高效液相色谱-串联质谱检测牛奶中的甲状腺素

王宗义¹, 杨定忠², 冀梦瑶¹, 贾昌喜^{1*}, 黄漫青¹

(1. 北京农学院食品科学与工程学院 农产品安全检测与控制北京市重点实验室, 北京 102206;

2. 天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津 300462)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测牛奶中甲状腺素 3,3',5,5'-四碘-L-甲腺原氨酸(T₄), 3,3',5-三碘-L-甲腺原氨酸(T₃)和 3,3',5'-三碘-L-甲腺原氨酸(rT₃)的方法。样品用乙腈提取,离心,上清液经氨水碱化和 Cleanert PAX 固相萃取小柱净化,在 Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)色谱柱上以 0.1% (v/v) 乙酸水溶液和甲醇为流动相等度洗脱分离,以电喷雾正离子(ESI⁺)模式电离,多反应监测(MRM)模式质谱检测,内标法定量。结果表明,甲状腺素的检出限(LOD)不大于 0.03 ng/g,定量限(LOQ)不大于 0.1 ng/g;在考察的浓度范围内线性关系良好($r^2 > 0.998$);回收率为 80.61%~101.7%,相对标准偏差(RSD)为 1.48%~9.70%。室温下样品溶液中的甲状腺素保持稳定。对 5 个牛奶样品的测定结果显示,T₃ 含量为 0.59~1.30 ng/g, RSD 为 2.06%~7.70%;T₄ 和 rT₃ 未检出。该方法具有样品处理简单,灵敏度高,重现性好,定性和定量结果可靠等特点,为牛奶中甲状腺素的测定和相关质量安全评价提供了可靠手段。

关键词:高效液相色谱-串联质谱;甲状腺素;牛奶

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2013)03-0270-05

Determination of thyroid hormones in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Zongyi¹, YANG Dingzhong², JI Mengyao¹, JIA Changxi^{1*}, HUANG Manqing¹

(1. Beijing Key Laboratory of Agricultural Products Safety Detection and Control, College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. Bonna-Agela Technologies, Tianjin 300462, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed for the determination of thyroid hormones in milk including 3,3',5,5'-tetraiodothyronine (T₄), 3,3',5-triiodothyronine (T₃) and 3,3',5'-triiodothyronine (rT₃). The sample was extracted with acetonitrile and centrifuged, then the up layer was alkalinized with concentrated ammonia water and cleaned up with a Cleanert PAX cartridge. The chromatographic separation was carried out on a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm) with the mobile phase of 37% water containing 0.1% (v/v) acetic acid and 63% of methanol with an isocratic elution mode at a flow rate of 0.3 mL/min. The mass spectrometry detection was performed in positive electrospray ionization and monitored using multiple reaction monitoring (MRM) mode (m/z 652.0/605.5 and 652.0/478.6 for T₃ and rT₃; m/z 777.7/731.7 and 777.7/604.9 for T₄; m/z 784.0/737.9 and 784.0/639.4 for T₄-¹³C₆). The analytes were identified by their retention times and relative abundance ratios of the characteristic product ions, and quantified by internal standard method. The method was linear with the correlation coefficients (r^2) greater than 0.998 in the concentration ranges investigated. The limits of detection (LODs) were not more than 0.03 ng/g, and the limits of quantification (LOQ) were not more than 0.1 ng/g for the analytes. The recoveries were 80.61%–101.7% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.48%–9.70%. The results of five real milk samples

* 通讯联系人. Tel: (010)80799170, E-mail: jcxbac@sohu.com.

基金项目:北京农学院基础科学基金重点资助项目(2067516001).

收稿日期:2012-11-12

showed that the contents of T3 were 0.59 – 1.30 ng/g with the RSDs of 2.06% – 7.70%, and T4 and rT3 weren't found. The method presents many merits including simple sample pretreatment, high sensitivity, good reproducibility and unequivocal confirmation and quantification for the analytes. It could be used to monitor the levels of thyroid hormones in the milk for safety quality evaluation.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); thyroid hormone; milk

甲状腺素(TH)是维持人和动物体正常生理功能的重要激素,包括3,3',5,5'-四碘甲腺原氨酸(T4),3,3',5-三碘甲腺原氨酸(T3)和无生理活性的3,3',5'-三碘甲腺原氨酸(rT3)。早在上世纪70至80年代就已经证实人乳和牛乳中存在微量甲状腺素^[1,2],并且证实注射T3会使大鼠和兔子奶中的T3水平显著升高^[3,4]。给奶牛注射TH,或饲喂碘化酪蛋白(活性物质为TH),能显著提高奶牛奶量^[5,6],但这是否对牛奶质量安全产生影响,尚不清楚。因此,建立牛奶和奶粉中TH的检测方法对开展相关研究和质量安全评价具有重要意义。

