

## 超高效液相色谱串联质谱法检测鸡肉中 5 种雌激素残留

韩迪, 张艳, 周建于, 柏桦, 张敏, 王琦  
(昆明医科大学 公共卫生学院 云南 昆明 650050)

**[摘要]** **目的** 建立一种鸡肉中雌二醇、雌三醇、雌酮、 $17\alpha$ -乙炔雌二醇、己烯雌酚 5 种雌激素残留的固相萃取结合高效液相色谱串联质谱的检测方法。 **方法** 对色谱条件、萃取溶剂和固相萃取柱种类等条件进行优化选择。 **结果** 以乙酸乙酯-甲醇 (6:1) 为萃取溶剂, 固相萃取柱 HLB 净化富集, 采用 ACQUITY BEH C18 色谱柱进行分离, 以乙腈-水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 在多反应监测模式下进行 MS/MS 的定性及定量分析。在此最佳条件下, 方法显示出良好的线性, 检出限为  $0.3 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 在添加水平为  $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$  范围内的平均回收率为  $80.0\% \sim 102.9\%$ , 相对标准偏差为  $6.9\% \sim 12.3\%$ 。 **结论** 该方法适用于鸡肉中 5 种雌激素残留的检测, 具有灵敏度高、操作简单快速的特点。

**[关键词]** 超高效液相色谱串联质谱; 雌激素; 动物性食品; 鸡肉

**[中图分类号]** R155.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 07-0032-05

## Determination of Five Estrogens in Chicken by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

HAN Di, ZHANG Yan, ZHOU Jian-yu, BAI Hua, ZHANG Min, WANG Qi  
(School of Public Health, Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650050, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish an ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization triple-quadruple tandem mass spectrometric (UPLC-ESI MS/MS) method for determination of 5 estrogens, including estradiol, estriol, estrone,  $17\alpha$ -ethinylestradiol and diethylstilbestrol in chicken. **Method** Analytical conditions including chromatography condition, extraction solvents and the type of solid phase extraction column were optimized. **Results** The estrogens were extracted by ethyl acetate and methanol (6:1) and cleaned up on a HLB solid phase extraction column, Separation of the estrogens was carried out by ACQUITY BEH C18 column on the condition of acetonitrile and water as the mobile phases. Finally, the target compounds were confirmed and quantified by MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode. On the optimized conditions, the methods showed good linearity and the limits of detection (LOD) was  $0.3 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ . At spiked concentration of  $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ , the average recovery and RSD were  $80.0 \sim 102.9\%$  and  $6.9\% \sim 12.3\%$  respectively. **Conclusion** The developed method is fast, sensitive and simple and suitable for the determination of 5 selected estrogens in chicken.

**[Key words]** UPLC-MS/MS; Estrogens; Animal food; Chicken

动物源食品中激素残留是目前食品安全关注的热点问题之一。这些激素包括天然激素和人工合成激素, 它们通过食物链的富集进入人体, 会对人体产生内分泌干扰效应, 危害人体的生殖机

能, 增大与激素相关的癌症发病几率, 出现儿童性早熟、乳腺癌、前列腺癌等疾病<sup>[1]</sup>。我国农业部在 2002 年第 193 号公告里禁止性激素和具有雌激素样作用的物质在食品动物中使用, 但滥用激素类药

**[基金项目]** 云南省自然科学基金资助项目 (2011FZ106)

**[作者简介]** 韩迪 (1989~), 男, 内蒙古赤峰市人, 在读硕士研究生, 主要从事营养与食品卫生工作。

**[通讯作者]** 王琦. E-mail:lwangqi@163.com

物的情况常有发生, 所以为保障食品安全, 对动物源食品中激素残留的检测尤为重要。

目前检测食品中激素残留的方法有 HPLC<sup>[2]</sup>, HPLC-MS/MS<sup>[3,4]</sup>, GC-MS<sup>[5,6]</sup>法等, 常与固相萃取<sup>[7]</sup>、液液微萃取<sup>[8]</sup>柱前衍生<sup>[5-7]</sup>等样品前处理方法联用, 检测对象包括奶及奶制品<sup>[9]</sup>、水产品<sup>[4,6]</sup>、畜禽肉类及内脏<sup>[9,10]</sup>等, 其中 HPLC-MS/MS 法在定性和定量上具有较强的优势, 特别适用于痕量组分的分析检测。本文以常见的雌二醇 (E2)、雌三醇 (E3)、雌酮 (E1)、17 $\alpha$ -乙炔雌二醇 (EE2)、己烯雌酚 (DES) 为检测对象, 优化了样品前处理条件和色谱条件, 建立了一种固相萃取-超高效液相色谱串联质谱检测方法。并对方法的准确度和精密度进行验证。证明该方法高效简便, 适用于鸡肉中5种激素的检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC TM Quattro Premier XE 超高效液相色谱串联质谱仪 (美国 Waters 公司); Milli-Q

