

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱法测定水果中的 8 种环境雌激素

屈芳¹, 吕媛¹, 李林², 柳强¹, 李敏璐¹, 魏选东¹, 胡婧¹, 易银沙¹

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410006; 2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要:目的 建立同时测定水果中双酚 A、17 β -雌二醇、雌酮、雌三醇、炔雌醇、己烯雌酚、4-辛基酚和 4-*n*-壬基酚的高效液相色谱-串联质谱法。方法 样品经乙腈超声提取 2 次, Oasis HLB 固相萃取柱净化, 提取液氮吹至干, 残渣用甲醇溶解。待测物以乙腈-甲醇 (4:1, V/V) 与 0.1% 氨水为流动相, 经 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) 梯度洗脱分离后, 进行 HPLC-MS/MS 多反应监测模式 (MRM) 的定性及定量分析, 外标法定量。结果 8 种环境雌激素能与杂质较好分离, 在 5~100 μ g/L 范围内线性良好 (均 $r \geq 0.99$)。方法检出限为 0.17~0.51 μ g/kg, 定量限为 1.33~2.55 μ g/kg, 加标回收率为 67.77%~110.49%, RSD 为 1.08%~12.74%。应用该方法对实际样品进行检测, 均有微量双酚 A 检出, 大部分检测到 4-*n*-壬基酚和炔雌醇, 部分检测到 17 β -雌二醇, 其余 4 种环境雌激素均未检出。结论 本方法快速、灵敏、准确, 适用于水果中 8 种环境雌激素的定量及确证分析。

关键词: 高效液相色谱-质谱法; 水果; 环境雌激素; 食品安全; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)04-0445-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.008

Determination of 8 environmental estrogens in fruit by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

QU Fang, LYU Yuan, LI Lin, LIU Qiang, LI Min-lu, WEI Xuan-dong, HU Jing, YI Yin-sha
(Department of Preventive Medicine, Medical College of Hunan Normal University,
Hunan Changsha 410006, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of 8 environmental estrogens, including bisphenol A, 4-*n*-nonylphenol, estrone, 17 β -estradiol, estradiol, ethinyl estradiol, 4-octylpheno and diethylstilbestrol in fruits. **Methods** Fruit samples were ultrasonic extracted by acetonitrile and cleaned up on a HLB solid phase extraction column. The extract was evaporated to dryness under nitrogen, and the residue was redissolved in methanol. The gradient elution of 8 environmental estrogens was carried out by a ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ column (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) using acetonitrile-methanol (4:1, V/V) and 0.1% ammonia aqueous solution as the mobile phase. The target compounds were confirmed and quantified by HPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode with external standard method. **Results** 8 environmental estrogens and impurity could be well separated, and it showed good linearity in the range of 5-100 μ g/L (each $r \geq 0.99$). The detection limit of the method was 0.17-0.51 μ g/kg, the limit of quantification was 1.33-2.55 μ g/kg, the average recovery was 67.77%-110.49%, and the precision was 1.08%-12.74%. The method was applied to fruit samples, bisphenol A was detected in all samples, most samples were detected 4-*n*-nonylphenol and ethinyl estradiol, some were detected 17 β -estradiol and remaining 4 environmental estrogens were not detected. **Conclusion** The method is rapid, sensitive and accurate, and was suitable for the determination and confirmation of 8 environmental estrogens in fruit.

