

LC-MS/MS 测定牛奶中的雌激素残留

LCMSMS-628

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定牛奶中雌激素残留量的方法，8种雌激素在 1 µg/L~200.0 µg/L 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上。在高、中、低三个浓度下，标样保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.04%~0.16% 和 1.13%~7.40% 之间，仪器精密度良好。加标浓度为 1、5 和 20 µg/kg 的样品，回收率在 81.9~122.6% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于牛奶中雌激素的准确检测。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 牛奶 雌激素

雌激素是一类化学结构相似、具有生物活性的类固醇激素，具有影响动物性别分化、缩短动物生长周期的效应。雌激素在奶牛养殖业被广泛使用，以提高奶牛的产奶量，使得雌激素在牛奶中残留。近年来，已经有大量研究证明：雌激素通过食物链进入人体可能会诱发乳腺、子宫、睾丸、骨、肾和其他一些组织的癌症。中华人民共和国农业农村部公告第 250 号已明确将己二烯雌酚、己烯雌酚、己烷雌酚及其盐、酯列入食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单中。考虑到牛奶的主要消费对象为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。

为了保障人们的食品安全，农业农村部首次发布了《GB 31658.9-2021 动物性食品及尿液中雌激素类药物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法》，本文参考该标准，建立了牛奶中雌激素残留的检测方法，试样中残留的药物经酶解后用乙腈提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40DX3×2

质谱仪：LCMS-8050

柱温箱：CTO-40C

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

在线脱气机：DGU-405

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 µm)

岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03

流动相：A 相 - 水, B 相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 µL

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 20%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Pumps	Pump B Conc.	55
8.00	Pumps	Pump B Conc.	55
8.10	Pumps	Pump B Conc.	20
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 负离子模式

接口电压: -3.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

加热气: 空气 10 L/min

碰撞气: 氩气 (230kPa)

DL 管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

编号	化合物名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	雌三醇	Estriol	50-27-1	287.2	145.1*	19.0	37.0	30.0
					171.2	14.0	37.0	11.0
2	17 β -雌二醇	17 β -estradiol	50-28-2	271.2	145.1*	19.0	42.0	27.0
					183.1	13.0	40.0	17.0
3	17 α -雌二醇	17 α -estradiol	57-91-0	271.2	145.1*	10.0	40.0	14.0
					183.1	19.0	37.0	18.0
4	炔雌醇	Ethinylestradiol	57-63-6	295.2	145.1*	19.0	41.0	14.0
					159.1	13.0	43.0	12.0
5	雌酮	Estrone	53-16-7	269.2	145.1*	10.0	38.0	16.0
					159.2	10.0	34.0	18.0
6	己烯雌酚	Diethylstilbestrol	6898-97-1	267.2	237.1*	10.0	28.0	16.0
					251.2	12.0	24.0	17.0
7	己二烯雌酚	Dienestrol	84-17-3	265.2	93.1*	13.0	27.0	13.0
					249.2	13.0	26.0	17.0
8	己烷雌酚	Hexestrol	84-16-2	269.2	134.1*	10.0	15.0	13.0
					119.1	10.0	40.0	23.0
9	雌三醇-D3	Estriol-D3	/	290.2	173.2	20.0	38.0	11.0
10	17 β -雌二醇-D2	17 β -estradiol-D2	/	273.2	147.1	19.0	41.0	16.0
11	雌酮-D2	Estrone-D2	/	271.2	145.1	13.0	38.0	14.0
12	己烯雌酚-D8	Diethylstilbestrol-D8	/	275.2	259.1	10.0	27.0	12.0
13	己烷雌酚-D4	Hexestrol-D4	/	273.2	136.1	13.0	16.0	26.0

* 表示定量离子

■ 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制：

参考《GB 31658.9-2021 动物性食品及尿液中雌激素类药物多残留的测定 液相色谱—串联质谱法》中标准溶液的制备方法配制标准储备液及工作液。

校准曲线溶液的制备：

使用 40% 乙腈溶液将混合标准中间液逐级稀释成浓度为 1.0、2.0、5.0、20、50 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作曲线溶液，每一标准工作溶液含各内标浓度均为 5.0 $\mu\text{g/L}$ 。

