

液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 4 种雌激素残留

赵超敏¹, 岳振峰², 吴晖¹, 赖富饶¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 广东深圳 518045)

摘要: 建立了液相色谱/串联质谱 (LC-MS/MS) 同时测定牛奶中雌酮、17 α -雌二醇、17 β -雌二醇和雌三醇 4 种雌性激素残留的方法。牛奶样品用乙腈振荡提取, 经过 NaCl 脱水和低温冷冻除脂, 然后用 C₁₈ 固相萃取柱净化, 最后分析物采用 Hydrosphere C₁₈ 色谱柱分离, 以乙腈和水为流动相进行梯度洗脱, 负离子电喷雾电离多反应监测模式进行定性和定量分析, 同时优化液相色谱条件 (流动相、柱流速和柱温) 和质谱参数以提高检测灵敏度。以基质匹配外标法定量, 方法线性相关系数 $r > 0.999$; 雌酮、17 α -雌二醇、17 β -雌二醇和雌三醇定量限均为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 各雌性激素的浓度添加水平均为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 雌性激素加标回收率范围在 69.7~108.0% 之间, 相对标准偏差在 4.3~10.5% 之间。结果表明, 该方法准确、可靠, 适用于牛奶中雌性激素残留的检测。

关键词: 雌激素; 牛奶; 液相色谱串联质谱; 固相萃取

文章编号: 1673-9078(2014)6-244-249

Determination of Four Estrogens Residues in Milk Samples by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

ZHAO Chao-min¹, YUE Zhen-feng², WU Hui¹, LAI Fu-rao¹

(1. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Shenzhen Key Laboratory Detection Technology R&D on Food Safety, Food Inspection Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 5108045, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for simultaneous determination of four estrogens residues (estrone, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estriol) in milk samples. The milk samples were extracted by oscillation with acetonitrile, dehydrated with NaCl and defatted under freezing condition, and then purified by solid-phase extraction using C₁₈ cartridges. The analytes were separated using Hydrosphere C₁₈ chromatographic column with gradient elution of acetonitrile/water. Finally, the eluents were qualitatively and quantitatively determined by mass spectrometer with electrospray ionization in negative multiple reaction monitoring mode. The parameters of the liquid chromatography (mobile phase, flow rate, temperature of column) and mass spectrometry were also optimized to enhance detection sensitivity. Using matrix matched external standard method, good linearity in response could be obtained with correlation coefficients larger than 0.999. All quantification limits of estrone, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol and estriol were 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. At the spike levels of 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for each estrogen, the recoveries of estrogens were within the range of 69.7%~108.0%, and the relative standard deviation were from 4.3% to 10.5%. The above results showed that the method was accurate and reliable, and suitable for the determination of estrogens residues in milk samples.

Key words: estrogen; milk; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid-phase extraction

雌激素是一类有广泛生物活性的类固醇化合物, 具有促进和维持女性生殖器官和第二性征的生理作用, 并对内分泌系统、肌体的代谢和骨骼的生成和成熟有影响。雌激素在畜牧业中常常被用来作为促生长

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2010IK137); 广东省省部产学研结合项目 (2010B090400342); “双打” 质检公益项目子课题 (2012104003-4)

作者简介: 赵超敏 (1979-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品质量与安全
通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全

剂^[1]和促进母牛同期排卵以提高发情动物的数量和受胎率^[2~4]等。雌激素在食品动物中的滥用, 会导致其在动物源食品 (如牛肉、牛奶) 中残留, 残留激素通过食物链进入人体, 可产生一系列健康危害。牛奶中残留的雌激素可能导致儿童性早熟, 提高致癌风险 (如乳腺癌、卵巢癌、子宫癌和前列腺癌)^[5~8], 导致男性生殖障碍^[9, 10]和促进青少年体重增加^[11]等。2002 年我国农业部第 176 号和 235 号公告中规定禁止在饲料和动物饮用水中使用雌二醇, 且在动物性食品中不得检