超纯水仪 ((Millipore); Stratos 高速冷冻离心机 (Thermo Fisher); 氮吹仪 (上海皓庄); 涡旋混合器 (上海泸西); KQ-600E 超声波清洗仪 (昆山); 固相萃取仪 (Supeclo); 固相萃取柱 Oasis<sup>®</sup> HLB (3mL/60mg)

标准品己烯雌酚、雌酮、雌三醇、雌二醇、17 $\alpha$ -乙炔雌二醇、内标物己烯雌酚-d8 纯度均不低于 99%, 均购于 Dr. Ehrenstorfer 公司。乙酸乙酯、甲醇、乙腈、正己烷为色谱纯。

### 1.2 标准溶液的制备

标准品和内标物均用甲醇配成 100 mg/L 的标准储备液于 -20 $^{\circ}$ C 保存。临用前用甲醇逐级稀释成含上述标准品均为 1.00 mg/L 的混合标准液。

### 1.3 UPLC-MS/MS 分析条件

色谱条件 色谱柱 ACQUITY UPLC TM BEH C 18 柱 (50 mm  $\times$  2.1 mm 1.7  $\mu$ m) 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ L; 流动相: 水 (A) 和乙腈 (B) 梯度洗脱, 流速 0.3 mL/min。

质谱条件 电离方式: ESI+ 毛细管电压 2.80 kV, 离子源温度 120 $^{\circ}$ C, 锥孔反吹气 50 L/h, 脱溶剂气温度 350  $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流速 700 L/h。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Program of gradient elution

时间 (min)	水相 A (%)	乙腈 B (%)	梯度变化曲线
0.00	65	35	
4.00	50	50	6
4.50	0	100	6
5.00	0	100	6
5.50	65	35	1
6.00	65	35	1

表 2 5 种雌激素 UPLC-ESI MS/MS 的仪器参数

Tab. 2 UPLC-ESI MS/MS parameters of five estrogens

雌激素化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子(m/Z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
雌二醇 (E2)	1.94	271.1	145.1	62	40
			183.1		36
雌三醇 (E3)	0.72	287.1	145.1	64	36
			171.1		34
雌酮 (E1)	2.59	269.1	145.0	56	40
			159.1		33
17 $\alpha$ -乙炔雌二醇 (EE2)	2.43	295.2	145.0	54	44
			159.1		40
己烯雌酚 (DES)	3.17	267.1	237.1	44	28
			251.1		28

### 1.4 样品前处理

称取 5.0 g 绞碎样品 (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙酸乙酯-甲醇 (6:1), 涡旋提取 30 s, 超声 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 上清液倒入鸡心瓶中, 再用 20 mL 同样溶剂重复提取 1 次, 合并上清液于 40 °C 旋转蒸发至干, 加入 1 mL 甲醇, 9 mL 水, 待净化.

将上述样品溶液加至预先用 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 甲醇和 5 mL pH3.0 盐酸溶液活化的 HLB 固相萃取柱中, 依次用 5 mL 水-甲醇 (9:1)、5 mL 正己烷淋洗小柱, 抽干, 用 5 mL 乙酸乙酯洗脱于离心管中, 40 °C 水浴中氮气吹干, 再用 1 mL 乙腈-水 (20:80) 溶解残渣, 10 000 r/min 离心, 过 0.22 μm 滤膜, 供上机分析.

## 2 结果

### 2.1 色谱质谱条件的选择

流动相的组成是影响待测物质分离效果和保留时间的重要因素, 实验考察了甲醇-水和乙腈-水两种流动相对 5 种激素的分离效果, 结果表明, 以甲醇-水作流动相时, 5 种雌激素分离的峰型不理想, 雌二醇、雌三醇拖尾较为严重; 以乙腈-水作流动相效果较好. 进一步考察二者比例及梯度洗脱条件, 确定最佳的流动相组成及梯度洗脱条件, 见表 1.

以 1 μg/mL 的标准溶液通过注射泵进样, 分别找出五种激素和内标的母离子和定量与定性离子对, 并优化相关参数, 质谱方法, 见表 2. 5 种雌激素的总离子色谱图 (TIC) 和多反应监测模式 (MRM) 扫描色谱图分别如图 1 和图 2 所示, 出峰顺序为雌三醇 (E3)、雌二醇 (E2)、17α-乙炔雌二醇 (EE2)、雌酮 (E1)、己烯雌酚 (DES).

### 2.2 提取溶剂的选择

溶剂的选择是提高萃取率的关键. 本实验根据目标激素的极性考察了氯仿、乙酸乙酯、甲醇、乙腈四种溶剂的提取率, 结果表明, 用单一溶剂进行提取, 回收率均小于 70%, 而在乙酸乙酯中加入一定比例的甲醇, 可以提高萃取效率. 实验最后确定乙酸乙酯和甲醇的最佳配比为 6:1, 此时回收率可达 80%.

