

解决方案

猪肉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。

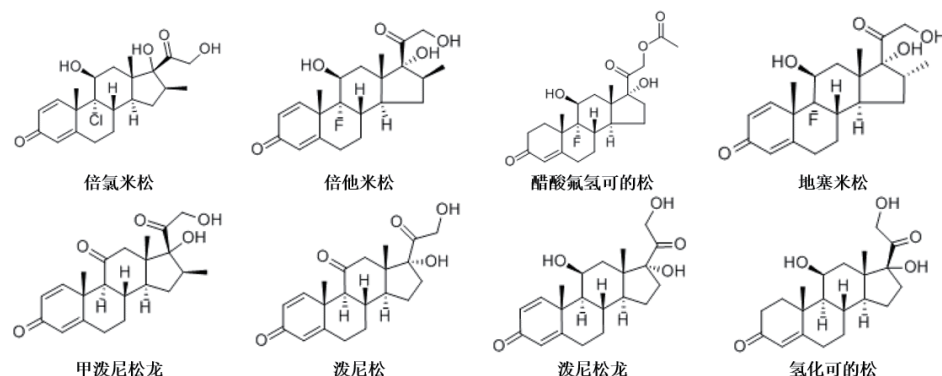


图-1. 八种糖皮质激素的结构式

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

仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AH-30 全自动均质器

高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410 或相当

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

耗材

硅胶固相萃取柱 (RayCure Silica, 500mg/6mL,

货号: RC-204-16844)

试剂

甲醇 (优级纯)

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

正己烷 (优级纯)

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

20% 乙腈水溶液: 将 20 mL 乙腈与 80 mL 水混合

2. 样品制备

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, 用 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 氢氧化钠 10 mL, 混匀. 再加入乙酸乙

酯 20 mL, 高速均质 3 分钟, 于 8000 r/min 离心 15min, 合并乙酸乙酯提取液于氮吹管中, 于 40℃ 条件下用 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪氮吹浓缩至近干, 加 6 mL 正己烷涡旋混匀.

2.1 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

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 μm 滤膜后用 LC-MS/MS 分析. 具体的固相萃取方法见图 3.

2.2 固相萃取净化条件

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



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+C3H8O (6:4)	收集	1	6	6.5
8	气推		收集	80	10	0.9
9	结束					
10						

Fotector Plus 固相萃取方法

3. 液质检测条件

3.1 液相色谱条件

液相色谱柱: Eclipse SB C18, 1.8 μm $\times$ 50mm

流动相及洗脱条件见表 1。

$\times$ 2.1mm (内径), 或类似色谱柱

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%

平衡时间: 5min

色谱柱温度: 40°C

流动相流速: 0.4mL/min

进样体积: 5 μL

3.2 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	1500 V
干燥气 (氮气) 温度	325 °C
干燥气流速	5 L/min
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	4000 V
增益电压	600 V

3.3 MRM 参数

No. 序号	Compound Name 化合物名称	Precursor Ion 母离子	Product Ion 子离子	Dwell 离子监测时间	Fragmentor 裂解电压	Collision Energy 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

本解决方案依据农业部 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。操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。AH-30 全自动均质器可以自动完成 16 个样品均质，均质后能够自动清洗刀头，清洗刀头时可以采用水洗、超声洗和溶剂洗等多级清洗组合，有效防止交叉污染，且全程无需人工干预；Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪通过独特的针自动

追随液面技术可以极大地减少氮气使用量，同时避免手动氮吹需要经常去调节氮吹针高度带来的麻烦；Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。



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.

智能化、自动化实验室整体解决方案

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 10 月版