

# 液质联用与气质联用测定水产品中雌二醇残留的方法比较

张泸文, 王柯, 刘畅\*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 比较分析高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)和气相色谱-质谱法(gas chromatography- mass spectrometry, GC-MS)测定水产品中雌二醇残留。**方法** HPLC-MS/MS法: 样品中的雌二醇经酶解, 用甲醇-水溶液提取, 经固相萃取富集净化, 采用HPLC-MS/MS测定, 以内标法定量; GC-MS法: 酸性条件下, 以乙腈提取样品中的雌二醇, 经过正己烷脱脂, C<sub>18</sub>固相萃取柱净化, 硅烷化试剂衍生化后, 采用GC-MS测定, 以内标法定量。**结果** HPLC-MS/MS和GC-MS分别在0.4~10 µg/kg和0.5~10 µg/kg浓度范围内有良好的线性关系, 相关系数 $r$ 分别为0.9996和0.9994; 方法检出限分别为0.4 µg/kg和0.5 µg/kg; HPLC-MS/MS方法在0.4、5和10 µg/kg添加水平的回收率为88.81%~106.0%, 精密度为2.5%~6.5%; GC-MS方法在0.5、1和5 µg/kg添加水平的回收率为80.24%~96.60%, 精密度为1.4%~5.4%。**结论** 两种检测方法线性关系良好, 均可同时定量和定性。但HPLC-MS/MS降低了方法检出限, 灵敏度更高, 并且前处理方法更为简便、省时、高效, 可有效提高水产品中雌二醇残留的检测效率, 节约检测成本, 并为水产品质量监控与检测提供了技术参考。

**关键词:** 雌二醇; 高效液相色谱-串联质谱法; 气相色谱-质谱法; 固相萃取

## Comparative study on the determination of estradiol residue in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry

ZHANG Lu-Wen, WANG Ke, LIU Chang\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: Objective** To compare the detection methods of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the determination of estradiol residues in aquatic products. **Methods** Samples for HPLC-MS/MS detection were extracted with methanol-water solution after enzymatic hydrolysis, cleaned up by solid-phase extraction, and then analyzed by HPLC-MS/MS and quantified by internal standard method. Meanwhile, the samples for GC-MS detection were extracted with acetonitrile under acidic condition, degreased by n-hexane, cleaned up by C<sub>18</sub> solid phase extraction column before derivative reaction with silane agents, and finally quantified by internal standard method. **Results** The correlation coefficients of HPLC-MS/MS method and GC-MS method were respectively 0.9996 and 0.9994 in the corresponding concentration ranges of 0.4~10 µg/kg and 0.5~10 µg/kg, respectively. The limits of detection of

\*通讯作者: 刘畅, 副主任药师, 主要研究方向为食品检测与食品安全。E-mail: cible@sina.cn

\*Corresponding author: LIU Chang, Associate Chief of Pharmacy, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: cible@sina.cn

HPLC-MS/MS method and GC-MS method were 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The mean recoveries of estradiol spiked at 3 levels of 0.4, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  by HPLC-MS/MS method were within 88.81%~106.0% with relative standard deviations (RSD) of 2.5%~6.5%; while the mean recoveries of estradiol spiked at 3 levels of 0.5, 1, 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  by GC-MS method were within 80.24%~96.60% with RSD of 1.4%~5.4%. **Conclusion** Two methods showed that estradiol had good linear relationships, which were suitable for quantitative and qualitative analysis. However, HPLC-MS/MS method has higher sensitivity and lower detection limit, with a more simple and efficient pretreatment, which can greatly increase the testing efficiency of estradiol residues in aquatic products and provide a reference for the quality and safety monitoring and detection of aquatic products.

**KEY WORDS:** estradiol; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; gas chromatography-mass spectrometry; solid-phase extraction

## 1 引言

雌二醇是一种甾体雌激素, 具有促生长作用, 在水产、禽畜养殖繁育中有广泛的药理作用。雌二醇掺在预混料及饲料添加剂中喂养水产, 可以大大加快其繁殖和生长, 提高生产率和产量, 但雌二醇及其衍生物却可滞留在体内, 通过食物链危害人类健康, 且对人体的危害是长期、累积性的<sup>[1]</sup>。研究发现, 人体中雌二醇含量水平与某些肿瘤、子宫癌和肝癌等有显著相关性<sup>[2-5]</sup>。因此, 需加强对农产品和食品中雌二醇残留的监测。我国农业部 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》<sup>[6]</sup>中明确规定, 动物性食品中不得检出雌二醇。

