

超高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中 己烯雌酚及玉米赤霉烯酮

肖永华, 毛翔, 革丽亚, 伍雅婷*, 黄常刚

(武汉市疾病预防控制中心, 武汉 430022)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)及玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)的分析方法。**方法** 采用 QuEChERS 提取方法, 奶粉加水浸润后用乙腈提取, 加入氯化钠促使乙腈和水分层, 取乙腈层经中性氧化铝小柱净化。以乙腈和水作为流动相, 经 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ 色谱柱分离后, 利用超高效液相色谱-串联质谱法在电喷雾负离子模式下进行测定, 内标法定量。**结果** DES 和 ZEN 在 5.0~100.0 μg/L 范围内线性关系良好($r^2 > 0.995$), 在 5、10 和 50 μg/kg 3 个加标浓度水平下, DES 和 ZEN 的回收率在 91.5%~97.5% 和 92.5%~95.7% 之间, 相对标准偏差小于 5%。**结论** 该方法灵敏度高, 定量准确, 可同时测定奶粉中的己烯雌酚及玉米赤霉烯酮。

关键词: 奶粉; 己烯雌酚; 玉米赤霉烯酮; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of diethylstilbestrol and zearalenone in milk power by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Yong-Hua, MAO Xiang, GE Li-Ya, WU Ya-Ting*, HUANG Chang-Gang

(Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of diethylstilbestrol (DES) and zearalenone (ZEN) in milk power by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The milk powder was infiltrated with water, extracted with acetonitrile by QuEChERS, and purified with neutral alumina column. The separation was achieved using a Waters UPLC®BEH C₁₈ column and a binary gradient mobile phase of acetonitrile-water solution. The measurement was carried out by electrospray ionization (ESI) in negative mode under multiple reaction monitoring mode and quantified by internal standard method. **Results** The linear relation were good in the range of 5.0-100.0 μg/L ($r^2 > 0.995$) for DES and ZEN. The recoveries of DES and ZEN were respectively in the range 91.5%-97.5% and 92.5%-95.7%, at 3 spiked concentrations of 5, 10 and 50 μg/kg. The relative standard deviations were less than 5%. **Conclusion** This method is sensitive and accurate, which is suitable for simultaneous determination of diethylstilbestrol and zearalenone in milk power.

KEY WORDS: milk power; diethylstilbestrol; zearalenone; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2016CFB177)

Fund: Supported by the Hubei Province Natural Science Foundation (2016CFB177)

*通讯作者: 伍雅婷, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向为环境与食品安全。Email: cherrywu521@gmail.com

*Corresponding author: WU Ya-Ting, Master, Associate Professor, Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430022, China. Email: cherrywu521@gmail.com

1 引言

己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)属类固醇类人工合成雌激素,早期曾用于临床妊娠早期保胎和雌激素替代疗法,其在自然环境中很难降解,通过食物链会在动物体内产生蓄积^[1];己烯雌酚能导致异常生长,妊娠期暴露于己烯雌酚会导致后代神经发育延迟,甚至对第三代的神经发育也有影响^[2];同时,孕妇产前暴露于己烯雌酚也会导致男性婴儿先天缺陷,出现生殖器异常等副作用^[3],欧盟指令(96/22/EC)将己烯雌酚列为动物养殖业禁用物质^[4],我国的农业部 2002 年 235 号公告-《动物性食品中兽药最高残留限量》也禁止在动物组织中检出己烯雌酚^[5]。玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是由丝状真菌产生的一种真菌毒素,在谷类和豆类中广泛存在^[6],玉米赤霉烯酮具有胚胎毒性、生殖毒性和免疫系统毒性^[7-9];欧盟规定在喂养动物的饲料中玉米赤霉烯酮的含量不能超过 2 mg/kg^[10],我国 GB 2761-2017《食品中真菌毒素限量标准》也规定小麦及玉米中的玉米赤霉烯酮限值为 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11]。由于己烯雌酚和玉米赤霉烯酮都能促进动物生长^[12],其中己烯雌酚还能提高奶牛产奶率,因此在奶牛养殖业中有养殖户存在为追求经济利益而在饲料中违规添加己烯雌酚或超标添加玉米赤霉烯酮的行为,导致奶粉中有己烯雌酚残留或玉米赤霉烯酮残留情况,从而对人群健康带来危害^[13]。

