

# 高效液相色谱荧光检测牛奶中的雌激素

## LC-056

**摘要：**建立了高效液相色谱荧光检测牛奶中雌激素的方法。样品经高氯酸去蛋白后，以纳米 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 和碳纳米管为萃取介质进行磁性分散萃取。三种雌激素在0.02~2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系良好，相关系数 $R$ 大于0.999，加标浓度为0.08  $\mu\text{g}/\text{g}$ 时，回收率在83.7~95.1%之间。

**关键词：**牛奶 雌激素 磁性分散萃取

近年来，自然界动物雌性化问题已成为全球关注的热点。目前已发现鱼类、鸟类、爬行动物类以及哺乳动物类出现了生殖器官变异，内分泌系统失常，种群退化等现象，导致上述现象的罪魁祸首便是内分泌干扰素。这类有害化学物质在动物和人体内发挥着类似雌性激素的作用，能干扰体内荷尔蒙，使生物的生殖机能失常。其中，关注的重点集中在几个雌激素活性尤其高的化合物上，如雌二醇、炔雌醇和己烷雌酚等。

考虑到牛奶的主要消费对象为胎儿、新生儿和青春期前儿童，他们处于生长发育的关键时期且对雌激素高度敏感。因此牛奶中各种类固醇类雌激素的分析和检测意义十分重大。本实验采用纳米 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 和碳纳米管为萃取介质进行磁性分散萃取，磁性萃取材料吸附目标物后，受外加磁场吸引，可直接、快速地从液体样品中分离出来，分析时间短。结合液相色谱荧光检测器测定，具有灵敏度高、选择性好、操作简便的优点，可满足牛奶中雌激素分析的要求。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津Prominence LC-20A高效液相色谱仪系统。具体配置为LC-20AT输液泵(2台)，DGU-20A3在线脱气机，SIL-20A自动进样器，CTO-10A<sub>sp</sub>柱温箱，RF-10AXL荧光检测器，CBM-20A<sub>lite</sub>系统控制器和LCsolution色谱工作站。

### 1.2 分析条件

流动相：乙腈/水 = 45/55(v/v)

流速：1.0 mL/min

色谱柱：Shimadzu VP-ODS(4.6 mm I.D.×250mm L., 5  $\mu\text{m}$ )

进样体积：20  $\mu\text{L}$

柱温箱：40 $^{\circ}\text{C}$

激发波长：280 nm

发射波长：310 nm

洗脱方式：等度洗脱

### 1.3 标准品溶液的配制及样品前处理

#### 1.3.1 储备液配制

精密称取10 mg的雌二醇、炔雌醇和己烷雌酚于10 mL的棕色容量瓶，以甲醇稀释至刻度，配成浓度为1 mg/mL混标储备液，于冰箱4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.3.2 前处理步骤

取1 mL的牛奶样品，加入100  $\mu\text{L}$  10%高氯酸溶液，再用pH4.0磷酸缓冲溶液稀释至10 mL。涡旋1 min，1000 rpm离心5 min。取上清液，加入2 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 和碳纳米管，萃取涡旋30 s。靠磁铁倾出上清液，残留材料加入1 mL丙酮，解析涡旋30 s。靠磁铁分离上清液，氮吹至近干，100  $\mu\text{L}$ 流动相定容，过滤后注入LC分析。

## 结果与讨论

### 2.1 雌激素色谱图

雌激素标准溶液得到的色谱图如图 1 所示。

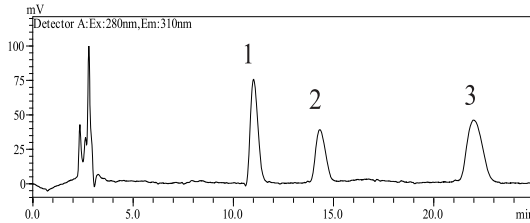


图1 (1=雌二醇,2=炔雌醇,3=己烷雌酚)

雌激素标准品的色谱图(0.4 μg/mL)

### 2.2 线性范围

将雌激素储备液用流动相稀释，配成浓度为0.02, 0.04, 0.08, 0.20, 0.40, 0.80, 2.00 μg/mL的标准溶液。以上标准溶液分别进样，得到的标准曲线如下图2所示。