目前, 测定水产品中雌二醇残留的检测方法主要有液相色谱法(liquid chromatography, LC)<sup>[7-9]</sup>、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)<sup>[10,11]</sup>以及高效液相色谱-串联质谱法(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)<sup>[12-13]</sup>。LC 法仅靠保留时间定性, 易产生假阳性结果, 且方法的检出限高。GC-MS 和 HPLC-MS/MS 法可同时进行定量和定性分析, 灵敏度高、检测限低, 是雌二醇残留检测中最常用的方法<sup>[14]</sup>。欧盟非强制执行政案 2002-657-EC 中指定使用 GC-MS 或 HPLC-MS/MS 方法检测食品中的雌激素<sup>[15]</sup>。本研究比较了 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法 高效液相色谱-串联质谱法》<sup>[16]</sup>和农业部 958 号公告-10-2007《水产品中雌二醇残留量的测定 气相色谱-质谱法》<sup>[17]</sup>两种检测方法, 并对其测定水产品中雌二醇残留进行评价和分析, 从而为水产品质量安全的监控与检测提供参考。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

5500 型四极杆串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司), 配超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 电子分析天平(精度

为 0.0001 g, 德国 Sartorius ME 公司); Thermo ST40R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); OA-SYS 氮吹仪(美国 Organonation Associates Jnc 公司); VIBRAX VXR 振荡器(德国 IKA 公司); MS3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); 石墨化炭黑固相萃取柱(500 mg, 6 mL, 上海安谱公司)和氨基固相萃取柱(500 mg, 3 mL, 上海安谱公司); C<sub>18</sub> 固相萃取柱(500 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司)。

标准物质: 雌二醇标准品购自欧洲药品质量管理局(European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM), 纯度 100%。雌二醇-D<sub>2</sub> 购自美国 Sigma 公司, 纯度 98.7%。

乙腈、甲醇、二氯甲烷、正己烷、正丙醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙酸铵(色谱纯, 美国 Sigma 公司);  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/芳香基硫酸酯酶(德国 Merck 公司); 乙酸、乙酸钠、二硫赤藓糖醇(dithioerythritol, DTE)、N-甲基三甲硅基三氟乙酰胺(methyl three methyl silicon fluorine acetamide, MSTFA)、三甲基碘硅烷(three methyl iodide silane, TMIS)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

鱼、虾均为上海市购, 取其肌肉部分, 均质混匀, 储存于-20 °C 冰箱中待测。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液的配制

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准储备溶液的配制: 精密称取雌二醇标准物质 10 mg (精确至 0.1 mg), 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 于 4 °C 冰箱保存。

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准使用溶液的配制: 精密量取 1 mL 标准储备溶液, 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标储备液配制: 精密称取雌二醇-D<sub>2</sub> 约 10 mg(精确至 0.01 mg), 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标使用溶液的配制: 精密量取 1 mL 内标储备溶液, 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。

标准工作溶液的配制: 精密量取 0.5 mL 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内标使用溶液, 置 10 mL 容量瓶中, 根据需要加入上述质量浓

度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准使用溶液置同一容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度分别为 0.4、1、2、4 和 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的系列标准溶液,供 HPLC-MS/MS 分析;配制成质量浓度分别为 0.5、1、2、5 和 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的系列标准溶液按样品衍生化方法同步操作,供 GC-MS 测定。

#### 2.2.2 衍生化试剂配制

准确称取 0.01 g DTE,溶解于 5 mL MSTFA,然后在液面下加入 10  $\mu\text{L}$  TMIS,混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  放置过夜后使用,避光防潮密封保存。衍生化试剂应是无色,如果发生棕红色颜色变化,表明试剂失效。

#### 2.2.3 仪器条件

##### 2.2.3.1 液相色谱-串联质谱条件

###### (1) 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH- $\text{C}_{18}$  (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为水, B 为乙腈; 流速: 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 10%~50%B; 3~6 min, 50%B; 6~10 min, 50%~100%B; 10.1~14 min, 10%B。柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

###### (2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI); 检测方式: 多反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM); 扫描方式: 负离子 ( $\text{ESI}^{-}$ ) 模式; 电喷雾电压 (ion spray voltage, IS): 5500 V ( $\text{ESI}^{-}$ ); 帘气 (curtain gas, CUR): 35 L/min; 碰撞气 (collision gas, CAD): 9 L/min; 雾化器 (ion source gas1, GS1): 55 L/min; 辅助气压力 (ionsource gas2, GS2): 45 L/min; 离子源温 (temperature, TEM): 550  $^{\circ}\text{C}$ ; 扫描时间: 0.1 s。

##### 2.2.3.2 气相色谱-串联质谱条件

###### (1) 气相色谱条件

DB-5MS 毛细管柱 (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ), 流量为 1.0 mL/min, 载气为氮气; 不分流进样, 进样量为 1.0  $\mu\text{L}$ ; 进样口温度为 250  $^{\circ}\text{C}$ ; 程序升温: 初始温度 120  $^{\circ}\text{C}$  维持 2 min, 以 25  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升温至 250  $^{\circ}\text{C}$ , 再以 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升温至 300  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 5 min。

