

三重四极杆质谱测定奶粉中的雌激素

LCMSMS-029

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定奶粉中 8 种雌激素的方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 内标法进行定量分析。雌三醇、17 β -雌二醇、炔雌醇和雌酮在 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，17 β -雌二醇在 2 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚在 0.5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.864%~4.843% 和 0.034%~0.638% 之间，仪器精密度良好；同时考察了奶粉空白基质加标结果，结果显示 8 种样品在定量限上均有很好的响应，方法定量限满足《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱 - 质谱质谱法》中的要求。

关键词：雌激素 奶粉 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

雌激素是一类有广泛生物活性的类固醇化合物，它具有促进和维持女性生殖器官和第二性征的生理作用。作为兽药，雌激素能够使母畜不怀孕产奶或者治疗母畜不孕症。中华人民共和国农业部 2002 年 12 月 24 日农业部发布了第 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》，对有关雌激素类的药物作出了明确的规定，规定苯甲酸雌二醇仅做治疗药物使用，禁止使用乙烯雌酚及其盐、脂，以及醋酸甲孕酮等物质，并且规定上述物质在动物性食品中不得检出。

同时欧盟第 96/22/EC 指令、美国食品药品监督管理局 (FDA)、日本肯定列表也禁止在动物源性食品中使用激素类药物。本文根据《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱 - 质谱质谱法》，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用，建立了快速准确测定奶粉中糖皮质激素的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0mmL

D. \times 75 mmL., 1.6 μm

流动相：，A - 水；B - 甲醇 / 乙腈 = 1:1(v/v)

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 45%，时间程序见表 1。

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 20 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：50 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	55
4.00	Pumps	Pump B Conc.	60
4.50	Pumps	Pump B Conc.	100
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
5.10	Pumps	Pump B Conc.	45
7.00	Controller	Stop	

表2MRM参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	雌三醇	287.30	171.20 [*]	22.0	40.0	16.0
			145.10	22.0	40.0	27.0
2	17- α -雌二醇	271.30	145.20 [*]	21.0	50.0	13.0
			183.05	21.0	45.0	18.0
3	17- β -雌二醇	271.30	145.10 [*]	20.0	45.0	24.0
			183.00	20.0	45.0	19.0
4	炔雌醇	295.30	145.20 [*]	11.0	50.0	26.0
			227.50	11.0	25.0	23.0
5	雌酮	269.30	145.15 [*]	20.0	40.0	28.0
			183.05	20.0	40.0	20.0
6	己烯雌酚	267.25	251.15 [*]	20.0	25.0	28.0
			237.10	20.0	30.0	25.0
7	己烷雌酚	269.25	134.20 [*]	10.0	15.0	26.0
			119.05	10.0	40.0	21.0
8	己二烯雌酚	265.25	93.10 [*]	20.0	25.0	17.0
			249.15	20.0	25.0	28.0
9	雌二醇- ¹³ C ₂	273.30	147.15	20.0	45.0	28.0
10	己烯雌酚-d ₈	275.30	245.15	21.0	30.0	27.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准溶液, 用水逐级稀释成浓度为 100, 40, 20, 10, 5, 2, 1 和 0.5 g/L 的标准工作液, 含有 10 g/L 的内标物质。

样品前处理方法:

同 GBT 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

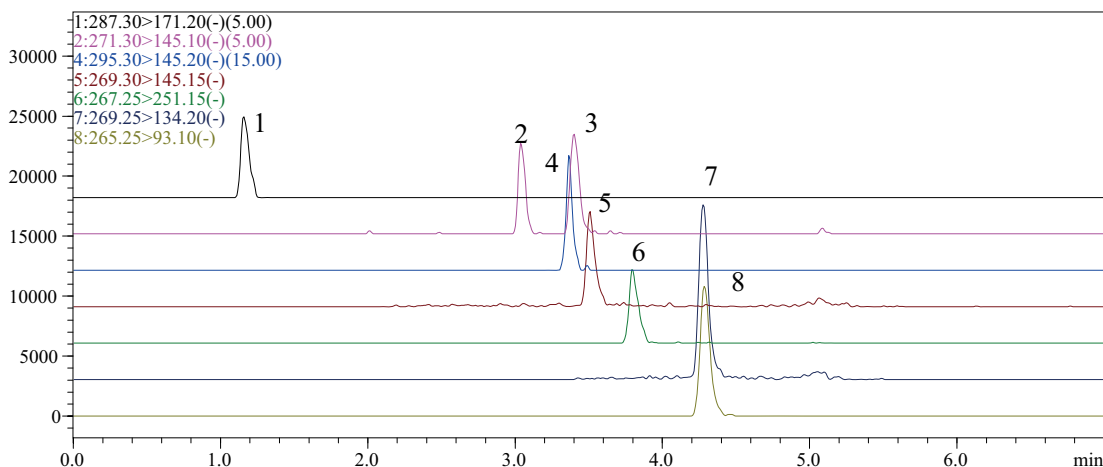


图 1 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱图

(1 雌三醇; 217- β -雌二醇; 317- α -雌二醇; 4 炔雌醇; 5 雌酮; 6 己烯雌酚; 7 己烷雌酚; 8 己二烯雌酚)

