Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

利用沃特世UPLC-XEVO TQ系统一次性检测奶粉中13种激素类物质

王冰 袁汉成 王少珍 耿霞
沃特世科技(上海)有限公司

2010年7月，一则“乳制品致婴儿性早熟”的新闻报道引起了社会广泛的关注。这是至08年“三鹿奶粉”事件之后，又一起有关乳制品食品安全事件。事件一出，农业部立即出台检测方法，对相关奶粉中的激素进行检测，检测结果为：该乳品中激素含量水平均在国家限定范围内。此次事件中人们对婴儿食用奶粉中的雌激素和孕激素水平是否超标的问题引起了广泛的讨论，同时对激素类物质检测的相关指标提出了更高的要求。曾有专家指出目前在我国还没有专门针对奶粉中激素检测的专门的国家标准检测方法，所采用的是动物性食品中激素检测方法。针对这一问题，沃特世最新推出了UPLC®-Xevo™ TQ质谱系统，专门针对奶粉中雌激素和孕激素物质进行快速检测与定量分析。

沃特世UPLC-Xevo TQ系统对奶粉中性激素快速检测的原理

首先利用UPLC(超高效液相色谱)的超高效分离能力实现对被检测的奶粉的有效分离，并采用Xevo TQ的IntelliStart™功能快速方便建立质谱，PICS(子离子确认扫描)功能辅助定性，以及应用Quanpedia(方法库)自动导入和导出生成MRM方法及液相方法，最后通过利用UPLC/Xevo TQ的正负电离模式快速切换功能,实现一次进样，同时检测多种激素(7种雌激素，6种孕激素),明显缩短检测周期,提高检测通量。

分析条件与步骤

本试验适用于分析外源性激素类物质，如果分析内源性物质可对检测样品进行酶解，酶解后的处理方法相同。

样品前处理

1、精确称取1g奶粉样品于8ml水中，充分混匀，超声5min。

2、在混匀液中加入1ml冰醋酸，酸化后再添加16ml乙腈进一步沉淀水溶性蛋白。7500rpm离心10min,取上清液于氮气流下吹至乙腈含量<5% 。

3、分别用6ml甲醇、6ml水活化平衡Oasis HLB (200mg/6cc)小柱。

4、上样，流速控制在3-4ml/min。

5、清洗:分别用6ml酸洗(5%甲醇、2%冰醋酸)、6ml碱洗(5%甲醇、2%氨水)、6ml甲醇水溶液(10%甲醇)进行清洗。

6、将清洗后的Oasis HLB小柱抽干10min。

7、乙酸乙酯/甲醇(9/1 v/v)活化氨基小柱(Sep-pak NH_2 500mg/6cc)，活化平衡后与Oasis HLB柱串联。

8、洗脱：分别用6ml乙酸乙酯/甲醇(9/1 v/v)、6ml5%氨水甲醇溶液洗脱串联后的两根柱子，收集洗脱液。

9、氮气流下吹干洗脱液至0.2ml。

10、依次加入0.4ml乙腈、0.4ml水溶液，分别涡旋，使最终体积为1ml，其中乙腈与水的比例为1:1。

11、7000rpm离心10min或过膜，收集上清液于UPLC/MS/MS分析。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC®系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1x50mm,1.8 μm
柱温:	40°C
样品室温度:	10°C
流速:	0.6mL/min
流动相A:	乙腈
流动相B:	水

梯度表:

时间	流速	%A	%B	递变曲线
0.00	0.600	35.0	65.0	Initial
0.20	0.600	40.0	60.0	11
0.80	0.600	45.0	55.0	6
1.50	0.600	50.0	50.0	6
2.00	0.600	60.0	40.0	6
2.30	0.600	95.0	5.0	6
5.00	0.600	100.0	0.0	1
6.00	0.600	35.0	65.0	1

弱洗针溶液: 10%乙腈水溶液
强洗针溶液: 90%乙腈水溶液
总运行时间: 6min
进样体积: 5μL，不充满定量环（针溢出）

MS条件
MS系统: Xevo TQ MS
电离模式: ESI+/ESI-
喷雾电压: 3.2kv(ESI+)/2.8kv（ESI-）
脱溶剂气: 氮气，1000L/Hr，450°C
锥孔气: 氮气，50L/Hr
源温度: 150°C
采集模式: 多反应监测(MRM)

其他质谱参数:

