

高效液相色谱-串联质谱法测定红糖中雌二醇

高裕锋*, 甄振鹏, 张琳, 余构彬, 郭剑雄, 李海乔

(广州甘蔗糖业研究所, 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 国家糖业质量监督检验中心, 广州 510316)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测红糖中雌二醇的分析方法。**方法** 红糖样品用乙腈提取, 经 QuEChERS 方法净化后, 采用 HPLC-MS/MS 进行分析检测, 在电喷雾质谱负离子模式(ESI⁻), 多反应监测(MRM)模式检测, 同位素内标法定量。**结果** 该方法在 1~50 μg/L 范围内线性良好($r=0.9996$), 检出限为 0.7 μg/kg。分别在样品中添加雌二醇标准溶液 2、5、10 μg/kg 水平上进行添加回收率实验, 方法的回收率范围为 101%~114%, 相对标准偏差为 2.2%~4.9% ($n=6$)。 **结论** 该方法样品前处理简单、快速, 分析时间短, 灵敏度、准确度和精密度满足红糖中雌二醇的检测要求。

关键词: 红糖; 雌二醇; QuEChERS; 高效液相色谱串联质谱法

Determination of estradiol in brown sugar by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

GAO Yu-Feng*, ZHEN Zhen-Peng, ZHANG Lin, YU Gou-Bin, GUO Jian-Xiong, LI Hai-Qiao

(Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Key Laboratory of Sugarcane Improvement and Bio-refinery, China Sugar Inspection Center, Guangzhou 510316, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of estradiol in brown sugar by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The sugar samples were extracted by acetonitrile, cleaned up by developed QuEChERS method, and then analyzed by HPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode via negative electrospray ionization (ESI⁻). Isotope internal standards were used for quantitative analysis. **Results** External standard method was used to determine the estradiol contents with a good linear relationship in the range of 1~50 μg/L ($r=0.9996$). The limit of quantification (LOQ) was 0.7 μg/kg. The recoveries of estradiol at three levels of 2, 5, and 10 μg/kg were from 101% to 114% with the relative standard deviations (RSDs) of 2.2%~4.9% ($n=6$) in brown sugar. **Conclusion** The method is simple, rapid and characterized with acceptable sensitivity and accuracy to meet the requirements of the determination of estradiol in brown sugar.

KEY WORDS: brown sugar; estradiol; QuEChERS; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B040400003, 2013B061800023, 2013B061800007, 2014B040404054, 2016A040403066)

Fund: Supported by Science and Technology Planning Project of Guangdong Province of China (2013B040400003, 2013B061800023, 2013B061800007, 2014B040404054, 2016A040403066)

*通讯作者: 高裕锋, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测、标准化。E-mail: gyuf2001@163.com

*Corresponding author: GAO Yu-Feng, Ph.D, Senior Engineer, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Key Laboratory of Sugarcane Improvement and Bio-refinery, China Sugar Inspection Center, Guangzhou 510316, China. E-mail: gyuf2001@163.com

1 引言

在我国,红糖不仅作甜味剂,而且从古至今都认为是保健品,具有益气养血、健脾暖胃、驱风散寒、活血化淤等功效,特别适于产妇、儿童及贫血者食用^[1]。2015年,一则红糖中检出高含量雌二醇的网络报道引起社会的普遍关注,使人们对目前市场上的红糖产品质量状况产生担忧。雌二醇是一种天然的甾体类雌激素,存在 α 和 β 两种化学构型。其中, β -雌二醇生物学效应最强,它可在动物组织内形成残留,并通过食物链进入人体,容易导致机体代谢紊乱、发育异常、致畸致癌等,严重威胁人类的健康^[2]。

目前,食品中检测雌二醇的方法主要包括气相色谱质谱法^[3-5]和高效液相色谱串联质谱法等^[6-8]。检测对象包括乳制品、水产品、畜禽肉类及内脏等,针对食糖类食品则尚未见报道。QuEChERS法(quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)是目前流行的一种应用于食品或农产品农药残留与兽药残留检测的前处理方法,它最早是由美国化学家 Steven J. Lehotay 和德国 Michelangelo Anastassiadas 提出的^[9-13]。QuEChERS 法结合色谱质谱联用方法可以成功地检测水产品 and 鸡肉中雌二醇残留^[14,15]。本研究根据红糖的基质特点,将 QuEChERS 法与高效液相色谱串联质谱法(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)结合,开发红糖中雌二醇的检验方法,藉此为食品安全监管工作的开展,提供必要的技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

