11种性激素标准溶液(1.0 mg/kg)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 11 sex hormones standard solutions (1.0 mg/kg)

1. 17α -ethinylestradiol; 2. 17α -estradiol; 3. 19-nortestosterone; 4. estriol; 5. testosterone; 6. androsterone; 7. 17β -estradiol; 8. estrone; 9. 17α -hydroxyprogesterone; 10. medroxyprogesterone; 11. progesterone.

1.4.2 质谱条件

接口温度: 280 ℃; 载气: 氦气 纯度 $\geq 99.999\%$, 1.0 mL/min; 进样量: 1 μ L; 进样方式: 无分流进样, 1.5 min 后开阀; 电离方式: 电子轰击(EI); 电离能

量: 70 eV; 测定方式: 多反应监测; 溶剂延迟: 6.8 min; 选择监测离子(m/z): 每种性激素分别选择 1 个定量离子 2~3 个定性离子。其他质谱参数及各目标物的保留时间见表 1。

表 1 11 种性激素的保留时间、母离子、子离子和碰撞能量
Table 1 Retention times, parent ions, product ions and collision energy for 11 sex hormones

Peak No. in Fig. 1	Compound	Retention time/min	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy/eV
1	17 α -ethinylestradiol	10.251	474	431 445*	12 11
2	17 α -estradiol	10.325	664	237* 451	7 8
3	19-nortestosterone	10.507	666.3	306 453*	12 11
4	estriol	10.571	876	235* 449	8 10
5	testosterone	10.617	680	320 467*	10 8
6	androsterone	10.681	486.1	213* 468	19 9
7	17 β -estradiol	10.685	664.2	237* 451	8 8
8	estrone	11.177	466	422* 448	10 10
9	17 α -hydroxyprogesterone	11.628	465	109* 147 369	7 11 15
10	medroxyprogesterone	11.857	479	109* 383	25 15
11	progesterone	12.275	510	263 425.2*	10 10

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 净化条件的优化

固相萃取技术在样品净化中的应用非常广泛, 针对我们研究的 11 种性激素, 文献中普遍使用 C_{18} 小柱^[15-18], 在试验中发现 C_{18} 小柱确实对样品起到了很好的净化作用。我们分别对能够最大限度地去除杂质而把目标物保留在小柱上的淋洗液和能够把目标物全部洗脱的洗脱液的极性进行了优化。选择淋洗液组成分别为: 甲醇/水(3:20, v/v)、甲醇/水(1:5, v/v)、甲醇/水(1:4, v/v)、甲醇/水(3:10, v/v) 和甲醇/水(2:5, v/v) 对 C_{18} 小柱进行了淋洗试验, 以确定最佳极性的淋洗液。结果表明, 当淋洗液中甲醇的体积分数不大于 20% 时, 洗脱液中 11 种目标物的含量最少。而当增加淋洗液中甲醇的体积分数时, 洗脱液中 11 种目标物的含量随之增大。因此, 选择甲醇/水(1:4, v/v) 溶液作为淋洗液。当

待测物吸附到 C_{18} 小柱后, 选择合适的洗脱液进行洗脱。为了尽可能减少洗脱液的用量, 我们选择了溶剂强度很大的甲醇作为洗脱液, 当甲醇的洗脱体积增加到 5 mL 时, 11 种性激素全部被洗脱下来, 因此, 我们选择 5 mL 的甲醇作为洗脱溶液。

2.2 衍生时间的优化

选用七氟丁酸酐作为衍生试剂, 对衍生时间进行了优化。取 11 种性激素标准品各 1 mL(1 g/L), 用氮气吹干后加入 300 μ L 七氟丁酸酐-衍生剂丙酮(1:4, v/v, 临用时配制), 混匀, 于 65 ℃ 下密闭衍生, 衍生时间分别为 2, 5, 15, 30, 60, 75, 120, 150, 180 min, 冷却吹干后, 用 1 mL 丙酮定容, 检测结果见图 2。可以看出, 当衍生时间从 2 min 增加到 60 min 时, 目标物的回收率均逐渐增加; 当从 60 min 增加到 180 min 时, 目标物的回收率却逐渐减少, 衍生时间为 60 min 时, 11 种目标物的回收率均达到最大。因此选择 60 min 作为最终衍生时间。

