

QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱法测定 土壤中61种激素类药物残留

任雪冬*, 王璐, 熊爽

(辽宁省分析科学研究院, 辽宁 沈阳 110015)

摘要:建立了 QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定土壤中61种激素类药物残留的分析方法。样品经乙腈提取, QuEChERS方法净化后进行 HPLC-MS/MS 测定。采用电喷雾离子源(ESI), 正、负模式扫描, 多反应监测(MRM)模式采集, 基质匹配工作曲线法定量。结果表明: 61种目标化合物在各自浓度范围内线性良好, 相关系数(r^2)为0.9918~0.9998, 检出限(LOD, $S/N \geq 3$)为0.01~2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量下限(LOQ, $S/N \geq 10$)为0.03~7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在10、50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个加标水平下, 平均回收率为62.6%~102%, 相对标准偏差($n=6$)为1.0%~11%。该方法简单、快速、重现性好、稳定性高, 可满足土壤中61种激素类药物残留的检测要求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS); QuEChERS; 激素残留; 土壤

中图分类号: O657.63; X132 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)09-1036-08

Determination of 61 Hormone Residues in Soil by QuEChERS/High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

REN Xue-dong*, WANG Lu, XIONG Shuang

(Liaoning Provincial Research Institute of Analytical Science, Shenyang 110015, China)

Abstract: A QuEChERS/high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (HPLC-MS/MS) method was developed for the determination of 61 kinds of hormone residues in soil. Samples were extracted with acetonitrile, and then purified using QuEChERS method. Analysis on the targets was performed by electrospray ionization mass spectrometry in positive or negative mode, multiple reaction monitoring(MRM) mode was used for collection, and matrix matched standard curve method was selected for quantitation. Results showed that 61 analytes showed good linearities in their respective ranges, with correlation coefficients(r^2) between 0.9918 and 0.9998. The limits of detection(LOD, $S/N \geq 3$) were 0.01-2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ while the limits of quantitation(LOQ, $S/N \geq 10$) were 0.03-7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Recoveries for the target analytes at spiked levels of 10, 50 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ranged from 62.6% to 102%, with relative standard deviations($n=6$) of 1.0%-11%. The method is simple, rapid, replicable and high stable, and could meet the requirements for determination of 61 hormone residues in soil.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); QuEChERS; hormone residues; soil

20世纪70年代, 激素类药物开始应用于养殖业, 以促进动物生长, 提高饲料转化率, 从而尽快产生显著和直接的经济效益^[1]。但是激素类药物在动物体内不能完全代谢降解, 随畜禽粪便和尿液排出的比例较高。大量未经处理的畜禽粪尿以及随意丢弃的含激素的药物、化妆品、保健食品等进入土壤环境后, 会对土壤环境和动植物产生不利影响, 进而危害人体健康^[2-3]。因此, 建立土壤中多种激素类药物残留的同时检测方法具有重要意义。

针对不同领域中激素残留的检测已有较多文献报道和标准检测方法^[4-19]。其中, 土壤中激素残留的检测方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS), 但GC-MS

法需要复杂的衍生化操作。LC-MS/MS法无需衍生化,可同时测定多个目标化合物,且具有高选择性、高灵敏度、高通量的优势,能够满足检测要求。测定土壤中少数几种激素残留的LC-MS/MS法已有报道^[20],但同时测定土壤中61种激素残留的LC-MS/MS法尚未见报道。

土壤中激素类检测的样品前处理方法主要有索氏提取法、微波提取法、超声提取法、基质固相分散萃取法(MSPD)和加速溶剂萃取法(PLE)等。但传统方法的步骤繁琐、提取时间长、耗费有机溶剂,且回收率较低^[20]。QuEChERS法于2003年正式发布的一种新型前处理方法,具有效率高、成本低、操作简单、稳定性好、对环境及操作人员危害小等优点。该方法得到美国分析化学家协会(AOAC)和欧盟农残监测委员会的认可,已应用于植物、动物和环境样品中农、兽药残留及环境污染物等多类化合物的检测^[21]。但采用QuEChERS前处理方法同时测定土壤中61种激素残留的研究尚未见报道。

本文采用QuEChERS技术进行样品前处理,通过优化样品前处理及色谱-质谱分析条件,建立了同时测定土壤中61种激素残留(4种雌激素、6种孕激素、5种雄激素、42种糖皮质激素和4种甾体类激素)的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法,可为土壤中激素类残留的定性、定量分析提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200/6410B液相色谱-串联四极杆质谱联用仪(美国安捷伦公司);CT14RD离心机(天美科学仪器有限公司);TTL-DC II型水浴式氮吹浓缩仪(北京同泰联科技发展有限公司);IKA快速混匀器(德国IKA公司),Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司)。

