

液相色谱质谱联用法分析奶粉中四种雌激素

LCMS-013

摘要：本实验采用液质联用法测定奶粉中四种雌激素E1、E2、E3和EE2的含量。在最佳的实验条件下，结果显示该方法具有较高的回收率(60.7-88.4%)，良好的线性关系(10-500 ng/mL)，高的精密度(在较低的加标浓度下RSD均低于5.0%)以及低的检测限(1-2.5 ng/mL)。对于奶粉而言，四种雌激素的E1、E2、E3和EE2的方法检测限分别为0.4 μg/kg、1.0 μg/kg、1.0 μg/kg和1.0 μg/kg。通过实际奶粉分析，对该方法的有效性进行了评价，结果令人满意，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。

关键词：液相色谱质谱联用 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。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17α-乙炔雌二醇(17 α-ethinylestradiol, EE2)。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。最近，有媒体报道国内武汉地区出现几起婴儿体内雌激素达到成人水平事件，怀疑是因为食用同一个厂家的奶粉所致。

本文参考国标GB/T21981-2008动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法中的样品提取纯化过程，并进行适当修改，采用液质联用法测定奶粉中四种雌激素E1、E2、E3和EE2的含量，此方法重现性好，灵敏度高。

■ 实验部分

1.1 仪器概况

本实验使用岛津UFLCXR/LCMS-2020快速液相色谱质谱联用系统。LCMS-2020是岛津制作所投入整体力量开发的新一代质谱仪，具有以下特点：超高灵敏度，10 pg利血平信噪比大于1500；超高离子扫描速率，最快15000 amu/s；超快速正负极性转换，转换时间只需15 ms；全自动化操作，实现了分析的高效率；高度对应网络要求的综合管理系统，改善分析工作环境。

本次实验所用仪器的具体配置为LCMS-2020质谱仪，LC-20ADXR×2输液泵，DGU-20A5在线脱气机，SIL-20ACXR自动进样器，CTO-20AC柱温箱，CBM-20A控制器，和LCMSsolution 5.1色谱工作站。

1.2 分析方法

1.2.1 液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II 2.0×75 mm, 2.2 μm

流动相：A – 水；B – 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40℃

进样量：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱

梯度条件：初始40%B，梯度如下

时间 (min)	A(%)	B(%)
2.5	60	40
8	40	60
10	40	60
10.01	60	40
15	60	40

1.2.2 质谱条件

离子源: ESI, 正离子扫描
 DL温度: 250°C
 加热模块温度: 300°C
 雾化气流速: 1.5 mL/min
 干燥气流速: 10 L/min
 离子源电压: +4.5 kV
 检测器电压: 1.3 kV

1.3 样品前处理方法

参考国标GB/T21981-2008动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱质谱法中的样品提取纯化过程, 并进行适当修改, 具体步骤如图1所示。

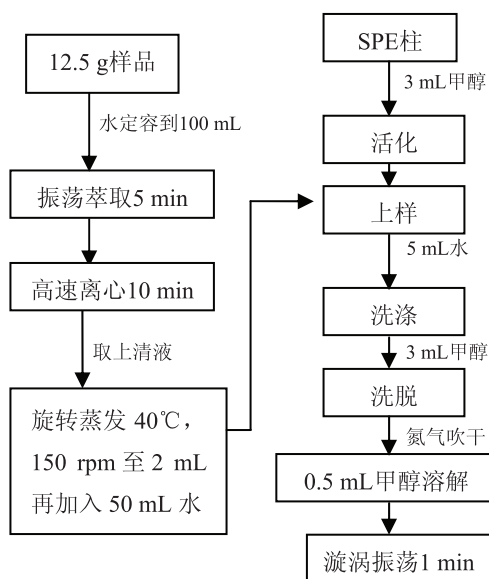


图1 样品前处理步骤

分析结果

2.1 保留时间与峰形

图2为本方法检测四种雌激素E1、E2、E3和EE2标样的典型色谱图(浓度为10 ng/mL)