出雌二醇^[12-13]。牛奶是人们生活中重要的食品之一，与人们的健康息息相关，由于近年来不断发生牛奶安全事件，牛奶安全问题备受关注。因此，建立一种准确可靠的雌激素分析方法，为牛奶的安全监控提供重要的技术手段。

目前，常用雌激素测定的方法有液相色谱法(LC)^[14]、气相色谱-质谱(GC-MS)法^[15]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)^[16-18]等。LC法应用紫外或荧光检测雌激素，干扰比较大，灵敏度低，无法满足现行法规对雌激素残留限量的要求；由于雌激素挥发性低，GC-MS法需要衍生化，操作繁琐，灵敏度也低；LC-MS/MS法因其特异性好，灵敏度高，可对化合物进行确证检测，是目前应用广泛的雌激素测定方法。雌激素主要包括雌三醇、17 α -雌二醇、17 β -雌二醇和雌酮，在代谢过程中可相互转化(图1)，雌二醇是雌激素中生物活性最强的激素。对牛奶或奶粉中内源性雌激素的残留分析，文献报道多以检测雌酮、雌三醇和17 β -雌二醇为主^[16-19]，未见有文献同时对牛奶中4种雌激素进行残留分析；17 α -雌二醇是17 β -雌二醇的同分异构体，本文作者曾在奶制品-黄油中检出17 α -雌二醇(约0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[20]，同分异构体因具有相同离子对而难以分离，本文优化了液相色谱条件，17 β -雌二醇与同分异构体17 α -雌二醇分离效果好，同时优化了样品提取和净化的前处理过程，所建方法灵敏度均高于文献报道值^[16-19]，该方法完善了雌激素残留分析的检测体系。

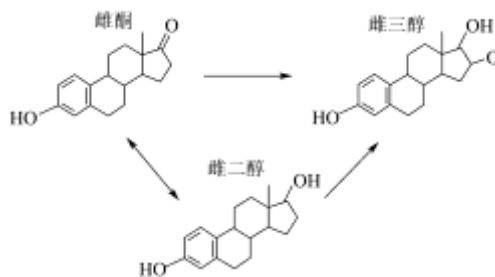


图1 雌酮、雌三醇和雌二醇结构式

Fig.1 Structure formulas of estrone, estradiol and estrone

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1200型高效液相色谱仪，美国Agilent公司；API5000型三重四级杆串联质谱仪，美国AB公司；漩涡振荡器，德国Heidolph公司；往复式振荡器，日本Yamato公司；低温离心机，美国Sigma公司；旋转蒸发仪，瑞士Buchi公司；全自动氮吹仪，美国Caliper公司；超纯水器，美国Millipore公司；移液器，

法国Gilson公司；固相萃取柱(SPE柱)：Bond Elut C₁₈柱(500 mg, 6 mL)和C₈柱(500 mg, 6 mL)，美国Agilent公司。

雌激素标准品：17 α -雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇和雌酮(纯度分别为99.0%、96.0%、99.0%、99.5%)，均购自德国Dr. Ehrenstorfer公司；甲醇、叔丁基甲醚、乙酸乙酯和乙腈(HPLC纯)，购自美国TEDIA公司；异丙醇和氯化钠(分析纯)，天津福晨化学试剂厂；实验室用水为Milli-Q水。

牛奶样品均为出入境法定监管样品。

1.2 标准溶液的制备

储备液：分别准确称取雌激素标准物质5 mg(精确至0.1 mg)，以甲醇配制浓度为500.0 mg/L的单标溶液；分别吸取一定量单标溶液，用甲醇配制为200.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液。所有溶液于棕色瓶中-30 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

工作液：现用现配，使用前移取适量混合标准溶液，氮吹至近干，以空白基质提取液逐级稀释成所需浓度。

1.3 仪器参数

1.3.1 色谱条件

色谱柱：YMC Hydrosphere C₁₈柱(100 \times 2.0 mm, 3 μm)；柱温：室温(26 $^{\circ}\text{C}$)；流动相：乙腈和水；梯度洗脱程序：初始流动相为35%乙腈，在12.0 min内，有机相由35%乙腈升至70%乙腈，保持1 min，然后在0.1 min内降至初始流动相35%乙腈，保持5 min；进样量：10 μL ；流速：0.25 mL/min。