###### (2) 质谱条件

四极杆温度为 150  $^{\circ}\text{C}$ , 传输线温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , EI 能量为 70 eV, 离子源温度为 230  $^{\circ}\text{C}$ , 溶剂延迟 8 min, 采集模式为选择离子监测 (selected ion monitoring, SIM) 方式。

#### 2.2.4 样品前处理

##### 2.2.4.1 液相色谱-串联质谱

###### (1) 样品提取

精密称取 5.0 g 试样 (精确至 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 精密加入内标工作溶液 50  $\mu\text{L}$ , 加入 10 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (pH 5.2), 涡旋混匀。再加入  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/芳香基硫酸酯酶溶液 20  $\mu\text{L}$ , 混匀后于 (37 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$  振荡酶解 12 h。取出冷却至室温, 加入 25 mL 甲醇超声提取 30 min, 0~4  $^{\circ}\text{C}$  下以 10000 r/min 离心 10 min; 取上清液至洁净烧杯

中待净化。

###### (2) 样品净化

将提取液以 2~3 mL/min 的速度通过活化过的石墨化碳黑固相萃取柱 (CNW, 500 mg, 6 mL) 后将小柱减压抽干。然后将活化过的氨基固相萃取柱 (CNW, 500 mg, 3 mL) 串联在石墨化碳黑柱下方。用 6 mL 二氯甲烷-甲醇洗脱, 收集洗脱液。取下石墨化碳黑柱, 再用 2 mL 二氯甲烷-甲醇洗氨基小柱, 合并洗脱液, 在微弱的氮气流下吹干, 用 1 mL 甲醇-水涡旋溶解残渣, 待液相色谱-串联质谱测定。

##### 2.2.4.2 气相色谱-串联质谱

###### (1) 样品提取

准确称取粉碎并混匀的试样 5 g (精确至 0.01 g) 置 50 mL 具塞离心管中, 精密加入内标工作溶液 50  $\mu\text{L}$ , 再加入 5 mL 乙酸钠缓冲溶液, 均质 1 min 后, 加入 10 mL 乙腈, 涡旋混合 1 min, 超声提取 15 min。取出离心管, 4600 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, 上清液倒入另一 50 mL 具塞离心管中。残渣中加入 10 mL 乙腈, 按上述方法再提取一次, 上清液合并于 50 mL 离心管中。

###### (2) 样品净化

向盛装上清液的离心管中加入 10 mL 正己烷, 加塞剧烈振荡 1~2 min, 以 4600 r/min 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下冷冻离心 5 min, 弃去正己烷层。再加入 10 mL 正己烷, 按上述方法重复洗涤一次, 所得溶液转移至鸡心瓶中, 加入 0.5 mL 正丙醇, 摇匀, 于 45  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下减压旋转蒸发至干。残渣中加入 1 mL 乙腈, 超声波清洗瓶壁 1 min, 用 5 mL 注射器吸取, 重复上述操作, 合并乙腈至 5 mL 注射器, 用针头过滤器经有机相滤膜过滤至 10 mL 具塞刻度管中, 加水至 10 mL, 涡旋混匀。

$\text{C}_{18}$  固相萃取柱 (Waters, 500 mg, 3 mL) 依次用 6 mL 甲醇、3 mL 乙酸溶液和 3 mL 水清洗并活化, 弃掉洗涤液。吸取待测溶液过柱, 弃掉流出液。用 3 mL 水洗涤  $\text{C}_{18}$  柱, 弃掉流出液。再用 9 mL 乙腈洗脱, 将洗脱液接收至 10 mL 离心管中, 于 50  $^{\circ}\text{C}$  下氮气吹至约 1 mL, 用滴管吸至样品反应瓶中, 用 0.5 mL 乙腈洗玻璃管, 合并至同一样品反应瓶中, 氮气吹干, 并注意防潮。

###### (3) 样品衍生化

向吹干的残留物中准确加入 100  $\mu\text{L}$  衍生化试剂, 盖紧塞子并涡旋混合 1 min, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中反应 30 min, 冷却至室温, 于 48 h 内进行气相色谱-质谱分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱质谱条件的优化

流动相的组成是影响待测物质峰形、响应和保留时间的重要因素, 实验考察了甲醇-水和乙腈-水两种流动相对雌二醇的分离效果。结果表明, 以甲醇-水作流动相时, 雌二醇的峰型不理想, 拖尾较为严重; 以乙腈-水作流动相时