61种激素标准品的纯度均大于95.6%(购于德国Dr. Ehrenstorfer公司、加拿大Trc公司和中国药品生物制品检定所);吸附剂:N-丙基乙二胺(PSA)、十八烷基键合硅胶(C₁₈)、中性氧化铝(Alu-N)、石墨化炭黑(GCB)(天津博纳艾杰尔科技有限公司);甲醇(美国Fisher公司)、乙腈(Sigma公司)、甲酸(迪马公司)均为色谱纯;无水硫酸镁、氯化钠、氨水(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯;实验用水为超纯水。

1.2 标准溶液的配制

准确称取标准品各10.0 mg(精确至0.000 1 g),置于10 mL棕色容量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,配制成1.0 mg/mL的单标储备液,于-18℃下冷冻保存。分别取上述标准储备溶液1.0 mL混合,用甲醇定容至100 mL,制成10.0 μg/mL的混合标准储备溶液,于-18℃下冷冻保存。将上述混合标准储备溶液用甲醇逐级稀释成混合标准工作溶液,用于绘制标准曲线。

1.3 色谱条件

1.3.1 正离子模式 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(1.8 μm, 3.0 mm×100 mm);柱温:25℃;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL;流动相:A为乙腈,B为0.1%甲酸溶液;梯度洗脱程序:0~3 min, 68% B;3~12 min, 68%~25% B;12~14 min, 25% B;14~16 min, 25%~68% B;保持9 min。

1.3.2 负离子模式 色谱柱:ZORBAX Extend-C₁₈(5 μm, 4.6 mm×150 mm);柱温:30℃;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL;流动相:A为乙腈;B为0.1%氨水溶液;梯度洗脱程序:0~1 min, 70% B;1~1.01 min, 70%~60% B;1.01~4 min, 60% B;4~4.01 min, 60%~40% B;4.01~7 min, 40% B;7~7.01 min, 40%~20% B;7.01~10 min, 20% B;10~11 min, 20%~30% B;11~15.1 min, 30%~50% B;15.1~20 min, 50%~70% B;保持10 min。

1.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI);正离子或负离子扫描模式;多反应监测(MRM)采集方式;干燥气温度:350℃;干燥气流速:9.0 L/min;雾化气压力:241.3 kPa(35 psi);毛细管电压:4 000 V。各目标化合物的质谱采集参数见表1。