	电离模式	MS(m/z)	m/z	椎孔电压(v)	碰撞能量(v)
雌二醇	ESI-	287.22	142.46	50	50
			170.97	50	32
雌酮	ESI-	269.16	144.9	50	40
			158.0	50	42
雌三醇	ESI-	271.1	145.2	60	35
			183.1	60	33
炔雌醇	ESI-	295.2	145.1	54	44
			159.1	54	40
己烯雌酚	ESI-	267.2	237.2	42	30
			251.2	42	24
己烷雌酚	ESI-	269.2	119.1	30	30
			134	30	20
17a-羟基孕酮	ESI+	331.4	96.9	28	22
			109.0	28	30
孕酮	ESI+	315.35	96.9	24	22
			108.9	24	26
炔诺酮	ESI+	299.4	97.05	28	20
			109.07	28	32
双烯雌酚	ESI-	264.98	92.95	38	22
			249	38	24
醋酸甲基孕酮	ESI+	385.2	325.1	26	14
			267.11	26	18
乙酸氯地孕酮	ESI+	405	309.7	21	16
			345.7	21	12
甲羟孕酮乙酸酯	ESI+	387.1	327.3	23	16
			285.5	23	16

数据采集与处理

本试验数据处理系统为Waters® MassLynx™ 4.1 SCN729，质谱方法开发用此软件的IntelliStart功能，不需要有经验的质谱操作人员进行方法开发与优化，同时配合TargetLynx®软件，只需设置几个参数即可得到完整的报告。IntelliStart功能可同时开发正负离子质谱参数，并实现一次进样正负离子同时扫描，如图1，图2所示。

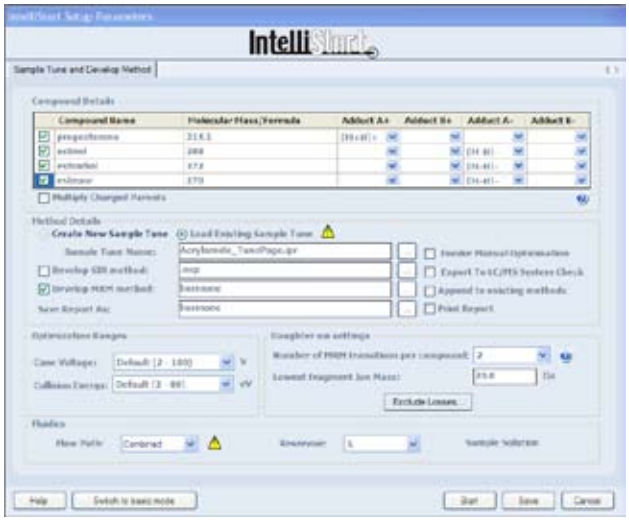


图1. IntelliStart功能可同时开发正负离子质谱参数。

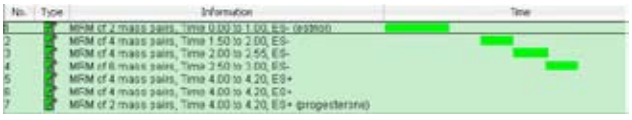
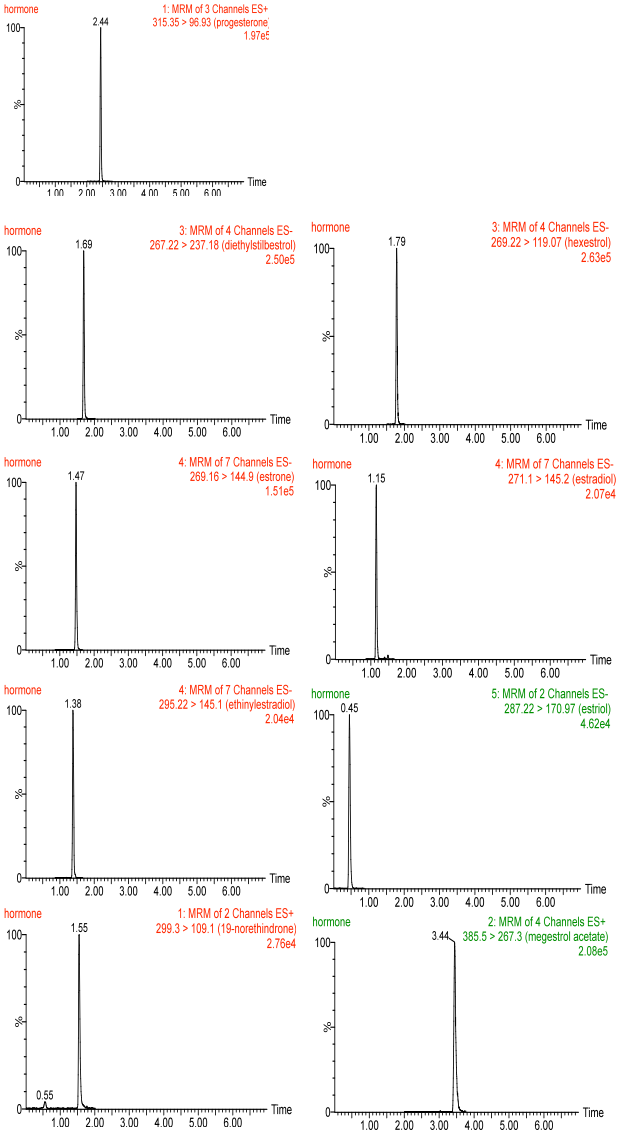


