

三重四极杆质谱法测定保健品中的雌激素残留

LCMSMS-112

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定保健品中 3 种雌激素残留的分析方法。保健品基质经超声提取、旋转蒸发等样品前处理后，以乙腈和水作为流动相，超高效液相色谱 LC-30A 进行梯度洗脱分离，用多反应监测串联质谱进行定量分析。采用外标法建立定量方法，3 种雌性激素具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9994-0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验，3 种雌激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.744% 和 5.55% 以下，系统精密度良好。样品基质加标不同浓度所得回收率范围为 92.5%-119.0%，方法检出限在 0.26-0.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间，定量限在 0.87-1.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。实验表明，本方法可以满足保健品中雌激素的检测需求。

关键词：雌激素 保健品 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

市场上有许多保健品，特别是儿童用的一些保健品往往让家长有一种想买却又不敢买的顾虑，产生这种顾虑的最大因素是怕保健食品中含有性激素成分。雌二醇、雌酮、己烯雌酚属于 18-碳雌烃系，雌二醇、雌酮是由卵泡和黄体所分泌的天然激素，生理活性最强的为雌二醇，雌酮是雌二醇的代谢产物，雌二醇、雌酮的活性比是 100:3。己烯雌酚是人工合成激素，其生理活性比天然雌激素强很多，这类雌性激素具有调节机体不同功能的作用，有的具有抗疲劳、延缓衰老、促进生长发育、改善性功能等保健作用，特别是对绝经后的妇女可缓解更年期综合征、预防骨质疏松，但性激素在长期毒性实验过程中也显示了致肿瘤、乳腺癌等作用。目前并没有三重四极杆测定保健品中雌激素的相关检测标准，岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 采用多反应监测模式，能有效的排除基质干扰，具有高的分离效率，能准确实现定量分析。

本文提出超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用法测定保健品中的雌激素，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-8040 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-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53

色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱优化条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0
mm I.D. \times 100 mm L., 2.2 μm

流动相：A - 纯水，B - 乙腈，A/B=60%/40% (V/V)

洗脱方式：梯度洗脱见表 1

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

质谱优化条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

喷雾针位置：1.0 mm

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：450 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：80 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
3.0	Pumps	Pump B Conc.	65%
3.1	Pumps	Pump B Conc.	40%
6	Controller	Stop	

表2 MRM参数

中文名称	英文名称	CAS号	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
雌二醇	Estradiol	50-28-2	271.20	145.15*	10.0	39.0	25.0
			271.20	183.20	10.0	45.0	29.0
雌酮	Estrone	53-16-7	269.20	145.10*	10.0	30.0	25.0
			269.20	143.20	10.0	50.0	24.0
己烯雌酚	Diethylstilbestrol	6898-97-1	267.15	251.20*	10.0	25.0	25.0
			267.15	237.25	10.0	27.0	24.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 基质标准工作曲线配制

用乙腈配制浓度为 1.0 mg/mL 的上述 3 种激素，将浓度为 1.0 mg/mL 的 3 种激素用乙腈和水 (v/v, 4:6) 依次稀释至 10 μg/mL 的混合标样。将 10 μg/mL 的 3 种激素混合标样，加标于保健品中使得最终浓度点分别为 10、20、50、100、200 μg/kg 的标准工作液用于建立基质曲线。

1.3.2 样品前处理方法

准确称取排毒养颜类保健食品胶囊中的粉末 1.0 g 于离心管中，加入 10 mL 甲醇进行溶解，涡旋 5 min，超声提取 30 min，然后置于旋转蒸发仪进行浓缩，最后用 1 mL 乙腈和水 (v/v, 4:6) 进行定容，定容液过 0.22 μm 滤膜后取 10 μL 用于液质联用仪分析。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

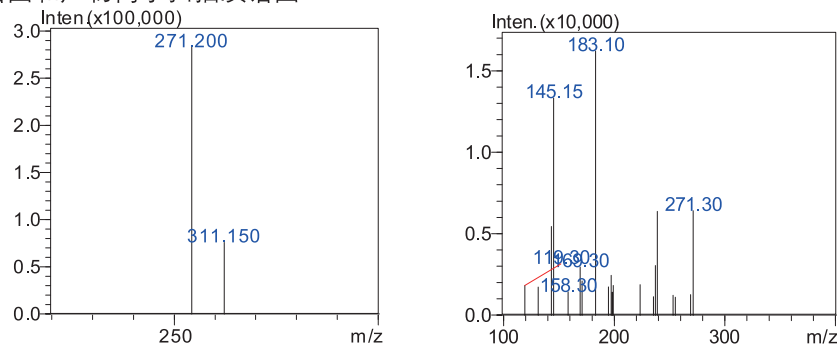


图1 雌二醇的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为43V) (右图)