关于TH的检测有大量报道,应用最多的是免疫分析相关方法^[7,8]、高效液相色谱法(HPLC)^[9]、液相色谱-质谱法(LC-MS)^[10]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[11]等。IA相关方法具有简便、快速和成本低等特点,但用于测定游离TH时容易受到其他蛋白质和抗体的干扰^[12]。HPLC法对低TH含量试样特异性和检出能力不足。LC-MS法和LC-MS/MS法由于在特异性、检出限和可靠性方面都具有突出的优势,特别是LC-MS/MS法,近年来在TH的临床检验上受到重视^[12],但使用LC-MS/MS检测牛奶样品中的TH尚未见报道。本文通过选择和优化样品处理方法和分析条件,建立了牛奶中TH的LC-MS/MS的检测方法,为相关研究和乳品质量安全评价提供了可靠手段。

1 实验部分

1.1 仪器、材料和试剂

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS系统(美国);H-1850R离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);AWL-1002-U艾科浦超纯水系统(重庆顺洋企业发展有限公司);12孔固相萃取装置、BF-2000氮气吹干仪、0.2 μm针式过滤器(北京八方科技有限公司);Cleanert PAX固相萃取小柱(3 mL, 60 mg)(天津博纳艾杰尔科技有限公司);50 mL塑料离心管(BD Biosciences公司)。HPLC级甲醇、乙腈(Burdick & Jackson, Honeywell公司);HPLC

级乙酸、分析纯甲酸、氨水(北京化学试剂公司);T3, rT3和T4(Sigma公司);T4-¹³C₆(Toronto Research Chemicals Inc.)。牛奶样品购自北京昌平回龙观地区超市。

1.2 溶液的配制

分别称取25 mg T3、rT3和T4, 2.5 mg T4-¹³C₆于25.00 mL容量瓶中,加100 μL氨水,用甲醇溶解并定容至刻度,得到T3、rT3、T4质量浓度均为1 g/L和T4-¹³C₆质量浓度为0.1 g/L的单标准储备液。1 mg/L的T4-¹³C₆内标溶液用甲醇稀释储备液获得。移取适量体积的T3、rT3和T4单标准储备液用甲醇定容至100.0 mL容量瓶中,得到混合标准溶液。分别移取适量体积的混合标准溶液与固定体积的内标溶液混合,用甲醇-水(3:2, v/v)溶液稀释至适当浓度,得系列标准工作液。

1.3 样品处理

1.3.1 提取

称取5 g(约5 mL)牛奶样品于50 mL塑料离心管中,加入25 μL 1 mg/L的T4-¹³C₆内标溶液,加入15 mL乙腈,摇匀,置于离心机中以8 000 r/min的转速离心5 min,取上清液备用。

1.3.2 固相萃取净化

Cleanert PAX固相萃取小柱经3 mL甲醇和3 mL水活化后,上接20 mL大体积盛样管,关闭阀门,将1.3.1节所得上清液完全倾入大体积盛样管中,用移液枪注入500 μL氨水,静置1 min使其混合均匀,打开阀门和真空泵,在负压作用下,使样品提取液缓慢流过小柱,用3 mL甲醇清洗小柱并抽干,最后用3 mL甲酸-甲醇溶液(1:49, v/v)洗脱小柱,收集洗脱液于5 mL塑料离心管,40 ℃下氮气吹干,用0.50 mL甲醇-水溶液(3:2, v/v)复溶,待测。

1.4 色谱-质谱条件

色谱条件:Zorbax Eclipse XDB-C18色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm), Zorbax Eclipse Plus-C18预柱(12.5 mm × 2.1 mm, 5 μm)。流动相为0.1% (v/v)乙酸水溶液-甲醇(37:63, v/v),流速为0.3 mL/min,等度洗脱10 min。进样体积

5 μL 。

质谱条件:电喷雾电离源正离子模式(ESI^+),多反应离子监测(MRM)方式检测,MRM 参数见表 1。干燥氮气温度为 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$,流速为 10 L/min ;雾化气压力 $137\,931\text{ Pa}(20\text{ psi})$;喷雾毛细管电压 $4\,000\text{ V}$ 。

表 1 TH 的多反应监测质谱参数				
Table 1 MS parameters of multiple reaction monitoring (MRM) for TH				
TH	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor voltage/V	Collision energy/eV
T3, rT3	652.0	605.5 *	145	25
		478.6	145	40
T4	777.7	731.7 *	165	25
		604.9	165	40
$\text{T4-}^{13}\text{C}_6$	784.0	737.9 *	165	25
		639.4	165	25

