

李双,李露青,王春芳,等.蛋白粉保健品中激素含量的快速筛查[J].环境化学,2018,37(7):1675-1677.

LI Shuang, LI Luqing, WANG Chunfang, et al. Determination and evaluation of hormones content in protein powder[J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(7): 1675-1677.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C 赛默飞世尔科技

蛋白粉保健品中激素含量的快速筛查*

李 双^{1,2} 李露青¹ 王春芳¹ 徐旭文¹ 钟莺莺¹ 张雅珩³
王传现⁴ 陈树兵^{1**}

(1. 宁波出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 宁波, 315211; 2. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波, 315211;
3. 甘肃出入境检验检疫局综合技术中心, 兰州, 730010; 4. 上海出入境检验检疫局, 上海, 200135)

摘 要 本文通过超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱, 利用建立的激素质谱信息数据库, 对 6 种市售蛋白粉中 28 种激素进行快速筛查。前处理技术基于载体辅助液液萃取, 通过一次性提取和净化, 完成涵盖了理化性质差异很大的 28 种激素的监测工作, 通过比较其保留时间、质荷比、同位素丰度比、以及二级碎裂片段, 极大地避免了假阳性结果的产生。结果表明, 有 3 种蛋白粉中检测到诺龙激素, 含量高达 5.916—11.052 mg·kg⁻¹; 1 种蛋白粉中检出甲睾酮, 含量为 0.206 mg·kg⁻¹; 此外, 4 种蛋白粉中还有检出雌性激素炔雌醇, 含量范围 0.194—0.942 mg·kg⁻¹; 1 种检出雌三醇, 含量为 0.110 mg·kg⁻¹。其他兽药均未检出。目前蛋白粉等保健品行业缺乏有效监管, 对禁止添加的营养强化剂没有明确规定, 在 6 种国内外不同厂家的蛋白粉中, 仅有 2 种未检出上述激素, 为合格产品。

关键词 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱, 载体辅助液液萃取, 蛋白粉, 激素。

蛋白粉作为一种特殊保健品, 被誉为训练后“黄金补充期口粮”, 尤其受到健身者的追捧和喜爱。面对品牌繁多、众说纷纭的蛋白粉, 消费者无法从外观、口感等途径, 直观地判断保健品质量和功能优劣, 更多只能听信于营销、广告及口碑, 容易被虚假宣传及不实信息所影响。

目前关于蛋白粉中激素的测定未见报道, 蛋白粉成分复杂, 其样品的前处理就显得非常重要, 常见的前处理技术包括固相萃取、固相微萃取、基质分散固相萃取、免疫亲和色谱技术、分子印迹技术、超临界流体萃取、加速溶剂萃取等。实验中, 我们基于载体辅助液液萃取技术通过一次性前处理, 完成涵盖了理化性质差异很大的共计 28 种激素的提取、净化工作。Q Exactive 质谱仪还配备了全自动筛选软件 ExactFinder™, 综合判断, 以得到准确性结果, 在分辨率达到 70000 的情况下获得的数据降低了共洗脱的相似质量数的干扰, 极大地避免了假阳性结果的产生。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Q-Exactive 四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技 ThermoFisher Scientific 公司), 配置有 H-ESI II 源。液相色谱系统为 UltiMate 3000 高压液相色谱带自动进样器(美国赛默飞世尔科技 ThermoFisher Scientific 公司)。色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C18 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)。Milli-Q 高纯水发生器(美国 Millipore 公司)。冷冻离心机(德国 SIGMA 公司)。漩涡振荡器(德国 Heidolph 公司)。滤膜(DIKMA, Nylon 0.22 μm)

激素标准品购自 Sigma 和 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度 ≥95%。基质样品来自国家植物源性残留监控抽样和进出口送检企业。硫酸铵, 二甲基亚砜, 乙二胺四乙酸二钠, 氨水(均为分析纯)购自南京化学试剂一厂; 色谱纯甲酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)。其他试剂(色谱纯, 德国 Merck 公司)。实验用水为 Milli-Q 超纯水(18.2 ΩM)。提取液: 称取 4.3 g 草酸和 3.7 g 乙二胺四乙酸二钠, 用 500 mL 水溶解, 氨水调至 pH 3.0; 草酸缓冲液配制(100 mmol·L⁻¹): 称取 0.9 g 的草酸, 用 90 mL 水溶解, 氨水调至 pH 5.0, 加水至 100 mL。

