

采用气相色谱-质谱联用仪分析动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮残留量

吴嘉雪

(广州禾信仪器股份有限公司, 广州 510530)

摘要: 使用禾信 GCMS 1000 按照 GB31658.7-2021《食品安全国家标准 动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法》对猪肉进行加标回收实验。实验结果表明, 在 10 μ g/L-1000 μ g/L 的浓度范围内, 目标物的标准曲线相关系数 R^2 均大于 0.990, 精密度为 1.1%-14.6%, 水质的加标回收率为 60.7%-106.8%, 检测限在 0.2 μ g/kg-0.3 μ g/kg 范围内。

关键词: 17 β -雌二醇; 雌三醇; 炔雌醇; 雌酮; 气相色谱-质谱法

17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮均为雌激素类, 常在动物性食品中添加使用。畜禽食用了含有激素的饲料后, 这些激素会沉积在畜禽的肉和内脏中, 人吃了含有大量激素的畜禽产品后, 常常会出现心动过速、心慌、手颤、头晕、头痛等神经中枢调节紊乱的现象, 尤其对高血压、心脏病、糖尿病、甲状腺功能亢进、前列腺肥大患者危险性更大。影响生殖系统, 性发育提前。吃激素含量高的畜禽产品可使体内雌激素增高, 可能致使男性乳房女性化发育。一些激素还易引起性发育提前和各种肿瘤, 如卵巢肿瘤、肾脏腺肿瘤等。

本文参考 GB31658.7-2021《食品安全国家标准 动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法》, 使用气相色谱-质谱联用仪检测猪肉中的 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮残留量, 通过检出限、精密度和准确度等指标评估仪器性能, 证明 GCMS 1000 满足检测的需要。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

乙酸乙酯 ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$): 色谱纯; 葡萄糖醛酸酶/芳香剂硫酸酯酶; 二硫赤藓糖醇 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, DTE); 三甲基碘硅烷 ($\text{C}_3\text{H}_9\text{ISi}$, TMIS); N-甲基三甲基硅基三氟乙酰氨 (MSTFA); 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮标准品 (含量 \geq 98.0%)。

1.2 样品前处理

取试样 5g, 于 50mL 离心管, 加醋酸钠缓冲液 10mL, 均质 1min, 涡旋振荡 2min, 加葡

葡萄糖醛酸酶/芳香基硫酸酯酶 20uL, 50°C酶解 2h, 加乙酸乙酯 20mL, 涡旋振荡 3min, 10000 r/min 离心 5min, 收集上清液于 100mL 鸡心瓶中, 残渣中加乙酸乙酯 20mL, 重复提取 1 次, 合并上清液, 40°C平行浓缩仪蒸发至近干, 用氢氧化钠溶液 6mL 分 3 次溶解洗涤鸡心瓶, 洗液转入 50mL 离心管中, 加正己烷 20mL, 涡旋振荡 1min, 10000r/min 离心 5min, 收集下层清液, 加醋酸铵溶液 1mL, 用冰醋酸调 pH 至 5.0~5.2, 备用。取 C₁₈ 固相萃取柱, 依次用甲醇、水各 5mL 活化。取备用液, 过柱, 分别用水、甲醇水溶液各 5mL 淋洗, 抽干, 加甲醇 5mL 洗脱, 收集洗脱液, 50°C水浴氮气吹干。加乙酸乙酯正己烷溶液 5mL 使溶解, 备用; 取硅胶固相萃取柱, 加正己烷 5mL 活化, 取备用液过柱, 淋洗, 抽干, 加乙腈 5mL, 洗脱, 收集洗脱液, 50°C水浴氮气吹干。加入甲苯、衍生化试剂各 100μL 于吹干玻璃管中, 混合均匀, 封口于 80°C烘箱衍生 60 min, 冷却后加入 300μL 甲苯, 混匀, 供 GCMS 测定。

