

LCMS-8045 测定牛奶中 5 种雌激素含量

LCMSMS-255

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-8045 联用测定牛奶中雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇 3 种天然雌激素和己雌酚、己烯雌酚 2 种合成雌激素含量的方法。牛奶样品以乙腈沉淀蛋白，并超声萃取后，不需要经过衍生，样品在 ESI 源负离子模式下电离，MRM 模式采集数据，外标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9993。对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05~0.12% 和 0.42~8.26% 之间，仪器定量限在 0.006~0.033 ng/mL。该方法前处理简单、灵敏度高、重复性好，可用于牛奶样品中雌激素含量的检测。

关键词: 三重四极杆质谱 LCMS-8045 牛奶 雌激素 负离子模式

雌激素属于类固醇类激素的一种，其在奶牛养殖业被广泛使用，以提高奶牛的产奶量，这种做法在提高经济效益的同时可能会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。因此牛奶中雌激素的分析和检测具有十分重要的现实意义。

本文以雌酮 (Estrone, E1)、17 β -雌二醇 (17

β -Estradiol, E2)、雌三醇 (Estriol, E3)、己雌酚 (Hexestrol, HEX) 和己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES) 为目标物，利用岛津 LCMS-8045 建立了牛奶中雌激素含量的检测方法：牛奶样品以乙腈沉淀蛋白，并超声萃取后，不需要经过衍生，样品在 ESI 源负离子模式下电离，MRM 模式采集数据，外标法定量。该方法前处理简单、灵敏度高、重复性好，可用于牛奶样品中雌激素含量的检测。

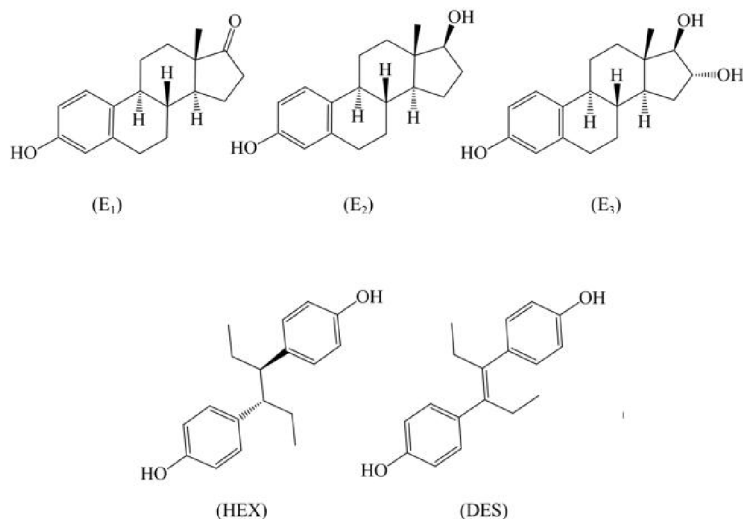


图1 5种雌激素分子结构式

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-8045 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-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS Column(2.1 mm I.D.×
100 mm L., 1.9 μm C18)

流动相: A 相 -0.03% 氨水溶液, B 相 - 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	20
0.50	Pumps	Pump B Conc.	50
3.50	Pumps	Pump B Conc.	50
3.70	Pumps	Pump B Conc.	95
4.50	Pumps	Pump B Conc.	95
4.60	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(-)

加热气: 空气 12.0 L/min

雾化气: 氮气 2.0 L/min

干燥气: 氮气 8.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 350°C

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 350°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
雌三醇	Estriol (E3)	50-27-1	287.20	171.10*	20.0	40.0	27.0
				145.10	20.0	47.0	22.0
17 β-雌二醇	17 β-Estradiol (17 β-E2)	50-28-2	271.20	145.10*	13.0	44.0	21.0
				183.20	28.0	45.0	30.0
雌酮	Estrone (E1)	53-16-7	269.20	145.10*	30.0	41.0	25.0
				143.00	13.0	66.0	12.0
己雌酚	Hexestrol (HEX)	84-16-2	269.20	119.05*	19.0	43.0	18.0
				134.10	19.0	16.0	11.0
己烯雌酚	Diethylstilbestrol (DES)	6898-97-1	267.20	251.10*	18.0	27.0	23.0
				237.10	18.0	31.0	22.0

注: *表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

标准溶液配制: 将 100 mg/L 混合标样储备液以 50% 甲醇水溶液逐级稀释得到浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL 的标准溶液。

1.4 样品前处理方法

取 200 μ L 牛奶样品, 加入 800 μ L 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 超声萃取 20 min, 10000 rpm 离心 3 min, 取上清液上机检测。

