

大型仪器在食、药品安全中的应用成果(001~008)

水产品中多种雌激素残留的质谱分析方法研究

卢巧梅

(福州大学 测试中心,福州大学食品安全与检测重点实验室,福建 福州 350002)

摘要:建立了同时测定 7 种雌激素残留的液相色谱-串联质谱法. 在最优条件下,待测物呈现良好的线性关系,相关系数均大于 0.995 7,检测限介于 0.500 0~50.00 ng/mL 范围. 鱼肉组织经 C₁₈ 小柱净化浓缩,4.0 mL 乙腈-水(体积比 5:95,%)淋洗,2.0 mL 乙腈-水(体积比 95:5,%)洗脱. 三类鱼肉样品中(鲷鱼、龙胆鱼、多宝鱼)均检出双酚 A 和己二烯雌酚,部分样品中检出雌二醇和雌酮,加标回收率为 85.70%~120.9%. 方法快速、准确,适用于水产品中雌激素多残留的高效测定.

关键词:雌激素;固相萃取;液相色谱;串联质谱;水产品

中图分类号:O657.3

文献标志码:B

文章编号:1006-3757(2016)01-0001-08

DOI:10.16495/j.1006-3757.2016.01.001

Mass Spectrometry Analysis of Diverse Estrogens in Aquatic Products

LU Qiao-mei

(Analytical and Testing Center, Ministry of Education Key Laboratory of Analysis and
Detection for Food Safety (Fuzhou University), Fuzhou 350002, China)

Abstract: Simultaneous determination of seven estrogens residue was developed using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Under the optimal conditions, target compounds presented good linear relationship with correlation coefficients larger than 0.995 7 and limit of detections in the range of 0.500 0~50.00 ng/mL. Fish tissue was extracted by a C₁₈-solid phase extraction cartridge, washed with 4.0 mL of acetonitrile-H₂O (5:95, V/V, %), and then eluted with 2.0 mL of acetonitrile-H₂O (95:5, V/V, %). Both bisphenol A and dienestrol were detected in three different fish samples, while estradiol and estrone were detected in part of the samples. Recoveries were in the range of 85.70%~120.9%. The proposed method is rapid, accurate and suitable to analyze diverse residue of estrogens in aquatic products.

Key words: estrogen; solid phase-extraction; liquid chromatography; tandem mass spectrometry; aquatic product

雌激素是一类常见的内分泌干扰物,会扰乱机体内分泌物的正常生成、转化、代谢和结合,造成生物体免疫、生殖功能异常^[1-2]. 近年来,避孕药和畜牧养殖用药使用量激增,在湖泊、河流、污水中均存在雌激素富集的现象,导致鱼类出现严重性畸形^[3]. 对人类而言,雌激素通过食物链转移,进入人体可诱发儿童性早熟,对成人生育功能也有影响,尤

其对女性影响最为明显,易造成流产、婴儿出生缺陷等问题,甚至诱发卵巢癌、乳腺癌等疾病^[4-5]. 因此,雌激素对环境、生态和人类的影响备受关注,有必要建立灵敏、科学的方法分析雌激素.

目前,雌激素多残留检测分析方法已有综述^[6-7],主要包括气相色谱^[8]、气相色谱-质谱联用法^[9-10]、液相色谱法^[11-12]、液相色谱-质谱联

收稿日期:2016-01-12; 修订日期:2016-02-23.

基金项目:国家自然科学基金(21275029),福州大学科技启动专项基金(2013-XQ-3)

作者简介:卢巧梅(1983-),女,助理研究员,博士,研究方向为色谱分析、食品和药物分析,E-mail: luqm@fzu.edu.cn, Tel: 0591-87893206.

用^[13-16]等。其中,液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)以选择性强、灵敏度高的特点,应用最广。四级杆飞行时间质谱(QTOF-MS)灵敏、分辨率高、特异性强,基于碰撞诱导解析和二级质谱功能,提供化合物的结构断裂原理,在雌激素等药物残留检测中具有良好的应用前景。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

1200系列液相色谱-6520型四级杆飞行时间串联质谱仪(Agilent, USA); Milli-Q超纯水系统(Milipore, USA); 7018-00固相萃取装置(J T Baker公司)。