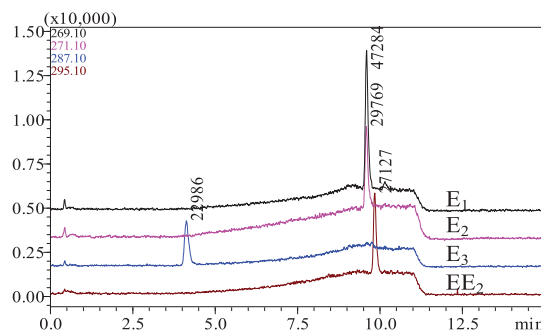


图2 四种雌激素标样图谱

2.2 精密度

取浓度为10 ng/mL五种雌激素标样, 连续进样5次, 结果如表1所示。

表1 保留时间与峰面积的重现性

编号	保留时间(min)			
	E ₁	E ₂	E ₃	EE ₂
1	9.587	9.579	4.072	9.833
2	9.594	9.585	4.145	9.838
3	9.596	9.585	4.14	9.837
4	9.577	9.567	4.103	9.818
5	9.594	9.585	4.127	9.843
Average	9.5896	9.58	4.1174	9.8338
RSD%	0.082	0.082	0.732	0.097
编号	峰面积(μV.S)			
	E ₁	E ₂	E ₃	EE ₂
1	47649	30809	22679	28746
2	45437	32592	22405	27578
3	48647	32103	22568	27747
4	45781	31679	21681	28960
5	47284	29769	22986	27127
Average	46960	31390	22464	28032
RSD%	2.844	3.562	2.165	2.807

由表1结果可见，本方法测定四种雌激素具有很好的精密度和重现性。

2.3 标准曲线

取标准品，用甲醇稀释成浓度为10 ng/mL、50 ng/mL，100 ng/mL，200 ng/mL，500 ng/mL的标准工作液，分别进样，得到校准曲线(见图3-图6)。

