

气相色谱质谱联用法检测奶粉中四种雌激素

GCMS-054

摘要：本实验建立了对复杂基质本底的奶粉中四种雌激素雌酮、雌二醇、雌三醇和炔雌醇的气相色谱质谱联用检测方法。实验以乙腈为提取溶剂，经正己烷去除油脂，通过C₁₈固相萃取柱净化后，使用体积比为99:1的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)和甲基氯硅烷(TMCS)为衍生试剂在吡啶存在下进行衍生。结果显示该方法各组分分离良好，在低浓度下加标回收率为61.2~85.4%，线性范围为2~500 ng/g，在低浓度下RSD均低于15.0%，检测限为0.13~0.3 ng/g。该方法可实现对奶粉中四种雌激素准确、灵敏的定性定量检测。

关键词：气相色谱质谱联用 雌激素 奶粉

类固醇类雌激素是一大类亲脂、低分子量、具有雌激素活性的一类化合物，被广泛用于奶牛养殖业，其在促进提高牛奶产量同时也带来了牛奶和奶粉中残留雌激素的风险。激素通过食物链进入人体会产生一系列与内分泌相关的诸如生长发育障碍、出生缺陷和生育缺陷等疾病，且多数激素具有潜在的致癌性。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，如天然雌激素17β-雌二醇(17β-estradiol,E2)，雌酮(estrone,E1)，雌三醇(estriol,E3)和炔雌醇(17α-ethinylestradiol,EE2)。考虑到奶粉的主要消费对象为婴幼儿和青春期前儿童，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。

本文采用气质联用法测定奶粉中四种雌激素雌酮、17β-雌二醇、雌三醇和炔雌醇的含量，此方法重现性好，灵敏度高。

实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津GCMS-QP2010Plus气质联用仪、旋转蒸发器、氮吹仪、固相萃取装置、固相萃取柱C₁₈(2g, 6 mL)。

乙腈、正己烷、吡啶为HPLC级

衍生试剂：BSTFA-TMCS(体积比99:1)

1.2 分析条件

色谱柱：Rtx-5SilMS, 30m×0.25mm i.d.×0.25 μm

进样口温度：280℃

柱温：100℃(1 min) 25℃/min 250℃(0 min) 5℃/min
300℃(5 min)

柱流量：1.02 mL/min

进样模式：不分流，1 min

高压进样：250 kPa, 1 min

离子源温度：230℃

接口温度：280℃

采集方式：SIM(各组分的定量离子和参考离子见表

1)

表1 各组分定量离子和参考离子

雌激素	定量离子	参考离子
雌酮 (E1)	342	257,244
雌二醇 (E2)	416	285,326
炔雌醇 (EE2)	425	285,440,300
雌三醇 (E3)	504	311,345

1.3 样品处理

样品处理步骤见图1。

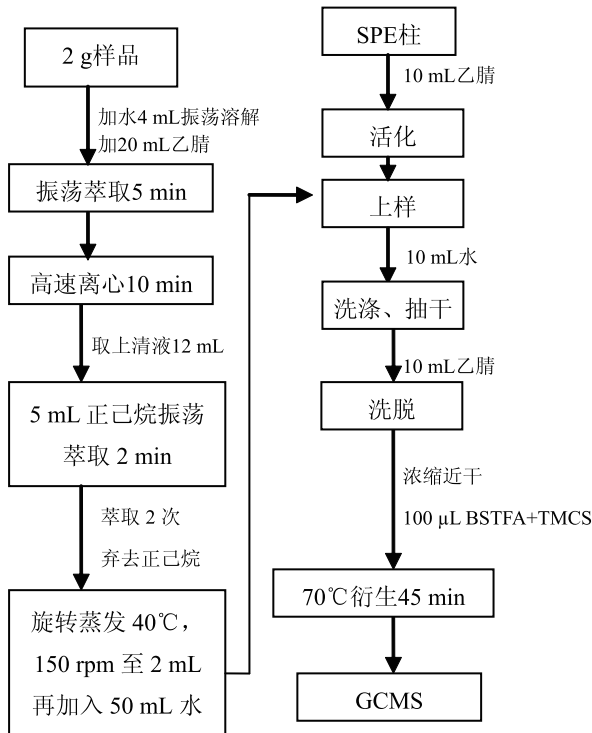


图1 样品前处理步骤

结果与讨论

2.1 雌激素组分出峰谱图

图2为本方法检测四种雌激素标样的总离子流图(浓度为10 ng/mL)