1.3.2 质谱条件

表1 雌三醇、17 α /17 β -雌二醇和雌酮的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters for estrone, 17 α /17 β -estradiol and estrone

化合物	17 α /17 β -estradiol and estrone				
	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	去簇电压/DP/V	碰撞气能量CE/ev
雌三醇	2.35	287.15	145.0*	-120	-56
			171.1	-120	-53
17 β -雌二醇	8.21	271.10	144.9*	-160	-55
			183.1	-160	-55
17 α -雌二醇	8.84	271.20	143.1*	-160	-78
			145.0	-160	-58
雌酮	9.84	269.10	143.0	-120	-75
			145.0*	-120	-43

注：其中*标注的碎片离子为定量离子。

电离模式：电喷雾电离负离子模式(ESI⁻)；检测

方式:多反应监测(MRM);碰撞气压41.4 kPa;气帘气压241.3 kPa;雾化气压275.8 kPa;去溶剂气压482.7 kPa;离子喷雾电压-4500 V;离子源温度500 °C;碰撞室入口电压为10 V;碰撞室出口电压为15 V,其他条件见表1。

1.4 样品处理

称取5.0 g样品于50 mL具塞离心管中,若为加标样品则加入一定量的混合标准溶液,加入25 mL乙腈,涡旋0.5 min,平行振荡提取20 min,于4 °C 9500 r/min下离心5 min,上清液转入一洁净50 mL离心管中,残渣用10 mL乙腈重复提取1次,合并上清液于离心管中,然后加入5 g NaCl,涡旋混匀后-30 °C冷冻20 min,取出后立即于4 °C 9500 r/min下离心5 min,有机相转入旋转蒸发鸡心瓶中,加入5 mL异丙醇,40 °C旋转蒸发至近干,浓缩物用1 mL甲醇溶解,移入15 mL离心管中,加水稀释至10 mL,漩涡混匀,待净化。 C_{18} 柱(5 mL甲醇和5 mL水依次活化),待净化溶液过柱后,用5 mL 10%甲醇水溶液淋洗柱,抽干,然后用8 mL甲醇溶液洗脱,洗脱液在40 °C氮气吹至近干,用35%乙腈水溶液溶解浓缩物并定容至1.0 mL,过0.22 μ m有机滤膜,待LC-MS/MS分析。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

将1.0 mg/L的单标准溶液用流动注射泵连续注入质谱仪,分别在正、负离子模式下进行一级质谱全扫描,确定母离子。因为4种雌激素均含有羟基,易脱氢而带负电荷,所以负离子模式下易获得母离子,对母离子施加一定的碰撞能量进行二级质谱扫描(图2),选丰度较高、干扰较少的两个碎片离子作为定量和定性离子,同时优化对应离子对的碰撞能、去簇电压、碰撞室入口电压和碰撞室出口电压等各项质谱参数(见1.3.2节)。