2.2 标准样品的扫描及产物离子扫描质谱图

8 种雌激素标准品的扫描 (SCAN, ESI⁻) 及产物离子扫描谱图如下所示。

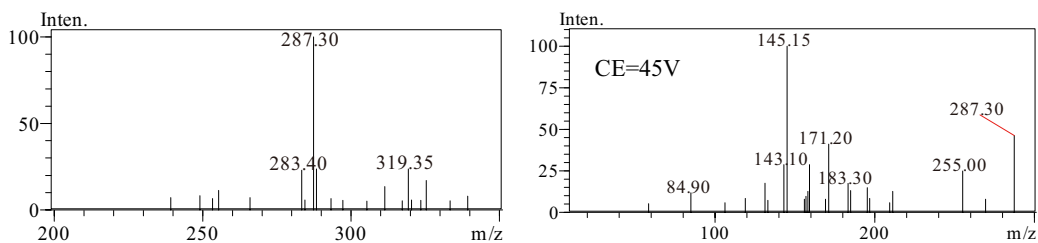


图 2 雌三醇的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

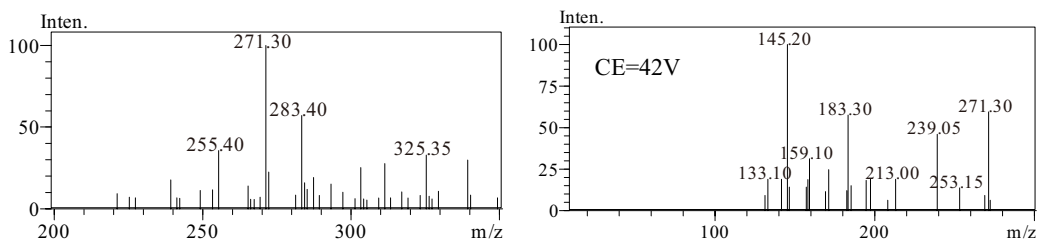


图 3 17- β -雌二醇的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

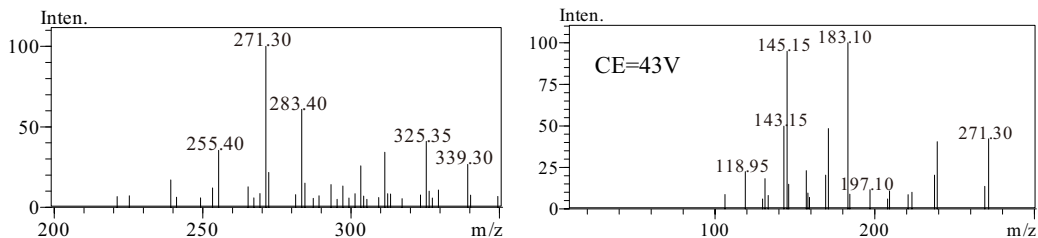


图 4 17- α -雌二醇的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

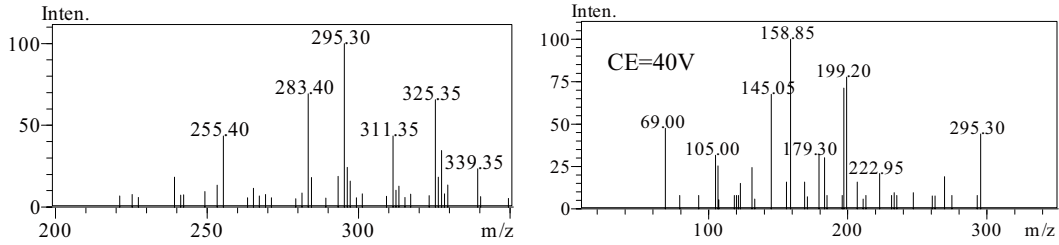


图5 炔雌醇的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

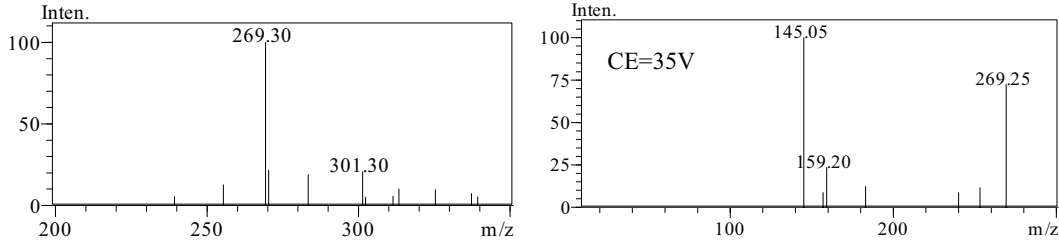


图6 雌酮的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