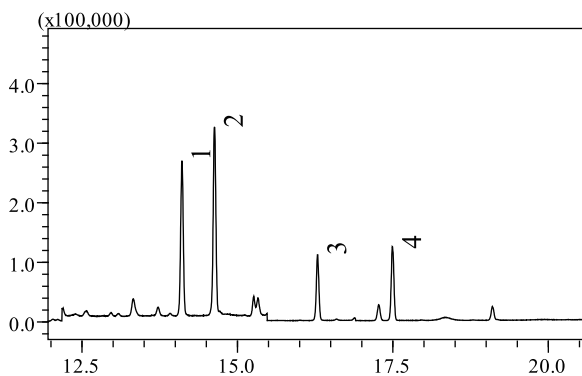


图2 四种雌激素标样总离子流图
1.雌酮 2.雌二醇 3.炔雌醇 4.雌三醇

2.2 标准曲线

取甲醇浓度为100 ng/mL的工作液储备液，使用按照样品处理步骤制备的基质溶液将其稀释为2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/mL的标准工作液，氮气吹干后衍生，分别进样，得到校准曲线。

结果表明，该方法线性良好，线性方程及相关系数见表2。

表2 线性方程及相关系数

雌激素	线性方程	相关系数
E1	$Y=21721X-28474$	0.9991
E2	$Y=19227X-26088$	0.9993
EE2	$Y=11202X-21841$	0.9981
E3	$Y=5662X-9451$	0.9989

2.3 方法重现性

平行处理加标浓度为20 ng/g的样品3份，重现性结果如表3所示。

表3 保留时间与峰面积的重现性

编号	保留时间(min)			
	E1	E2	EE2	E3
1	14.151	14.665	16.328	17.520
2	14.163	14.674	16.344	17.531
3	14.148	14.663	16.327	17.521
平均值	14.154	14.667	16.333	17.524
RSD%	0.06	0.04	0.06	0.03

编号	峰面积			
	E1	E2	EE2	E3
1	1098890	882117	498600	223924
2	1050633	844935	515861	245422
3	879692	666549	430615	184217
平均值	1009828	797867	481692	217845
RSD%	11.39	14.44	9.36	14.25

结果表明样品在低浓度加标，经过前处理后检测结果具有良好的重现性

2.4 加标回收率

取奶粉空白样品，分别加入不同浓度的四种雌激素标准工作液，使最终含量分别为5 ng/g、20 ng/g。其加标回收率结果如表4所示。

表4 不同浓度加标回收率

加标量 (ng/g)	化合物	平均结果 (ng/g)	平均回收率 (%)
5	E1	3.28	65.6
	E2	3.06	61.2
	EE2	3.47	69.7
	E3	4.04	80.8
20	E1	16.08	80.4
	E2	16.65	83.3
	EE2	16.63	83.2
	E3	17.07	85.4

2.5 检测限

以三倍噪声计算得出四种雌激素E1、E2、EE2和E3的检测限分别为0.16 ng/g、0.13 ng/g、0.24 ng/g、0.30 ng/g。

2.6 实际样品分析结果

按本方法测定某品牌的奶粉，得到的图谱如图3所示。两份重复样品中均未检出四种雌激素。

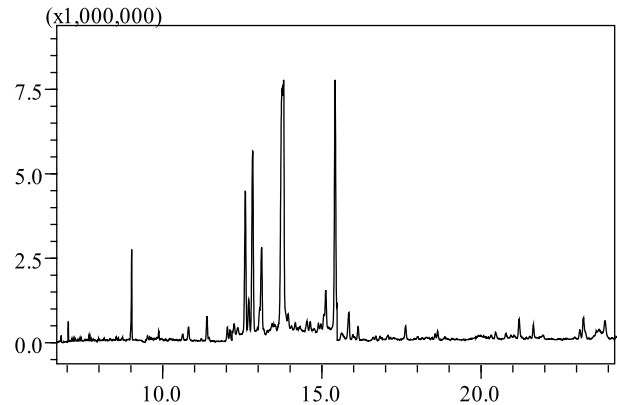


图3 某品牌样品总离子流图

结论

本方法具有灵敏度高、重现性好、线性范围宽等优点，适用于奶粉中四种雌激素含量的准确测定，特别是低含量样品的检测。