AB 4000 Q-trap 型串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司),配 LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(奥然科技有限公司);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司);电子天平(0.1 mg, 日本 AND 公司)。

雌二醇(17-beta-estradiol)和雌二醇-D₄(estradiol-D₄)标准品(德国 Dr.Ehrenstorfer)购于上海安谱实验科技股份有限公司;甲醇(色谱纯,美国默克公司);N-丙基乙二胺(PSA)填料(40 μ m)、C₁₈ 填料(40 μ m)、石墨化碳(PestiCarb)填料(200 Mesh)和有机相滤膜购于天津博纳艾杰尔科技公司。

实验所用的红糖样品是在网络销售平台随机购买的样品。

2.2 标准溶液配制

分别准确称取雌二醇与雌二醇-D₄标准物质 10.00 mg,用甲醇溶解并定容至 10 mL 制成 1000 mg/L 的标准储备液,标准储备液置于 4 °C 冰箱中保存,有效期为 3 个月。取上述的标准储备液,用甲醇逐级稀释,配制浓度为 1、2、5、

10、20、50 μ g/L 的标准系列溶液;配制雌二醇-D₄内标溶液,浓度为 1 mg/L,并分别加入至标准系列溶液中,使每份溶液中内标浓度为 40 μ g/L。

2.3 提取和净化

准确称取 5.00 g 红糖样品于 50 mL 离心管中,加入 0.2 mL 雌二醇-D₄内标溶液(1 mg/L),并加入 20 mL 乙腈溶剂提取,涡旋振荡 2 min,后置于离心机中,在 8000 r/min 转速下离心 5 min。准确移取 10.0 mL 上清液于离心管中,加入 400mg 无水 MgSO₄,400 mg PSA 填料、200 mg C₁₈ 填料,涡旋振荡 1 min。静置后精密移取 4.0 mL 上清液于 10 mL 刻度试管中,45 °C 水浴氮气吹至近干,用甲醇定容至 1 mL,溶液用 0.22 μ m 有机滤膜过滤,滤液进入 LC-MS/MS 检测。

2.4 LC-MS/MS 分析

2.4.1 液相条件

色谱柱: Ultra AQ C₁₈(100 mm \times 2.1 mm, 3 μ m); 流动相 A: 水, 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱: 0~2 min, 10%B, 2~5 min, 10%B~95%B, 5~7 min, 95%B, 7~9 min, 95%B~10%B, 9~10 min, 10%B。流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μ L。

2.4.2 质谱条件

电离模式: ESI; 采集模式: 多反应监测模式(MRM); 离子喷雾电压: 4500 V; 离子源温度: 550 °C; 气帘气压力: 344.5 kPa, 雾化气压力: 344.5 kPa, 辅助加热气压力: 344.5 kPa; 其他参数如表 1 所示。

3 结果与讨论

3.1 色谱和质谱条件选择

色谱条件优化方法: 在电喷雾质谱检测中, 色谱流动相的组成除了影响保留时间和峰形外, 还会影响离子化效率, 进而影响目标化合物的检测灵敏度。参考文献^[5-7]和国家标准^[8], 本研究依然采用 C₁₈ 类型的色谱柱, 主要优化流动相的条件。比较了乙腈-水和甲醇-水作为流动相时对检测分离效果和灵敏度的影响。结果表明, 以国家标准中推荐的乙腈-水作为流动相, 按照其梯度洗脱条件, MRM 图谱效果并不理想, 雌二醇响应值较低。改用甲醇-水作为流动相并调整梯度洗脱条件, 响应显著提高, 如图 1 所示, 20 μ g/L 标准溶液峰形对称、尖锐, 无其他杂峰干扰。

