

荧光法快速测定奶粉中三种雌激素的总量

◆梁 良 付佳伟 于昊辰

(辽宁工业大学 辽宁锦州 121000)

摘要: 雌激素是由卵巢分泌的一类类固醇激素,其通过食物链进入人体后会扰乱体内激素平衡,影响生殖系统、神经系统,诱发乳腺癌、卵巢癌等疾病。1996年欧盟明令禁止使用具有促生长作用的激素(Council Directive 96/22/EC, 96/23/EC《中华人民共和国农业部公告第235号》)也规定了雌激素为禁用药物。但是食品中微量雌激素残留问题依然存在,为了有效地监督动物源性食品的质量,开发具有高灵敏、高通量检测雌激素残留的确证分析方法是必要的。

关键词: 奶粉;雌激素;快速测定

目前,关于动物源性食品中雌激素残留的测定方法已有综述报道,主要有高效液相色谱法、液质联用法(LC-MS)和气质联用法(GC-MS)。但是,关于牛奶和奶粉中雌激素的文献报道较少。奶及奶制品基质成分复杂,激素残留量低,而且部分激素化学结构相似,影响分析准确性,因此需要建立快速、准确的方法来检测奶及奶制品中的雌激素检测问题。本工作旨在建立一种GC-MS法快速、灵敏、准确测定奶及奶制品中炔雌醇、17 β -雌二醇和雌三醇的残留量。

【实验/操作方法】

本方法是将样品中的雌激素用乙酸乙酯提取,固相萃取的方法净化,衍生后用气相色谱-质谱进行定性、定量。该方法定量准确,灵敏度高,重现性好,能够满足目前奶及奶制品中雌激素检测的需要。

【实验结果/结论】

衍生条件的优化。乙酸乙酯、甲苯和正己烷等有机溶剂在衍生反应的过程中,都能部分地转化炔雌醇的衍生物为雌酮的衍生物,从而造成对样品结果的错误估计。吡啶是较合适的反应介质,不会有衍生物之间的相互转化。

仪器分析方法优化

以全扫描的方式对3种雌激素的衍生物进行测定,得到其质谱图(图1)。根据全扫描质谱图和保留时间,选择合适的定性和定量的特征目标监测离子。测定时,可根据标准物和待测物的定量离子流图中的峰面积,外标法定量。确证时,可根据碎片离子及其丰度比作为其阳性判别的依据。在选定的色谱条件下,标准品的色谱图见图2。

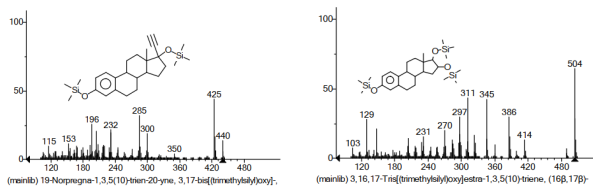


图1.雌二醇、炔雌醇、雌三醇(自上而下)的质谱图

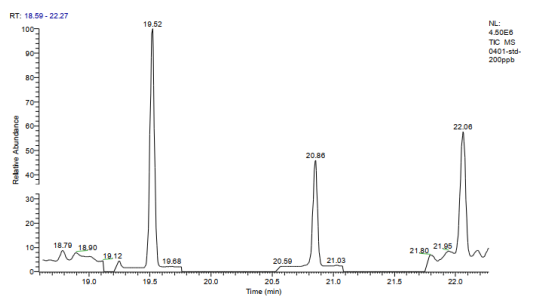


图2. 200ng/mL 雌激素标准溶液衍生产物色谱图
线性关系及测定下限

准确移取适量雌激素混合标准中间液,分别用甲醇稀释配制得到浓度为5、10、20、50、100、200ng/L的标准工作液,各取1mL氮气吹干,加入衍生试剂和吡啶,按上述方法进行衍生,供气相色谱质谱测定。以测定峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线如图3。方法检出限以3倍信噪比计

算得到,本方法牛奶的测定低限为0.5 μ g/kg,奶粉的测定低限为2.0 μ g/kg。

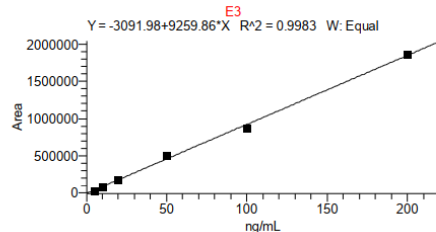


图3.三种雌激素的线性情况

回收率及精密度实验

用标准添加法,在空白牛奶和奶粉样品中,添加雌激素混合标准溶液,做加标回收实验,按上述方法进行提取、净化、衍生和测定,牛奶样品添加浓度为1 μ g/kg和2 μ g/kg两个水平,奶粉样品添加水平为10 μ g/kg,各做3个平行,空白样品、添加谱图见图4,结果见表1。

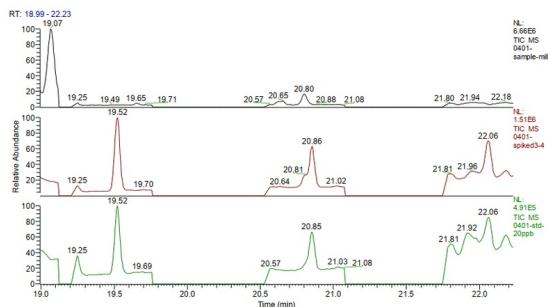


图4.样品空白和样品加标谱图(自上而下依次为空白样品、样品加标、标准溶液)

表1.空白样品添加实验回收率和精密度

	添加水平 (μ g/kg)					
	1.0		2.0		10.0	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
17 β -雌二醇	72.4	11.7	65.9	8.9	72.2	5.1
炔雌醇	65.4	11.2	61.7	7.1	64.0	9.5
雌三醇	84.6	14.1	76.9	7.7	65.2	4.3

结论

样品中的雌激素经乙酸乙酯提取后,经C18固相萃取小柱净化,衍生后采用赛默飞世尔新型的气相色谱质谱仪检测和确证,外标法定量。结果表明,三种雌激素的平均回收率为61.7-84.6%,3次平行测定的RSD值 $\leq$ 14.1%,方法测定低限为0.5ng/g。此法灵敏度高,能够满足牛奶和奶粉中雌激素的残留分析要求。

【仪器/耗材清单】

仪器

Trace1310-ISQ 气相色谱质谱联用仪,配EI源(ThermoScientific);AS1310自动进样器(Thermo Scientific);恒温干燥箱、离心机、天平、漩涡混合器、氮吹仪、旋转蒸发器、固相萃取仪(Thermo Scientific)

耗材

色谱柱: TG-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) (Thermo Scientific, PN: 26098-1420)

C18 SPE柱, 500mg, 3mL (Thermo Scientific)

试剂与标准品

炔雌醇、17 β -雌二醇和雌三醇标准品: 含量 $\geq$ 99%; 氢氧化钠: 优级纯; 盐酸: 优级纯; 无水硫酸钠: 优级纯; 正己烷、乙酸乙酯、乙腈、吡啶: 衍生试剂: BSTFA+TMCS(99+1)

参考文献:

[1]张和平, 张列兵. 现代乳品工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005, 292.