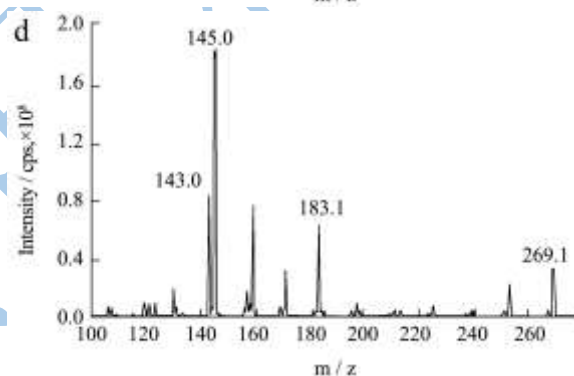
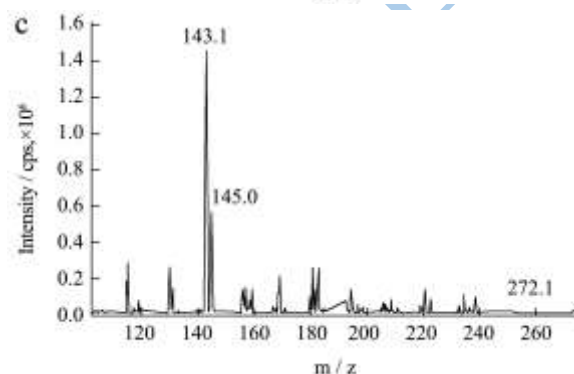
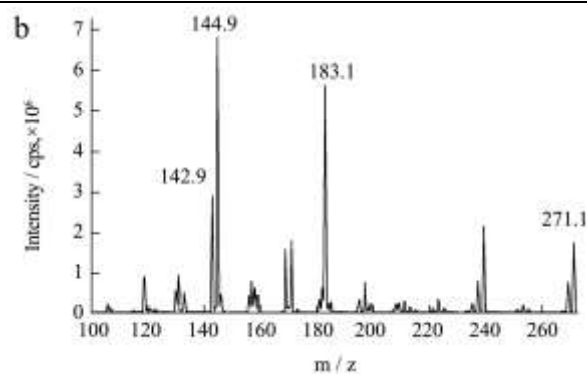
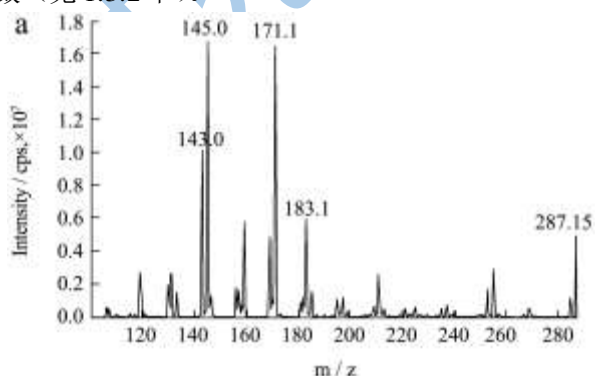


图2 雌三醇、17 β -雌二醇、17 α -雌二醇和雌酮的二级质谱图

Fig.2 Product ion spectra of estradiol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol and estrone

注: a~d 分别为雌三醇、17 β -雌二醇、17 α -雌二醇和雌酮。

2.2 液相色谱条件优化

流动相和色谱柱是影响色谱分析的重要因素。试验采用不同流动相、色谱柱和流速分析结果。结果显示,流动相乙腈-水比甲醇-水在负离子模式时更利于分析物的去质子化;色谱柱Hydrosphere C_{18} 柱优于Agilent Eclipse XDB C_{18} (150 \times 2.1 mm, 3.5 μ m)色谱柱,XDB柱虽然也能分离4种雌激素,但是稳定性差,峰型易宽且拖尾;对于含有羟基的弱极性雌激素,亲水性的Hydrosphere柱分离效果更好,峰型尖锐对称,无拖尾,稳定性和重复性好;17 α -雌二醇和17 β -雌二醇是同分异构体,异构体具有相同的特征离子对,在彼此离子对下二者同时出峰,因此必须优化液相条件使得同分异

构体分开, 流速对比0.2 mL/min、0.25 mL/min和0.3 mL/min分析显示, 4种雌激素在0.25 mL/min时分离度好 (图3); 柱温改变对4种雌激素的分离效果及响应值的变化影响不大, 因此柱温选择为室温。