目前检测己烯雌酚和玉米赤霉烯酮的方法主要有抗体固定电容免疫传感法^[14]、分子印迹发光法^[15]、中空纤维液相微萃取液相色谱法^[16]、气相色谱-串联质谱法^[17]和液相色谱-串联质谱法^[18,19]等。液相色谱-串联质谱法具有定性定量准确、灵敏度高等优点,在检测领域得到了越来越多的应用,在己烯雌酚和玉米赤霉烯酮国家标准检测方法(GB/T 22992-2008^[18])中,用乙腈作为蛋白沉淀剂和提取剂,提取液用阴离子固相萃取小柱净化;而在食品中玉米赤霉烯酮的测定(GB 5009.209-2016^[19]第三法)中,采用 β -葡萄糖苷酸/硫酸酯复合酶水解后乙醚提取,经液液分配、固相萃取柱净化。本研究采用 QuEChERS 样品提取方法,结合中性氧化铝小柱净化方式对样品进行前处理,采用超高效液相色谱-串联质谱法检测样品中的己烯雌酚和玉米赤霉烯酮。该方法快速、高效且定性定量准确,可作为监测奶粉中己烯雌酚及玉米赤霉烯酮等物质残留的有效检测技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC Xevo-TQS 超高效液相色谱-串联质谱仪[配备电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)以及 MAsslynx4.1 数据处理系统,美国 Waters 公司];

ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(美国 Waters 公司); Multi Reax 涡旋振荡器、低温高速离心机(德国 HERMLE 公司); 氮气吹干仪(美国 Organomation Associates 公司); 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

己烯雌酚、己烯雌酚 D8、玉米赤霉烯酮(德国 DR.Ehrenstorfer GmbH 公司); 乙腈(美国 TEDIA 公司); 氯化钠(国药集团); 中性氧化铝小柱(1 g, 6 mL, 美国安捷伦公司), 实验用水为 Milli-Q 纯水机(美国 MILLIPORE 公司)制备。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

己烯雌酚和玉米赤霉烯酮分别用乙腈配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液,己烯雌酚-D8 用乙腈配制成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液, -18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。再用乙腈将己烯雌酚-D8 配制成 100 ng/mL 内标工作液,该工作液临用时现配。

2.2.2 样品处理

称取 2 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 超纯水和 200 μL 100 ng/mL 己烯雌酚-D8 内标标准溶液,于涡旋振荡器振荡 5 min 后加入 10 mL 乙腈和 2 g 氯化钠,再涡旋 2 min 后低温高速离心,取上清液过中性氧化铝小柱,收集流出液,再加入 3 mL 乙腈淋洗小柱,合并流出液于氮吹仪中氮气吹干,最后用 1.0 mL 乙腈对样品进行复溶,过 0.45 μm 滤膜后上机测定。

2.2.3 仪器条件

(1) 液相色谱条件

ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 水(A), 乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~2.8 min, 50%A; 2.8~3.0 min, 50%A~10%A; 3.0~4.0 min, 10%A; 4.0~4.1 min, 10%A~50%A。流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 1 μL 。

(2) 质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ion source, ESI), 负离子模式; 毛细管电压: -2.5 kV; 脱溶剂气温度: 550 $^{\circ}\text{C}$; 离子源温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流速: 1000 L/Hr; 锥孔气流速: 150 L/Hr; 扫描模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。通过质谱直接进样合并流动相的方式优化己烯雌酚、己烯雌酚-D8 及玉米赤霉烯酮质谱参数, MRM 采集参数详见表 1。

3 结果与分析

3.1 样品提取条件

QuEChERS 样品提取方法具有快速、高效、成本低等特点,在水果和蔬菜的多农药残留检测中应用广泛,但在动物制品激素残留中的应用较少。本研究采取 QuEChERS 方法同时比较了奶粉不加水直接用乙腈提取和加水对奶粉样品充