雌三醇(E₃)、双酚A(BPA)、雌二醇(E₂)、2,4-二氯苯酚(2,4-dcp)、己二烯雌酚(DE)购自Sigma-aldrich公司,炔雌醇(EE)、雌酮(E₁)购自德国Dr Ehrenstorfer GmbH公司。乙腈为色谱纯(Sigma-aldrich公司),乙酸铵购自天津市福晨化学试剂厂,试验用水为超纯水。所有试剂使用前过滤。

1.2 溶液配制及工作曲线绘制

标准溶液:准确称取适量标准品,乙醇溶解,配制成1 000 μg/mL储备液,4℃贮存。乙酸铵溶液:称取0.77 g乙酸铵,定容至1 000 mL,稀释成5.0、1.0 mmol/L溶液,用于后续试验。

工作曲线绘制:混合标准母液用超纯水逐级稀释,获得一系列混标工作溶液。在最优条件下测定,根据峰面积与相应浓度的关系绘制工作曲线。

1.3 液相色谱-质谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈(Φ5 μm, 4.6×150 mm);流动相为H₂O(A)-乙腈(B)二元体系;梯度洗脱;流速0.4 mL/min;进样量8 μL;柱温35℃。质谱选择ESI(-)和多反应监测模式;干燥气温度350℃、流速10 L/min;雾化气压力0.276 MPa;毛细管电压3 500 V;碎裂电压140 V;2 GHz动态拓展采集模式;m/z 100-310。试验所用气体为氮气(纯度>99.9%),碰撞气为高纯氮气(纯度>99.999%)。

1.4 样品处理

样品提取:鲷鱼、龙胆鱼、多宝鱼购自福州马尾水产品批发市场。鱼类去头、鳞、骨及内脏,取鱼肉组织,液氮中研磨成鱼粉。称取0.50 g鱼粉,加入

5.0 mL乙腈,超声提取10 min,10 000 r/min下离心10 min,取上清液。残渣再用2.0 mL乙腈重复提取,合并两次上清液。提取液用正己烷脱脂,每次用量3.0 mL,重复操作二次,弃去正己烷,氮气吹干,用2.0 mL H₂O溶解待用。

固相萃取(SPE):Bond Elut-C₁₈小柱(200 mg/3 mL,Agilent公司)用3.0 mL甲醇活化、3.0 mL水平衡,提取液过柱,4.0 mL乙腈-水(体积比5:95,%)淋洗、2.0 mL乙腈-水(体积比95:5,%)洗脱,收集洗脱液,氮吹浓缩,H₂O定容至1.0 mL,过滤后供HPLC-MS分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱流动相选择

选定Zorbax SB-C₁₈色谱柱(Φ5 μm, 150×4.6 mm),考察乙腈-水、乙腈-1.0 mmol/L乙酸铵及乙腈-5.0 mmol/L乙酸铵作为流动相的效果,结果如图1(a)所示。试验结果表明,乙酸铵浓度增大,雌激素峰面积总体呈下降趋势。故采用乙腈-H₂O为流动相,此时色谱峰响应高、分离效果理想。在分离复杂混合物时,梯度洗脱能提高分析效率、改善分离度。尝试了多种梯度方案对混合物分离的影响。结果发现,最优的梯度洗脱程序为:0~4.0 min,维持65% B;4.0~4.1 min,65%~97% B;4.1~8.0 min,维持97% B;8.0~8.5 min,97%~65% B,流速为0.4 mL/min。在单次分析结束后,充分冲洗和平衡色谱柱。

2.2 MS条件的优化

7种雌激素的化学结构式如图2所示,其结构中含有不同数量的羟基或氯原子,首选ESI(-)检测。为保证母离子良好的传输效率,优化了质谱碎裂电压的影响,如图1(b)所示。当碎裂电压介于140~150 V之间,大部分物质的响应值基本恒定,故选取碎裂电压为140 V。其他质谱参数的选择是为了改善喷雾效果和电离状况,提高方法的灵敏度。经优化,确定干燥气温度350℃,干燥气流速10 L/min。最优条件下,待测物在8 min内实现分离,且形成很强的[M-H]⁻母离子峰和明显的同位素峰(如图3所示)。