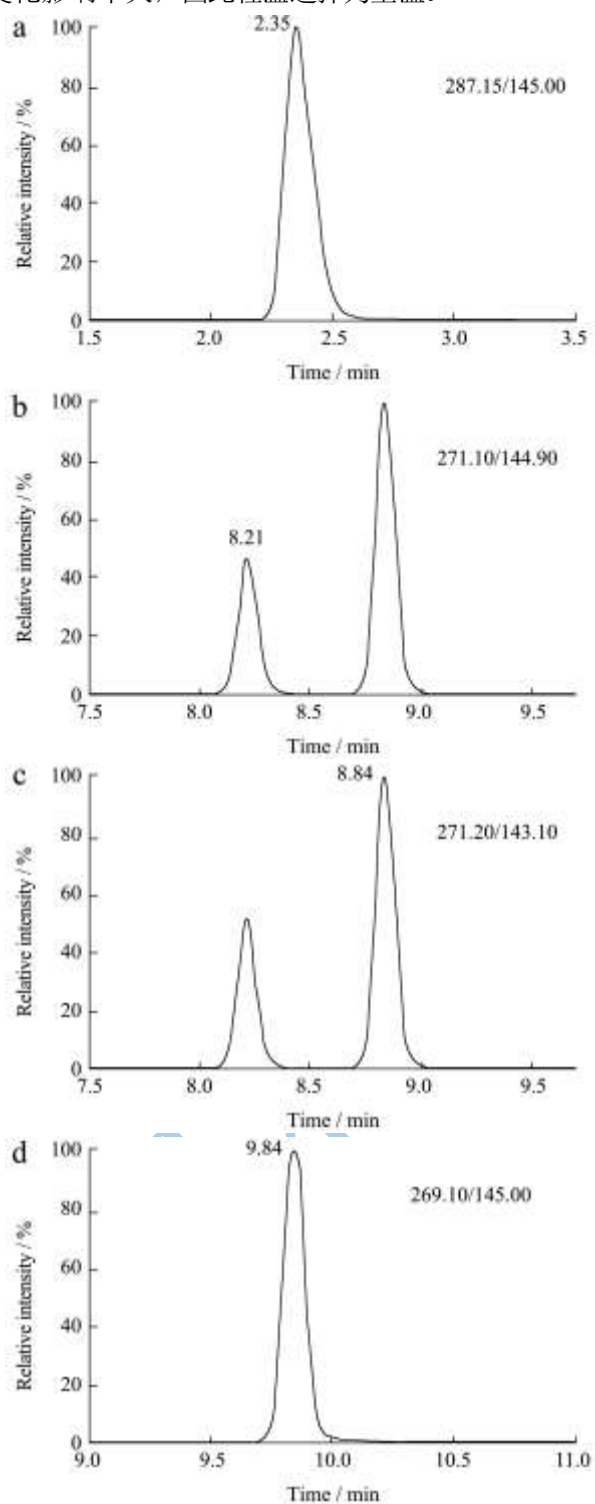


图3雌激素混合标准溶液的定量离子色谱图

Fig.3 Chromatograms of quantification transitions of mixed standard solution of estrogens

2.3 提取和净化条件的优化

牛奶除含有水分外还含有蛋白质和脂肪, 样品的前处理是试验的关键。提取试剂考察了甲醇、乙腈、叔丁基甲醚和乙酸乙酯, 研究发现, 叔丁基甲醚和乙酸乙酯提取时, 乳化现象严重, 即使于 12000 r/min 离心 5 min 仍不能使上清液与絮状物分离, 无法完全消除乳化现象; 甲醇和乙腈都具有提取雌激素的同时沉淀蛋白质的作用, 而乙腈沉淀效果好, 离心后上清液与沉淀物完全分离, 并且在提取液中加入 NaCl 时, 有机相和水相能快速有效分层, 脱水同时能有效去除牛奶基质中水溶性干扰物, 而甲醇则不能, 因此提取试剂选择乙腈; 脂肪在净化时易堵塞固相萃取柱而影响净化效果, 试验选择低温冷冻法去脂; 提取液在旋转蒸发时, 易沸腾而造成提取物损失, 因此加入异丙醇防止沸腾; 对基质提取液的净化, 多采用固相萃取柱净化法, 具有回收率高和操作简单等优点, 本文比较了不使用固相萃取柱和使用 C₁₈ 与 C₈ 固相萃取柱净化, 研究发现, 不使用固相萃取柱时, 分析物在质谱上的基质效应严重, 检测灵敏度差, 回收率极低; 采用 C₁₈ 柱对 4 种雌激素平均回收率在 83%~97% 之间, 采用 C₈ 柱平均回收率则在 60%~85% 之间, 因此, 本实验采用 C₁₈ 固相萃取柱净化。