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 色谱-质谱条件的确定

由于 TH 分子中都含有相对较大的弱极性基团,再通过酸性流动相抑制羧基电离造成的色谱峰

拖尾,因此容易实现 TH 在 C18 柱上的分离。本实验以甲醇-乙酸水溶液为流动相,通过等度洗脱,在 1.4 节条件下实现了对 T3, rT3 和 T4 的满意分离,实际样品按 1.3 节的方法处理后,没有观察到明显的离子抑制效应。图 1a 和图 1b 分别为混合标准溶液和牛奶样品溶液的 MRM 色谱图(只给出了定量离子对)。

采用质谱检测 T3, rT3 和 T4 时使用电喷雾源的正、负离子模式均可,但在本色谱条件下以正离子模式电离更灵敏,故选用 ESI^+ 模式检测。TH 的 MRM 检测的优化参数如表 1 所示。TH 的准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 的主要碎裂方式为脱甲酸、脱碘、脱氨,同时脱氨脱碘和同时脱甲酸脱碘等。当碰撞能较低时,主要碎裂方式为脱甲酸,T3 (rT3)、T4 和 $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ 的子离子 $m/z\,606$ 、 $m/z\,732$ 和 $m/z\,738$ 有最高丰度,用作定量离子;随着碰撞能的增加,T3 (rT3)和 T4 同时脱甲酸脱碘获得的子离子峰 $m/z\,478.6$ 和 604.9 增强,用作佐证离子;但随着碰撞能的增加, $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ 的同时脱甲酸脱碘和同时脱氨脱碘峰都不明显,因此选择较低碰撞能时丰度较高的同

图 1 (a)混合标准溶液和(b)牛奶样品的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of (a) a mixed standard solution of TH ($4\text{ }\mu\text{g/L}$ for each) and $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ ($50\text{ }\mu\text{g/L}$) and (b) a milk sample solution

1. $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$; 2. T4; 3. T3; 4. rT3.

时脱氨脱碘获得的子离子 m/z 639.4 作佐证离子。

2.2 样品处理条件的选择

文献^[8]中使用乙醇(加氨水碱化)提取牛奶中的 TH 进行酶联免疫吸附(ELISA)检测,本文对比考察了甲醇、乙腈和三氯乙酸作提取剂时的提取效果。实验发现,三氯乙酸虽有较好的蛋白质沉淀效果,提取液可直接使用 Cleanert PCX (聚合物填料强阳离子交换型)小柱净化,但不能对牛奶中的 TH 进行有效提取;使用乙腈能有效地对 TH 进行提取,且较甲醇、乙醇有更好的蛋白质沉淀效果,有利于后续离心分离和净化;因此本实验选择乙腈作提取剂。在提取时加入少量氨水,目的是对 TH 进行负离子化,提高其在提取液中的溶解度和为后续使用 Cleanert PAX 小柱进行阴离子交换固相萃取净化做准备。但实验发现,用乙腈提取时,不加氨水对 TH 的提取效率无影响,加入氨水反而不利于离心除蛋白质时溶液的分层。因此,适量氨水在乙腈提取后加入。

2.3 检出限、定量限和线性关系

由于牛奶中的 TH 是一种内源性物质,很难获得不含 TH 的空白试样用于检出限、定量限的评定。因此本实验在经净化处理使样品溶液基质效应被有效消除的基础上,通过与系列浓度标准溶液对应色谱峰进行比较,分别以 3 倍和 10 倍信噪比对检出限和定量限进行了估计,确定样品溶液中 TH 的检出限和定量限分别小于或等于 0.3 和 1.0 $\mu\text{g/L}$;按本实验的样品处理方法进行换算,则液态奶中 TH 的检出限和定量限分别小于或等于 0.03 和 0.1 ng/g 。考虑到样品溶液中 TH 的可能浓度,对 1~100 $\mu\text{g/L}$ ($\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ 为 50 $\mu\text{g/L}$) 的质量浓度范围进行了线性考察,结果表明线性关系良好,见表 2。

表 2 样品溶液中 TH 的线性方程和相关系数(r^2)
Table 2 Regression equations and correlation coefficients (r^2) of TH in the sample solution

TH	Regression equation	r^2
T3	$y = 0.7751x - 0.0154$	0.9989
rT3	$y = 0.4484x + 0.0059$	0.9998
T4	$y = 0.4860x + 0.0109$	0.9996

y is the peak area ratio of analyte to internal standard; x is the content ratio of analyte to internal standard. The mass concentration of internal standard ($\text{T4-}^{13}\text{C}_6$) is 50 $\mu\text{g/L}$.