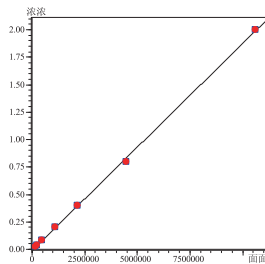


图2-1 雌二醇标准曲线

$$Y = aX + b$$

$$a = 1.887e-007$$

$$b = -1.205e-002$$

$$R = 0.9998$$

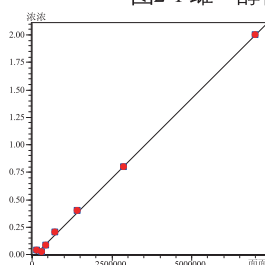


图2-2 炔雌醇标准曲线

$$Y = aX + b$$

$$a = 2.909e-007$$

$$b = -3.163e-002$$

$$R = 0.9995$$

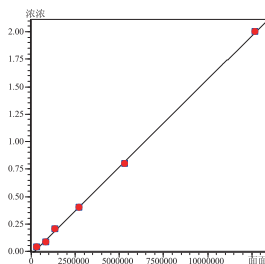


图2-3 己烷雌酚标准曲线

$$Y = aX + b$$

$$a = 1.596e-007$$

$$b = -3.142e-002$$

$$R = 0.9998$$

### 2.3 灵敏度实验

取牛奶空白样品，分别加入不同浓度的三种雌激素标准工作液，使最终含量分别为5.0 ng/g, 20 ng/g和50 ng/g,

以三倍噪声和十倍噪声计算得出三种雌激素的检测限(LOD)及定量限(LOQ)，结果见表1。

表 1 雌激素的检测限及定量限

化合物	LOD(ng/g)	LOQ(μg/g)
雌二醇	4.6	15.1
炔雌醇	9.5	31.4
己烷雌酚	8.5	28.0

### 2.4 方法的准确度及精密度

测定牛奶样品中雌激素的含量，并计算牛奶样品中雌激素的加标浓度为80 ng/g的精密度和回收率。结果表明，方法的相对标准偏差小于10%，回收率在83.7~95.1%之间(见表2)。图3为牛奶样品色谱图，图4为牛奶样品加标80 ng/g连续三次进样色谱图。

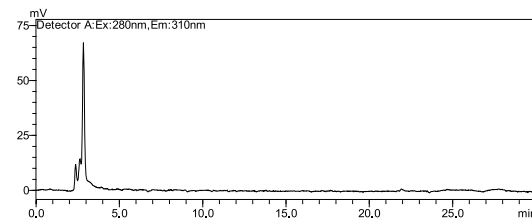


图3 牛奶样品色谱图

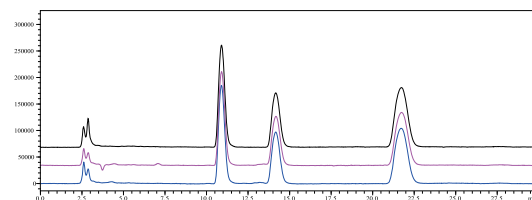


图4 牛奶样品加标0.08 μg/g连续三次进样色谱图

表2 牛奶样品中雌激素的加标浓度为80 ng/g的回收率

名称	回收率			平均值	RSD
	1	2	3		
雌二醇	103.9 %	106.5 %	98.3 %	102.9 %	4.1 %
炔雌醇	104.2 %	106.9 %	95.4 %	102.2 %	5.9 %
己烷雌酚	94.0 %	98.6 %	90.8 %	94.5 %	4.2 %

## ■ 结论

本文建立了磁性分散固相萃取液相色谱荧光检测牛奶中雌激素的方法。三种目标组分在0.02~2.00  $\mu\text{g/mL}$ 的范围内，线性关系良好，相关系数R大于0.999，最低检测限在4.6~9.5 ng/g之间。加标浓度为80 ng/g时，回收率在83.7~95.1%之间(RSD < 6%)。本法灵敏度高，选择性好，操作简便，可满足牛奶中雌激素残留分析的要求。