2.4 线性关系和定量限

空白样品按 1.4 所述样品前处理方法得到样品处理液, 利用该处理液配制浓度分别为 0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 μg/kg 的基质匹配混合标准溶液, 以浓度为横坐标 (x, μg/kg) 和定量离子对峰面积为纵坐标 (y) 进行线性回归计算, 所得回归方程和相关系数见表 2, 所得相关系数均大于 0.999, 线性关系良好。定量限根据信噪比 S/N ≥ 10 确定, 4 种雌激素的定量限均为 0.2 μg/kg。

表 2 雌激素的检测线性范围和线性回归方程

Table 2 Linear range and regression equations of estrogens			
激素	线性范围 /(μg/kg)	回归方程	相关系数 (r)
雌三醇	0.2~4.0	$y=8.91 \times 10^4 x - 2.19 \times 10^4$	0.9996
17β-雌二醇	0.2~4.0	$y=4.63 \times 10^4 x - 1.36 \times 10^3$	0.9996
17α-雌二醇	0.2~4.0	$y=4.75 \times 10^4 x - 9.47 \times 10^3$	0.9995
雌酮	0.2~4.0	$y=7.01 \times 10^4 x - 5.83 \times 10^3$	0.9999

2.5 回收率与精密度

在空白样品中添加 0.2 μg/kg、0.4 μg/kg、1.0 μg/kg 三个浓度水平进行回收试验, 每个水平平行测定 6 次, 结果见表 3, 各化合物在基质中的回收率为 69.7~108.0% 之间, 相对标准偏差为 4.3~10.5% 之间, 方法的准确度和精密度符合国内外对激素残留分析的要求。

表3 空白牛奶中雌激素加标的回收率和精密度

Table 3 The recoveries and accuracies of estrogens in spiked

milk (n=6)			
激素	加标浓度 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	相对标准 偏差/%
雌三醇	0.2	69.7~92.0	10.5
	0.4	80.0~99.0	7.6
	1.0	83.8~96.5	6.8
17 β -雌二醇	0.2	76.5~95.0	8.0
	0.4	85.0~102.5	6.3
	1.0	92.0~105.0	5.9
17 α -雌二醇	0.2	77.8~92.0	7.0
	0.4	81.6~101.0	6.8
	1.0	86.0~99.3	5.1
雌酮	0.2	79.0~100.0	7.9
	0.4	88.7~99.5	4.6
	1.0	95.0~108.0	4.3

2.6 实际样品分析

采用所建方法对 10 份法定监管牛奶样品进行检测, 均未检出上述 4 种雌激素。

3 结论

本文建立了牛奶样品中雌三醇、17 α -雌二醇、17 β -雌二醇和雌酮的液相色谱/串联质谱(LC-MS/MS)检测方法。该方法具有快速简便、灵敏度高、净化效果好等特点, 其灵敏度、和准确度均能满足激素药物残留检测的要求, 可作为常规方法对牛奶样品中雌激素药物残留进行检测分析。

参考文献

- [1] Heinrich H D Meyer. Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production [J]. APMIS, 2001, 109(1): 1-8
- [2] Maarten F A Andringa, Frank J C M Van Eerdenburg, Elisa Fernández, et al. Comparison between two progesterone sources and two oestradiol formulations in a heatsynch protocol for postpartum cycling dairy cows in pasture[J]. Journal of Veterinary Science, 2013, 14(2): 161-166
- [3] M H C Pereira, A D P Rodrigues, T Martins, et al. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: comparison of the 5-d cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol [J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(11): 6904-6914
- [4] M A Lammoglia, R E Short, S E Bellows, et al. Induced and

synchronized estrus in cattle:dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F_{2 α} [J]. Journal of Animal Science, 1998, 76(6): 1662-1670