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。

根据雌二醇的分子结构特征, 选择 ESI 源负离子模式扫描。将标准溶液利用流动注射泵注入离子源, 对其进行全扫描, 确定其母离子, 通过优化电喷雾电压、气帘气电压、雾化器压力、辅助气压力使母离子丰度及稳定性最佳; 然后对其进行子离子扫描, 得到碎片信息, 并对二级质谱的去簇电压、入口电压、碰撞能量和碰撞池出口电压等条件进行优化, 使特征碎片离子的强度及稳定性达到要求。

雌二醇和雌二醇-D<sub>2</sub> 的定量和定性离子、碰撞能量等

参数见表 1。雌二醇总离子流图和雌二醇-D<sub>2</sub> 提取离子流图见图 1。

### 3.2 气相质谱条件的优化

雌二醇及其内标衍生物的极性较弱, 采用 DB-5MS 弱极性的色谱柱, 符合相似相溶原则, 使目标峰出峰较晚, 同时利用柱程序升温能有效分离目标峰和干扰峰, 形成良好的色谱峰进行定性定量。

雌二醇的保留时间和定性、定量离子见表 2, 雌二醇和雌二醇-D<sub>2</sub> 提取离子流图分别见图 2 和图 3。

表 1 雌二醇和雌二醇-D<sub>2</sub> 的质谱分析参数  
Table 1 Mass parameters for estradiol and estradiol-D<sub>2</sub>

分析物	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	去簇电压(eV)	碰撞能量(eV)	入口电压(eV)	出口电压(eV)
雌二醇	(-)271.3	145.2	-110	-53	-6	-26
雌二醇-D <sub>2</sub>	(-)273.3	182.8	-110	-48	-6	-26
		147.2	-100	-54	-6	-15

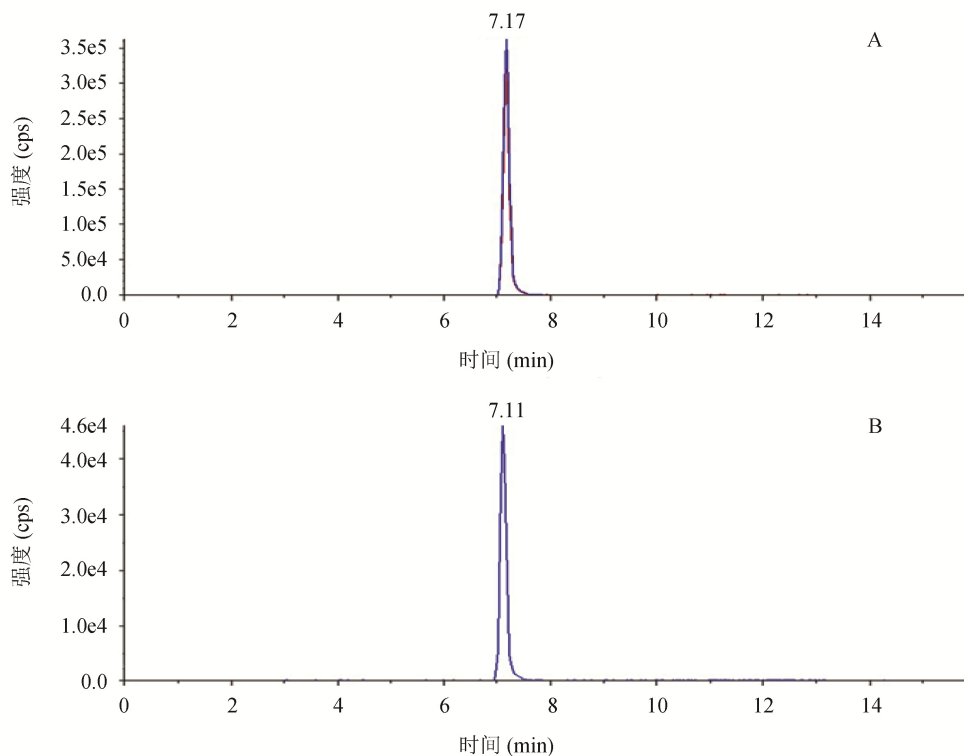


图 1 雌二醇和雌二醇-D<sub>2</sub> 的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of estradiol and estradiol-D<sub>2</sub>  
A 为雌二醇的总离子流图; B 为雌二醇-D<sub>2</sub> 的提取离子流图

A: total ion chromatogram of estradiol; B: extract ions chromatogram of estradiol-D<sub>2</sub>

表 2 雌二醇的质谱分析参数  
Table 2 Mass parameters for estradiol

分析物	保留时间(min)	定量离子( $m/z$ )	定性离子 ( $m/z$ )
雌二醇	12.89	416	285
雌二醇-D <sub>2</sub>	12.89	418	287