Key words: High liquid chromatography tandem mass spectrometry; fruit; environmental estrogens; food safety; detection

收稿日期: 2016-04-15

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (14JJ4028); 农业微生物学国家重点实验室开放课题 (AMLKF201209); 湖南省教育厅教改项目 (湘教通 [2014]247 号); 2016 年湖南省普通高等学校教学改革研究项目; 湖南省研究生科研创新项目 (CX2015B182)

作者简介: 屈芳 女 硕士生 研究方向为营养与食品卫生学 E-mail: 879428117@qq.com

通信作者: 易银沙 男 副教授 研究方向为公共卫生与食品污染物风险评估 E-mail: yyss598598@126.com

环境雌激素 (environmental estrogens, EEs) 是指一类进入机体后, 能够与雌激素受体结合, 或者以影响细胞信号途径等其他方式模仿或部分模仿雌激素, 发挥类似雌激素效应^[1], 干扰机体的内分泌物质的正常功能, 破坏机体内环境稳定的化合物^[2], 包括人工合成化合物及植物天然雌激素, 属于环境内分泌干扰物 (EEDs) 中的一类^[3]。天然激素包括人和动物体内天然存在的内源性雌激素, 如雌酮 (E₁)、17 β -雌二醇 (E₂) 和雌三醇 (E₃), 以及植物性和真菌类雌激素, 如人参皂苷、玉米赤霉醇和大豆异黄酮, 还包括一些天然存在于环境中的重金属, 如铅。人工合成激素包括己烯雌酚 (DES)、炔雌醇 (EE₂) 等口服避孕药和一些用来助长牲畜发育的激素, 还包括辛基酚 (OP)、壬基酚 (NP)、双酚 A (BPA)、六六六、DDT、狄氏剂、多氯联苯等人工合成化学品。它们中有 80% 以上可直接进入环境, 通过污染土壤或水被水果和蔬菜吸收, 并可在机体内长期蓄积, 再以直接或间接的方式进入人体, 从而对人体健康造成难以估量的危害。据报道水果中主要的环境雌激素为双酚 A、17 β -雌二醇、炔雌醇和壬基酚。EEs 对人类和动物的影响主要表现为致癌作用^[4-5]、生殖障碍、发育异常^[6-7] 以及干扰神经系统和免疫系统。目前, 国际癌症研究所已经把己烯雌酚列为人类致癌物质。

目前, 对于环境雌激素的分析检测, 国际上应用较多的方法有毛细管电泳技术、酶联免疫吸附法、气相色谱法 (GC)^[8]、高效液相色谱法 (HPLC)^[9]、气相色谱-质谱法 (GC-MS)^[10-11]、液相色谱-质谱法 (LC-MS)^[12-14]、电感耦合等离子体发射光谱法 (ICP) 及其相关质谱联用法等^[15]。国家标准 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》^[16] 于 2014 年 1 月 1 日已正式实施。然而, 测定的样品主要为动物源性食品^[17]、尿液^[18]、化妆品^[9] 和水产品^[10, 13], 对于水果中环境雌激素的研究报道却很少, 仅有 LU 等^[19] 用以气相色谱-质谱法 (GC-MS) 为基础的同位素稀释技术测定蔬菜和水果中的环境雌激素的报道。因此迫切需要建立准确可靠、灵敏度高的检测方法解决水果中环境雌激素的检测问题。

本研究拟采用高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 同时测定水果中 17 β -雌二醇 (E₂)、雌酮 (E₁)、雌三醇 (E₃)、炔雌醇 (EE₂)、双酚 A (BPA)、己烯雌酚 (DES)、4-辛基酚 (4-OP)、4-*n*-壬基酚 (4-*n*-NP) 8 种环境雌激素, 旨在建立快速、便捷、灵敏、准确检测水果中环境雌激素的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

选择市场消费量较高的 6 种水果样品 (苹果、梨子、香蕉、橘子、柠檬和草莓), 将样品去皮、去仁, 取日常人们食用部位果肉, 充分绞碎, 均质, 于 -20 °C 以下棕色玻璃瓶避光保存备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

ACQUITY TQD-串联四极杆液质联用仪、ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μ m)、HLB 柱 (3 ml, 60 mg) 均购自美国 Waters, N-EVAPTM112 氮吹仪 (美国 Organomation), 电子天平, 超声波清洗器, 反渗透纯水机, 高速离心机。