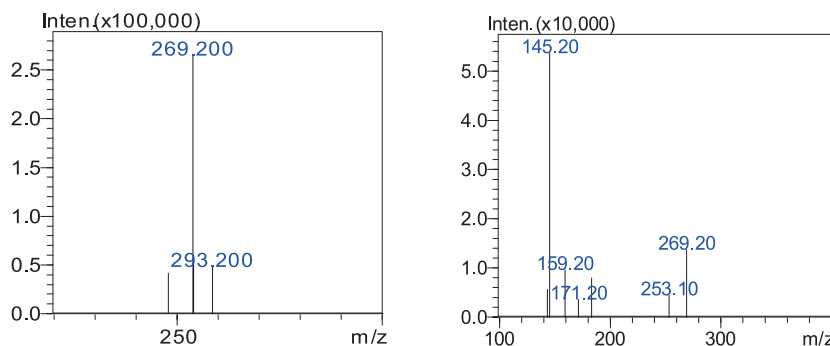
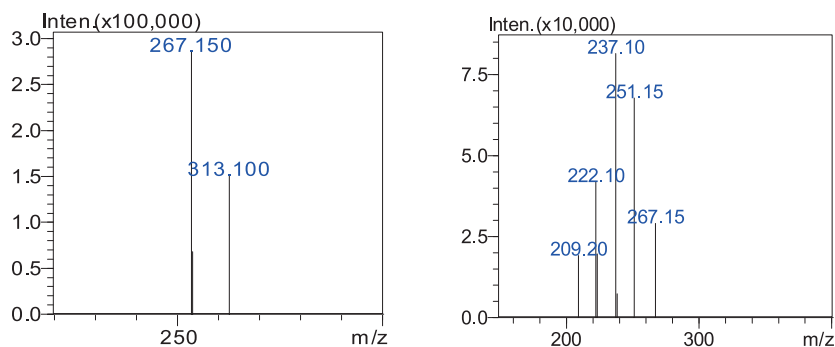


图2 雌酮的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为37V) (右图)



己烯雌酚的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为29V）（右图）

图1 雌激素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

雌激素混合标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

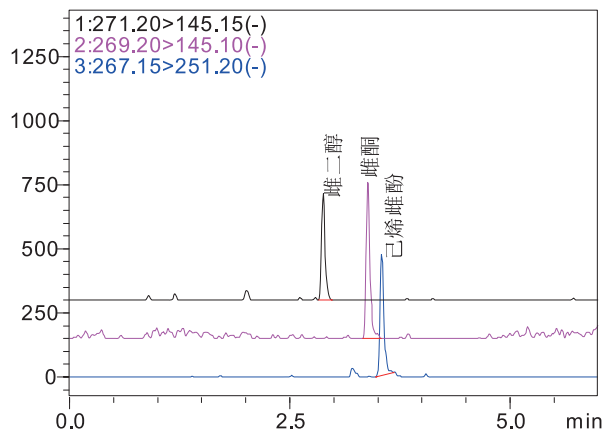


图2 雌激素浓度为2 µg/L的MRM色谱图

2.3 线性关系

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，采用外标法建立校准曲线，如图 3 所示，3 种雌激素在 10–200 µg/kg 的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数在 0.9994–0.9999 之间，方法检出限和定量限见表 3。