1.5 样品制备

土壤样品取自沈阳地区农田土、养殖场附近土壤和城区表层土(0~20 cm),采用自然通风干燥,过60目筛后备用。

表 1 61 种激素的质谱采集参数
Table 1 MS acquisition parameters of 61 kinds of hormones

Compound	Retention time (min)	ESI mode	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
Estriol(雌三醇)	8.40	-	287.2	171.0*, 145.1	170	35, 40
17- α -Estradiol(17 α -雌二醇)	14.03	-	271.2	182.8, 145.2*	170	45, 40
17 α -Ethinylestradiol(17 α -炔雌醇)	14.60	-	295.2	159.2, 145.2*	160	35, 40
Diethylstilbestrol(己烯雌酚)	14.80	-	267.1	237.2*, 222.1	140	25, 30
Hexestrol(己烷雌酚)	15.20	-	269.1	134.1, 119.1*	120	8, 40
Dienoestrol(双烯雌酚)	14.90	-	265.1	235.0, 93.1*	140	20, 25
Estrone(雌酮)	15.10	-	269.2	159.2, 145.1*	150	35, 35
Zeranol(玉米赤霉醇)	5.20	-	321.1	303.2, 277.2*	150	15, 15
Norethisterone(炔诺酮)	13.46	+	299.2	231.3, 109.1*	120	15, 25
Chlormadinone acetate(醋酸氯地孕酮)	16.87	+	405.2	345.2, 309.2*	115	10, 12
17- α -Hydroxyprogesterone(17 α -羟孕酮)	14.18	+	331.2	109.1*, 97.1	120	30, 30
Progesterone(孕酮)	17.93	+	315.2	109.1, 97.1*	120	25, 20
Melengestrol acetate(醋酸美仑孕酮)	17.67	+	397.2	337.2*, 279.1	110	10, 20
Megestrol-17-acetate(醋酸甲地孕酮)	17.26	+	385.2	325.2, 267.2*	110	10, 15
Testosterone(睾酮)	13.38	+	289.2	108.9, 97.0*	120	25, 20
17- α -Methultestosterone(甲基睾酮)	14.41	+	303.2	109.2*, 97.2	120	30, 25
Boldenone(去氢睾酮)	12.47	+	287.2	134.9, 120.9*	100	10, 25
19-Nortestosterone(19-去甲睾酮)	12.40	+	275.2	257.4, 109.0*	130	12, 25
Trenbolone(群勃龙)	11.80	+	271.2	253.2*, 133.2	130	20, 25
Triamcinolone(曲安西龙)	2.10	+	395.2	357.2*, 225.2	95	9, 15
Prednisolone(泼尼松龙)	5.39	+	361.2	343.2*, 147.0	89	5, 20
Hydrocortisone(氢化可的松)	5.27	+	363.2	327.1, 121.1*	130	15, 30
Prednisone(泼尼松)	5.73	+	359.2	341.0, 147.1*	110	5, 25
Cortisone(可的松)	6.00	+	361.2	163.1*, 121.1	140	25, 35
Methylprednisolone(甲基泼尼松龙)	8.20	+	375.2	357.1*, 161.1	100	5, 20
Betamethasone(倍他米松)	9.34	+	393.2	355.0, 147.0*	100	5, 25
Dexamethasone(地塞米松)	9.30	+	393.2	355.2, 147.1*	96	5, 29
Flumethasone(氟米松)	9.22	+	411.1	253.1*, 121.0	100	10, 35
Beclomethasone(倍氯米松)	10.32	+	409.2	390.9*, 147.0	100	8, 35
Triamcinolone acetonide(曲安奈德)	10.90	+	435.2	397.0, 339.1*	100	10, 12
Fludrocortide(氟氢缩松)	10.82	+	437.2	181.2, 121.2*	140	40, 40
Triamcinolone diacetate(曲安西龙双醋酸酯)	11.41	+	479.1	440.9, 321.0*	100	3, 12
Prednisolone 21-acetate(泼尼松龙醋酸酯)	11.64	+	403.1	384.8, 147.2*	100	3, 25
Fluoromethalone(氟米龙)	11.43	+	377.2	321.1, 279.1*	100	5, 10
Hydrocortisone 21-acetate(氢化可的松醋酸酯)	11.60	+	405.2	309.1*, 120.8	130	15, 35
Deflazacort(地夫可特)	11.92	+	442.2	142.0, 124.0*	160	35, 50
Fludrocortisone 21-acetate(氟氢可的松醋酸酯)	11.70	+	423.2	239.0*, 120.9	150	20, 40
Prednisone 21-acetate(泼尼松醋酸酯)	12.10	+	401.2	295.0, 146.8*	120	8, 24
Cortisone 21-acetate(可的松醋酸酯)	12.20	+	403.2	343.1, 163.1*	142	17, 25
Methylprednisolone 21-acetate(甲基泼尼松龙醋酸酯)	12.70	+	417.2	399.2*, 253.1	95	5, 20
Betamethasone 21-acetate(倍他米松醋酸酯)	12.67	+	435.1	337.1, 309.1*	100	8, 8
Budesonide(布地奈德)	14.13	+	431.3	413.3*, 147.2	100	6, 35
Hydrocortisone 17-butyrate(氢化可的松丁酸酯)	13.43	+	433.2	345.0, 121.0*	130	8, 25
Dexamethasone 21-acetate(地塞米松醋酸酯)	13.01	+	435.2	337.2, 309.2*	94	5, 8
Fluorometholone 17-acetate(氟米龙醋酸酯)	13.53	+	419.2	321.2, 279.1*	105	8, 10
Hydrocortisone 17-valerate(氢化可的松戊酸酯)	14.74	+	447.2	345.1, 120.9*	130	8, 35
Triamcinolone acetonide acetate(曲安奈德醋酸酯)	14.63	+	477.2	339.1*, 321.2	105	12, 15
Fluocinonide(氟轻松醋酸酯)	14.38	+	495.2	337.1*, 121.0	110	10, 10
Diflorasone diacetate(二氟拉松双醋酸酯)	14.24	+	495.2	317.3*, 278.9	110	8, 12
Betamethasone 17-valerate(倍他米松戊酸酯)	15.49	+	477.2	355.1, 279.1*	110	8, 15

(续表1)

Compound	Retention time (min)	ESI mode	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
Prednicarbate(泼尼卡酯)	16.37	+	489.2	381.1, 115.0*	100	3, 10
Halcinonide(哈西奈德)	15.78	+	455.2	120.9, 105.0*	150	45, 65
Alclomethasone dipropionate(阿氯米松双丙酸酯)	17.82	+	521.2	301.2*, 279.2	110	12, 10
Amcinonide(安西奈德)	16.50	+	503.2	338.8, 321.1*	100	10, 13
Clobetasol 17-propionate(氯倍他素丙酸酯)	16.23	+	467.2	373.2*, 354.9	100	8, 10
Fluticasone propionate(氟替卡松丙酸酯)	16.08	+	501.2	313.1, 293.1*	105	8, 12
Mometasone furoate(莫米他松糠酸酯)	16.59	+	521.1	503.0*, 263.1	100	3, 20
Betamethasone dipropionate(倍他米松双丙酸酯)	16.77	+	505.2	318.9, 279.1*	105	12, 15
Beclomethasone dipropionate(倍氯米松双丙酸酯)	16.60	+	521.2	503.0*, 319.1	110	5, 10
Clobetasone 17-butyrate(氯倍他松丁酸酯)	18.48	+	479.2	342.9, 278.9*	130	15, 15
Fluocinonide acetone(氟轻松)	10.98	+	453.2	337.0, 121.0*	110	10, 40