8 种环境雌激素标准品: 双酚 A [GBW (E) 100136]、17 β -雌二醇 (CDCT-C13213100)、雌酮 (CDCT-C13213230)、雌三醇 (CDCT-C13213200)、炔雌醇 (CDGG-011100-02)、己烯雌酚 (CDCT-C12607000)、4-辛基酚 [GBW (E) 100261]、4-*n*-壬基酚 (CDCT-C15630000) 均购自美国 Sigma-Aldrich (纯度 \geq 98%)。甲醇、乙腈和乙酸乙酯均为色谱纯, 乙酸铵、三乙胺、正己烷、丙酮和甲酸均为优级纯, 其余所用试剂均为分析纯。试验用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取各标准品 10.00 mg 于 100 ml 容量瓶中, 用甲醇为溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到各物质标准储备液浓度为 100 mg/L, 在此基础上配制浓度分别为 5、10、20、30、40、60、100 μ g/L 的 8 种物质混合标准溶液, 作为储备液于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.2 样品前处理

样品提取: 准确称取 5.00 g 均质样品于离心管中, 加入 3 ml 100 g/L 的碳酸钠溶液、10 ml 乙腈, 涡旋混匀 1 min, 25 °C 超声提取 25 min, 9 000 r/min 离心 10 min 取乙腈提取液的上清层于锥形瓶中, 向残渣中加入 10 ml 乙腈, 重复提取 1 次, 合并 2 次提取液, 于 35 °C 下氮吹浓缩至干, 用 1 ml 甲醇溶解残留物, 加水 9 ml 稀释, 备用。

样品净化: 采用 HLB 柱进行富集。上样前, 依次用 10 ml 乙酸乙酯、10 ml 甲醇和 10 ml 盐酸溶液 (pH = 3.0) 活化 HLB 固相萃取小柱, 取样品提取液过柱, 控制流量不超过 2 ml/min, 再用 10 ml 甲醇-水溶液 (1:9, V/V) 淋洗小柱, 将固相萃取柱抽干, 最后用 10 ml 乙酸乙酯洗脱, 控制流量不超过 2 ml/min。收集洗脱液于 10.0 ml 离心管中, 经无水硫酸钠脱水后于 40 °C 水浴中氮吹至干, 用 10% 甲醇溶解并定容至 1 ml, 过 0.22 μ m 孔径有机滤膜, 按仪器工

作条件进行测定。

1.2.3 仪器条件

色谱条件: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为乙腈-甲醇 (4:1, V/V), 流动相 B 为 0.1% 氨水, 流速 0.2 ml/min, 采用梯度洗脱的方式, 具体梯度程序见表 1, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μl。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	30.0	70.0
2.0	50.0	50.0
3.0	95.0	5.0
4.5	95.0	5.0
6.0	30.0	70.0

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 多反应监测 (MRM) 负离子模式。毛细管电压 -2.5 kV, 锥孔气流量 50 L/h, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流量 600 L/h, 其他参数见表 2。

表 2 8 种环境雌激素的质谱参数

Table 2 Mass spectrometry parameters for 8 EEs

化合物	保留时间 /min	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
双酚 A	4.50	227.00	132.76	28	40
			211.93*	18	40
己烯雌酚	4.62	267.00	251.00	30	50
			237.00*	20	50
雌酮	4.76	269.40	159.20	40	50
			145.20*	40	50
17β-雌二醇	4.74	271.29	144.70	40	50
			183.02*	35	50
雌三醇	4.24	287.24	171.09	44	56
			145.05*	47	56
炔雌醇	4.69	295.18	159.03	30	45
			145.18*	35	45
4-n-壬基酚	5.65	219.27	119.10	30	40
			133.06*	30	40
4-辛基酚	5.72	205.10	106.04*	20	40