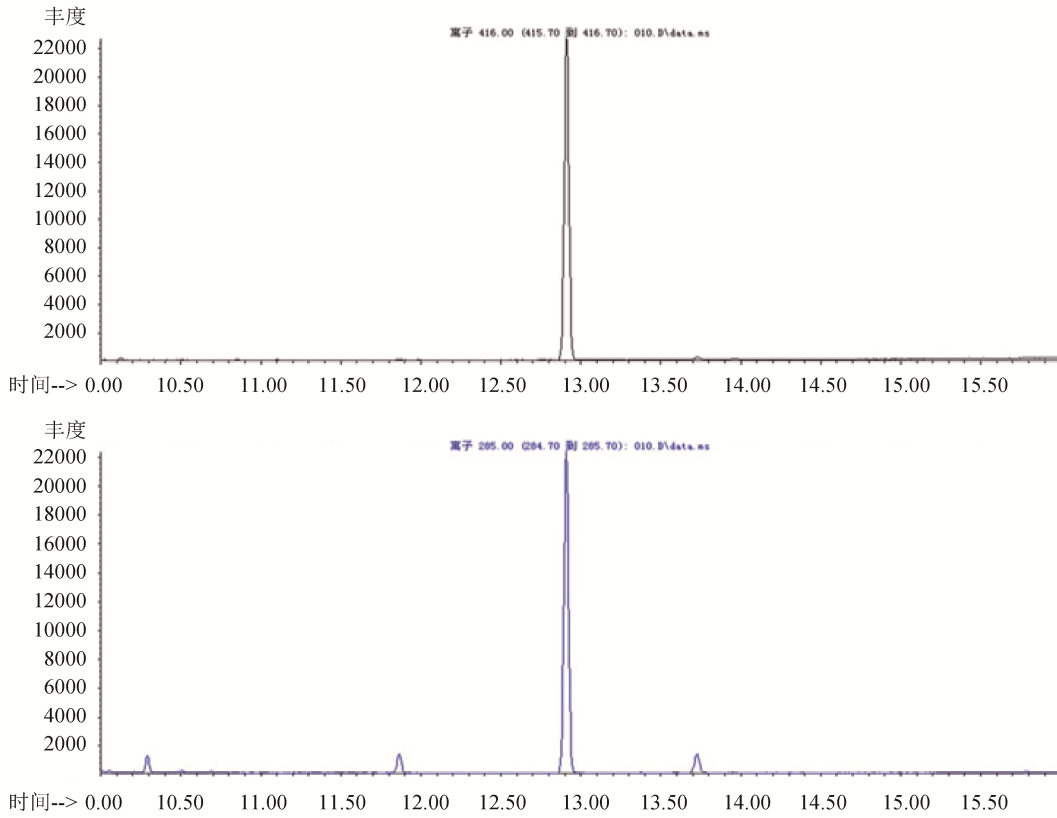


图 2 雌二醇的提取离子流图  
Fig.2 Extract ions chromatograms of estradiol

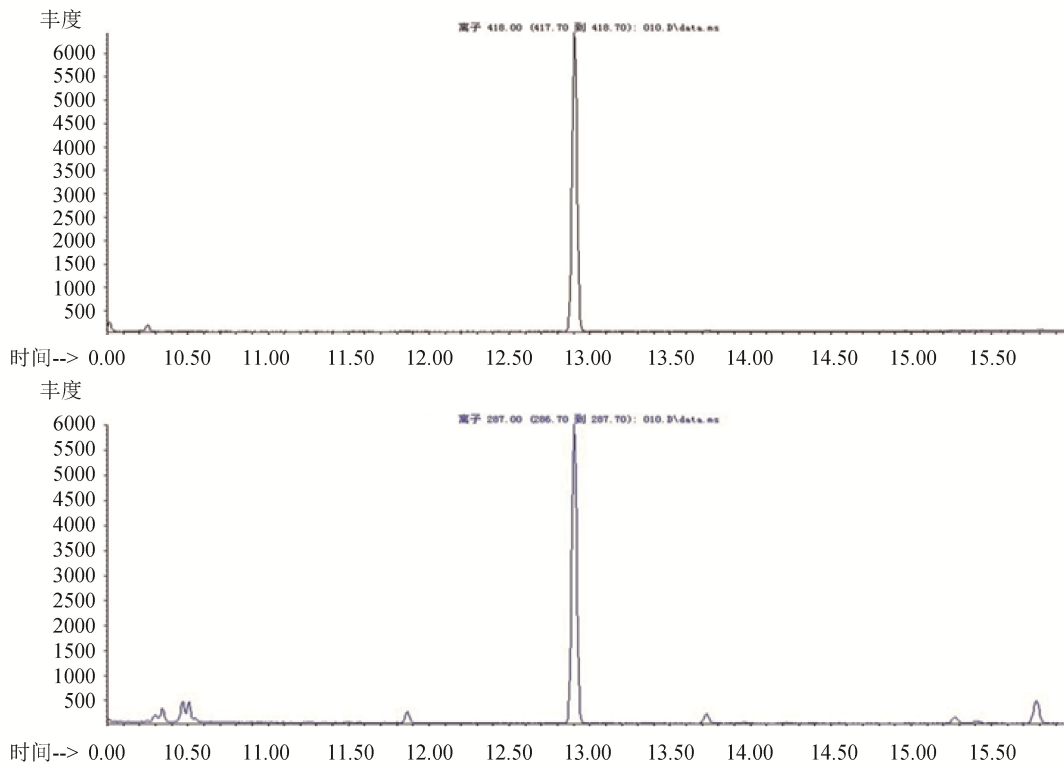


图 3 雌二醇-D<sub>2</sub>的提取离子流图  
Fig.3 Extract ions chromatograms of estradiol-D<sub>2</sub>

### 3.3 前处理方法的比较

#### 3.3.1 提取方式的比较

雌二醇多以生物体蛋白结合存在, 游离态很少, 在用有机溶剂提取样品前, 必须将结合态的雌二醇水解成游离态雌二醇, 才能提取完全。常用的方法为酸、碱水解法和酶解法, 其中酶解法较为温和, 适用于对酸碱不稳定的化合物。本研究, HPLC-MS/MS 法采用在乙酸钠的缓冲溶液中进行酶解, GC-MS 法利用在乙酸钠的缓冲溶液中均质提取, 不进行酶解。两种方法相比, HPLC-MS/MS 法采用酶解法能够有效将结合态雌二醇游离出来, 提高雌二醇测定的准确性, 同时在弱酸介质的乙酸钠缓冲溶液中进行水解, 可去除一些碱性杂质, 并且酶解过夜后酶解完全, 使经处理后色谱图杂峰减少。

#### 3.3.2 提取溶剂的比较

提取溶剂的选择是提高提取效率的关键。由雌二醇的结构可知, 中间的多个碳环为非极性部分, 两端的羟基为极性基团, 能同时溶于极性和非极性溶剂中。HPLC-MS/MS 法和 GC-MS 法分别采用甲醇-水和乙腈-水提取, 经对比二者并无明显差异, 提取回收率均大于 90%(见表 3)。但乙腈、甲醇和水互溶, 会将一部分水溶性蛋白一并提取出来, 带来更多杂质, 使萃取溶液浑浊, 不利于后续净化。而据文献报道, 乙酸乙酯极性与雌二醇极性相近, 提取效率较高, 样品经乙酸乙酯提取后干扰物质较少, 基线干扰小, 水分含量少、易浓缩, 是最佳的萃取溶剂<sup>[18-21]</sup>。故可考虑用乙酸乙酯作为提取溶剂。