* quantitation ion

1.6 样品前处理

1.6.1 提取 取样品5.0 g(精确至0.01 g), 置于50 mL具塞离心管中, 加入5 mL水, 充分涡旋混匀1 min后, 准确加入10.0 mL乙腈, 涡旋混合2 min, 再加入QuEChERS盐析剂(4.0 g无水硫酸镁、1.0 g氯化钠), 充分涡旋混匀后, 置于冰水浴中降温, 在4 °C下以9 000 r/min离心10 min, 移取上清液于另一离心管中, 待净化。

1.6.2 净化 在待净化离心管中准确加入600 mg无水硫酸镁、200 mg中性氧化铝和200 mg PSA, 充分涡旋混匀1 min, 以9 000 r/min离心10 min后, 移取上清液至10 mL具塞刻度试管中, 于45 °C水浴下氮吹浓缩至近干, 加入1.0 mL 30%乙腈水溶液复溶, 涡旋30 s, 过0.22 μm有机滤膜后, 待测。

1.7 基质匹配工作曲线的绘制

取空白基质样品, 按“1.6”处理后浓缩至干, 加入“1.2”配制的混合标准工作溶液, 定容至1.0 mL, 涡旋混匀, 过0.22 μm有机滤膜后上机测定, 绘制标准工作曲线。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

本文的61种激素包括57种甾体激素(4种雌激素、6种孕激素、5种雄激素和42种糖皮质激素)和4种非甾体类激素^[1]。分别在正、负离子模式下对质谱条件进行优化, 结果表明: 雌激素与玉米赤霉醇等二羟基苯甲酸内酯类化合物在ESI源的负离子模式下易电离, 形成 $[M-H]^-$ 准分子离子, 其中雌酮在负模式下的响应值远大于正模式。其它激素类化合物在正离子模式下响应值高, 形成 $[M+H]^+$ 准分子离子, 其中醋酸氯地孕酮在正模式下的响应值比负模式高50%以上。在此基础上, 进一步优化碎裂电压(Fragmentor)、碰撞能量(Collision energy)使所有目标化合物的母离子和对应子离子的响应最大化, 并选择合适的干燥气温度、流速等条件使所有目标化合物均有良好的响应值。61种激素的质谱采集参数见表1。

2.2 色谱条件的选择

根据目标化合物质谱行为的差异, 分别建立正、负离子模式下的色谱条件。

正模式下: 考察了4种不同流动相体系(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液)的分离效果, 结果表明, 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相可获得良好的色谱峰形及较高的灵敏度。进一步对比了ZORBAX SB-C₁₈(1.8 μm, 3.0 mm×100 mm)、ZORBAX SB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm)和Eclipse XDB-C₁₈(3.5 μm, 4.6 mm×150 mm)色谱柱的分离效果, 发现ZORBAX SB-C₁₈(1.8 μm, 3.0 mm×100 mm)对目标化合物的分离效果、灵敏度、色谱峰形均最优。在“1.3.1”的最佳色谱条件下, 53种激素的提取离子流图见图1。

负模式下: 考察了2种不同流动相体系(乙腈-水、乙腈-0.1%氨水溶液)的分离效果, 发现以乙

脞-0.1% 氨水溶液为流动相时目标化合物的分离效果、色谱峰形均最优。由于流动相使用 0.1% 氨水溶液, 其 pH 值达到 10.0 左右, 因此选用可耐受 pH 2.0~11.5 范围的 ZORBAX Extend-C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) 色谱柱, 达到了良好的分离效果。在“1.3.2”的最佳色谱条件下, 其余 8 种激素的提取离子流图见图 2。

2.3 样品前处理条件的优化

2.3.1 酶解

激素类药物以游离或结合物两种形式存在, 若检测结合物或总量, 则前处理时样品需要酶解^[22]。然而, 祝伟霞等^[7]对奶粉与牛奶中内源性激素雌二醇与孕酮的研究显示, 酶解与不酶解的测定值无明显差异; Shao 等^[23-24]研究显示, 动物肌肉组织中睾酮可解离的结合态 < 20%, 17β-雌二醇 < 5%。Yang 等^[24]研究显示, 肌肉、虾、牛奶中的内源性激素在酶解和无酶解条件下的测定结果无差异。虽然土壤中的动物排泄物(以尿、粪的形式)含有结合物形式的激

素, 但在激素残留总量中占比不高或极少, 而正常情况下在城区、农村的土壤样品中畜禽尿液、粪便的比例极低, 为节约分析时间与成本, 本实验省略酶解步骤。若土壤样品采自养殖场附近或粪尿农用农田, 为保证数据准确性可进行酶解步骤。

2.3.2 QuEChERS 样品处理条件的优化

提取溶剂的选择: 61 种激素类化合物多为弱极性或中等极性, 根据其化学结构并参考国家标准及相关文献^[4,7,14,16,18], 考察了常用提取溶剂乙腈、甲醇、乙酸乙酯的提取效果。结果显示, 甲醇的盐析效果不佳; 乙酸乙酯的共萃取物较多, 不易净化。而乙腈作为提取溶剂可以减少共提取物, 同时具有沉淀蛋白的作用, 因此选用乙腈为提取溶剂。