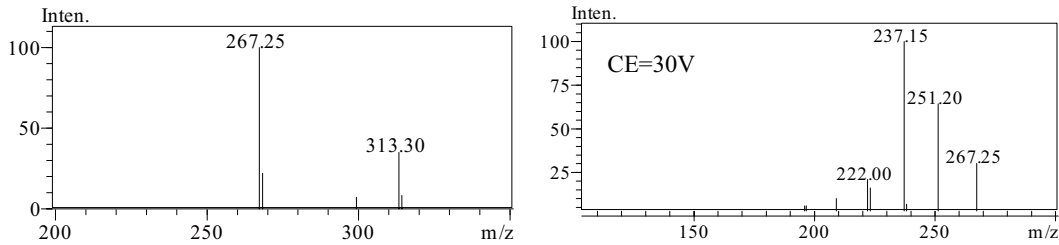


图7 己烯雌酚的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

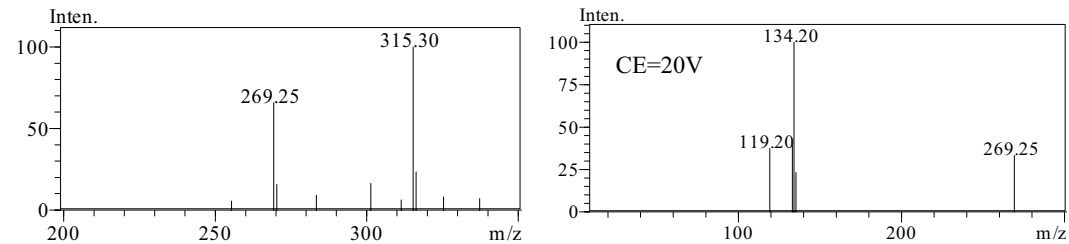


图8 己烷雌酚的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

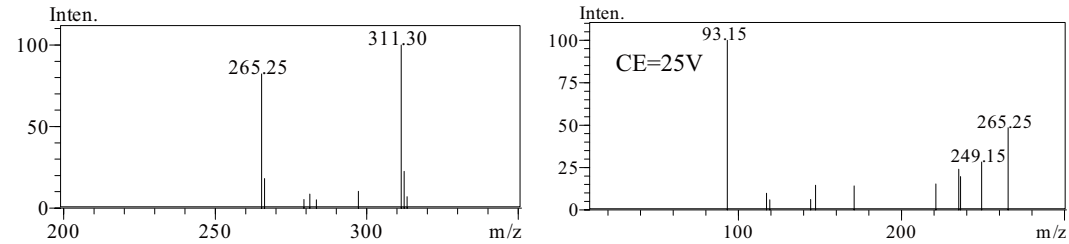


图9 己二烯雌酚的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

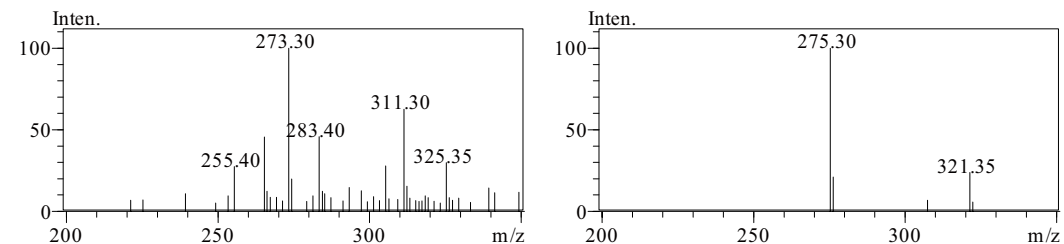


图10 雌二醇-¹³C₂（左图）和己烯雌酚-d₈（右图）的扫描谱图

2.3 线性关系

将浓度为 100, 40, 20, 10, 5, 2, 1 和 0.5 g/L 的混合标准工作液 (10 g/L 的内标物质) 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线, 如图 11~18 所示。8 种激素在一定浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