分浸润后再用乙腈提取 2 种前处理方式, 结果发现奶粉样品不加水会导致己烯雌酚-D8 的绝对回收率低于 10%, 而加水后己烯雌酚-D8 的绝对回收率能达到 60%以上, 加水后奶粉颗粒能得到充分的膨胀, 增加了与乙腈的接触面积, 从而提高己烯雌酚的提取效果。由此可见, 加水对奶粉进行浸润后能有效的提高己烯雌酚的提取效率。

己烯雌酚在乙腈中的溶解度要大于在水中的溶解度, 在提取液中加入氯化钠能促使乙腈和水分层, 同时也能提高乙腈沉淀蛋白的效果, 使上清液更加澄清透明。乙腈提取液进一步通过中性氧化铝小柱净化后能有效去除提取液中的油脂类杂质, 从而能有效降低背景所带来的干扰。

3.2 仪器条件优化

质谱方法: 通过联合进样模式(即质谱注射进样结合流动相共同进入质谱检测器)对己烯雌酚和玉米赤霉烯酮的质谱参数进行优化。常规的质谱参数优化模式包括单独质谱进样和联合进样模式 2 种, 因为仪器参数与化合物在

不同的溶剂介质下具有较强的相关性, 相比单独进样模式, 联合进样更能体现化合物通过色谱柱进行分析的情况。采取联合进样模式首先调节毛细管电压和锥孔电压优化母离子参数, 再通过调节碰撞池能量建立子离子参数。

色谱方法: 本研究分别在有机相中选取乙腈和甲醇, 水相中选取超纯水和乙酸铵溶液, 采用 2*2 模式建立色谱条件。结果发现, 选取乙酸铵做水相时, 无论有机相是甲醇还是乙腈, 己烯雌酚的响应值均较超纯水做水相时明显降低, 同时乙腈作为有机相时较甲醇响应值更高, 因而本研究选取乙腈和水的体系作为液相系统的流动相。

为最大限度的降低样品基质带来的干扰, 在满足方法灵敏度的情况下, 应减少样品的进样量, 本研究选择的进样量为 1 μL , 较好的降低了背景噪音水平, 同时也取得了比相关国标更低的检出限。

通过上述参数所采集的己烯雌酚和玉米赤霉烯酮的 MRM 色谱图详见图 1。

表 1 DES、DES-D8、ZEN MRM 参数
Table 1 The MRM parameters for DES, DES-D8 and ZEN

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
DES	267.3	237.2	0.1	20	25
		251.2*			23
DES-D8	275.3	259.2	0.1	20	23
ZEN	317.3	131.1*	0.1	25	29
		175.0			24