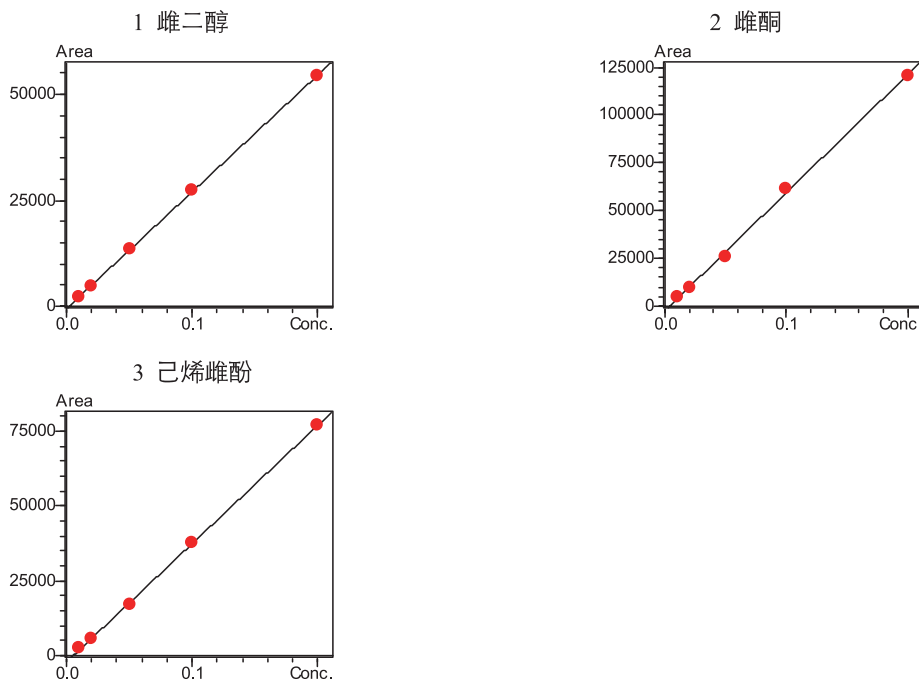


图3 基质样品中3种雌激素的标准曲线

表3 雌激素的校准曲线参数、检出限及定量限

名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/kg}$)	相关系数 (R)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
雌二醇	$Y = (275821)X + (-523.805)$	10-200	0.9999	0.39	1.30
雌酮	$Y = (617762)X + (-2333.08)$	10-200	0.9994	0.47	1.57
己烯雌酚	$Y = (396753)X + (-2166.69)$	10-200	0.9998	0.26	0.87

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表4），平行测定6次，3种物质的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.349%~0.744%和2.16%~5.55%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD%	(10 $\mu\text{g/L}$)	RSD%	(50 $\mu\text{g/L}$)	RSD%	(200 $\mu\text{g/L}$)
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
雌二醇	0.744	5.50	0.600	5.33	0.713	3.48
雌酮	0.512	4.40	0.628	3.62	0.375	3.22
己烯雌酚	0.538	5.55	0.556	4.72	0.349	2.16

2.5 基质加标实验

图4为保健品基质按照1.3中样品制备方法所得MRM色谱图。往保健品基质中添加3种雌激素混合标样，加标MRM色谱图如图5所示，从图5中可以看到，基质加标样品在定量限以上均有很好的响应，加标回收率结果见表5。

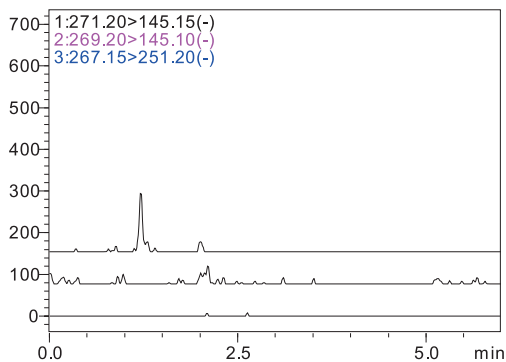


图4 保健品基质的MRM色谱图

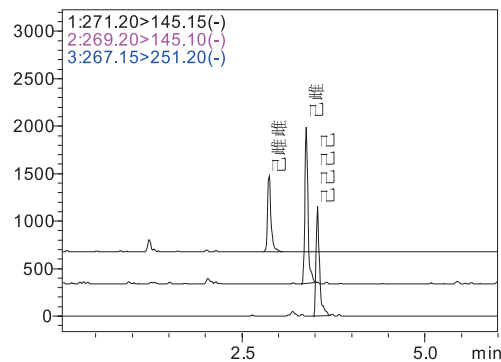


图5 保健品基质加标10 $\mu\text{g/kg}$ 的MRM色谱图

表5 保健品中雌激素检测与加标回收率结果

名称	检测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	加标浓度1 ($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度1 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率1 (%)	加标浓度2 ($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度2 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率2 (%)
雌二醇	N.D.	10	9.25	92.5	50	54.2	108.4
雌酮	N.D.	10	11.3	113.4	50	50.4	100.8
己烯雌酚	N.D.	10	11.9	119.0	50	48.5	97.0

注：N.D.表示未检出

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱联用仪测定保健品中雌激素残留的分析方法。3种雌性激素在 10–200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 线性范围内，相关系数在 0.9994–0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密程度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.744% 和 5.55% 以下，仪器精密度良好。3 种雌激素加标不同浓度回收率范围为 92.5%–119.0%，方法检出限在 0.26–0.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间，定量限在 0.87–1.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。实验结果表明该方法灵敏度高，岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱联用仪可以满足保健品中雌激素的检测需求。