样品前处理：

参考《GB 31658.9-2021 动物性食品及尿液中雌激素类药物多残留的测定 液相色谱—串联质谱法》样品前处理方法。

■ 结果与讨论

3.1 雌激素标准溶液谱图

配制的 1 ng/mL 混合标准溶液，上机分析，得到 8 种雌激素药物的 MRM 色谱图，详见图 1，色谱峰形良好，通道无干扰。

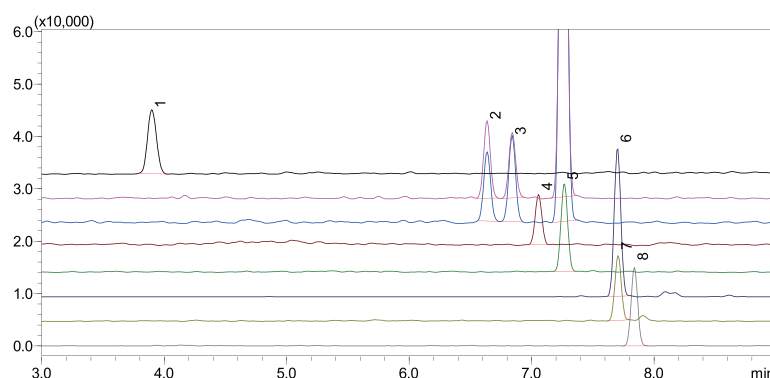
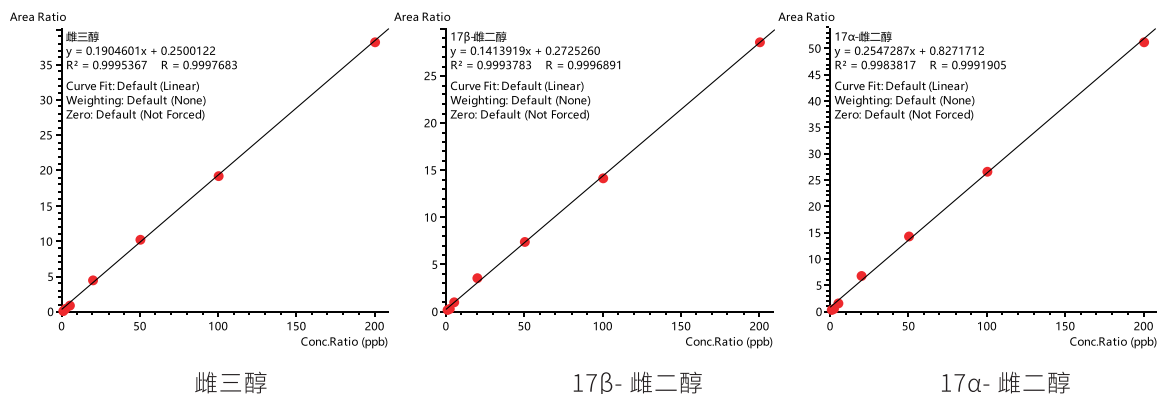


图 1 1 ng/mL 8 种雌激素标准品溶液 MRM 色谱图

(1、雌三醇；2、17 β -雌二醇；3、17 α -雌二醇；4、炔雌醇；5、雌酮；6、己烯雌酚；7、己二烯雌酚；8、己烷雌酚)

3.2 线性关系

将 1.0、2.0、5.0、20、50、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准工作液（内标 5 $\mu\text{g/L}$ ）按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。雌激素校准曲线及检测限、定量限的结果见表 3。