1.2 一步式提取净化体系操作

样品来源于宁波市蛋白粉销售某专卖店, 生产厂家为本埠和外埠。由于 28 种激素种类不同, 性质差异较大, 而蛋白粉

* 浙江省基础公益研究计划项目(LGN18B050002)和国家质检总局科技项目(2016IK169, 2016IK170, 2017IK255)资助。

** 通讯联系人, Tel: 0574-87022692, E-mail: shubingchen@126.com

基质中脂肪和蛋白质含量较高,因此根据提取溶剂的 pK_a 值及极性大小,样品提取净化步骤如下:(1)称取 5.00 g 样品,加入 10 mL 提取液(“1.1 部分”)和 15 mL 乙腈,振荡 5 min,4500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;(2)取出上清液,加入 1 g 硫酸铵,振荡 5 min,4500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,得到乙腈层(上)和水层(下);(3)取水层上样,平衡 15 min,乙腈(上层)作为洗脱液进行洗脱,再分别用 10 mL+10 mL 纯乙腈清洗离心管,并依次硅藻土柱(Chromabond XTR(1000 mg))洗脱,下接 50 mL 离心管,并加入 0.5 mL 二甲基亚砜,纯乙腈定容至 25 mL;(4)取出 12.5 mL,加入 200 μL 的草酸缓冲盐,氮吹至 1 mL 左右,用纯水定容至 1.0 mL,过 0.22 μm 滤膜,高浓度加标稀释到线性范围内,待分析。

1.3 色谱条件与质谱条件

色谱柱:Hypersile Gold C18(100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm ,美国 Thermo Fisher),柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。部分激素成分(ESI^-),流动相 A:含有 0.1% 氨水的甲醇溶液;流动相 B:含有 0.1% 氨水的水溶液;其余激素成分(ESI^+),流动相 A:含有 0.1% 甲酸+5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵的甲醇溶液,流动相 B:含有 0.1% 甲酸+5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵的水溶液,梯度如下:0 min,5% A—95% B;8 min,95% A—5% B;10 min,95% A—5% B;10.1 min,5% A—95% B;15 min,5% A—95% B。进样量为 10 μL ,洗脱总时间为 15 min,流动相流速为 0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

正/负离子模式下全扫描($\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$,质量范围: m/z 100—1000),分辨率 70000,自动增益控制(AGC)目标值 $10e^6$;喷雾电压为 3500 V,离子传输管温度为 300 $^{\circ}\text{C}$,鞘气压(N_2)35 arb,辅助气压(N_2)10 arb,气化室温度 350 $^{\circ}\text{C}$;在样品运行前对仪器分别进行正负离子校正。

1.4 激素的定性、定量分析

在 Thermo 公司的高分辨筛查软件 Exactfinder 的辅助下完成。空白样品按照上述“1.2 部分”前处理,得到的基质液中加入上述 28 种混合标准溶液,配置基质加标曲线,浓度范围:0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以浓度为横坐标,仪器响应值(响应值=标准品峰面积/标准品质量)为纵坐标,作为样品待测物浓度定量的依据。

2 结果与讨论

2.1 提取条件优化

本实验针对蛋白粉的基质成分,将蛋白粉用水溶解后,第一步是采用强极性水性提取液进行提取,可得到蛋白粉中含有的强极性激素成分,并可以防止脂肪从蛋白粉中提取出来,避免脂肪的干扰,提取液中含有的 EDTA 也可以很好地络合蛋白粉中含有的大量金属离子;第二步是采用解性好、渗透强的乙腈溶液,沉淀样品中蛋白质组分的同时,可以防止弱极性激素成分随蛋白质沉淀而损失。

采用 Chromabond XTR(1000 mg)硅藻土柱,比较了提取液体积为 5、8、12、15 mL 时柱子的负载情况,当提取液体积为 12 mL 和 15 mL 时,柱子的填料达到饱和并渗出,导致后期的氮吹浓缩过程时间加长;当提取液体积为 5 mL 和 8 mL 时,柱子填料未充分利用,部分填料处于干涸状态,降低了柱子的利用率,同时会降低激素的检出限,增加仪器的检出难度。因此,本研究最终将提取液体积确定为 10 mL。