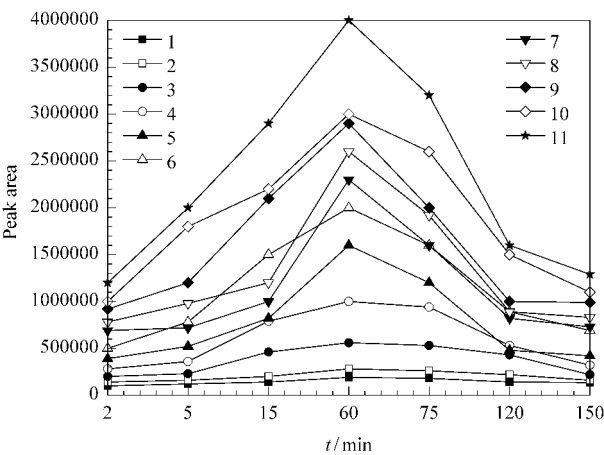


图 2 衍生时间对 11 种性激素峰面积的影响
Fig. 2 Effect of derivatization time on the peak areas of 11 sex hormones

1. 17 α -ethinylestradiol; 2. 17 α -estradiol; 3. 19-nortestosterone; 4. estriol; 5. testosterone; 6. androsterone; 7. 17 β -estradiol; 8. estrone; 9. 17 α -hydroxyprogesterone; 10. medroxyprogesterone; 11. progesterone.

2.3 衍生剂用量的优化

衍生剂的用量也是决定衍生效果的重要因素，因此我们对衍生剂的用量进行了优化。分别取 11 种性激素标准品各 1 mL(1 g/L)，用氮气吹干后加入 100,300,500,750,1 000,2 000 μ L 七氟丁酸酐-丙酮(1:4, v/v)，混匀，于 65 $^{\circ}$ C 下密闭衍生 60 min 后，冷却吹干，用 1 mL 丙酮定容后测定。试验结果见图 3。从图中可以看出，当衍生剂量从 100 μ L 增加到 300 μ L 时，目标物的回收率逐渐增加；当从 300 μ L 增加到 500 μ L 时，回收率逐渐下降；继续增加衍生剂的用量，回收率变化较小。因此，衍生剂的最佳用量为 300 μ L。

2.4 线性范围、精密度和最低检出限

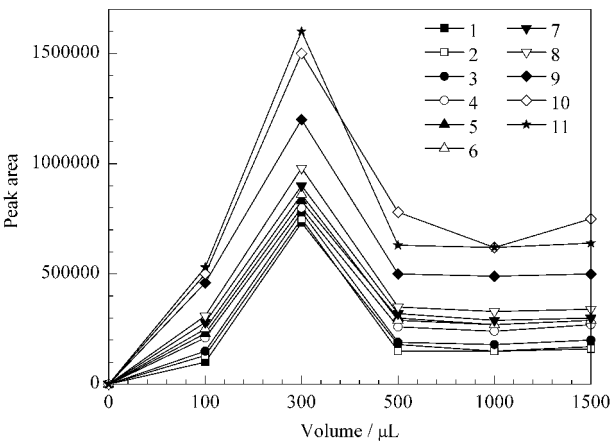


图 3 衍生剂用量对 11 种性激素峰面积的影响
Fig. 3 Effect of derivatization reagent volume on the peak areas of 11 sex hormones

1. 17 α -ethinylestradiol; 2. 17 α -estradiol; 3. 19-nortestosterone; 4. estriol; 5. testosterone; 6. androsterone; 7. 17 β -estradiol; 8. estrone; 9. 17 α -hydroxyprogesterone; 10. medroxyprogesterone; 11. progesterone.