■ 结果讨论

2.1 标准样品色谱图

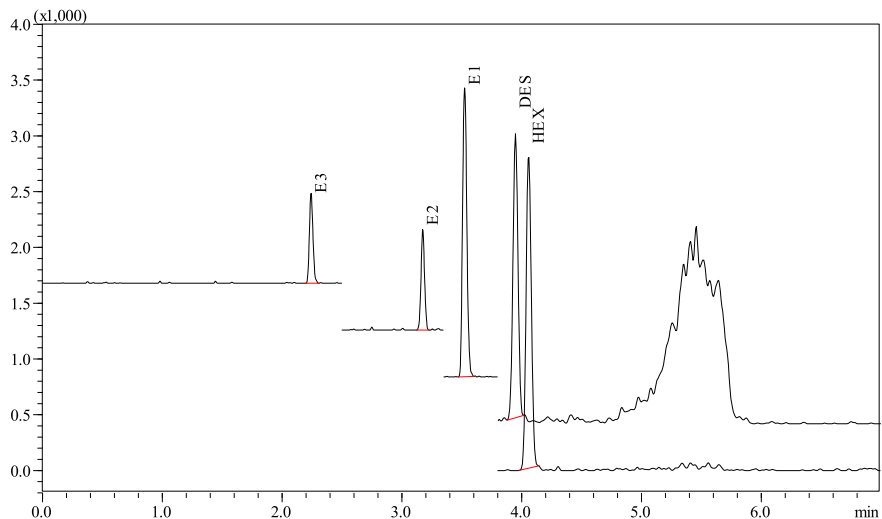
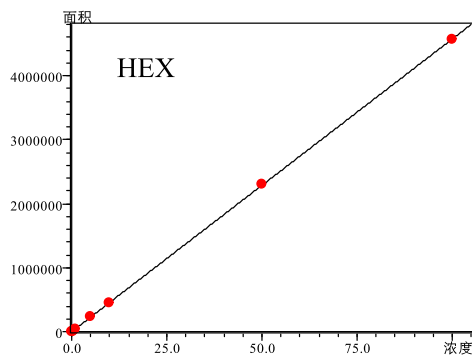
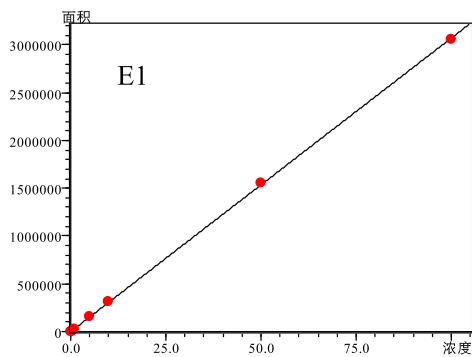
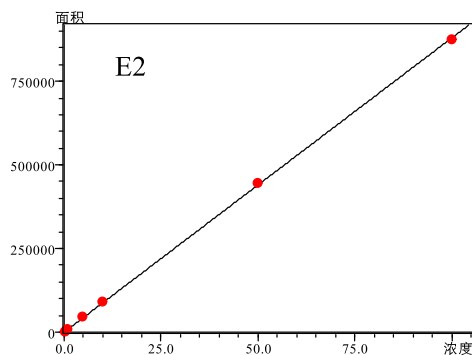
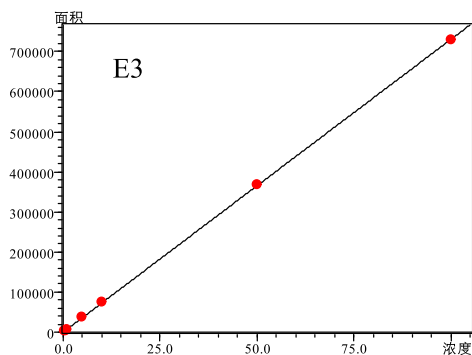


图2 0.2 ng/mL标准样品MRM色谱图



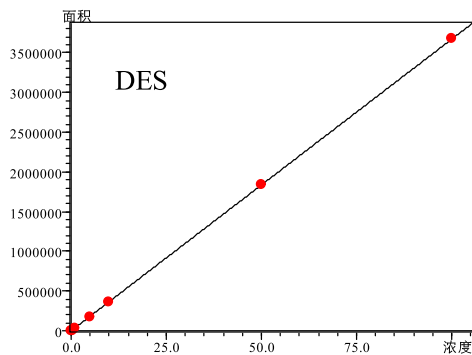


图3 校准曲线

将浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 和 100.0 ng/mL 的 4 种目标物标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 如图 2 所示, 线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

表3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	线性相关系数 R	准确度 (%)
E3	$Y = (7335.5)X + 150.426$	0.2-100	0.9999	96.01-103.4%
E2	$Y = (8932.6)X - 2.7160$	0.2-100	0.9999	95.5-104.7%
E1	$Y = (30778.2)X - 18.0396$	0.1-100	0.9998	94.7-104.9%
HEX	$Y = (45714.2)X - 376.316$	0.1-100	0.9999	96.5-106.1%
DES	$Y = (36057.1)X - 196.210$	0.1-100	0.9997	93.4-105.1%

2.3 精密度实验

配制目标物浓度分别为 0.2、5.0、100 ng/mL 的混合标样, 平行测定各 6 次, 考察仪器的重复性, 保留时间和峰面积重复性结果如表 4 所示, 仪器重复性良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