质谱条件优化方法: 雌二醇化学结构式为 C₁₈H₂₄O₂, 带有羟基, 容易去质子化, 形成负离子峰, 因此采用负离子采集模式^[6]。先通过母离子全扫描, 确定雌二醇的分子离子峰, 然后以该分子离子峰为母离子, 在改变碰撞能量的条件下, 对其子离子进行全扫描, 获得响应较强的子离子, 最后以多反应监测模式采集谱图, 并获得最优的去簇电压和碰撞能量等相关参数, 具体参数如表 1 所示。

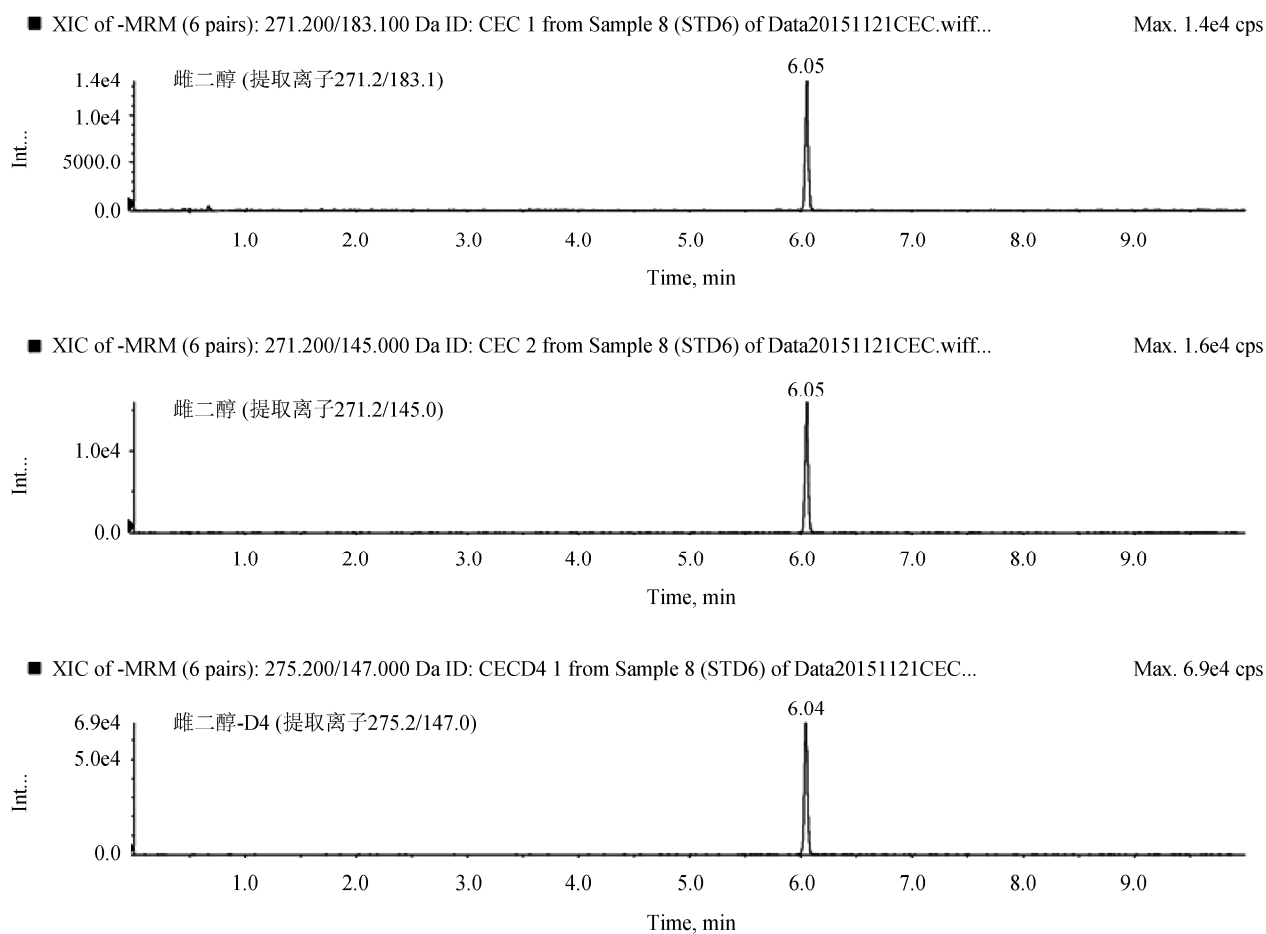
图 1 雌二醇(20 µg/L)和雌二醇-D₄(40 µg/L)标准溶液的提取离子色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms for standard solutions of 17-beta-estradiol (20 µg/L) and estradiol-D₄ (40 µg/L)