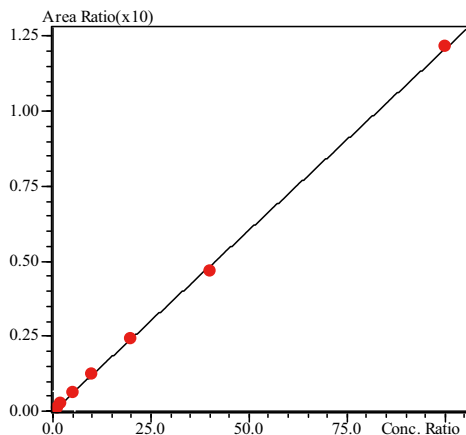


图 11 雌三醇的标准工作曲线

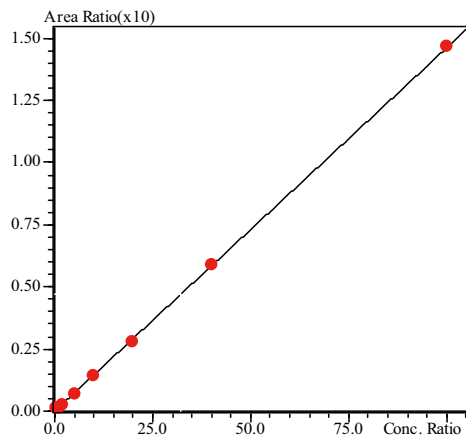


图 12 17-a-雌二醇的标准工作曲线

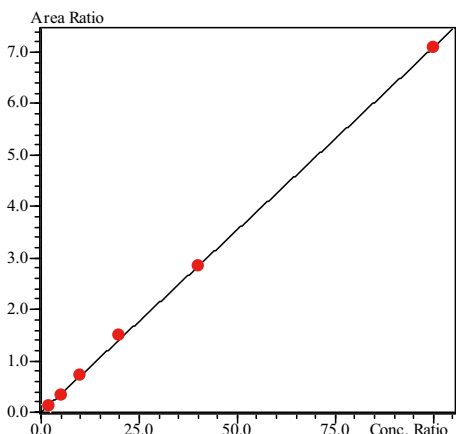


图 13 17-β-雌二醇的标准工作曲线

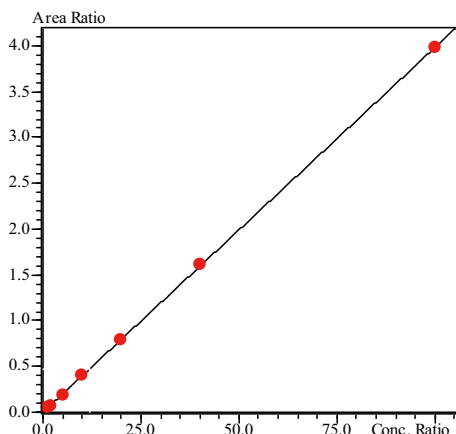


图 14 炔雌醇的标准工作曲线

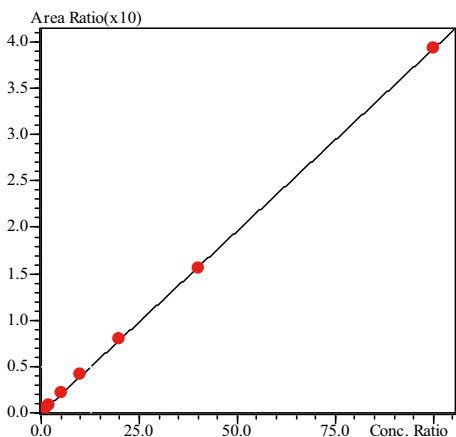


图 15 雌酮的标准工作曲线

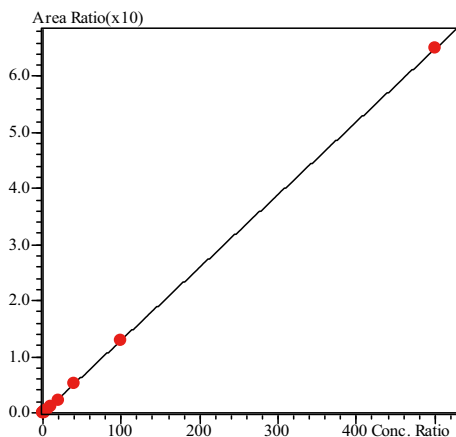


图 16 己烯雌酚的标准工作曲线

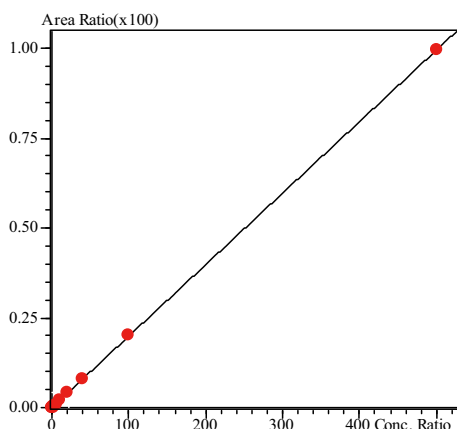


图17己烷雌酚的标准工作曲线

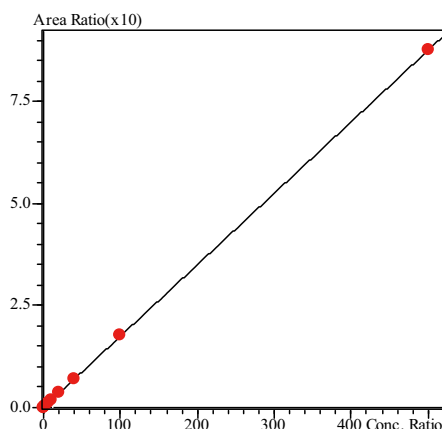


图18己二烯雌酚的标准工作曲线

表3 8种雌激素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	线性范围 (μg/L)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
1	雌三醇	$Y = (0.120659)X + (0)$	0.9998	1-100	0.01	0.03
2	17-α-雌二醇	$Y = (0.146104)X + (0)$	0.9999	1-100	0.05	0.15
3	17-β-雌二醇	$Y = (0.0709176)X + (0)$	0.9998	2-100	0.13	0.39
4	炔雌醇	$Y = (0.039812)X + (0)$	0.9999	1-100	0.12	0.36
5	雌酮	$Y = (0.392514)X + (0)$	0.9999	1-100	0.06	0.18
6	己烯雌酚	$Y = (0.129798)X + (0)$	0.9999	0.5-500	0.03	0.09
7	己烷雌酚	$Y = (0.199119)X + (0)$	0.9999	0.5-500	0.04	0.12
8	己二烯雌酚	$Y = (0.175211)X + (0)$	0.9998	0.5-500	0.03	0.09

2.4 精密度实验

对 5 μg/L、10 μg/L 和 100 μg/L 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.864 ~ 4.843% 和 0.034 ~ 0.638% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (5 μg/L)		RSD% (20 μg/L)		RSD% (100 μg/L)	
	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T
雌三醇	3.160	0.638	2.448	0.135	1.801	0.122
17-α-雌二醇	4.236	0.323	1.318	0.084	1.852	0.053
17-β-雌二醇	4.843	0.240	4.354	0.080	1.816	0.057
炔雌醇	4.401	0.454	4.675	0.084	2.846	0.097
雌酮	4.007	0.241	1.818	0.051	1.146	0.051
己烯雌酚	4.753	0.271	0.929	0.079	0.864	0.059
己烷雌酚	2.372	0.034	0.868	0.080	1.463	0.057
己二烯雌酚	1.159	0.194	1.079	0.058	0.981	0.095

2.5 仪器灵敏度考察

为了考察方法的灵敏度，在处理后的空白奶粉样品中添加混合标样，其中 17-- 雌二醇和炔雌醇加标浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；其他样品加标浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，得到色谱图如图 19 所示。从图中可以看到，基质加标样品在定量限上均有很好的响应，满足《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》中的要求。