注: *定量离子。

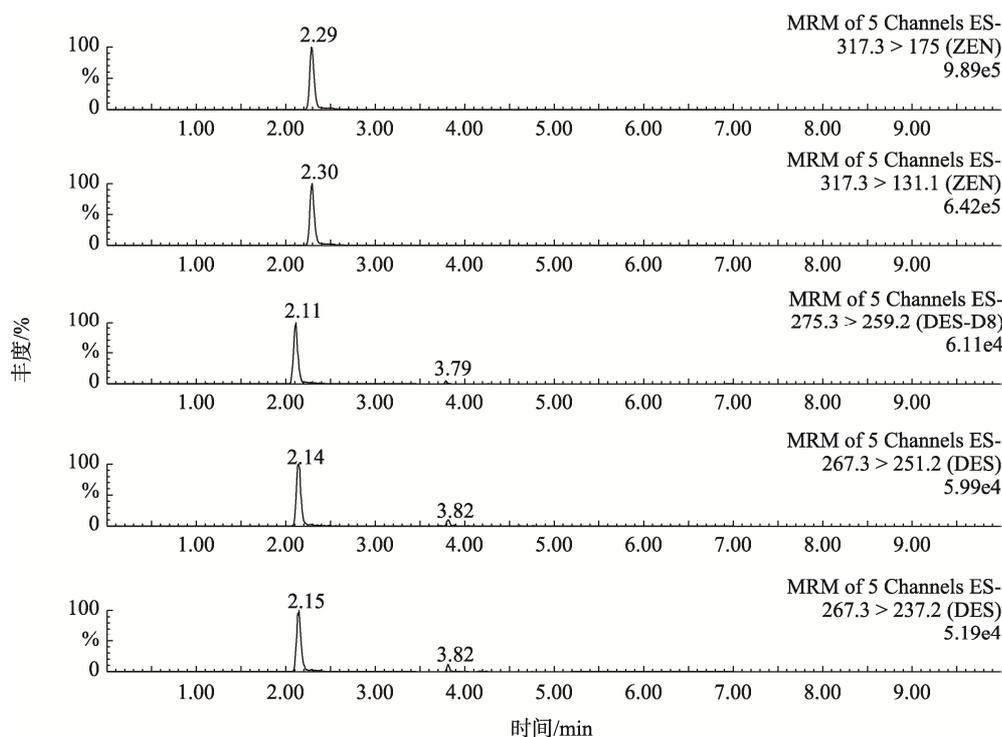


图 1 DES、DES-D8 和 ZEN 的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of DES, DES-D8, ZEN

3.3 方法学考察

3.3.1 线性范围及检出限

将 100 $\mu\text{g/mL}$ DES 和 ZEN 混合标准溶液用水稀释, 配制浓度分别为 5.00、10.0、20.0、50.0、100 $\mu\text{g/L}$ 的 DES 和 ZEN 混合标准系列, 内标 DES-D8 浓度为 20 $\mu\text{g/L}$, 将 DES-D8 作为 DES 和 ZEN 的内标, 制作标准曲线, DES 回归方程为: $Y=1.32X-2.89$, 相关系数 $r^2=0.998$, ZEN 回归方程为: $Y=19.51X-2.90$, 相关系数 $r^2=0.998$ 。通过逐级稀释法以 3 倍信噪比计算仪器的检出限, DES 和 ZEN 的仪器检出限分别为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 和 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

3.3.2 回收率和精密度

做 3 个加标水平的回收率实验, 分别准确称取 2.0 g 奶粉样品, 加入 DES 和 ZEN 混合标准溶液以及 DES-D8 内标溶液, 3 个加标浓度分别作 6 平行, 按 2.2.2 方法处理样品, 计算加标回收率, 分析结果见表 2。

表 2 奶粉中 DES 和 ZEN 加标回收率及精密度 ($n=6$)
Table 2 Recoveries and RSDs of DES and ZEN ($n=6$)

化合物	加标量/ $(\mu\text{g/kg})$	回收率/%	相对标准偏差/%
DES	5	91.5	4.76
	10	95.1	4.02
	50	97.5	3.29
ZEN	5	92.5	4.41
	10	93.2	4.52
	50	95.7	3.89

3.4 样品分析

利用该方法顺利通过了中国合格评定认证认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 组织实施的《奶粉中己烯雌酚能力验证计划》(CFAPA-390), 其中 A 样结果为 47.80 $\mu\text{g/kg}$, B 样结果为 138.28 $\mu\text{g/kg}$, A 样和 B 样的 Z 比分数分别为 -0.20 和 0.28, 取得了满意的结果。

同时用该方法分析了 10 种奶粉样品, 结果己烯雌酚和玉米赤霉烯酮均未检出。按取 2.0 g 样品计算, DES 和 ZEN 的方法检出限分别为 0.25 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 。

4 结论

在方法 GB 5009.209-2016 中, ZEN 的检出限为 1 $\mu\text{g/kg}$, 而在方法 GB 22992-2008 中, ZEN 和 DES 的方法检出限均为 8.0 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法相对于国标方法省略了酶解过程, 在固相萃取过程中步骤简单, 消耗试剂量少, 同时具有比国标方法更低的检出限, 适用于奶粉中己烯雌酚及玉米赤霉烯酮残留的检测, 可为畜牧养殖行业的产品质量控制提供技术支持。