表 3 提取溶剂的比较  
Table 3 Comparison of extraction solvents

分析物	分析方法	提取溶剂	回收率(%)
雌二醇	HPLC-MS/MS	甲醇-水	95.28
	GC-MS	乙腈-水	90.15

#### 3.3.3 净化方法的比较

GC-MS 法先经正己烷脱脂, 浓缩后再经 C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化。雌二醇的极性不强, 在正己烷中有一定的溶解度, 因而用正己烷除脂不可避免地会带来部分损失; 同时 C<sub>18</sub> 固相萃取柱平行净化效果的一致性较差。而 HPLC-MS/MS 法用甲醇-水溶液提取后, 直接用石墨化碳黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化, 可更为简便有效地去除样品中的色素、极性杂质。

#### 3.3.4 衍生化比较

雌二醇结构中含有羟基和芳环, 侧链 C<sub>3</sub>、C<sub>17</sub> 为极性基团, 低挥发性, 因此不适合直接进行 GC-MS 分析, 需增加衍生化步骤。GC-MS 法采用 MSTFA-DTE-TMIS 混合试剂进行衍生化, 衍生化试剂挥发性大, 具有一定的毒性, 反应时间控制在 20~45 min 内, 反应温度保持在 60~70 °C 之间, 并且衍生化过程中注意防潮, 因为衍生化试剂遇水立即分解且衍生物遇水也容易分解。衍生化条件较为苛刻, 容易失败, 并且衍生化副产物较多, 有时可干扰目标物的检出。而 HPLC-MS/MS 法净化后直接测定, 无需衍生化, 简化了前处理步骤, 减少试剂的损耗, 缩短前处理时间, 更为环保、简便、高效。