表 1 雌二醇和雌二醇-D₄保留时间与多反应监测条件Table 1 The retention time and MRM conditions for 17-beta-estradiol and estradiol-D₄

序号	中文名称	英文名称	保留时间(min)	定量离子	定性离子	去簇电压(V)	碰撞能量(V)
1	雌二醇	17-beta-estradiol	6.05	271.2/183.1	271.2/183.1 271.2/145.0	-120	-52; -52
2	雌二醇-D ₄	estradiol-D ₄	6.04	275.2/147.0	275.2/147.0	-100	-51; -51

3.2 提取方法

雌二醇不溶于水, 易溶于甲醇、乙腈、丙酮等有机试剂, 因此这些溶剂常常作为雌二醇的提取溶剂。分别使用甲醇、乙腈、叔丁基甲醚对红糖中雌二醇进行提取, 实验结果表明使用甲醇和乙腈提取回收率都较高。由于蔗糖在乙腈中的溶解度小于甲醇, 为了减少基质效应的影响, 本研究选用乙腈作为提取溶剂。

3.3 净化方法

QuEChERS 法常用的净化剂主要有 PSA、C₁₈、石墨化碳 3 种材料。PSA 填料含有 NH₂ 基, 可以吸附基质中的有机酸、色素、金属离子、酚类和糖类等; C₁₈ 填料是传统的反相色谱基体, 主要通过疏水相互作用除去基质中的非极性或弱极性物质; 石墨化碳填料的吸附能力较强, 尤其是对于平面分子有极强的亲和力, 常用于去除色素和甾醇

表2 红糖中雌二醇平均回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Average recoveries and relative standard deviations for 17- β -estradiol in brown sugar ($n=6$)

	添加水平 1(2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		添加水平 2(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		添加水平 3(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)
雌二醇(17- β -estradiol)	4.6	114	2.2	103	4.9	101

类物质;加入硫酸镁主要是除去溶液中的水分。红糖主要由蔗糖和其他有机物质组成,利用乙腈提取后,溶液中会存在较多的蔗糖和有机色素类物质。通过调整净化剂的比例,可以有效地消除基质效应,得到较好的回收率。考察了10 mL加标浓度为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 提取液中分别单独加入0、200、400 mg的3种填料时对样品回收率的影响,并进行正交分析。实验结果表明,石墨化碳填料对回收率的影响最大,加入石墨化碳填料会引起回收率显著降低,这是因为雌二醇属于甾醇结构,石墨化碳对其有较强的吸附性;PSA加入可以提高样品回收率,其原因是溶液基质里含有大量的糖类物质,加入PSA可以有效地吸收糖类物质; C_{18} 填料对样品回收率基本没有影响。通过上述比较,最终选择加入400 mg的PSA填料和200 mg的 C_{18} 填料作为实验的净化材料。

3.4 方法线性范围和检出限

利用LC-MS/MS对1.0~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准工作溶液进样分析,以质谱峰面积作为Y轴,标准物质浓度作为X轴,拟合线性方程。雌二醇标准曲线的相关系数为0.9996,线性关系良好。以标准曲线上的最低浓度点的3倍信噪比计算方法检出限(LOD),以标准曲线上的最低浓度点的10倍信噪比计算方法定量限(LOQ),得出雌二醇检出限为0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,基本可以满足雌二醇痕量分析的需要。

3.5 回收率和精密度

以不含雌二醇的红糖样品作为基质,在2、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上进行添加回收实验,每个水平分别做6次重复实验,结果如表2所示。3个添加水平的平均添加回收率在101%~114%之间,相对标准偏差在2.2%~4.9%之间,符合国内外残留分析的要求。