### 2.3 净化条件的选择

实验考察了 Oasis<sup>®</sup> HLB (60mg/3mL) 和 Cleanert Silica CM 改性硅胶固相萃取柱 (100 mg/6mL) 对 5 种激素的净化效果. Oasis<sup>®</sup> HLB 是一种通用型的固相萃取小柱, 它是由亲水性的 N-乙烯吡咯烷酮和亲脂性的二乙烯基苯两种基本单体按特定比例聚合构成的, 是可满足所有 SPE 需要的亲水亲脂平衡的水可浸润性反相吸附剂. 结果证明, HLB 小柱具有较高的回收率和较好的重现性, 5 种激素回收率均达到 80% 以上, 而 Silica CM 固相萃取小柱对雌二醇、雌三醇和雌酮的回收率较高, 分别可达到 82.3%、89.5% 和 91.6%. 但对己烯雌酚和 17α-乙炔雌二醇的回收率较低, 均低于 65%. 所以实验选用 HLB 小柱对样品进行净化.

### 2.4 标准曲线的绘制

吸取混合标准溶液分别稀释成 1.0、5.0、10、20、30 μg/L 的标准溶液, 进行线性回归, 得到线性方程, 线性相关系数  $r > 0.992$ , 以  $S/N=3$  所对应的目标物的含量作为方法的检测限, 5 种雌激素的检测限为 0.3~0.5 μg/kg, 见表 3.

### 2.5 方法的精密度、回收率与检出限

于空白鸡肉中分别加入 1、2、5 μg/kg 混合标准溶液, 每组做 6 个平行样, 进行回收率和精密度试验. 结果表明, 5 种雌激素回收率在 80.0~102.9% 之间, RSD 为 6.9%~12.3%.

### 2.6 实际样品的检测

用建立的方法对市场 10 份鸡肉样品进行了 5 种激素残留的检测, 未检测雌激素残留.

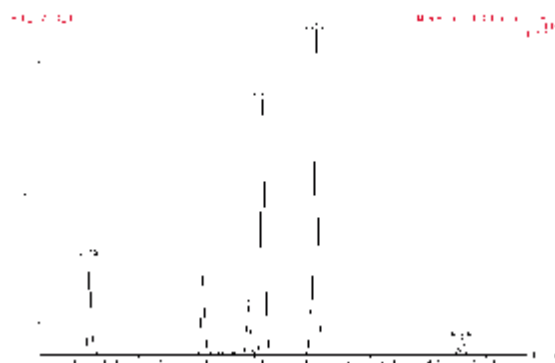


图 1 5 种雌激素 TIC 图 (浓度 10 ng/mL)

Fig. 1 Total Ion Chromatograms of five estrogens (10 ng/mL)

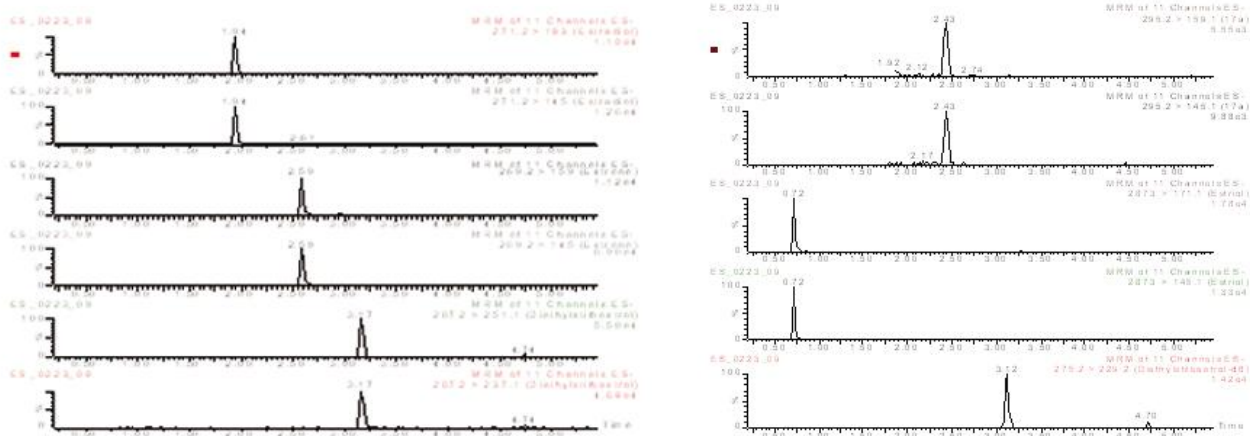


图 2 5 种雌激素和内标物 MRM 图

Fig. 2 Multiple reaction monitoring Chromatograms of five estrogen and internal standard