参考文献

- [1] 黄芬, 叶绍辉, 龚振明. 己烯雌酚的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 51-54.
Huang F, Ye SH, Gong ZM. The development of diethylstilbestrol [J]. China Anim Husb Veter Med, 2007, 34(2): 51-54.
- [2] Kioumourtoglou MA, Coull BA, O'Reilly EJ, *et al.* Association of exposure to diethylstilbestrol during pregnancy with multigenerational neurodevelopmental deficits [J]. JAMA Pediatr, 2018, 172(7): 670-677.
- [3] Tournaire M, Devouche E, Epelboin S, *et al.* Birth defects in children of men exposed in utero to diethylstilbestrol (DES) [J]. Therapie, 2018, 73(5): 399-407.
- [4] Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 Concerning the Prohibition on the Use in Stockfarming of Certain Substances Having a Hormonal or Thyreostatic Action and of Beta-agonists (1996). Off.J.Eur.Comm. L125:3-9.
- [5] 农业部 2002 年 235 号公告-动物性食品中兽药最高限量[S]. Ministry of agriculture notice No.235 of 2002-The maximum residue limit of veterinary drugs in animal food [S].
- [6] Wozny M, Obremski K, Hliwa P, *et al.* Feed contamination with zearalenone promotes growth but affects the immune system of rainbow trout [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 84: 680-694.
- [7] Cao H, Zhi Y, Xu H, *et al.* Zearalenone causes embryotoxicity and induces oxidative stress and apoptosis in differentiated human embryonic stem cells [J]. Toxicol In Vitro, 2018, 54: 243-250.
- [8] Yang Z, Xue KS, Sun X, *et al.* Toxicogenomic responses to zearalenone in *Caenorhabditis elegans* reveal possible molecular mechanisms of reproductive toxicity [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 122: 49-58.
- [9] 闫昭明, 陈清华, 陈凤鸣. 玉米赤霉烯酮毒性研究[J]. 动物营养学报, 2018, 30(9): 3453-3458.
Yan ZM, Chen QH, Chen FM. Study on toxicity of zearalenone [J]. Chin J Anim Nutr, 2018, 30(9): 3453-3458.
- [10] Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (Text with EEA relevance). Official Journal L 229:0007-0009.
- [11] GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量标准[S]. GB 2761-2017 National food safety standard-Limits for mycotoxins in food [S].
- [12] Rykaczewska A, Gajecka M, Dabrowski M, *et al.* Growth performance, selected blood biochemical parameters and body weights of pre-pubertal gilts fed diets supplemented with different doses of zearalenone (ZEN) [J]. Toxicon, 2018, 152: 84-94.
- [13] Thielecke F, Nugent AP. Contaminants in grain-A major risk for whole grain safety? [J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1213-1236.
- [14] Foubert A, Beloglazova NV, Hedstrom M, *et al.* Antibody immobilization strategy for the development of a capacitive immunosensor detecting zearalenone [J]. Talanta, 2019, 191: 202-208.
- [15] Beloglazova N, Lenain P, Tessier M, *et al.* Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone [J]. Talanta, 2019, 192: 169-174.
- [16] Socas-Rodriguez B, Asensio-Ramos M, Hernandez-Borges J, *et al.* Analysis of oestrogenic compounds in dairy products by hollow-fibre

liquid-phase microextraction coupled to liquid chromatography [J]. Food Chem, 2014, 149: 319-325.

- [17] 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.

- [18] GB/T 22992-2008 牛奶和奶粉中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].

GB/T 22992-2008 Determination of zearalanol, zearalanone, diethylstilbestrol, hexetrol and dienolestrol multi-residues in milk and milk powder-LC-MS-MS method [S].

- [19] GB 5009.209-2016 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定 [S].

GB 5009.209-2016 National food safety standard-Determination of zearlanone in food [S].

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



肖永华, 硕士研究生, 主管技师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: xyh_28@163.com

伍雅婷, 硕士研究生, 副主任医师, 主要研究方向为环境与食品安全。

E-mail: cherrywu521@gmail.com