### 3.4 方法的线性范围及检出限

取质量浓度分别为 0.4、1、2、4 和 10 μg/kg 的系列标准溶液, 在已优化的“2.2.3.1”和“2.2.4.1”条件下进行 HPLC-MS/MS 分析; 取质量浓度分别为 0.5、1、2、5 和 10 μg/kg 的系列标准溶液, 在已优化的“2.2.3.2”和“2.2.4.2”条件下进行 GC-MS 分析, 分别以峰面积(Y)对相应的质量浓度(X)作图, 得标准曲线, 并求出相应的线性回归方程及相关系数。HPLC-MS/MS 和 GC/MS 在 0.4~10 μg/kg 和 0.5~10 μg/kg 浓度范围内, 相关系数 *r* 分别为 0.9996 和 0.9994, 均大于 0.999, 表明两种方法下雌二醇在相应的浓度范围内均具有良好的线性关系。相较于 GC-MS 而言, HPLC-MS/MS 避免了衍生化效率影响测定结果, 线性范围更宽。以添加样品信噪比(S/N)≥3 时的空白样品中的添加浓度确定方法的检出限(limit of detection, LOD), HPLC-MS/MS 和 GC-MS 方法检出限分别为 0.4 μg/kg 和 0.5 μg/kg, 结果见表 4。从方法的检出限结果可见 HPLC-MS/MS 灵敏度略优于 GC-MS。

### 3.5 回收率及精密度实验

以鱼肉和虾肉为代表基质, 进行添加回收率和精密度实验。称取 5 g(精确至 0.001 g)空白样品, 添加雌二醇标准品, 分别制成添加水平为 0.4、5 和 10 μg/kg 的样品各 6 份, 按“2.2.4”方法处理样品并进行 HPLC-MS/MS 分析; 分别制成添加水平为 0.5、1 和 5 μg/kg 的样品各 6 份, 按“2.2.4”方法处理样品并进行 GC-MS 分析, 计算平均回收率和精密度。由表 5 可知, HPLC-MS/MS 方法的各添加水平的回收率为 88.81%~106.0%, 精密度为 2.5%~6.5%; GC-MS 方法的各添加水平的回收率为 80.24%~96.60%, 精密度为 1.4%~5.4%。准确度与精密度均满足残留分析的要求。

表 4 雌二醇的保留时间、线性关系和检出限  
Table 4 Retention time, linear relationships and LODs of estradiol

分析物	分析方法	保留时间(min)	线性范围(μg/kg)	线性方程	相关系数 <i>r</i>	检出限 μg/kg
雌二醇	HPLC-MS/MS	7.17	0.4~20	$Y=0.194X+0.035$	0.9996	0.4
	GC-MS	12.87	0.5~10	$Y=0.1013X+0.03191$	0.9994	0.5

表 5 雌二醇在水产品中的添加回收率和相对标准偏差( $n=6$ )  
Table 5 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSD) of estradiol in aquatic products ( $n=6$ )

分析物	检测方法	添加水平( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	鱼肉		虾肉	
			平均回收率(%)	相对标准偏差 RSD (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
雌二醇	HPLC-MS/MS	0.4	101.5	5.1	88.81	6.5
		5	100.9	4.5	95.38	5.1
		10	106.0	2.5	94.54	3.2
	GC-MS	0.5	90.30	5.4	80.24	1.4
		1	95.12	3.2	92.14	2.2
		5	96.60	3.2	95.39	2.8

## 4 结 论

本实验比较了 GC-MS(农业部 958 号公告-10-2007)和 HPLC-MS/MS(GB/T 21981-2008)分别测定水产品中雌二醇残留量的两种检测方法。结果表明,两种检测方法线性关系良好,检测限低、灵敏度较高,测定结果准确、重现性好、专属性强,可同时进行定性和定量分析。但是 GC-MS 前处理方法过程复杂,耗材和试剂消耗大,衍生化过程易失败,分析耗时长。与之相比, HPLC-MS/MS 降低了方法检出限,灵敏度更高,酶解提高了雌二醇测定的准确性和净化效果,并且前处理时间短,有机溶剂用量少,可有效提高水产品中雌二醇残留的检测效率,节约检测成本,并为水产品质量安全的监控与检测提供技术参考。