2.3 前处理方法探索

对比了两种C₁₈小柱的萃取效果。结果发现,Pro Elut-C₁₈小柱对E₃和BPA的回收率不理想(低

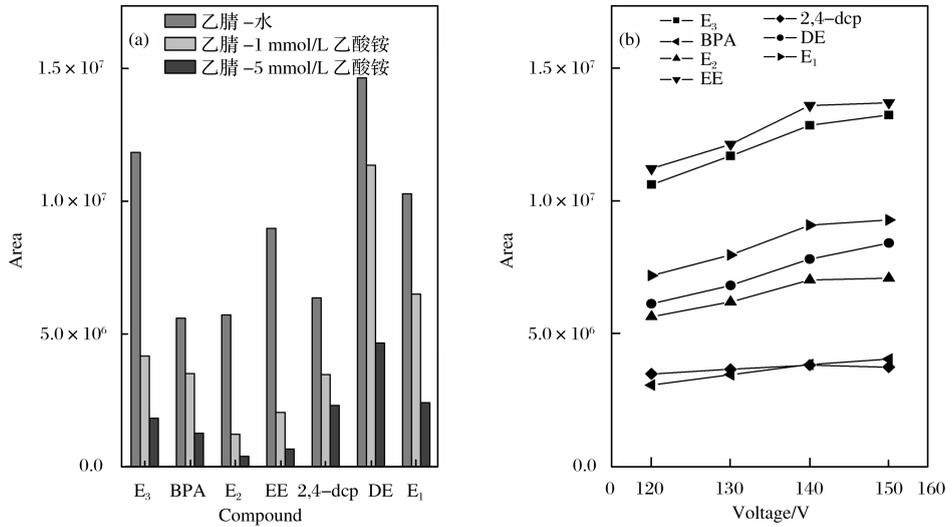


图 1 不同乙酸铵浓度 (a) 和碎裂电压 (b) 对化合物响应的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of ammonium acetate (a) and fragment voltages (b) on response of compound