用基质提取液配制一系列不同质量浓度的 11 种性激素混合标准溶液，以峰面积 Y 为纵坐标，质量浓度 X 为横坐标进行分析。各目标物的线性关系见表 2。将标样逐步稀释进行分析，以信噪比(S/N)为 3 确定仪器的检出限；将稀释的标样加入到基质提取液中，能够检出的最低质量浓度为定量限。各目标物的检出限和定量限见表 2。

2.5 样品的加标回收率

我们选用了—个阴性样品进行了加标回收试验，分别在样品中加入如表 3 所示的 3 个水平的浓度后进行测定，样品的回收率和相对标准偏差(RSD)如表 3。11 种性激素的平均回收率为 67.4%~99.1%，RSD 为 2.6%~13%。

表 2 11 种性激素的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限
Table 2 Linear regression equations, linear ranges, correlation coefficients (r), limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) of 11 sex hormones

Compound	Regression equation	Linear range/(μ g/L)	r	LOD/(μ g/L)	LOQ/(μ g/kg)
17 α -Ethinylestradiol	$Y = 368.92X - 3456.52$	5.0 - 500	0.9926	2.0	5.0
17 α -Estradiol	$Y = 704.70X - 4925.47$	5.0 - 500	0.9988	2.0	5.0
19-Nortestosterone	$Y = 542.53X - 743.40$	5.0 - 500	0.9994	2.0	5.0
Estriol	$Y = 831.93X - 8681.25$	1.0 - 500	0.9990	0.3	1.0
Testosterone	$Y = 211.95X - 805.15$	1.0 - 500	0.9981	0.3	1.0
Androsterone	$Y = 776.99X - 5304.60$	1.0 - 500	0.9979	0.3	1.0
17 β -Estradiol	$Y = 1147.48X - 2605.81$	1.0 - 250	0.9999	0.3	1.0
Estrone	$Y = 807.15X - 2753.11$	5.0 - 500	0.9984	2.0	5.0
17 α -Hydroxyprogesterone	$Y = 3933.01X - 49463.53$	5.0 - 500	0.9916	2.0	5.0
Medroxyprogesterone	$Y = 1537.90X - 8621.54$	5.0 - 500	0.9988	2.0	5.0
Progesterone	$Y = 124.68X - 1068.46$	5.0 - 500	0.9933	2.0	5.0

Y : peak area; X : mass concentration, μ g/L.

表 3 11 种性激素的加标回收率和精密度
Table 3 Recoveries and relative standard deviations
of 11 sex hormones

Compound	Spiked / (mg /kg)	Recovery / %	RSD / %
17 α -Ethinylestradiol	0.010	74.8	8.6
	0.020	88.5	2.6
	0.100	83.1	13
17 α -Estradiol	0.010	74.0	7.8
	0.020	79.3	10
	0.100	80.4	11
19-Nortestosterone	0.010	75.8	10
	0.020	67.4	10
	0.100	75.4	9.4
Estriol	0.010	88.3	5.6
	0.020	84.3	7.4
	0.100	92.0	12
Testosterone	0.010	81.0	12
	0.020	81.7	12
	0.100	89.0	12
Androsterone	0.010	78.9	12
	0.020	80.8	11
	0.100	81.4	11
17 β -Estradiol	0.010	87.0	3.7
	0.020	89.2	3.1
	0.100	89.0	3.5
Estrone	0.010	83.3	10
	0.020	83.0	8.4
	0.100	88.3	6.9
17 α -Hydroxyprogesterone	0.010	85.9	12
	0.020	92.1	10
	0.100	99.1	10
Medroxyprogesterone	0.010	86.7	9.3
	0.020	81.2	11
	0.100	96.4	10
Progesterone	0.010	89.1	6.7
	0.020	90.6	6.1
	0.100	92.3	6.6