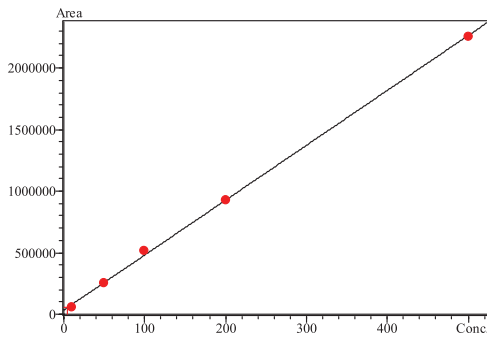


图3 E₁ 校准曲线

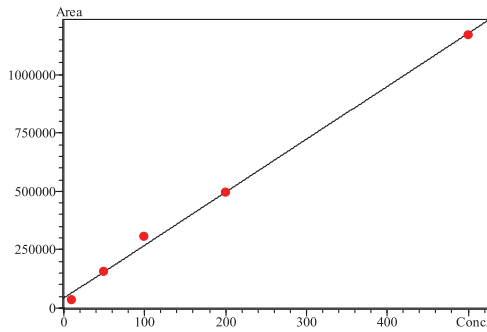


图4 E₂ 校准曲线

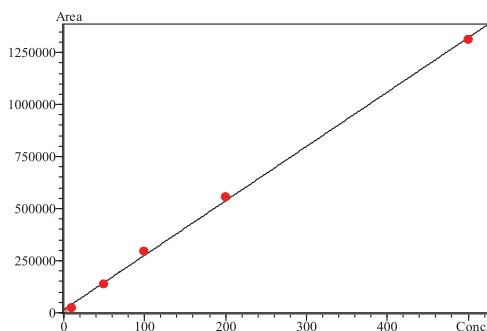


图5 E₃ 校准曲线

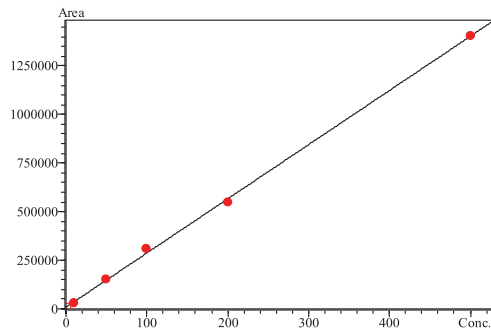


图6 EE₂ 校准曲线

结果表明，该方法线性良好，E1的线性方程为 $Y=4456.65X+35074.2$ ，线性相关系数为0.9998；E2的线性方程为 $Y=2267.39X+42947.3$ ，线性相关系数为0.9985；E3的线性方程为 $Y=2611.05X+15214.1$ ，线性相关系数为0.9995；EE2的线性方程为 $Y=2786.25X+9016.94$ ，线性相关系数为0.9995。

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1 ng/mL，5 ng/mL，20 ng/mL结果如下：