名称	RSD (% , 0.2 ng/mL)		RSD (% , 5.0 ng/mL)		RSD (% , 100 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
E3	0.12	3.99	0.11	1.33	0.08	0.42
E2	0.12	5.34	0.09	1.48	0.06	0.54
E1	0.10	2.20	0.09	0.62	0.06	0.51
HEX	0.11	3.35	0.09	0.84	0.05	0.49
DES	0.08	8.26	0.09	1.62	0.05	0.39

2.4 灵敏度实验

对目标物浓度为 0.20 ng/mL 标准溶液进样分析, 由信噪比计算各目标组分仪器检出限 (ILOD, S/N=3) 和仪器定量限 (ILOQ, S/N=10), 结果如表 5 所示。

表5 检出限和定量限

名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
E3	0.008	0.025
E2	0.007	0.021
E1	0.002	0.006
HEX	0.007	0.020
DES	0.010	0.033

2.5 回收率实验

将在超市购买的某品牌牛奶按照 1.4 对样品处理后进样分析，结果 5 种目标组分均未检出，如图 4 所示。在牛奶中添加 5 种目标组分，计算加标回收率，结果如表 6 所示。

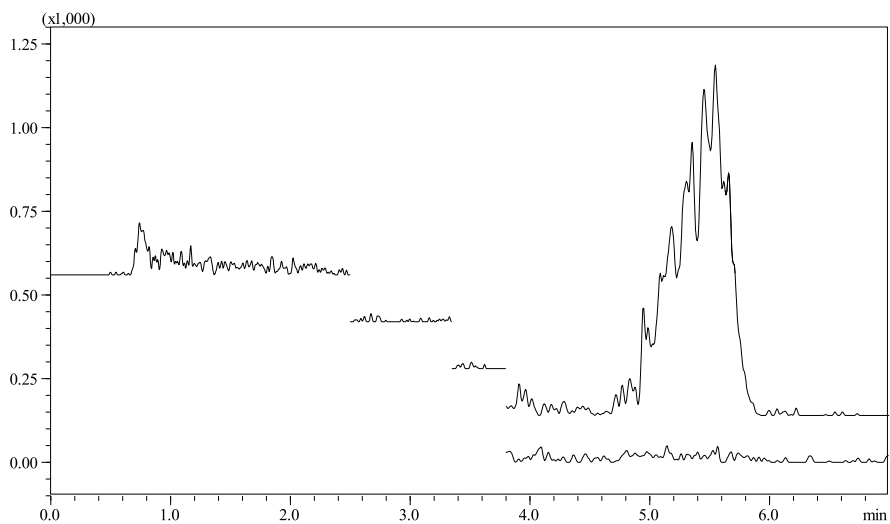


图4 阴性样品色谱图

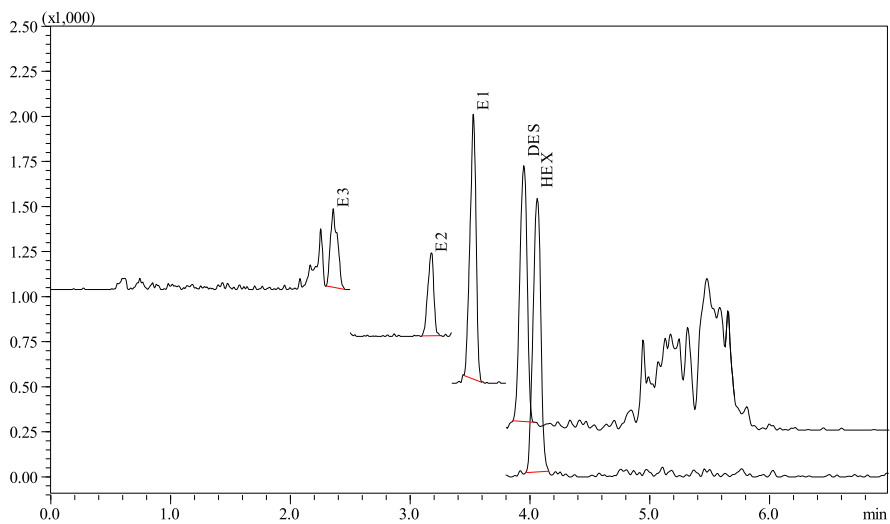


图5 空白基质加标0.2 ng/mL色谱图

表6 加标回收实验

名称	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)
E3	0.2	103.3	4.0	86.5	80	92.0
E2	0.2	87.8	4.0	103.3	80	106.0
E1	0.2	86.8	4.0	102.4	80	106.3
HEX	0.2	81.0	4.0	90.8	80	95.9
DES	0.2	83.3	4.0	102.9	80	109.4

■ 结论

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-8045 联用测定牛奶中雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇 3 种天然雌激素和己雌酚、己烯雌酚 2 种合成雌激素含量的方法。牛奶样品以乙腈沉淀蛋白，并超声萃取后，不需要经过衍生，样品在 ESI 源负离子模式下电离，MRM 模式采集数据，外标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9993。对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05~0.12% 和 0.42~8.26% 之间，仪器定量限在 0.006~0.033 ng/mL。该方法前处理简单、灵敏度高、重复性好，可用于牛奶样品中雌激素含量的检测。