净化条件的优化: 常用的吸附剂有 PSA、C₁₈、中性氧化铝及 GCB, 其中 PSA 通常用于去除提取液中的脂类和糖类物质; C₁₈及中性氧化铝具有良好的除脂能力; GCB 可去除提取液中的色素, 但对含苯环官能团的化合物有较强的吸附作用^[21,25]。本实验对比了上述 4 种吸附剂对 61 种目标物的吸附情况, 在 200 μg/L 混合标准溶液中分别加入上述吸附剂 100 mg, 充分混匀、离心后上机测定。结果显示, GCB 对待测物的吸附极强; C₁₈对待测物也有很大吸附; 而 PSA 与中性氧化铝对大多数目标物的吸附较少, 61 种目标物的回收率分别为 81.5%~103% 和 87.9%~103%, 可作为净化剂进一步优化。根据土壤成分特点, 进一步考察了 PSA(50~1 000 mg)、中性氧化铝(50~600 mg)及起脱水作用的无水硫酸镁(200~1 000 mg)的用量。发现以 200 mg PSA、200 mg 中性氧化铝及 600 mg 无水硫酸镁为净化剂组合的样品基质干扰最小, 回收率最好。优化的样品处理条件如“1.6”所示。

2.4 基质效应的影响

LC-MS/MS 的基质效应由分析物的共流出组分影响电喷雾离子源的离子化效率所致, 即待测组分与样品中的基质成分在雾滴表面离子化过程存在竞争^[26]。其竞争结果会显著降低(离子抑制)或增加(离子增强)目标离子的生成效率及离子强度, 进而影响测定结果的精密度和准确度。基质效应可采用(基质匹配标准溶液所作标准曲线的斜率/无基质标准溶液所作标准曲线的斜率-1) × 100% 进行评价^[27]。负值表示存在基质抑制效应, 正值表示存在基质增强效应, 绝对值越大则表明基质效应越强。本实验对 61 种化合物的基质效应进行了评价(见表 2), 发现玉米赤霉醇、炔诺酮、倍他米松、泼尼松龙醋酸酯的基质效应较小, 大部分化合物存在不同程度的增强或抑制效应, 而以二氟拉松双醋酸酯、阿氯米松双丙酸酯、氯倍他索丙酸酯、莫米他松糠酸酯的基质效应最为明显。本方法采用配制基质匹配标准工作溶液的方法消除基质影响, 能够满足激素残留的检测要求。

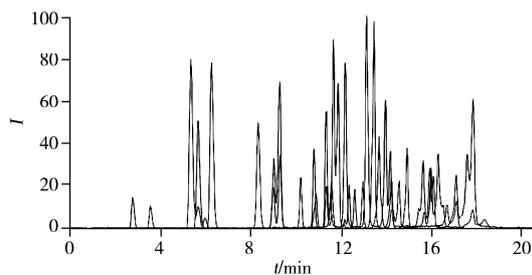


图 1 正离子模式下 53 种激素的提取离子流图
Fig. 1 Extracted ion chromatogram of 53 hormones under positive ion mode

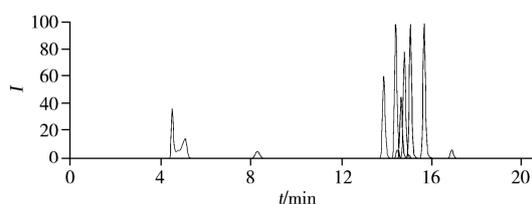


图 2 负离子模式下 8 种激素的提取离子流图
Fig. 2 Extracted ion chromatogram of 8 hormones under negative ion mode

2.5 线性范围、检出限与定量下限

按“1.7”方法配制6个浓度水平的基质匹配混合标准工作溶液,上机测定,以待测物的质量浓度对其响应值绘制标准曲线。61种目标化合物在各自范围内线性良好,相关系数(r^2)为0.9918~0.9998。采用标准添加法进行测定,以定量离子信噪比 $S/N \geq 3$ 得到61种目标化合物的检出限(LOD)为0.01~2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,以 $S/N \geq 10$ 得到定量下限(LOQ)为0.03~7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (见表2)。

表2 61种待测物的基质效应、检出限、定量下限、线性范围、平均回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 2 Matrix effects, LOD, LOQ, linear ranges, average recoveries and relative standard deviations of 61 analytes($n=6$)

