

解决方案

猪肉中己烯雌酚残留的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；己烯雌酚

介绍

己烯雌酚是一种人工合成的雌性激素，可以提高畜禽的免疫力，缩短畜禽的生长周期，因其作用明显，价格便宜，常被应用在猪、牛、羊、鸡、鸭等畜禽类动物以及鱼、虾等水产品的养殖中。人们长期食用这种肉类可以导致己烯雌酚在人体内蓄积，人体摄入过量会出现恶心、呕吐、厌食、头痛等不良反应并可诱发生殖系统恶性肿瘤，而且女性长期食用会使子宫内膜增生过度而导致子宫出血与子宫肥大，孕妇食用会导致胎儿先天性缺陷。为保障动物源性食品安全，维护人们身体健康，2002年农业部发布了176号公告，公布了禁止在饲料、动物饮水和畜禽水产养殖中使用己烯雌酚，但由于使用DES经济效益显著，违法滥用现象仍然存在。因此非常有必要对食品中的己烯雌酚残留量进行检测。

对于己烯雌酚残留的检测现主要依据GB/T 20766-2006：牛猪肝肾和肌肉组织中玉米赤霉醇、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-串联质谱法和GB/T 5009.108.2003：畜禽肉中己烯雌酚的测定。

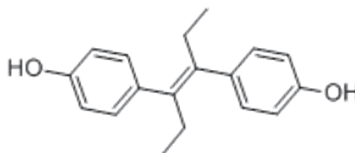


图-1.己烯雌酚的结构式

本方法参考上述标准，猪肉样品用乙腈提取，固相萃取柱净化，最后用50%的乙腈水溶液复溶，经高效液相色谱-串联质谱进行检测。

1. 仪器和耗材

仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol MPE-16 高通量真空平行浓缩仪

高效液相色谱-串联质谱: Waters LC 2695,

Quattro micro API 或相当

耗材

NH₂固相萃取柱 (RayCure NH₂, 500mg/6mL, 货

号: RC-204-16104)

试剂

甲醇 (优级纯)

乙腈 (优级纯)

正己烷 (优级纯)

二氯甲烷 (优级纯)

甲醇: 丙酮 (1:1) 溶液: 取 50 mL 甲醇与 50 mL 丙酮混匀

50% 乙腈水溶液: 将 50 mL 乙腈与 50 mL 水混合

2. 样品制备

准确称量 5 g (精确至 0.01 g) 样品装于 100 mL 离心管中, 加入约 10 g 无水硫酸钠, 用玻璃棒搅成沙状, 加入 30 mL 乙腈用 AH-30 全自动均质器高速匀浆 1 分钟, 于冷冻离心机上 4000 rpm 离心 10

分钟, 上清液转移到 250 mL 平底烧瓶中。离心管中再加入 20 mL 乙腈, 再次匀浆, 离心。在 50℃ 水浴条件下用 MPE-16 高通量真空平行浓缩仪浓缩至干, 用 5 mL 二氯甲烷溶解残渣, 待净化。

2.1 净化

用 5 mL 甲醇: 丙酮 (1:1) 混合溶液及 5 mL 正己烷活化 NH₂固相萃取柱, 上样弃去流出液, 用 5 mL 正己烷淋洗, 吹干小柱, 然后用 5 mL 甲醇: 丙酮 (1:1) 溶液洗脱, 控制整个过程流速为 1 mL/min,

收集洗脱液于 44 °C 下用 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪吹干, 然后用 2 mL 乙腈-水 (1:1) 溶液涡旋溶解残渣, 过 0.22 um 滤膜经 LCMSMS 分析。具体的固相萃取方法见图 3。

2.2 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Raykol Fotector Plus
固相萃取柱	NH ₂ 固相萃取柱 (RayCure, 500mg/6mL)
活化	甲醇: 丙酮 (1:1)、正己烷
洗脱	甲醇: 丙酮 (1:1)



序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	MeOH+Acetone(1:1)				2.8
2	活化	MeOH+Acetone(1:1)	有机废液	2	5	2.9
3	活化	C6H14	有机废液	2	5	2.9
4	上样		特殊废液	1	5	5.6
5	清洗样品瓶	CH2Cl2	特殊废液	60	2	3
6	淋洗	C6H14	有机废液	2	5	2.9
7	气推		有机废液	80	10	0.9
8	吹干					2
9	洗脱	MeOH+Acetone(1:1)	收集	1	5	5.4
10	气推		收集	80	10	0.9
11	结束					
12						

Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪

Fotector Plus全自动固相萃取仪萃取方法

3. 液相条件

3.1 Waters LC2695 液相条件

Column 色谱柱	XTerra® MS C18, 150mm × 2.1mm, 5 μm
Column oven 柱温	40 °C
Flow rate 流速	0.2 mL/min
Injection volume 进样量	20μL

3.2 液相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A (乙腈)	流动相 B (超纯水)
0.00	40%	60%
1.00	40%	60%
4.00	70%	30%
5.00	70%	30%
5.10	90%	10%
7.00	90%	10%
7.10	40%	60%
16.00	40%	60%

3.3 质谱仪器参数

Source (ESI ⁻) Parameters 离子源 (负离子轰击电离源) 参数		Analyser Parameters 质量分析器参数	
Capillary (KV) 毛细管电离电压	2.6	LM 1 Resolution 低分子量 1 分辨率	13
Cone (V) 孔电压	35	HM 1 Resolution 高分子量 1 分辨率	13
Extractor (V) 二级锥孔电压	3.00	Ion Energy 1 离子能量 1	1.0
RF Lens (V) 透镜电压	0	Entrance (V) 碰撞室入口电压	2
Source Temperature (°C) 电离源温度	100	Collision (V) 碰撞电压	10
Desolvation Temperature (°C) 脱溶剂温度	300	Exit (V) 碰撞室出口电压	2
Cone Gas Flow (L/Hr) 锥孔气流速	50	LM 2 Resolution 低分子量 2 分辨率	13.0
Desolvation Gas Flow (L/Hr) 脱溶剂气流速	600.0	HM 2 Resolution 高分子量 2 分辨率	13.0
Multiplier (V) 光电倍增管电压	650	Ion Energy 2 离子能量 2	1.0

3.4 MRM 参数

Name 化合物名称	parent ion 母离子	daughter ion 子离子	Cone 孔电压 (V)	Coll Energy 碰撞电压 (eV)	Dwell Time 驻留时间 (secs)	Qualitative Ion 定量离子	Quantitative Ion 定性离子
Diethylstilbestrol 己烯雌酚	267.04	222.10	42	34	0.3		+
		237.1	42	28	0.3	+	+
		251.10	42	26	0.3		+
DES-D8	275.10	228.10	46	36	0.3		+

己烯雌酚-Ⅷ 8		245.10	46	30	0.3		+
		259.10	46	26	0.3	+	+

4. 结果与讨论

为了验证该方法的回收率，本实验向猪肉组织样品 (5 g) 中加入己烯雌酚标准品进行加标回收验证 (n=5)。数据如表-2 所示：加标回收率在 90-110%

之间，RSD 值控制在 5%以内。说明该方法能够很好地运用于动物肌肉组织样品中己烯雌酚的检测。

表-2. 猪肉样品的加标回收率及 RSD 值

序号	化合物	添加浓度 ug/L	回收率 (%) 样品-1	回收率 (%) 样品-2	回收率 (%) 样品-3	回收率 (%) 样品-4	回收率 (%) 样品-5	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	己烯雌酚	2.5	104.32%	96.64%	102.44%	108.04%	99.40%	102.17%	4.31%

5. 总结

本解决方案操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。AH-30 全自动均质器可以自动完成 16 个样品均质，均质后能够自动清洗刀头，清洗刀头时可以采用水洗、超声洗和溶剂洗等多级清洗组合，有效防止交叉污染，且全程无需人工干预；

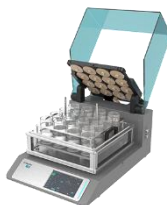
MPE-16 高通量真空平行浓缩仪特别适用于大体积提取液的浓缩，浓缩效率是单台旋蒸的 16 倍。

独特的尾管设计方便用户观察剩余体积和定容；

Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus能够实现高通量处理，最多一天能够处理180个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。



全自动均质器
均质



高通量真空平行浓缩仪
浓缩



高通量全自动固相萃取仪
净化



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 10 月版