注: * 为定量离子

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 提取剂的选择

8 种雌激素化合物在弱极性或中等极性有机溶剂中有较高的溶解性, 本试验分别用丙酮、乙腈、乙酸乙酯和甲醇等溶剂提取。结果表明: 以乙腈为提取剂时, 所得回收率最高, 8 种雌激素的回收率大于 70%, 且颜色干扰少; 以甲醇和丙酮提取草莓样品时, 提取液颜色均较深, 且很难与水相分层, 回收率低, 且大量杂质存在于提取液中, 这对净化过程十分不利, 容易引起固相萃取小柱堵塞; 以乙酸乙酯

为提取剂, 回收率较低, 提取效率不理想, 且存在杂质干扰, 给后面的净化工作带来了很大的困难。因此, 选择乙腈作为本试验样品的提取剂。

2.1.2 净化方式的选择

采用固相萃取净化时, 目标化合物的回收率与 SPE 小柱和性质及洗脱溶剂性质有关。本试验分别比较了 CN 柱、Strata 柱、硅胶柱和 HLB 柱对样品的净化效果。取 1 ml 配制好的 10 μg/L 混合标准溶液, 置 35 °C 下氮吹浓缩至干, 用 2 ml 甲醇-水溶液 (1:9, V/V) 溶解, 直接过已活化的固相萃取小柱, 用 5 ml 乙酸乙酯洗脱, 于 35 °C 氮吹至干, 用甲醇-水溶液 (1:9, V/V) 定容至 1 ml, 上机测定。结果表明: CN 柱、Strata 柱和硅胶柱对待测物质保留都相对较差, 回收率 (10% ~ 60%) 也不太理想, 而 HLB 柱对 8 种雌激素保留效果好, 回收率相对较高, 萃取效果相对较好, 同时杂质干扰较少, 净化效果理想, 能较好地满足试验要求。因此, 本试验选择 HLB 柱作为固相萃取柱。

采用乙酸乙酯为 HLB 固相萃取柱的洗脱液, 考察了乙酸乙酯体积分别为 1、2、3、4、5、10 ml 时对洗脱效果的影响。结果表明, 5 ml 乙酸乙酯可洗脱完全。

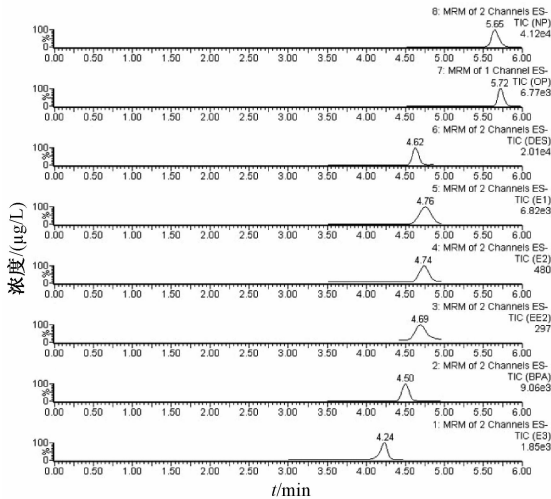
2.2 仪器条件的选择

2.2.1 色谱条件的优化

本试验分别比较了甲醇-乙腈和水、甲醇和 0.01% 氨水、乙腈和 0.01% 氨水、乙腈-甲醇和 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 (用乙酸调其 pH = 4.0)、乙腈-甲醇 (4:1, V/V) 和 0.01% 氨水、乙腈和水 (含 0.5% 甲酸)、乙腈和甲酸水溶液 (甲酸调其 pH = 3.0)、乙腈和 0.1% 氨水、乙腈-甲醇 (4:1, V/V) 和 0.02 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1% 氨水)、乙腈和水 (10 mmol/L 乙酸铵)、甲醇和 0.1% 氨水等混合流动相体系对这 8 种环境雌激素分离情况的影响。试验发现, 以水、甲酸和磷酸作为水相, 均比氨水的效果差。这可能是因为所检测的 8 种环境雌激素均为极性物质, 在以氨水为流动相的碱性环境中, 促进了电离, 使得分离效果更为明显。因此, 本试验选择碱性流动相。这与李雪、祝伟霞等^[12,14]所报道的效果基本一致。