表 3 5 种雌激素的标准曲线

Tab. 3 The calibration curve of five estrogens

雌激素化合物	标准曲线	r	线性范围 (μg/L)	检出限 (μg/kg)
雌二醇 (E2)	$Y=2.134\ 31X + 0.060\ 0176$	0.992	1 ~ 200	0.5
雌三醇 (E3)	$Y=1.179\ 9X + 0.005\ 353\ 73$	0.995	1 ~ 200	0.5
雌酮 (E1)	$Y=0.951\ 644X + 0.003\ 491\ 48$	0.993	1 ~ 200	0.5
17α-乙炔雌二醇 (EE2)	$Y=0.754\ 726X + 0.044\ 604\ 9$	0.995	1 ~ 200	0.5
己烯雌酚 (DES)	$Y=0.901\ 988X + 0.007\ 992\ 05$	0.991	1 ~ 200	0.3

注: \* 相关系数 t 检验  $P < 0.05$ .

表 4 5 种雌激素在鸡肉中 3 个添加水平下精密度和回收率 (n = 6)

Tab. 4 Recoveries and RSD of five estrogens spiked in chicken at three different levels (n = 6)

雌激素化合物	添加量 (μg/kg)	Found (μg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)
雌二醇 (E2)	1	0.81	81.0	9.5
	2	1.70	85.2	9.2
	5	4.63	92.5	8.6
雌三醇 (E3)	1	0.86	86.0	9.2
	2	1.79	89.6	9.5
	5	5.09	101.8	7.3
雌酮 (E1)	1	0.87	87.0	8.6
	2	1.80	90.1	9.1
	5	5.12	102.3	10.8
17α-乙炔雌二醇 (EE2)	1	0.80	80.0	8.2
	2	1.67	83.6	6.9
	5	4.43	88.5	7.9
己烯雌酚 (DES)	1	0.85	85.0	11.7
	2	1.93	96.3	12.3
	5	5.15	102.9	9.4

### 3 讨论

本文建立了超高效液相色谱串联质谱法检测鸡肉中 5 种雌激素残留,并对实验条件进行了优化.样品经乙酸乙酯-甲醇(6:1)提取,HLB 固相萃取柱净化,ACQUITYT BEH C 18 色谱柱分离后,在 LC-MS/MS 多反应监测模式下进行定性及定量分析.方法具有较高的灵敏度高、准确度和精密度,适合于鸡肉中雌激素残留的测定.

在优化的色谱条件和样品前处理条件中,提取溶剂的选择与提取率和方法的回收率密切相关,净化步骤可有效去除基质干扰,减少杂质对仪器设备的污染;而色谱条件是影响待测化合物分离效果的重要因素.在日常检测中,要综合考虑各种因素,选择适当的提取溶剂和色谱条件,以保证检测的准确性.本实验所选条件只针对鸡肉一种样品,其他同类样品是否适用这一条件还需进一步探索.

#### [参考文献]

- [1] 潘尚霞,张建鹏,戴昌芳. 环境内分泌干扰物研究进展[J]. 中国环境卫生,2006,9(12):29-32.
- [2] 郁倩,王洪新,安可,等. 水中5种雌激素的固相萃取高效液相色谱测定法[J]. 环境与健康杂志,2008,25(5):438-440.
- [3] 张爱芝,王全林,沈坚,等. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定鱼制品中残留的7种性激素[J]. 色谱,2010,28(2):190-196.
- [4] 徐英江,田秀慧,张秀珍,等. 超高效液相色谱串联质谱法对水产品中8种雌激素的测定[J]. 分析测试学报,2010,29(2):152-156.
- [5] 邓晓丽,范军,黄涛宏,等. 气相色谱-质谱联用法检测奶粉中四种雌激素[J]. 中国食品,2011,12(4):56-57.
- [6] 湛嘉,俞雪钧,李佐卿,等. 黄鳝肌肉中11种性激素的气质联用检测方法[J]. 分析测试学报,2007,26(5):642-646.
- [7] 廖涛,吴晓翠,王少华,等. 固相萃取-气相色谱/质谱联用法同时检测水体中9种环境雌激素[J]. 分析化学,2013,41(3):422-426.
- [8] 刘建林,张琛,王夏娇,等. 基于碳纳米管的固相萃取-分散液液微萃取测定水中多种痕量环境雌激素[J]. 高等学校化学学报,2012,33(1):37-43.
- [9] 林奕芝,张世英,梁伟,等. HPLC法同时测定肉与肉制品中五种雌激素残留量[J]. 中国卫生检验杂志 2002,12(4):411-412.
- [10] 康海宁,欧阳珊,林黎,等. 液相色谱-串联质谱法检测动物肝肾组织中3种雌激素[J]. 色谱,2012,30(10):986-990.

(2014-04-10 收稿)