1.3 仪器条件

表 1 仪器方法参数

模块	参数	值
色谱	进样口温度	220°C
	进样方式	不分流
	色谱柱系统	DB-5ms (30m×0.25mm×0.25μm)
	升温程序	起始温度100°C, 保持1min, 以20°C/min升至200°C, 保持3min; 20°C/min升至260°C, 保持5min; 再以20°C/min升至
	载气	氦气
质谱	柱流量	1mL/min恒流模式
	离子源	EI, 70eV
	离子源温度	230°C
	接口温度	280°C
	检测器电压	1500V
	采集速率	1000amu/s
	溶剂延迟	16min
	采集模式	SIM

2 结果和结论

2.1 标准谱图和物质信息

实验总离子流图见图1, 17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮加标浓度均为1000μg/L。17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮出峰顺序、保留时间以及特征离子信息见表2。

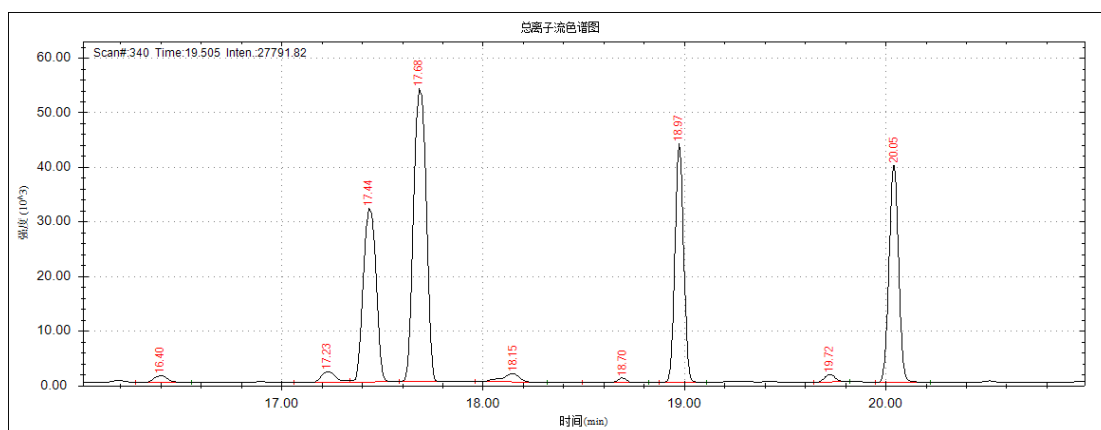


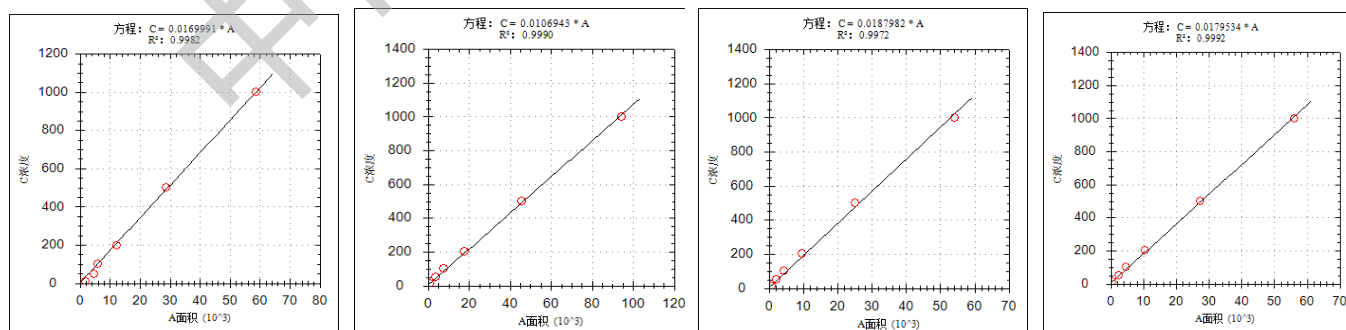
图1 17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮衍生物总离子流图

表2 17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮保留时间和特征离子信息表

序号	名称	CAS	RT, min	定量离子 m/z	定性离子 m/z
1	雌酮	200-164-5	17.44	414	399, 309, 231
2	17β-雌二醇	50-28-2	17.68	416	232, 285, 326
3	炔雌醇	57-63-6	18.97	425	285, 300, 440
4	雌三醇	50-27-1	20.05	504	311, 345, 414