结果表明, 以甲醇为流动相时, 8 种目标环境雌激素的响应值比较高, 然而有些化合物的峰形有严重拖尾现象, 分离不完全, 严重影响物质的定量; 以乙腈为流动相时, 各化合物的信号响应值虽然低于甲醇, 但是能将 8 种物质全部分离, 得到的峰形也比甲醇要好, 且保留时间缩短。试验还证明在乙腈中加入一定比例的甲醇, 效果更好。经反复试验

证,乙腈-甲醇(4:1, V/V)和0.1%氨水混合体系中,能在较短的时间内实现8种待测雌激素的有效分离,且其质谱信号响应和色谱分离效果都是最好的,基线稳定,8种组分出峰的保留时间短。图1为8种环境雌激素混合标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图(20 μg/L)。



注:NP为壬基酚;OP为辛基酚;DES为己烯雌酚;E₁为雌酮;
E₂为17β-雌二醇;EE₂为炔雌醇;BPA为双酚A;E₃为雌三醇

图1 8种环境雌激素混合标准溶液(20 μg/L)的
MRM 色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of 8 environmental estrogens
mixed standard solution

表3 8种环境雌激素的回归分析、检出限和定量限

Table 3 Regression analysis, limits of detection and limits of quantification of 8 environmental estrogens

化合物	回归方程	线性范围 /(μg/L)	相关系 数 <i>r</i>	LOD /(μg/kg)	LOQ /(μg/kg)
双酚 A	$y = 7.54x + 1.94$	5.00 ~ 100.00	0.999 5	0.40	2.00
4- <i>n</i> -壬基酚	$y = 2.64x + 0.81$	5.00 ~ 100.00	0.996 6	0.40	1.55
雌酮	$y = 22.82x - 45.54$	5.00 ~ 100.00	0.999 3	0.51	1.59
17β-雌二醇	$y = 1.13x - 6.84$	5.00 ~ 100.00	0.994 7	0.27	1.65
雌三醇	$y = 2.71x + 5.29$	5.00 ~ 100.00	0.998 6	0.32	1.33
炔雌醇	$y = 2.92x - 17.12$	5.00 ~ 100.00	0.998 5	0.45	1.69
4-辛基酚	$y = 22.70x + 211.88$	5.00 ~ 100.00	0.998 9	0.34	2.55
己烯雌酚	$y = 7.45x + 8.41$	5.00 ~ 100.00	0.999 4	0.17	2.19

以3倍信噪比(S/N)为方法检出限(LOD),10倍信噪比(S/N)为方法定量限(LOQ),经样品添加试验确定各物质的检出限和定量限。由表3可知,8种环境雌激素的方法检出限为0.17~0.51 μg/kg,定量限为1.33~2.55 μg/kg。

2.4 方法的回收率和精密度

在苹果、梨子、香蕉、柠檬、橘子、草莓空白样品中分别加入不同浓度水平(4、8、16 μg/kg)的雌激素混合标准溶液,按试验方法处理后进行测定,每组平行测定6次。由表4可知,不同浓度的8种环境雌激素的回收率为67.77%~110.49%, RSD 为1.08%~12.74%,说明该方法精密度良好,结果准

2.2.2 质谱条件的优化

以双酚A为例,首先选择负离子模式ESI(-)进行一级质谱扫描,确定双酚A的分子离子($[M-H]$, m/z 227.00,然后以其分子离子为母离子进行相应的子离子扫描,得到 m/z 132.76、211.93等碎片离子,其中 m/z 211.93的丰度最高,其次为 m/z 132.76,因此,选取 m/z 211.93作为定量离子, m/z 132.76为定性离子。最后以MRM模式优化毛细管电压、离子源温度、脱溶剂气温度、脱溶剂气流速、碰撞能量等质谱参数,其他7种环境雌素质谱条件选择方法类似,结果见表2。