3.6 实际样品测试

按上述方法检测了在网络上随机采购的30份红糖样品,其中包括国内品牌红糖和台湾地区、日本、韩国、新西兰产的红糖。结果显示,所有的红糖样品均未检测出雌二醇。

4 结论

本文建立了通过QuEChERS净化,高效液相色谱-串联质谱检测红糖中雌二醇的方法。该方法简单、快速、准确,可满足目前食品安全监管的检测工作需要。

参考文献

- [1] 保国裕,蓝艳华,朱绍熹.甘蔗原汁红糖的活性营养物与开发应用优势[J].甘蔗糖业,2015,1:30-36.
Bao GY, Lan YH, Zhu SX. The active nutrients and application development advantages of brown sugar[J]. Sugar Cane Sugar, 2015, 1: 30-36.
- [2] 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.
Hu W, Huang RB, Chen XJ, et al. Study on derivation method of dihydrotheelin by gas chromatography[J]. Anal Test Technol Instrum, 2001, 7(1): 41-44.
- [3] GB 29698-2013 食品安全国家标准奶及奶制品中17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇多残留的测定气相色谱-质谱法[S].
GB 29698-2013 Determination of 17 β -estradiol, estriol and ethinylestradiol residues in milk and milk products by gas chromatography-mass spectrometric method [S].
- [4] 张秀珍,徐英江,宫向红,等.气相色谱质谱法同时测定水产品中8种雌激素类化合物[J].中国水产科学,2009,05:791-797.
Zhang XZ, Xu YJ, Gong XH, et al. Determination of eight estrogens in aquatic products by GC-MS [J]. J Fish Sci China, 2009, 05:791-797.
- [5] 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.
Liao T, Wu XC, Wang SH, et al. Simultaneous detection of nine kinds of estrogens in water by solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(3): 422-426.
- [6] 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.
Xu YJ, Tian XH, Zhang XZ, et al. Determination of 8 estrogen in aquatic products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2010, 29(2): 152-156.
- [7] 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.
Kang HN, OuYang S, Lin L, et al. Determination of three estrogens in animal liver and kidney tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(10): 986-990.
- [8] GB/T 21981-2008 动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S].
GB/T 21981-2008 Determination of hormone multiresidues in food stuffs of animal origin-LC-MS/MS method [S].
- [9] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbauer D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412.

- [10] Lehotay SJ, Mastovská K, Lightfield AR. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(2): 615.
- [11] 高裕锋, 甄振鹏, 郭剑雄, 等. 高效液相色谱串联质谱测定甘蔗中 12 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. *甘蔗糖业*, 2013, 1: 58-62.
Gao YF, Zhen ZP, Guo JX, *et al.* Determination of 12 kinds of carbamate pesticide residues in sugarcane by HPLC-MS/MS [J]. *Sugar Cane Sugar*, 2013, 1: 58-62.
- [12] 连英杰, 林升航, 曾琪, 等. QuEChERS/超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法检测鸡肉中 11 种激素类药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(2): 384-392.
Lian YJ, Lin SH, Zeng Q, *et al.* Determination of 11 hormones residues in chicken using QuEChERS sample preparation method with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(2): 384-392.
- [13] Klinsunthorn N, Petsom A, Nhujak T. Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2011, 55: 1175-1178.
- [14] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 30 种激素类及氯霉素类药物残留[J]. *分析测试学报*, 2011, 12: 1329-1337.
Luo HT, Huang XL, Wu HQ, *et al.* Simultaneous determination of 30 hormones and chloramphenicols residues in fish using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2011, 12: 1329-1337.
- [15] 马丽莎, 戴晓欣, 谢文平, 等. QuEChERS/GC-MS 法同时测定鱼、虾中的雌二醇与己烯雌酚残留[J]. *分析测试学报*, 2015, 1: 62-66, 72.
Ma LS, Dai XX, Xie WP, *et al.* Simultaneous determination of diethylstilbestrol and estradiol in fish and shrimp by GC-MS with QuEChERS sample preparation [J]. *J Instrum Anal*, 2015, 1: 62-66, 72.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



高裕锋, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测、标准化。
E-mail: gyuf2001@163.com