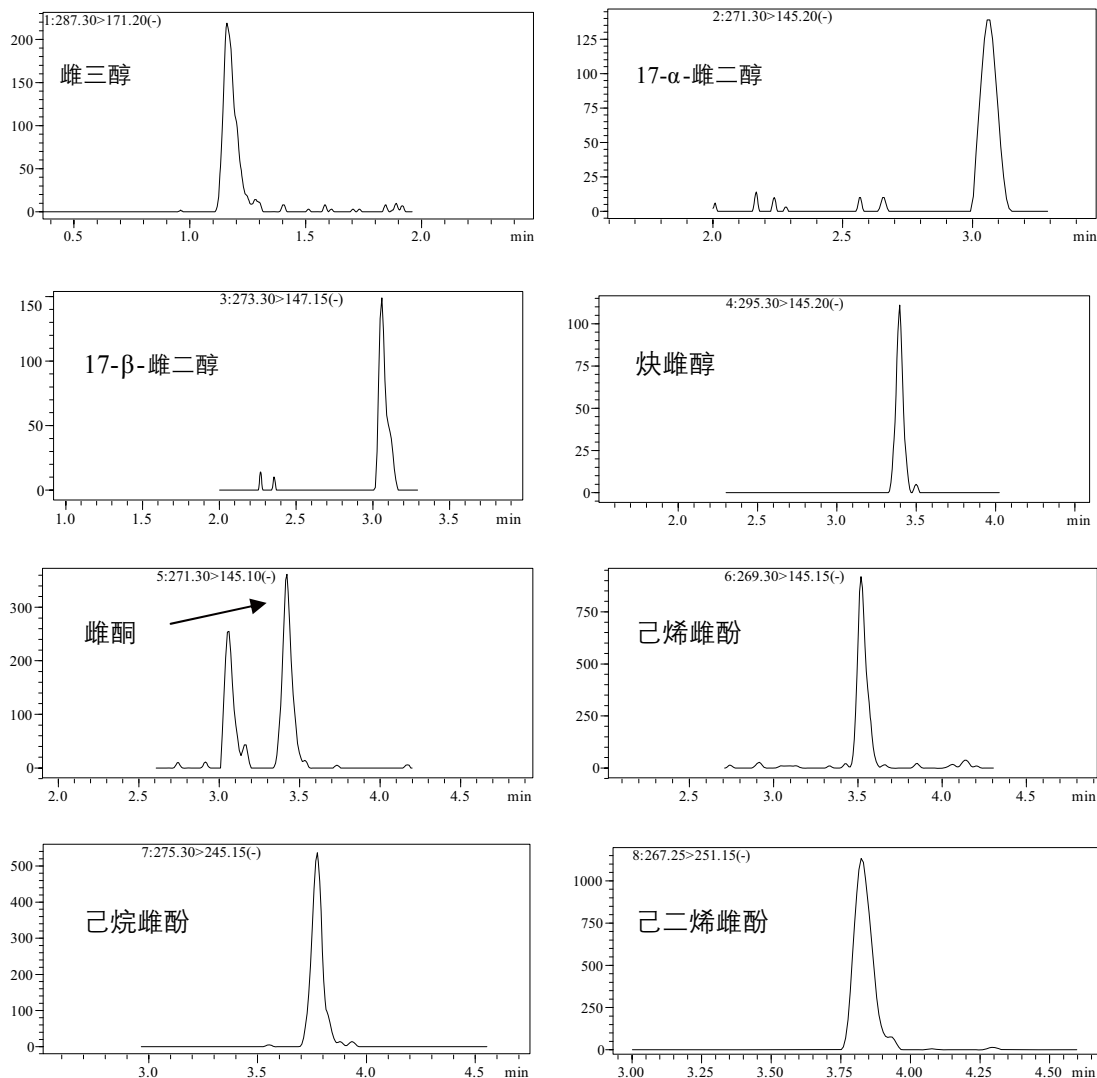


图 19 奶粉空白基质加标样品的色谱图

结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定奶粉中 8 种雌激素的方法。该方法分析速度快，重复性和精密度良好；雌三醇、17-- 雌二醇、炔雌醇和雌酮在 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，17-- 雌二醇在 2 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚在 0.5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.999 以上；方法定量限满足《GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱-质谱质谱法》中的要求。