分别考察乙腈作为洗脱溶剂的添加量 10 mL、10 mL \times 2 和 10 mL \times 3 对待测激素回收率的影响。雌三醇、诺龙和苯甲酸雌二醇的保留时间覆盖了本方法所测 28 激素的整个极性范围。结果可见,当乙腈体积为 10 mL \times 2 和 10 mL \times 3 时,提取率趋于稳定,3 种代表性激素在蛋白粉中的回收率均平稳地保持在 70% 以上。从节约氮吹浓缩的时间和成本的角度出发,确定纯乙腈作为洗脱液的洗脱体积为 10 mL \times 2。

2.2 仪器条件优化

分别采用色谱柱 Thermo Hypersil Gold C18 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μm)和色谱柱 Thermo Hypersil Gold C18 柱(2.1 mm \times 150 mm, 3 μm)对 28 种激素进行了色谱分离,结果显示,除了保留时间的差异外,两种色谱柱均能很好地分离几种化合物,但在实际试验中,粒径为 1.9 μm 的色谱柱流速更小,可以节约有机溶剂,更符合日常检测中,快速、高效、经济的原则。因此本实验采用 1.9 μm 粒径的色谱柱进行激素类化合物的检测。

水相选择纯水,分别选择 a: 甲醇; b: 甲醇+0.05% 甲酸; c: 甲醇+5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵; d: 甲醇+0.05% 甲酸和 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵进行研究。结果表明,甲醇+5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵溶液(0.05% 甲酸)作为流动相时获得了最优的色谱峰形、分离效果和质谱信号响应。负离子模式测定的激素类兽药则以 0.1% 氨水的水-甲醇溶液做为流动相。全过程选择梯度洗脱方式,通过优化流动相梯度洗脱条件实现了 28 种激素的有效分离。

2.3 蛋白粉中激素数据库检索

通过对 28 种激素单一标准品的 HPLC-MS 和 HPLC-MS/MS 分析,得到了上述仪器条件下,建立激素液质信息数据库,包括保留时间,同位素分布,质荷比(m/z)和主要二级碎片等。然后利用 Q Exactive 质谱仪配备的全自动筛选软件 ExactFinderTM 进行数据库快速检索,通过数据库匹配实现 28 种激素的快速筛查。

2.4 加标回收结果分析

分别准确移取适量混合标准工作液(浓度=100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),用前处理后的空白样品基质液稀释,配制成浓度为 0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列基质匹配标准溶液,待测定。以测得峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横

坐标,绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数.结果表明,28种激素在 $0.01\text{--}0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系,相关系数 r^2 大于0.991可以满足定量分析的要求.用基质提取液添加低水平的标准溶液($0.01\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),获得每种激素对应信噪比 $S/N \geq 10$ 时的含量,以此作为该化合物的定量限(LQD).3种水平浓度的加标回收率在60%—120%范围,标准偏差在15%以内.结果表明,本方法对蛋白粉食品基质具有较强的适用性,并可以一步式解决无论是脂溶性还是水溶性激素的提取、净化流程.

激素标准品添加在不同的样品基质中,采用自动触发模式采集提取离子流色谱图和全扫描二级质谱图.通过与建立的目标数据库中化合物的分子式对应的质量数匹配、同位素丰度匹配,并结合色谱保留时间,二级碎裂片段,所有样品基质加标与标准品的二级质谱图碎片质量数和丰度基本一致.二级全扫描质谱的使用提高了定性的准确性,进一步降低了假阳性出现的几率.

2.5 蛋白粉中激素的含量

6种蛋白粉中有4种检出性激素,但含量差别较大.诺龙激素含量最高值(2#样品)为 $11.502\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,最低值(3#样品)为 $5.916\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,5#样品中诺龙含量为 $7.337\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,其他3个进口品牌蛋白粉中未检出;此外,甲睾酮在5#样品中也有检出含量为 $0.206\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;除了上述的两者雄性激素外,还检测到了部分雌性激素,如甲孕酮、雌三醇和炔雌醇,含量范围 $0.059\text{--}0.942\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,涉及样品编号为2#样品、3#样品、5#样品和6#样品.综上所述,6种蛋白粉中仅有2款蛋白粉未检出上述28种激素,为合格产品.

3 结论

部分市售蛋白粉中含有一定量的性激素,其部分含量较高,对人体已构成潜在性影响.我国农业部已发布了禁止所有激素类及有激素样作用的物质作为动物促生长剂使用,但对保健食品中性激素含量还没有制定最低限量标准和检验方法.因此,建议在全国开展蛋白粉中激素含量检测,评价激素及其代谢物的保健食品安全性及其对人类健康的影响,建立和完善监督机制和检验检测方法,确保蛋白粉等保健食品安全和人类健康.