Compound	Matrix effect (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linear range ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Added 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Added 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Added 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
					Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Estriol	-3.94	0.05	0.2	1~200	86.7	8.4	78.1	4.0	80.4	1.9
17- α -Estradiol	-10.8	0.06	0.2	1~200	84.6	6.6	80.1	2.6	73.2	2.3
17 α -Ethinylestradiol	-8.83	0.2	0.5	1~200	90.4	1.8	82.4	2.8	79.9	1.4
Diethylstilbestrol	-15.2	0.02	0.05	1~200	77.6	6.4	71.4	1.7	71.1	1.7
Hexestrol	-8.29	0.02	0.06	1~200	92.7	3.7	78.8	2.6	82.4	2.1
Dienoestrol	-11.6	0.01	0.03	1~200	88.3	3.6	76.6	5.4	72.6	2.8
Estrone	-9.49	0.02	0.07	1~200	90.9	6.9	80.8	3.7	75.4	3.2
Zeranol	0.48	0.3	0.9	1~200	93.1	2.5	83.4	2.6	80.3	3.8
Norethisterone	-0.31	0.2	0.6	2~200	65.0	5.8	75.6	3.5	74.3	2.2
Chlormadinone acetate	8.30	0.06	0.2	1~200	95.9	4.8	90.4	4.2	82.7	2.8
17- α -Hydroxyprogesterone	-4.53	0.07	0.3	1~200	81.3	4.8	77.6	4.3	72.7	2.3
Progesterone	-2.65	0.06	0.2	1~200	78.5	3.3	75.0	3.4	73.6	2.0
Melengestrol acetate	7.23	0.1	0.4	2~200	93.5	4.0	91.3	4.2	86.5	3.5
Megestrol-17- acetate	2.17	0.06	0.2	1~200	91.1	5.2	88.6	6.1	82.2	1.4
Testosterone	1.11	0.06	0.2	1~200	65.8	4.7	71.8	1.4	71.6	1.3
17- α -Methultestosterone	-4.27	0.09	0.3	1~200	70.6	5.2	72.9	1.6	73.9	2.6
Boldenone	3.77	0.07	0.3	1~200	71.5	8.3	73.9	3.8	71.4	1.5
19-Nortestosterone	2.70	0.09	0.3	2~200	101	2.4	76.8	2.4	71.0	1.0
Trenbolone	3.37	0.1	0.4	2~200	62.6	3.6	74.6	2.1	75.0	2.2
Triamcinolone	4.30	0.2	0.7	2~200	92.2	3.7	84.9	3.3	84.5	1.9
Prednisolone	11.3	0.4	1.3	2~200	82.0	5.8	83.9	4.3	82.0	1.2
Hydrocortisone	-9.00	0.2	0.5	2~200	68.8	7.2	79.9	5.6	81.6	1.2
Prednisone	13.4	0.3	1.1	5~200	90.1	3.9	79.5	1.5	80.1	2.8
Cortisone	6.20	0.07	0.3	1~200	63.1	4.8	72.4	3.1	76.0	1.2
Methylprednisolone	6.60	0.5	1.7	2~200	77.6	5.0	83.8	3.4	80.5	4.5
Betamethasone	-0.50	0.3	1.0	2~200	85.8	3.7	84.2	1.8	78.8	2.6
Dexamethasone	2.60	0.5	1.7	2~200	76.4	4.4	83.3	3.9	81.7	4.3
Flumethasone	13.5	0.4	1.2	2~200	86.8	5.3	87.1	6.5	91.8	1.9
Beclomethasone	11.3	0.6	1.9	2~200	97.6	2.6	91.3	5.2	92.5	2.6
Triamcinolone acetonide	7.00	0.6	2.0	5~200	96.5	3.8	92.5	6.0	92.8	1.7
Fludrocortide	2.70	0.6	2.0	5~200	76.4	7.0	101	1.6	99.8	3.2
Triamcinolone diacetate	17.5	2.3	7.5	10~200	80.3	5.4	93.2	5.5	96.1	2.0
Prednisolone 21-acetate	0.56	0.7	2.2	5~200	90.0	5.4	88.9	5.7	79.2	2.2
Fluoromethalone	-4.10	0.2	0.4	2~200	88.5	2.3	87.8	5.1	77.8	2.2
Hydrocortisone 21-acetate	7.10	0.4	1.1	2~200	94.7	3.2	96.4	2.9	87.1	1.7
Deflazacort	8.00	0.09	0.3	2~200	98.7	3.4	90.6	7.7	91.3	3.7
Fludrocortisone 21-acetate	2.40	1.1	3.7	5~200	94.4	2.7	92.2	5.8	94.4	2.7
Prednisone 21-acetate	1.30	0.8	2.5	5~200	89.2	4.8	85.2	1.7	85.6	3.2
Cortisone 21-acetate	6.10	0.1	0.4	2~200	94.2	4.1	91.2	5.1	80.6	4.2
Methylprednisolone 21-acetate	13.1	0.9	2.8	5~200	86.0	1.8	86.2	2.8	95.5	1.7
Betamethasone 21-acetate	8.60	0.8	2.6	5~200	99.9	2.2	84.9	4.9	78.6	3.0
Budesonide	11.4	0.5	1.6	2~200	91.9	4.1	86.8	4.5	98.8	2.5
Hydrocortisone 17-butyrate	4.40	1.0	3.4	5~200	88.4	7.2	86.0	3.1	84.8	3.5

(续表 2)