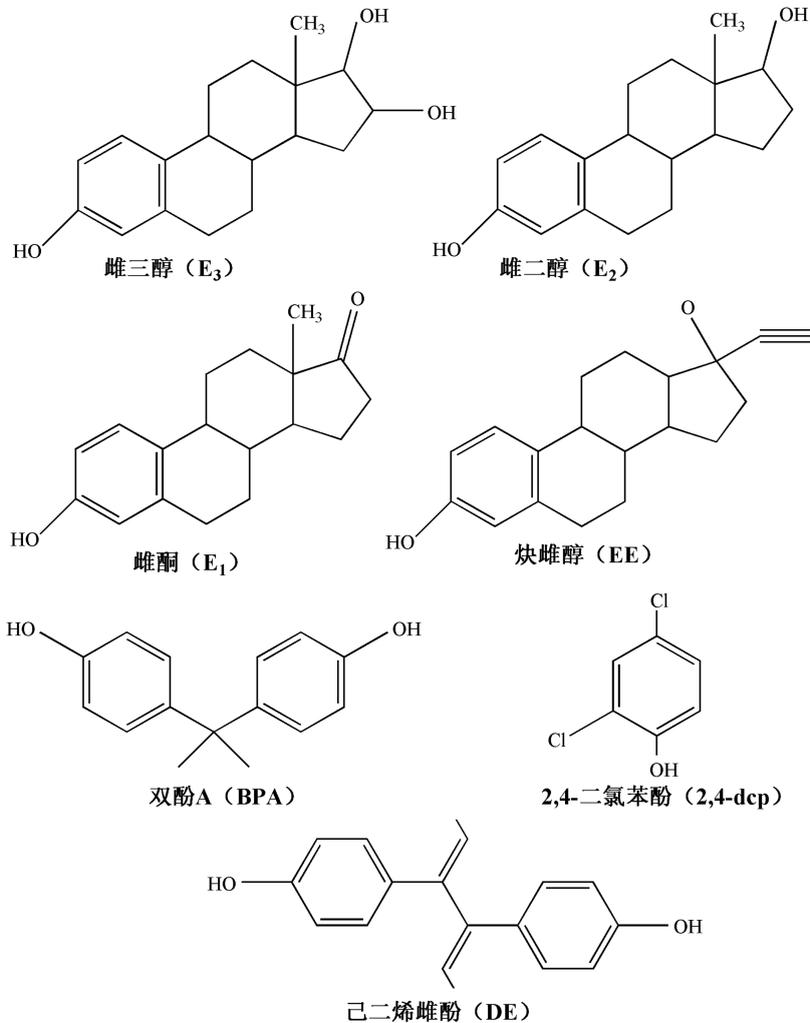


图 2 7 种雌激素结构式

Fig.2 Structures of seven estrogens

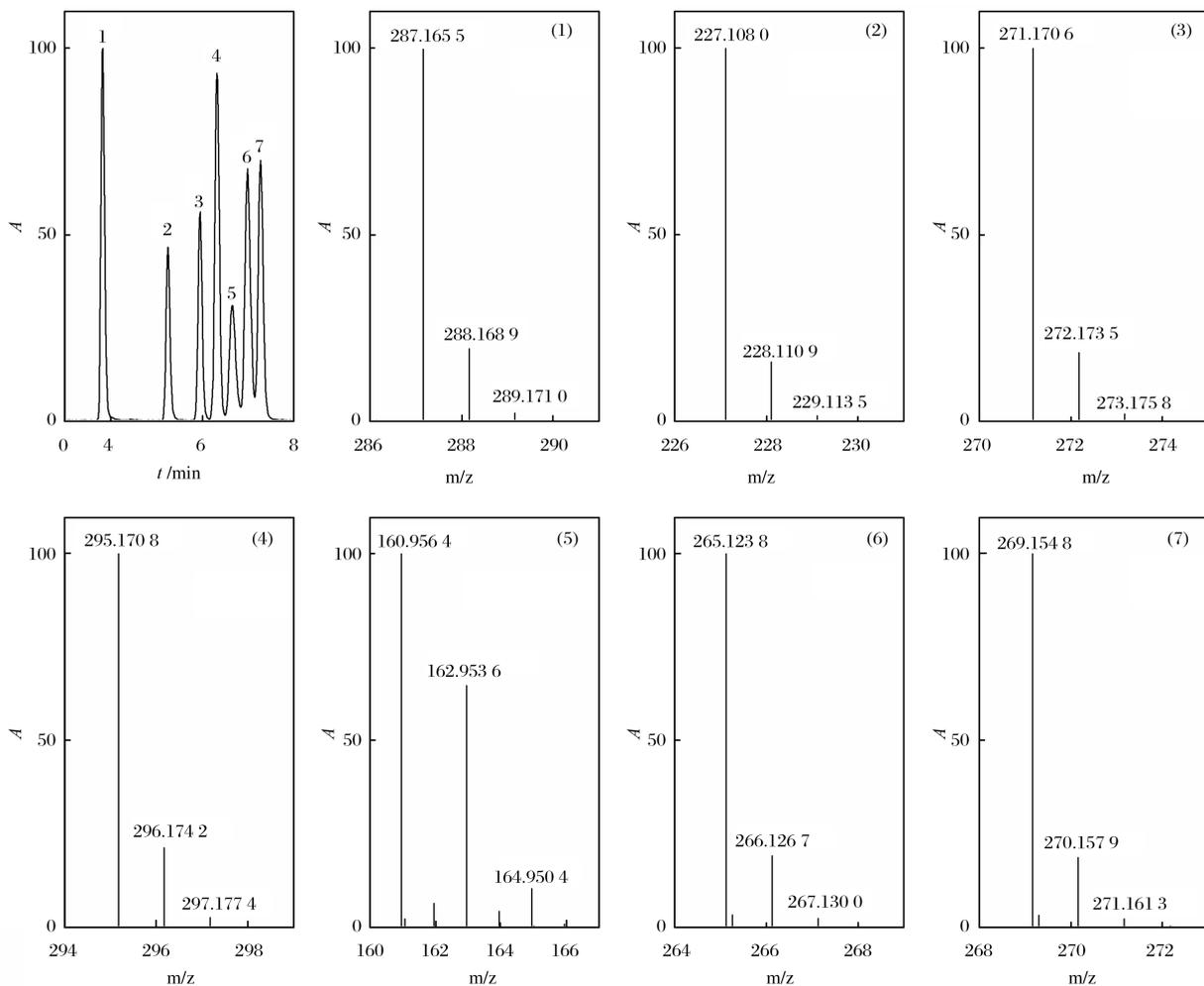


图3 7种雌激素在最优条件下的提取离子流及相应质谱图

Fig. 3 Extracted ion chromatogram and mass spectrograms of seven estrogens under optimal conditions

(1) E_3 (500 ng/mL); (2) BPA (100 ng/mL); (3) E_2 (500 ng/mL); (4) EE (1 000 ng/mL);
(5) 2,4-dcp (500 ng/mL); (6) DE (500 ng/mL); (7) E_1 (500 ng/mL)