- [5] Davaasambuu Ganmaa, Akio Sato. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers [J]. Medical Hypotheses, 2005, 65(6): 1028-1037
- [6] X M Li, D Ganmaa, A Sato. The experience of Japan as a clue to the etiology of breast and ovarian cancers: relationship between death from both malignancies and dietary practices [J]. Medical Hypotheses, 2003, 60(2): 268-275
- [7] Li Qiang Qin, Pei Yu Wang, Takashi Kaneko, et al. Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer [J]. Medical Hypotheses, 2004, 62(1): 133-142
- [8] W Yue, R J Santen, J P Wang, et al. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 86(3-5): 477-486
- [9] D Ganmaa, P Y Wang, L Q Qin, et al. Is milk responsible for male reproductive disorders? [J]. Medical Hypotheses, 2001, 57(4): 510-514
- [10] Sharpe R M, Skakkebaek N E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? [J]. The Lancet, 1993, 341(8857): 1392-1395
- [11] Catherine S Berkey, Helaine R H Rockett, Walter C Willett, Graham A Colditz. Milk, dairy fat, dietary calcium, and weight gain: a longitudinal study of adolescents [J]. Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine, 2005, 159(6): 543-550
- [12] 中华人民共和国农业部公告第176号. 2002
The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC 176, 2002
- [13] 中华人民共和国农业部公告第235号. 2002
The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC 235, 2002
- [14] 周建科, 岳强, 宿书芳, 等. 牛奶中雌性激素的高效液相色谱分析[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(11): 56-58
ZHOU Jian-ke, YUE Qiang, Su Shu-fang, et al. Analysis of estrogens in milk by high performance liquid chromatography [J]. China Dairy Industry, 2005, 33(11): 56-58
- [15] 李强, 赵炜, 蔡立鹏, 等. 气相色谱-串联质谱测定乳粉中6种雌激素[J]. 乳业科学与技术, 2013, 36(6): 18-20
LI Qiang, ZHAO Wei, CAI Li-peng, et al. Simultaneous analysis of six estrogens in milk powder by GC-MS-MS [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2013, 36(6): 18-20
- [16] 张艳, 陈剑刚, 冯翠霞. 液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中

- 7种雌激素类药物残留[J]. 实施预防医学, 2013, 20(6): 740-743
ZHANG Yan, CHEN Jian-gang, FENG Cui-xia. Simultaneous determination of seven estrogens residues in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Practical Preventive Medicine, 2013, 20(6): 740-743
- [17] 李雪, 牟光庆, 陈历俊, 等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱法测定原料奶中5种环境雌激素残留量的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 293-297
LI Xue, MU Guang-qing, CHEN Li-jun, et al. Research of the determination of 5 kinds of environmental estrogens residues in raw milk by solid phase extraction-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(9): 293-297
- [18] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定乳制品中14种雌激素及孕激素残留[J]. 分析实验室, 2012, 31(11): 76-81
LUO Hui-tai, HUANG Xiao-lan, WU Hui-qin, et al. Simultaneous determination of 14 estrogens and progesterones residues in dairy by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 31(11): 76-81
- [19] 祝伟霞, 刘亚风, 袁萍, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定婴幼儿配方奶粉中39种激素残留量[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1031-1037
ZHU Wei-xia, LIU Ya-feng, YUAN Ping, et al. Quick determination of 39 hormones residues in infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(11): 1031-1037
- [20] 赵超敏, 岳振峰, 吴晖, 等. 黄油中8种类固醇激素的液相色谱/串联质谱检测. 分析化学, 2014, 42(3): 360-366
ZHAO Chao-min, YUE Zhen-feng, Wu Hui, et al. Determination of eight steroid hormones in butter samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(3): 360-366