Compound	Matrix effect (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linear range ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Added 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Added 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Added 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
					Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Dexamethasone 21-acetate	5.20	0.4	1.3	2~200	95.6	2.0	78.4	4.1	80.3	1.6
Fluormetholone 17-acetate	4.70	0.06	0.2	1~200	102	1.1	84.8	3.5	86.4	2.0
Hydrocortisone 17-valerare	8.90	0.6	2.0	5~200	96.8	2.9	89.1	1.9	95.3	1.3
Triamcinolone acetonide acetate	5.90	0.3	1.1	2~200	96.9	2.7	85.6	2.7	93.9	1.5
Fluocinonide	7.10	0.6	2.0	5~200	99.0	3.2	85.7	2.8	78.2	1.3
Diflorasone diacetate	27.6	0.9	2.9	5~200	86.8	2.1	94.2	5.0	98.7	3.2
Betamethasone 17-valerate	15.2	0.8	2.7	5~200	94.1	4.8	96.9	3.0	96.8	2.0
Prednicarbate	7.60	0.2	0.4	2~200	98.1	3.3	86.5	2.0	79.7	2.5
Halcinonide	-4.40	0.6	1.8	5~200	86.6	11	102	2.0	94.4	2.0
Alclomethasone dipropionate	20.9	0.5	1.6	5~200	102	1.5	93.5	4.4	94.1	2.1
Amcinonide	5.90	0.2	0.6	2~200	85.2	4.2	95.0	2.2	84.7	3.4
Clobetasol 17-propionate	21.0	0.2	0.6	5~200	89.9	8.8	101	2.7	99.0	2.6
Fluticasone propionate	9.80	0.2	0.6	2~200	81.9	3.2	85.4	2.5	86.0	4.1
Mometasone furoate	22.4	0.3	1.1	5~200	88.6	9.0	84.8	3.7	85.1	2.8
Betamethasone dipropionate	18.4	0.2	0.4	2~200	92.2	6.9	92.1	3.4	101	2.3
Beclomtasone dipropionate	8.60	0.4	1.1	5~200	98.3	3.0	98.1	1.9	86.5	3.3
Clobetasone 17-butyrate	7.80	0.5	1.7	10~200	89.9	9.8	78.2	2.8	88.2	3.1
Fluocinolone acetonide	7.70	0.9	3.0	5~200	88.7	5.0	102	2.9	99.9	3.9

2.6 回收率与相对标准偏差

向空白基质样品中添加 3 个浓度水平(10、50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的 61 种目标化合物混合标准溶液,按“1.6”方法进行前处理后上机测定,每个浓度水平做 6 个平行实验。计算得到 61 种待测物的平均回收率为 62.6%~102%,相对标准偏差(RSD)为 1.0%~11%(见表 2)。

2.7 实际样品的测定

利用本方法对沈阳地区不同地点采集的土壤样品进行检测,在 1 份样品中检出雌三醇,含量为 5.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结 论

本文建立了测定土壤中 61 种激素类药物的 QuEChERS/HPLC-MS/MS 方法,包括 4 种雌激素、6 种孕激素、5 种雄激素、42 种糖皮质激素和 4 种非甾体类激素。在最佳实验条件下,61 种激素的检出限为 0.01~2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量下限为 0.03~7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率为 62.6%~102%,RSD 为 1.0%~11%。该方法样品前处理成本低、简便快速、灵敏可靠,适合于土壤中激素类药物残留的定性、定量分析。

参考文献:

- [1] Wang X Q, Wu Y N. *Applications of Chromatography in Food Safety Analysis*. Beijing: Chemical Industry Press(王绪卿, 吴永宁. 色谱在食品安全分析中的应用. 北京: 化学工业出版社), 2005: 108-111.
- [2] Qu S, Kolodziej E P, Cwiertny D M. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46(24): 13202-13211.
- [3] Bartelt-Hunt S L, Snow D D, Kranz W L, Mader T L, Shapiro C A, Donk S J, Shelton D P, Tarkalson D D, Zhang T C. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46(3): 1352-1360.
- [4] GB/T 24800.2-2009. Determination of 41 Glucocorticoids in Cosmetics by LC-MS-MS and TLC Method. National Standards of the People's Republic of China(化妆品中四十一一种糖皮质激素的测定 液相色谱/串联质谱法和薄层层析法. 中华人民共和国国家标准).
- [5] Zhao X, Zhang Z E, Zhang L, Peng S X, Cheng H. *J. Instrum. Anal.* (赵昕, 张占恩, 张磊, 彭淑香, 成昊. 分析测试学报), 2015, 34(1): 56-61.
- [6] Tan L C, Ge F, Shan Z J, Wang Y. *Chin. J. Anal. Chem.* (谭丽超, 葛峰, 单正军, 王懿. 分析化学), 2012, 40(4): 545-550.
- [7] Zhu W X, Liu Y F, Yuan P, Yang J Z. *Chin. J. Chromatogr.* (祝伟霞, 刘亚凤, 袁萍, 杨冀州. 色谱), 2010, 28(11): 1031-1037.