于50%)。提取液经 Bond Elut- C_{18} 小柱过柱,采用5%、10%、20%的乙腈-水溶液淋洗。乙腈含量越高,淋洗液的洗脱能力越强。5%乙腈-水淋洗时,后续检测杂质稍多,但利用质谱提取离子功能,目标物测定不受影响且回收率较高。

考察乙腈质量分数在80%~100%的洗脱效果。当乙腈质量分数低于90%时,后续浓缩步骤耗时长、回收率不高;乙腈质量分数为95%时的洗脱效果与100%乙腈接近,因此选择95%乙腈将目标物洗脱。优化了洗脱液体积(1.0~3.0 mL),发现用量为2.0 mL时,目标物回收效果较好。因此, Bond Elut- C_{18} 小柱以4.0 mL 5%乙腈-水淋洗,2.0 mL 95%乙腈洗脱。相较于液液萃取, SPE法操作简便、

节省有机溶剂。

2.4 二级质谱解析

利用串联质谱对分析物进行结构分析(如图4所示)。 E_2 、 E_3 、EE和 E_1 4种组分具有相同母核,形成共同的碎片离子峰 m/z 145.0637(或143.0491)、183.0798,上述物质的断裂原理与文献^[17-18]相符。BPA苯环侧链上两个甲基空间位阻大,推测丢失- CH_3 、- C_6H_5O 、- C_3H_4 等自由基碎片。2,4-dcp对应的碎片离子 m/z 124.9776、89.0034为连续丢失-Cl所得。DE是苯二烯类化合物,分别形成 $[M-H-CH_3]^-$ 、 $[M-H-C_3H_6]^-$ 、 $[C_6H_5O]^-$ 等碎片。后3种物质的多级质谱断裂途径鲜见报道(如图5所示)。