图2. 一次进样正负离子同时扫描。

结果与讨论



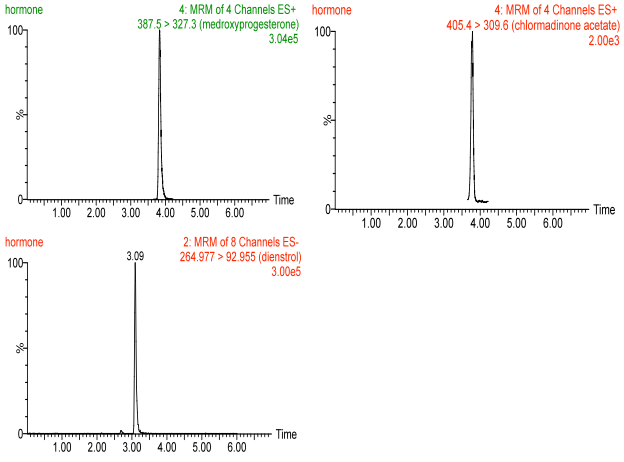


图3. 13种激素类物质提取离子色谱图。

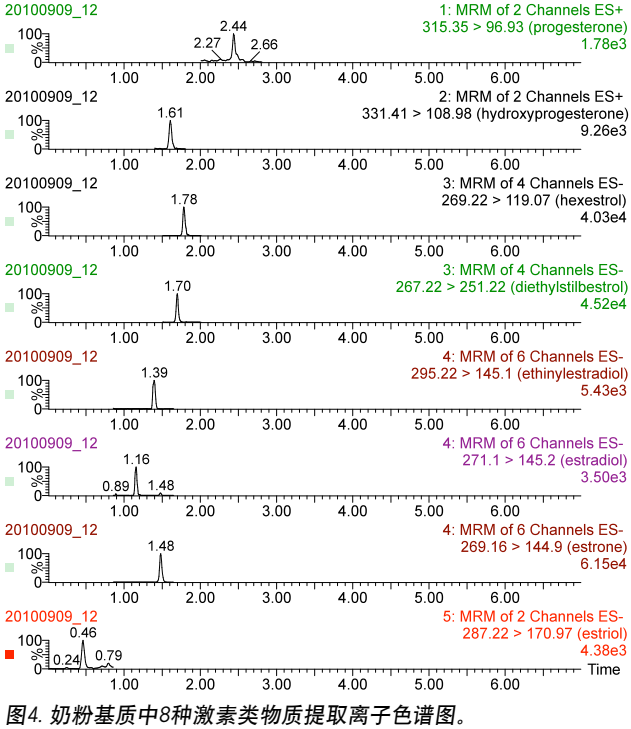


图4. 奶粉基质中8种激素类物质提取离子色谱图。

图3和图4分别为13种激素类物质提取离子色谱图和奶粉基质中8种激素类物质提取离子色谱图。

通过使用UPLC/Xevo TQ MS 对13种激素类物质进行分析，6min时间即可得到分析结果，同时在灵敏度和分离度等方面都能得到满意的结果。沃特世ACQUITY UPLC系统高效的分离度使质谱在多物质采集过程中对每一种物质都有足够的驻留时间进行分析，提高灵敏度的同时增加了定性的可靠性。Xevo TQ MS快速的正负离子切换功能使得实现一次进样，同时检测多种激素（7种雌激素，6种孕激素）,明显缩短检测周期,提高检测通量。

Xevo TQ系统应用MassLynx 4.1的IntelliStart功能，可自动、方便、快速的进行样品质谱条件的自动优化。本试验质谱方法开发全部使用了IntelliStart功能自动优化的质谱参数，试验结果均能令人满意。同时因该系统不需要有经验的质谱操作人员进行方法开发与优化，所以很大程度上节省了人力和物力。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

沃特斯中国有限公司
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
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

©2010沃特世公司
2010年10月