2.4 回收率、精密度和稳定性

分别向 24 支离心管中加入 5.0 g 牛奶和 25 μL 1 mg/L 的 $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ 内标溶液,然后分为 4 组,每组 6 支,以第一组为空白,分别向第二组的牛奶中加入 T3、rT3 和 T4 均为 20 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液 50

μL ,向第三组的牛奶中加入 T3、rT3 和 T4 均为 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液 50 μL ,向第四组的牛奶中加入 T3、rT3 和 T4 均为 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液 200 μL ,获得 TH 添加质量浓度分别为 0、0.20、2.00 和 8.00 ng/g 的牛奶样本(其中内标 $\text{T4-}^{13}\text{C}_6$ 均为 5.00 ng/g)。按 1.3 和 1.4 节的方法进行样品处理和进样分析,内标校准曲线定量,结果见表 3。

表 3 牛奶中 TH 的加标回收率和相对标准偏差(RSD) ($n=6$)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of TH in milk samples ($n=6$)

TH	Background/ (ng/g)	Added/ (ng/g)	Found/ (ng/g)	Recovery/ %	RSD/ %
T3	0.73	0.20	0.93	98.41	9.07
		2.00	2.56	91.32	6.40
		8.00	8.60	98.35	3.80
rT3	NF	0.20	0.16	80.61	6.56
		2.00	1.99	99.34	5.66
		8.00	8.13	101.7	5.40
T4	NF	0.20	0.19	93.09	8.40
		2.00	1.98	98.61	1.48
		8.00	8.08	101.0	1.84

NF: not found.

样品溶液于实验室室温放置,首次进样后,又分别于 24、48 和 96 h 后重新进样分析,通过对峰面积进行方差分析,结果显示在 0、24、48 和 96 h 进样,同一浓度水平样品的峰面积之间无显著差异($\alpha = 0.05$),说明 TH 在样品溶液中比较稳定。

2.5 实际样品的测定

应用本方法对市售 5 个品牌的鲜牛奶和纯牛奶样品进行了测定(见表 4)。结果显示,鲜牛奶和纯牛奶中 T3 含量为 0.59~1.30 ng/g , RSD 为 2.06%~7.70%,鲜牛奶中 T3 含量明显高于纯牛奶;鲜牛奶和纯牛奶中未检出 rT3 和 T4。

表 4 市售牛奶中 TH 的测定结果($n=6$)
Table 4 Results of TH in milks from market ($n=6$)

Sample	T4 and rT3/ (ng/g)	T3/ (ng/g)	RSD of T3 content/%
Fresh milk-1	NF	1.09	2.06
Fresh milk-2	NF	1.30	2.88
Pure milk-1	NF	0.59	7.70
Pure milk-2	NF	0.75	5.91
Pure milk-3	NF	0.73	4.80

NF: not found.

3 结论

本文建立了高效液相色谱-串联质谱测定牛奶中甲状腺素 T3、rT3 和 T4 的检测方法。该方法具有样品处理简单,灵敏度高,重现性好,定性和定量结果可靠等特点,为牛奶中甲状腺素的测定和相关质量安全评价提供了可靠手段。

参考文献:

[1] Moller B, Bjorkhem I, Falk O, et al. J Clin Endocrinol Metab, 1983, 56(1): 30

[2] Strbák V, Macho L, Kovác R, et al. Endocrinol Exp, 1976, 10(3): 167

[3] Koldovsky O, Krulich L, Tenore A, et al. Biol Neonate, 1980, 37(1/2): 103

[4] Slobodzinski A B, Gawecka A. Endocrinol Exp, 1983, 17(3/4): 243

[5] Khazali H, Khajavi M, Rokni H. Anim Sci J, 2000, 71(5): 481

[6] Sun Y M, Lu L, Zhao Z S, et al. Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine (孙延鸣, 陆良, 赵宗胜, 等. 黑龙江畜牧兽医), 2002(7): 18

[7] Zhang W Y, Guo J. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases (张雯艳, 郭杰. 中国地方病防治杂志), 2010, 25(2): 130

[8] Todini L, Malfatti A, Salimei E, et al. J Dairy Res, 2010, 77: 419

[9] Wang Z, Lv M, Li D, et al. Acta Chromatogr, 2008, 20(1): 59

[10] Wang Z, Yang W, Chang B, et al. Chromatographia, 2011, 73: 143

[11] Higashi T, Ichikawa T, Shimizu C, et al. J Chromatogr B, 2011, 879: 1013

[12] Soldin O P, Soldin S J. Clin Biochem, 2011, 44: 89