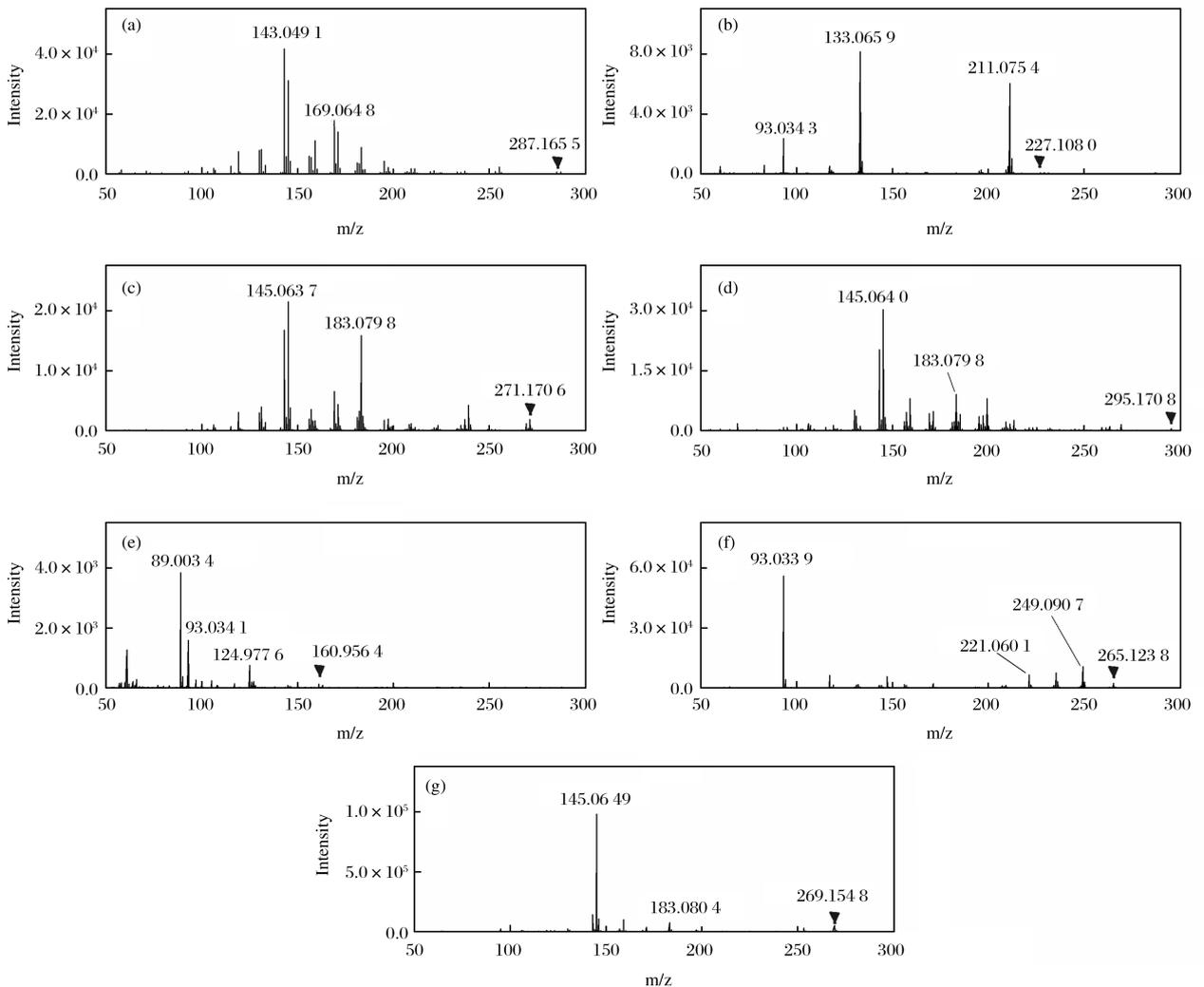


图 4 化合物在最佳碰撞能下的 MS/MS 图

Fig. 4 MS/MS spectrograms of seven compounds under optimal collision energy

(a) E_3 (60 eV), (b) BPA (35 eV), (c) E_2 (55 eV), (d) EE (55 eV),
(e) 2,4-dcp (30 eV), (f) DE (30 eV), (g) E_1 (45 eV)

2.5 方法验证

精确配制 7 种雌激素的系列标准混合液,考察线性关系,以 3 倍信噪比为检测限,结果如表 1 所列. 方法的检测限为 0.500 0 ~ 50.00 ng/mL,相关系数介于 0.995 7 ~ 0.999 9 范围内. 以 200 ng/mL 标准混合液 (BPA 40 ng/mL, EE 400 ng/mL, 其余组分为 200 ng/mL) 进行精密度试验,连续 5 天进样,日间 RSD 小于 9.074%,表明方法稳定且重现,适合于 7 种雌激素的定量分析.

2.6 鱼肉样品分析

鱼肉样品中雌激素的计算公式为: $C_x = C_i \times V/m$, 其中, C_i 为各化合物质量浓度 (由标准曲线计算,

ng/mL), V 为样品处理最后定容的溶液体积 (mL), m 为鱼肉质量 (g). 试验发现,鱼肉样品基质复杂,虽经 SPE 净化,在质谱总离子流图中干扰峰仍较多. 利用 QTOF 质谱的提取离子功能结合保留时间、精确质量数等信息,3 种鱼肉中均检出 BPA 和 DE,部分样品检出 E_2 和 E_1 残留 (如表 2 所列). 向龙胆鱼样品添加两个不同质量浓度的目标物,每个水平测定 3 份样,计算回收率 (如表 3 所列). 由表 3 可得,目标物回收率大于 85.70%, RSD 为 0.837 0% ~ 3.568%,表明方法可靠,满足分析检测的要求.