2.2 标准曲线

取17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮适量，用甲醇稀释成浓度分别为10μg/L、50μg/L、100μg/L、200μg/L、500μg/L、1000μg/L系列标准溶液，各量取500μL加入氮吹玻璃试管中，50°C水浴氮气吹干，在吹干玻璃管中加入甲苯、衍生化试剂各100μL，震荡混合，于80°C烘箱衍生60min冷却后加入300μL甲苯混匀后进行分析，分析结果见图2。17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮的线性相关系数 R^2 均大于0.990，详见表3



(a) 雌酮

(b) 17β-雌二醇

(c) 炔雌醇

(d) 雌三醇

图2 17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮标准曲线图

表3 17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮标准曲线线性相关系数

序号	化合物	线性相关系数 R ²
1	雌酮	0.9982
2	17β-雌二醇	0.9990
3	炔雌醇	0.9972
4	雌酮	0.9992

2.3 加标回收实验

1) 精密度

分别对 5g 猪肉进行加标实验，最终定容后加标浓度为 10μg/L、100μg/L、500μg/L，各六次平行实验，对精密度进行评估，具体信息详见下表 4。目标物浓度为 10μg/L 的目标物的相对标准偏差（RSD）在 8.5%-14.6%范围内，17β-雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮浓度为 100μg/L 和 500μg/L 时，RSD 分别在 7.1%-8.9%和 1.1%-1.8%范围内。

表4 加标精密度

序号	化合物	目标物加标浓度 (μg/L)		
		10	100	500
1	雌酮	8.5%	7.9%	1.1%
2	17β-雌二醇	13.1%	8.9%	1.7%
3	炔雌醇	14.6%	7.1%	1.5%
4	雌三醇	13.6%	7.9%	1.8%

2) 准确度

分析 5g 猪肉加标（最终定容后加标浓度为 10μg/L、100μg/L、500μg/L），对方法回收率进行评估，具体信息详见下表 5。加标浓度为 10μg/L、100μg/L 和 500μg/L 猪肉基质的回收率分别为 61.2%-90.8%、66.0%-108.3%、65.3%-106.8%。

表5 猪肉加标回收率

序号	化合物	加标浓度 (μg/L)		
		10	100	500
1	雌酮	90.8%	75.9%	106.8%
2	17β-雌二醇	61.4%	61.3%	78.7%
3	炔雌醇	75.2%	70.1%	78.9%

3) 检出限

方法 GB31658.7-2021《食品安全国家标准 动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法》建议对 5 g 猪肉进行前处理,并最终定容至 0.5mL。测定平行加标样品 7 次,计算标准偏差 (SD),根据方法检出限 MDL= $t(n-1, 0.99) \times SD$ 计算各目标化合物的方法检出限。结果如下表 6 所示,计算可知,17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮检出限范围 0.2 μ g/L - 0.3 μ g/L。

表6 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮检出限

序号	化合物	方法检出限 (μ g/kg)	标准要求方法检出限 (μ g/kg)
1	雌酮	0.2	0.5
2	17 β -雌二醇	0.3	0.5
3	炔雌醇	0.2	0.5
4	雌三醇	0.3	0.5

2.4 结论

本文依据 GB31658.7-2021《食品安全国家标准 动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法》,采用禾信 GCMS 1000 分析了猪肉基质中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮残。结果显示:17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮残的线性相关系数 R^2 均大于 0.990; RSD 在 1.1%-14.6%范围,优于方法要求的 $RSD \leq 15\%$;猪肉中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮残的加标回收率在 60.7%-106.8%范围,满足方法标准回收率应在 60%-110%;定量限在 0.2 μ g/kg -0.3 μ g/kg 范围,满足方法要求的检测限 0.5 μ g/kg。上述结果表明禾信 GCMS 1000 具有优异的重现性和检测灵敏度。

参考文献

[1] GB31658.7-2021《食品安全国家标准 动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌酮和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法》