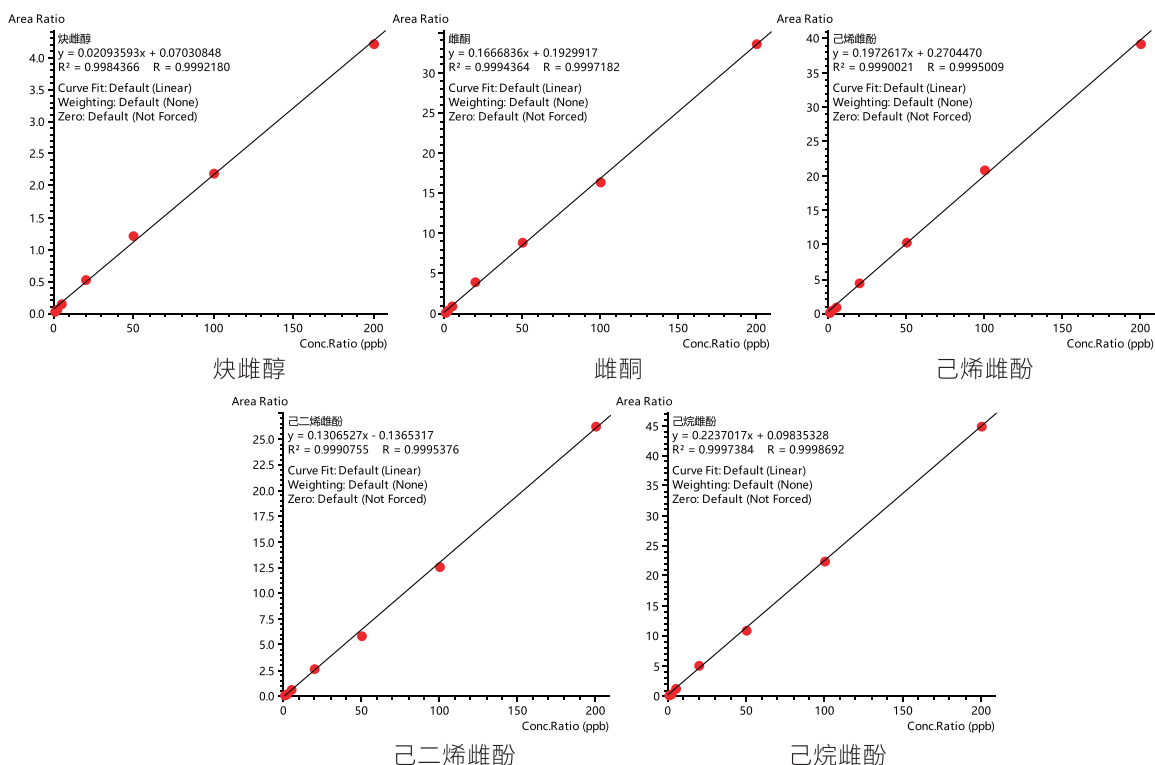


图 2 雌激素校准曲线

表 3 8 种雌激素校准曲线及检测限、定量限

编号	化合物	校准曲线	相关性系数 R	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	雌三醇	$Y = (0.190460)X + (0.250012)$	0.9998	0.10	0.33
2	17β- 雌二醇	$Y = (0.141392)X + (0.272526)$	0.9997	0.07	0.25
3	17α- 雌二醇	$Y = (0.254729)X + (0.827171)$	0.9992	0.05	0.17
4	炔雌醇	$Y = (0.0209359)X + (0.0703085)$	0.9992	0.09	0.31
5	雌酮	$Y = (0.166684)X + (0.192992)$	0.9997	0.02	0.07
6	己烯雌酚	$Y = (0.197262)X + (0.270447)$	0.9995	0.02	0.05
7	己二烯雌酚	$Y = (0.130653)X + (-0.136532)$	0.9995	0.05	0.18
8	己烷雌酚	$Y = (0.223702)X + (0.0983533)$	0.9999	0.01	0.02

3.3 精密度

对 1 μg/L、20 μg/L 和 200 μg/L 三个浓度标准工作液连续测定 6 次，考察仪器精密度。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04%~0.16% 和 1.13%~7.40% 之间，仪器精密度良好。

表 4 雌激素保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物	RSD% (1 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (200 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	雌三醇	0.08	4.58	0.16	2.70	0.04	1.78
2	17β-雌二醇	0.04	7.40	0.09	3.70	0.04	3.76
3	17α-雌二醇	0.05	5.30	0.09	1.13	0.04	2.58
4	炔雌醇	0.04	5.90	0.09	2.12	0.04	1.89
5	雌酮	0.05	5.32	0.08	2.99	0.04	2.86
6	己烯雌酚	0.05	3.75	0.08	2.63	0.04	1.41
7	己二烯雌酚	0.05	5.49	0.08	1.50	0.04	1.78
8	己烷雌酚	0.04	6.88	0.08	2.17	0.04	2.42

3.4 回收率

取空白牛奶 5 g, 加入少量雌激素标准工作液, 使加标浓度为 1、5 和 20 µg/kg, 样品经提取与净化后, 按照 1.2 中的分析条件测定雌激素的加标回收率, 平行测定 3 次。8 种雌激素的回收率在 81.9~122.6% 之间, 具体结果见表 5。

表 5 雌激素回收率结果 (n=3)

编号	化合物	加标浓度 1 µg/kg		加标浓度 5 µg/kg		加标浓度 20 µg/kg	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	雌三醇	88.6	4.30	91.9	0.90	98.7	2.42
2	17β-雌二醇	99.0	7.21	110.8	1.72	103.8	1.69
3	17α-雌二醇	102.5	6.81	97.3	5.31	98.9	2.41
4	炔雌醇	98.2	7.01	103.7	7.31	96.2	3.31
5	雌酮	97.4	3.63	100.9	1.86	91.5	1.05
6	己烯雌酚	81.9	5.59	87.7	6.97	93.3	2.85
7	己二烯雌酚	122.6	2.77	110.6	8.50	104.6	3.25
8	己烷雌酚	93.4	2.28	92.7	4.52	89.9	1.71

■ 结论

依据国家标准《GB 31658.9-2021 动物性食品及尿液中雌激素类药物多残留的测定 液相色谱 - 串联质谱法》, 建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定牛奶中雌激素残留的方法。样品经酶解后用乙腈提取, 固相萃取柱净化, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 进行检测, 内标法定量。8 种雌激素在 1 µg/L~200.0 µg/L 浓度范围内线性良好, 相关系数 r 均在 0.999 以上。加标浓度为 1、5 和 20 µg/kg 的样品, 回收率在 81.9~122.6% 之间。该方法灵敏度高, 分析时间短, 结果准确, 可用于牛奶中雌激素的准确检测。

岛津应用云