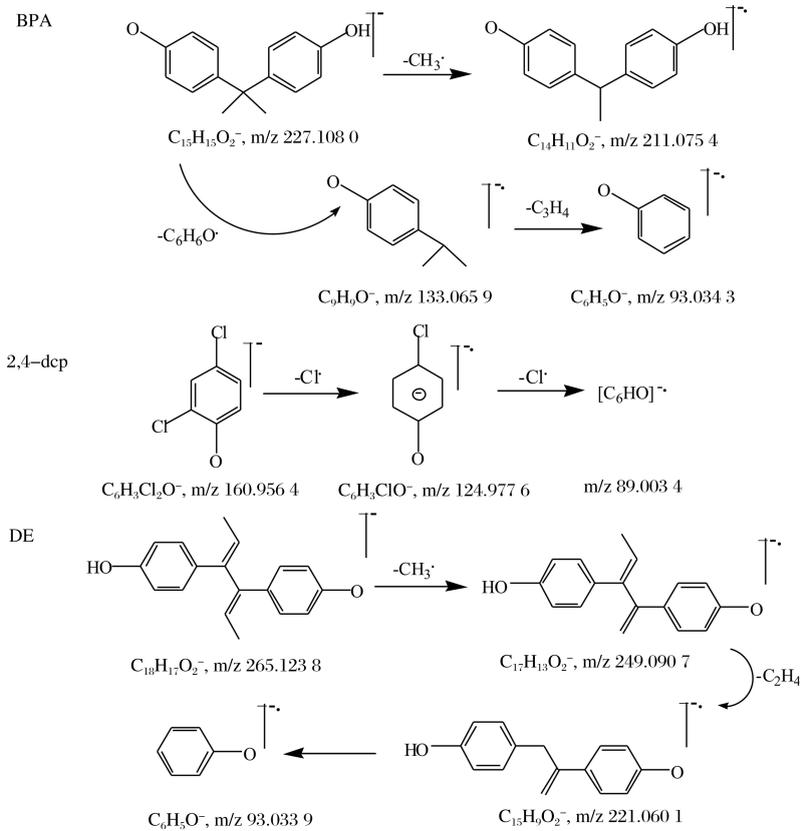


图5 BPA、2,4-dcp和DE的断裂途径

Fig. 5 Fragmentation pathways of BPA, 2,4-dcp and DE

表1 7种雌激素的分析参数

Table 1 Analytical parameters of seven estrogens

分析物	线性范围 /(ng/mL)	相关系数	检测限 /(ng/mL)	日间精密度/($n=5$, RSD, %)	
				保留时间	峰面积
E ₃	2.500 ~ 2 500	0.999 6	1.000	0.219 6	5.101
BPA	0.800 0 ~ 800.0	0.999 9	0.500 0	0.320 4	6.205
E ₂	25.00 ~ 2 500	0.998 2	10.00	0.287 1	8.164
EE	80.00 ~ 5 000	0.995 7	50.00	0.226 9	8.519
2,4-dcp	5.000 ~ 1 000	0.999 9	2.000	0.153 4	8.427
DE	2.000 ~ 2 500	0.999 1	1.250	0.244 1	9.074
E ₁	4.000 ~ 4 000	0.999 3	2.500	0.168 2	4.767

表2 3种鱼肉中7种雌激素的检测结果

Table 2 Results of real samples in three different fishes

($\mu\text{g}/\text{kg}$)

样品	E3	BPA	E2	EE	2,4-dcp	DE	E1
鲷鱼	ND	9.180	124.1	ND	ND	64.920	ND
多宝鱼	ND	8.040	ND	ND	ND	61.060	ND
龙胆鱼	ND	6.920	ND	ND	ND	54.480	50.840

注:“ND”为未检出。

表 3 实际样品回收率
Table 3 Recoveries of real sample

分析物	空白质量浓度 /(ng/mL)	加入质量浓度 /(ng/mL)	测得质量浓度 /(ng/mL)	回收率 /%	RSD /(n=3,%)
E ₃	ND	100.0	96.60	96.60	2.311
		1 000	993.9	99.39	1.633
BPA	3.460	20.00	25.12	108.3	2.601
		200.0	244.4	120.5	1.854
E ₂	ND	100.0	93.10	93.10	3.438
		1 000	1019	101.9	1.131
EE	ND	200.0	179.4	89.70	2.562
		2 000	2 019	101.0	2.034
2,4-dcp	ND	50.00	57.92	115.8	4.105
		500.0	559.6	111.9	1.056
DE	27.24	50.00	70.09	85.70	2.334
		500.0	631.9	120.9	3.568
E ₁	25.42	100.0	135.6	110.2	0.837
		1 000	1 129	110.4	1.456

注:“ND”为未检出。

3 结论

建立了固相萃取-液相色谱-串联质谱快速测定 7 种雌激素残留的方法。结合 Q-TOF-MS/MS 定性精确、结构信息丰富的特点,推测了部分雌激素的裂解途径。此研究能为水产品中激素类药物残留的快速鉴定提供分析手段,也有助于了解雌激素残留分布的规律,为保证食品安全提供方法借鉴。

参考文献:

- [1] 严炜,林金明. 雌激素类内分泌干扰物的液相色谱-质谱分析样品前处理方法 [J]. 分析化学,2010,38(4):598-606.
- [2] 王强,赵静,薛晓锋. 农产品中雌激素的研究进展 [J]. 现代科学仪器,2013,3:23-28.
- [3] Jürgens M D, Holthaus K I E, Johnson A C, et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers [J]. Environ Toxicol Chem, 2002, 21 (3): 480-488.
- [4] 龙鼎新,李勇,陈锋. 环境雌激素的生殖和发育毒性研究进展 [J]. 中国优生优育,2001,1(1):46-48.
- [5] Nagari A, Franco H L. Interplay between inflammatory and estrogen signaling in breast cancer [J]. Cytokine, 2015, 76: 588-590.
- [6] 卢安根,黄志标,杜寒春,等. 水产品中环境雌激素特性及检测技术研究进展 [J]. 广西科学院学报, 2011,27(3):269-272.
- [7] 黄斌,孙雯雯,李晓曼,等. 类固醇雌激素分析方法研究进展 [J]. 安全与环境学报,2015,15(3):367-374.
- [8] 胡伟,黄荣斌,陈小君,等. 用气相色谱考察雌二醇的衍生化方法 [J]. 分析测试技术与仪器,2001,7(1):41-44.
- [9] Fang K, Pan X J, Huang B, et al. Simultaneous derivatization of hydroxyl and ketone groups for the analysis of steroid hormones by GC - MS [J]. Chromatographia, 2010, 72 (9): 949-956.
- [10] Hibberd A, Maskaoui K, Zhang Z, et al. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment [J]. Talanta, 2009, 77: 1315-1321.
- [11] 毛丽莎,孙成均,李永新,等. 柱前荧光衍生-高效液相色谱法测定尿和血清中的环境雌激素 [J]. 分析化学,2005,33(1):33-36.
- [12] 付银杰,高彦征,董长勋,等. SPE-HPLC/FLD 法同

- 时测定水中4种雌激素[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(11): 2296-2303.
- [13] 武中平, 卢剑, 高巍, 等. 液相色谱-质谱法测定塑料食品包装物中11种环境雌激素[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 204-207.
- [14] 于慧娟, 张珊珊, 张晓玲, 等. 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中雌激素、孕激素和雄激素[J]. 质谱学报, 2014, 35(2): 170-178.
- [15] Vihma V, Wang F, Savolainen-Peltonen H, et al. Quantitative determination of estrone by liquid chromatography - tandem mass spectrometry in subcutaneous adipose tissue from the breast in postmenopausal women [J]. J Steroid Biochem, 2016, 155: 120-125.
- [16] 王和兴, 周颖, 姜庆五. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法同时分析奶粉中9种雌激素[J]. 分析化学, 2011, 39(9): 1323-1328.
- [17] Tedmon L, Barnes J S, Nguyen H P, et al. Differentiating isobaric steroid hormone metabolites using multi-stage tandem mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectr, 2013, 24 (3): 399-409.
- [18] 张婷岚, 史美云, 邸欣, 等. 5种雌激素类化合物的电喷雾四级杆飞行时间质谱裂解规律研究[J]. 药理学学报, 2014, 49(4): 507-512.

通知

2016 第十届中国科学仪器发展年会

2016 第十届中国科学仪器发展年会 (Annual Conference of China Scientific Instruments 2016, ACCSI 2016) 将于 2016 年 4 月 22 日在北京隆重召开。该年会将继续秉承“科学仪器行业的达沃斯”论坛的高端定位, 以研究和探讨科学仪器行业以及相关产业现状、追踪发展趋势、促进行业交流为宗旨。

在“新一代信息技术与制造业深度融合”的大趋势下, 作为“立国之本、科技强国之基”的科学仪器行业有哪些新趋势、新热点、新应用, 是业界管理者共同关心的问题。在国家十三五的开局之年, 会议将邀请业内专家、行业领袖深度解读过去 10 年科学仪器行业发展的经验, 与科学仪器制造企业管理者、研发者一起, 从运营、技术、和市场角度, 共同探讨科学仪器行业趋势, 新机遇以及如何抓住机遇。

主办单位: 中国仪器仪表行业协会; 中国仪器仪表学会; 中国仪器仪表学会分析仪器分会; 仪器信息网 (www.instrument.com.cn)。

协办单位: 首都科技条件平台; 我要测网 (www.woyaoce.cn)。

年会网站: <http://acsi.instrument.com.cn>

仪器信息网供稿