- [8] Zhang X L, Luo Y J, Lu Y, Jiang J, Feng N. *J. Instrum. Anal.* (张学亮, 罗云敬, 路勇, 姜洁, 冯楠. 分析测试学报), **2015**, 34(4): 388-394.
- [9] Zhang H W, Cai X, Lin L M, Chen L Z, Liang C Z, Bao L, Tang Z X, Niu Z Y, Wang F M. *Chin. J. Chromatogr.* (张鸿伟, 蔡雪, 林黎明, 陈亮珍, 梁成珠, 鲍蕾, 汤志旭, 牛增元, 王凤美. 色谱), **2012**, 30(10): 991-1001.
- [10] Qin Y, Chen J, Zhang M J. *Chin. J. Anal. Chem.* (秦燕, 陈捷, 张美金. 分析化学), **2006**, 34(3): 298-302.
- [11] Xu J Z, Zhang X Y, Ding T, Wu B, Shen C Y, Jiang Y, Liu F. *Chin. J. Anal. Chem.* (徐锦忠, 张晓燕, 丁涛, 吴斌, 沈崇钰, 蒋原, 刘飞. 分析化学), **2009**, 37(3): 341-346.
- [12] Xu H, Lin A Q, Gu L, Tang D Z, He J. *J. Instrum. Anal.* (许泓, 林安清, 古珑, 唐丹舟, 何佳. 分析测试学报), **2007**, 26(1): 20-23.
- [13] Fang Q H, Huang X H, Guo C N, Yang G, Kong X K. *J. Instrum. Anal.* (方秋华, 黄显会, 郭春娜, 杨刚, 孔祥凯. 分析测试学报), **2012**, 31(10): 1314-1318.
- [14] Luo H T, Huang X L, Wu H L, Zhu Z X, Huang F, Lin X S, Ma Y F, Deng X, Zhou P C. *J. Instrum. Anal.* (罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 朱志鑫, 黄芳, 林晓珊, 马叶芬, 邓欣, 周培才. 分析测试学报), **2016**, 35(2): 119-126.
- [15] Li J R, Ma Q, Meng X S, Chen Y X, Ma H J, Zhang Q, Bai H. *J. Instrum. Anal.* (李晶瑞, 马强, 孟宪双, 陈云霞, 马会娟, 张庆, 白桦. 分析测试学报), **2015**, 34(1): 43-49.
- [16] Li Q, Zhang X G, Ma J M, Li R Y, Fan S F, Zhang Y. *J. Instrum. Anal.* (李强, 张晓光, 马俊美, 李润岩, 范素芳, 张岩. 分析测试学报), **2016**, 35(2): 179-184.
- [17] Li Z Y, Wang F M, Niu Z Y, Luo X, Zhang G, Chen J H. *Chin. J. Chromatogr.* (李兆永, 王凤美, 牛增元, 罗忻, 张罡, 陈军辉. 色谱), **2014**, 32(5): 477-484.
- [18] Niu Z Y, Luo X, Wang F M, Zhang L, Li Z Y, Chen J. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (牛增元, 罗忻, 王凤美, 张丽, 李兆永, 陈静. 质谱学报), **2016**, 37(3): 201-212.
- [19] Wang M L, Yan H F, Fu S L, Zhang F, Yao J T, Dai H, Li Y J. *Chin. J. Chromatogr.* (王美玲, 颜鸿飞, 傅善良, 张帆, 姚劲挺, 戴华, 李拥军. 色谱), **2012**, 30(10): 980-985.
- [20] Ma S, Feng X Y, Han P, Dai Y, Ping H, Li Y, Wang J H. *J. Food Saf. Qual.* (马帅, 冯晓元, 韩平, 戴莹, 平华, 李杨, 王纪华. 食品安全质量检测学报), **2016**, 7(2): 505-510.
- [21] Chen X H, Wang Q J. *Solid-phase Extraction: Technology and Application*. Beijing: Science Press(陈小华, 汪群杰. 固相萃取技术与应用. 北京: 科学出版社), **2010**: 162-169.
- [22] Ren X D, Liu C Y, Lin X Z, Zhao H B, You H D, Xiong S. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (任雪冬, 刘成雁, 林雪征, 赵海波, 尤海丹, 熊爽. 理化检验-化学分册), **2011**, 47(7): 872-876.
- [23] Shao B, Zhao R, Meng J, Xue Y, Wu G H, Hu J Y, Tu X M. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 548(1): 41-50.
- [24] Yang Y, Shao B, Zhang J, Wu Y N, Duan H J. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877(5): 489-496.
- [25] Lehotay S J. *Pesticide Protocols*. Totowa: Humana Press, **2006**: 239-261.
- [26] Pascoe R, Foley J P, Gusev A I. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(24): 6014-6016.
- [27] Tso J, Aga D S. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217: 4784-4795.

(责任编辑: 丁 岩)