## 参考文献

- 谢国建, 姜理英, 陈建孟.  $17\beta$ -雌二醇的危害及其环境行为研究[J]. 土壤通报, 2008, 39(1): 182-185.  
Xie JG, Jiang LY, Chen JM. Environmental Behavior of  $17\beta$ -estradiol [J]. Chin J Soil Sci, 2008, 39(1): 182-185.
- Kavlock RJ. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States[J]. Chemosphere, 1999, 39: 1227-1236.
- Peterson W, Davis RK, Orndoff HA.  $17\beta$ -estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers [J]. J Environ Qual, 2000, 29: 826-834.
- Qin LQ, Wang PY, Kaneko T, *et al.* Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer [J]. Med Hypotheses, 2004, 62(1): 133-142.
- Noppe H, Le bizec B, Verheyden K, *et al.* Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices [J]. Anal Chim Acta, 2008, 611(1): 1-16
- 中华人民共和国农业部公告第 235 号 动物性食品中兽药最高残留限量[Z].  
Ministry of Agriculture No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [Z].
- 林奕芝, 张世英, 梁伟, 等. 高效液相色谱法测定肉中激素残留量[J]. 现代预防医学, 2002, 29(6): 766-767.  
Lin YZ, Zhang SY, Liang W, *et al.* Detection of hormone residue of meat and meat product by HPLC [J]. Mod Prev Med, 2002, 29(6): 766-767.
- 谢维平, 欧阳燕玲, 黄盈煜, 等. 凝胶渗透色谱净化-高效液相色谱法测定鱼肉中的 5 种激素类药物残留[J]. 色谱, 2010, 28(4): 388-392.  
Xie WP, Ouyang YL, Huang YY, *et al.* Determination of five hormone drug residues in fish tissue by high performance liquid chromatography with gel permeation chromatographic clean-up [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(4): 388-392.
- 王凌云, 李洁珍, 黎敏, 等. 高效液相色谱法测定水产品中 4 种雌激素的残留量[J]. 化学分析计量, 2005, 14(4): 38-40.  
Wang LY, Li JZ, Li M, *et al.* Determination of four kinds of estrogen residues in aquatic product by HPLC [J]. Chem Anal Meter, 2005, 14(4): 38-40.
- 王玉飞, 周凯, 李继革. GC/MS 法同时测定海产品中 4 种雌激素残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 1(16): 21-23.  
Wang YF, Zhou K, Li JG. Determination of estrogens in marine foods by gas chromatography/mass/mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, 1(16): 21-23.
- 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, 5(16): 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, 5(16): 791-797.
- 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(30): 1329-1337.  
Luo HT, Huang XL, Wu HQ, *et al.* Simultaneous determination of 30 hormones and chloramphenicol residues in fish using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2011, 12(30): 1329-1337.
- 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, 2(35): 170-178.  
Yu HJ, Zhang SS, Zhang XL, *et al.* Simultaneous determination of the estrogen, progestogen and androgen in aquatic products by isotope dilution-LS-MS/MS [J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2014, 2(35): 170-178.

- [14] 戴小华, 吴国娟, 沈红, 等. 畜产品中雌二醇检测方法的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 131-133.  
Dai XH, Wu GJ, Shen H, *et al.* The detection methods of estradiol and its research progress in livestock product [J]. Chin Agric Sci Bull, 2005, 21(5): 131-133.
- [15] European Communities. Commission Decision 2002/657/EC. 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. [Z].
- [16] GB/T 21981-2008 食品安全国家标准 动物源食品中激素多残留检测方法 高效液相色谱-串联质谱法[S].  
GB/T 21981-2008 National Food Safety Standard Determination of hormone multiresidues in foodstuffs of animal origin-LC-MS/MS method [S].
- [17] 中华人民共和国农业部公告第 958 号 水产品中雌二醇残留量的测定 气相色谱-质谱法[Z].  
Ministry of Agriculture . No. 958 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Determination of estradiol residues in fishery products Gas chromatography-mass spectrometry method [Z].
- [18] 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, 34(1): 62-66.  
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, 34(1): 62-66.
- [19] 陈宜军, 刘勇军. GC-MS 法测定婴幼儿奶粉中 17 $\beta$ -雌二醇、雌三醇、炔雌醇、雌酮残留量[J]. 北京农业, 2012, 4: 145-148.  
Chen YJ, Liu YJ. Determination of 17 $\beta$ -estradiol, estriol, ethinylestradiol, estrone in infant milk with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Beijing Agric, 2012, 4: 145-148.
- [20] 黄冬梅, 钱蓓蕾, 惠芸华. GC-MS 测定水产品中雌二醇残留量[J]. 分析实验室, 2008, 27: 153-156.  
Huang DM, Qian BL, Hui YH. The determination of estradiol residue in aquatic products by GC-MS [J]. Anal Lab, 2008, 27: 153-156.
- [21] 李向军, 于慧娟, 冯兵, 等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定水产品中 24 种性激素[J]. 分析实验室, 2012, 31(5): 62-65.  
Li XJ, Yu HJ, Feng B, *et al.* Simultaneous determination of 24 hormones in aquatic products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Lab, 2012, 31(5): 62-65.

(责任编辑: 姚 菲)

### 作者简介



张泸文, 主要研究方向为食品检测。  
E-mail: aileenzlw@126.com



刘 畅, 副主任药师, 主要研究方向  
为食品检测与食品安全。  
E-mail: cible@sina.cn