2.6 实际样品分析

我们分别对来自长春市、白山市、内蒙古和西藏的鹿茸茶、鹿茸软胶囊、破壁灵芝孢子软胶囊、鹿茸口服液、鹿茸精华素、鹿茸丸、浓缩鹿茸血和鹿茸膏 8 个鹿茸保健品进行了检测。结果发现: 鹿茸茶中含有 5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的诺龙, 鹿茸丸中含有 13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 17 α -羟基黄体酮, 其余样品均不含有这 11 种性激素。从检测结果可以看出, 我们随机在市场上购买的这 8 种鹿茸保健品的性激素含量较低, 因此这类保健品在激素方面的保健作用很小。

3 结语

本文建立了 C_{18} 固相萃取小柱净化、七氟丁酸酐衍生、GC-MS/MS 检测鹿茸保健品中 11 种性激素的方法。该方法具有操作简便、灵敏度高、选择性好的特点, 各项指标可以满足日常检测的要求。对市场上常见的 8 种鹿茸保健品中 11 种性激素的含量进行了检测, 对保健品中激素水平和含量的检测提供了重要的技术支持。

参考文献:

- [1] Yang R M, Zhang J H, Gu P Q, et al. Journal of the Central University for Nationalities (杨若明, 张经华, 顾平圻, 等. 中央民族大学学报), 2003, 12(4): 301
- [2] Xu Q J, Zhang Y, Gu Z W, et al. Chinese Journal of Chromatography (徐其进, 张英, 顾忠伟, 等. 色谱), 1999, 17(2): 187
- [3] Zhao S, Wu D N, Wang P. Chinese Journal of Chromatography (赵珊, 吴大南, 王鹏. 色谱), 2004, 22(3): 267
- [4] Wang C, Ma Q, Wang X. Chinese Journal of Chromatography (王超, 马强, 王星. 色谱), 2006, 24(6): 654
- [5] Lin W X, Dong W F, Chen X, et al. Chinese Journal of Chromatography (林维宣, 董伟峰, 陈溪, 等. 色谱), 2009, 27(3): 294
- [6] Zou L, Lin H, Jiang J. Chin J Anal Chem, 2007, 35(7): 983
- [7] Zuo Y G, Zhang K, Lin Y J. J Chromatogr A, 2007, 1148(2): 211
- [8] Zhang A Z, Wang Q L, Shen J, et al. Chinese Journal of Chromatography (张爱芝, 王全林, 沈坚, 等. 色谱), 2010, 28(2): 190
- [9] Zhu W X, Liu Y F, Yuan P, et al. Chinese Journal of Chromatography (祝伟霞, 刘亚凤, 袁萍, 等. 色谱), 2010, 28(11): 1031
- [10] Koh Y K K, Chiu T Y, Boobis A, et al. J Chromatogr A, 2007, 1173(1/2): 81
- [11] Kouwa Y, Mitsunobu O, Yoko W, et al. Steroids, 2007, 72(11/12): 819
- [12] Farre M, Kuster M, Rubio R B F, et al. J Chromatogr A, 2007, 1160(2): 166
- [13] Arroyo D, Ortiz M C, Sarabia L A. J Chromatogr A, 2007, 1157(1): 358
- [14] Wu W Q, Shen C Y, Yang Y L, et al. Journal of Environmental and Occupational Medicine (吴维群, 沈朝辉, 杨玉林, 等. 环境与职业医学), 2004, 21(4): 307
- [15] Edman K, Svensson L, Eriksson B, et al. J Chromatogr B, 2000, 738(2): 267
- [16] Matich J, Nicholson L F B, Barling P M, et al. Cell Biol Int, 2003, 27(8): 625
- [17] Inoue K, Ferrante P, Hirano Y, et al. Talanta, 2007, 73(4): 886
- [18] Boyer S, Garcia P, Popot M A, et al. J Chromatogr B, 2007, 852(4): 684