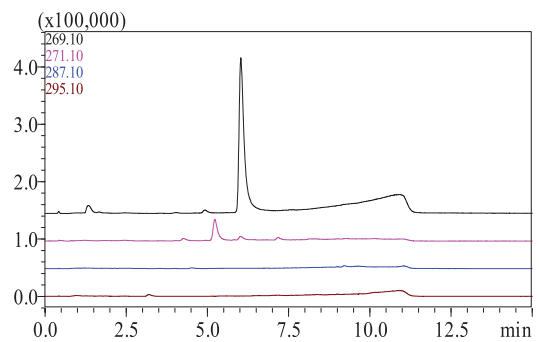


图7 空白奶粉

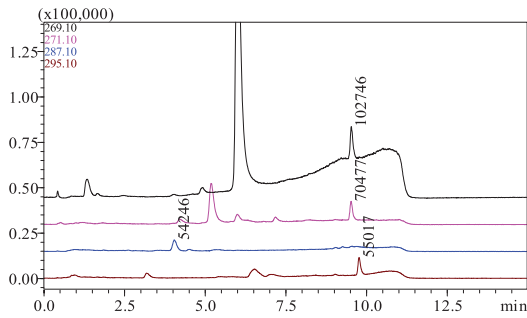


图 8 空白奶粉添加 1 ng/mL 雌激素

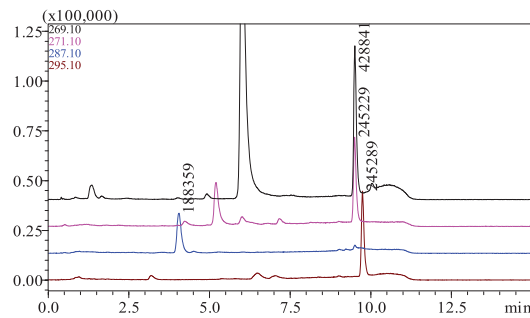


图 9 空白奶粉添加 5 ng/mL 雌激素

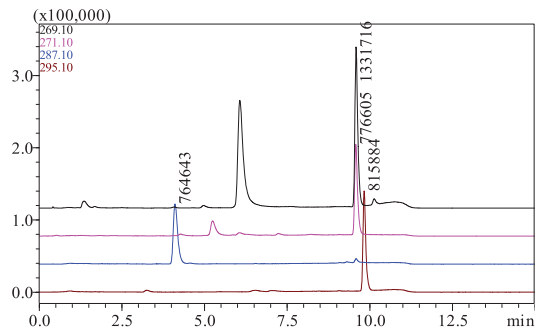


图 10 空白奶粉添加 20 ng/mL 雌激素

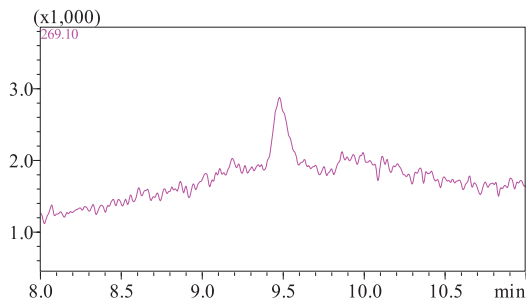
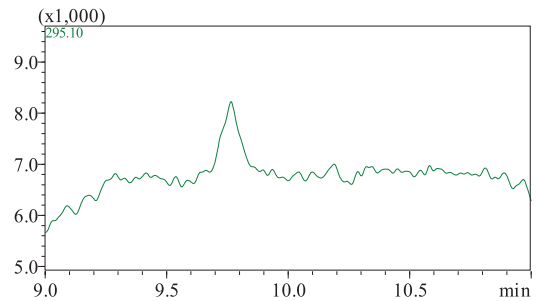
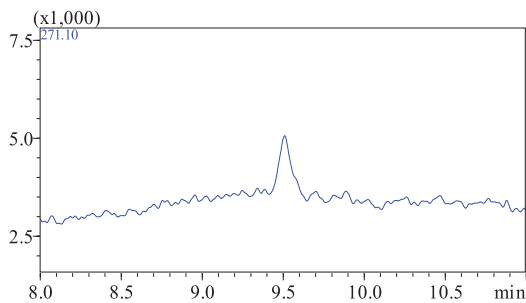
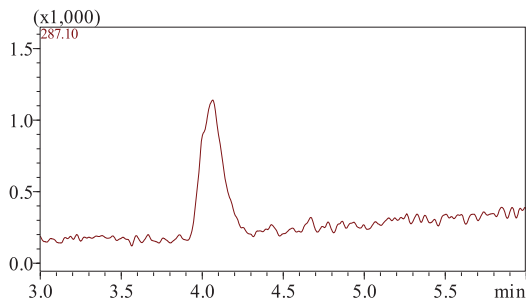
空白奶粉中未检出四种雌激素，其加标回收率结果如表2所示。

表 2 3 个不同浓度样品回收率

加样量 (ng/mL)	化合物	计算结果 (ng/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	E1	0.76	76.0	74.6
		0.73	73.1	
	E2	0.61	60.7	62.0
		0.63	63.3	
	E3	0.75	74.7	72.6
		0.72	70.5	
EE2	0.83	82.5	83.8	
	0.85	85.0		
5	E1	4.42	88.4	87.2
		4.29	85.9	
	E2	4.46	89.2	88.2
		4.36	87.3	
	E3	3.32	66.3	65.2
		3.21	64.1	
EE2	4.24	84.8	83.9	
	4.15	83.0		
20	E1	14.55	72.7	72.0
		14.28	71.4	
	E2	16.18	80.9	79.8
		15.77	78.8	
	E3	14.35	71.8	72.8
		14.77	73.9	
EE2	14.48	72.4	73.0	
	14.71	73.5		

2.5 检测限

通过稀释四种雌激素标准溶液得出四种雌激素E1、E2、E3和EE2的检测限分别为1 ng/mL、2.5 ng/mL、2.5 ng/mL、2.5 ng/mL，如图9-12所示。


 图 11 E₁ 检测限图谱

 图 14 EE₂ 检测限图谱

 图 12 E₂ 检测限图谱

 图 13 E₃ 检测限图谱

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12所示。两份重复样品中均为检出四种雌激素。

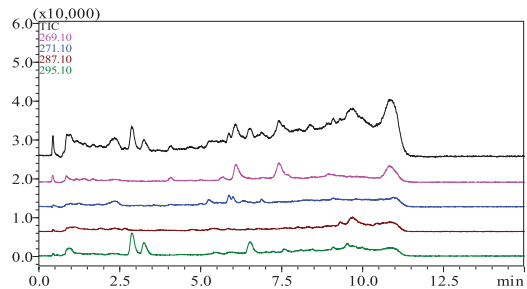


图 15 某品牌样品检测结果

结论

本方法四种雌激素的E₁、E₂、E₃和EE₂检测限分别为1 ng/mL、2.5 ng/mL、2.5 ng/mL和2.5 ng/mL。对于奶粉而言，四种雌激素的E₁、E₂、E₃和EE₂的方法检测限分别为0.4 μg/kg、1.0 μg/kg、1.0 μg/kg和1.0 μg/kg。四种雌激素的线性相关系数均大于0.998。本方法具有灵敏度高和重现性好等优点，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。