2.3 工作曲线和检出限

采用基质加标的工作曲线进行外标法定量。根据基质的不同,按试验方法进行提取、净化和浓缩,对5、10、20、30、40、60、100 μg/L雌激素混合标准溶液进行测定,以峰面积(y)为纵坐标、浓度(x)为横坐标进行回归分析,得到基质加标工作曲线,线性回归方程和相关系数见表3。结果显示:8种环境雌激素在5~100 μg/L浓度范围内,峰面积(y)与系列混合标准溶液浓度(x)线性关系良好,且所有相关系数都大于0.99,说明峰面积(y)与浓度(x)关联性很强,基质效应干扰少。

确可靠。因此本方法能满足水果中环境雌激素含量的分析要求。

2.5 实际样品的测定

按照本试验方法测定了市场上消费较高的6种水果样品,共检测216份样品,每种水果各检测36份样品。由表5可知,6种水果样品中均有双酚A检出,在橘子中含量高达6.92 μg/kg,且检出率都高于90%;在苹果、梨子、橘子样品中检测到17β-雌二醇,检出率为77.78%~86.11%;除草莓外,其他5种水果样品都检测到了炔雌醇和4-*n*-壬基酚,其中4-*n*-壬基酚在橘子中含量高达26.35 μg/kg;其他4类雌激素化合物均未检出。

表 4 8 种环境雌激素的加标回收率和精密度 ($n = 6$)
Table 4 Recoveries and accuracies of 8 environmental estrogens

化合物	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	苹果		梨子		香蕉	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
双酚 A	4	83.42	9.57	85.60	9.12	86.74	9.93
	8	81.70	6.45	91.70	12.50	85.69	12.72
	16	79.92	2.86	94.34	2.97	83.53	3.81
雌酮	4	80.11	11.51	69.81	5.86	72.85	8.67
	8	80.20	4.79	102.12	6.72	89.62	3.51
	16	84.42	6.01	109.84	4.87	110.21	4.78
17 β -雌二醇	4	85.81	12.70	81.79	9.48	79.48	11.08
	8	86.78	8.43	87.24	6.02	89.36	9.45
	16	87.45	9.14	109.84	4.57	95.73	5.21
雌三醇	4	71.65	4.81	72.84	5.71	73.91	7.94
	8	96.90	3.21	104.51	3.67	8.58	5.80
	16	102.2	7.96	100.35	3.50	106.17	1.85
炔雌醇	4	69.43	8.83	81.70	8.09	85.03	4.60
	8	97.75	4.23	83.59	6.43	94.56	7.92
	16	103.21	2.09	90.94	5.77	97.45	6.26
4- <i>n</i> -壬基酚	4	84.15	9.21	76.58	7.00	80.20	11.17
	8	98.71	4.93	90.24	4.62	105.61	5.32
	16	98.65	1.85	101.25	4.15	95.36	1.82
4-辛基酚	4	75.39	6.39	78.65	9.15	76.23	8.76
	8	89.68	4.78	83.54	8.62	97.89	9.67
	16	95.36	5.52	98.62	4.59	98.53	5.86
己烯雌酚	4	69.87	9.23	86.07	6.07	77.31	8.11
	8	95.60	6.34	119.12	12.51	110.05	5.36
	16	110.49	12.74	84.51	5.84	85.06	6.84

化合物	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	柠檬		橘子		草莓	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
双酚 A	4	81.64	4.03	67.89	4.70	84.18	7.80
	8	95.71	3.12	91.00	5.45	98.36	6.04
	16	89.99	2.56	91.71	8.15	102.42	6.17
雌酮	4	69.75	7.59	68.54	9.76	78.56	5.62
	8	101.24	3.96	75.25	1.08	89.79	3.28
	16	105.63	4.52	102.30	2.99	88.87	4.33
17 β -雌二醇	4	81.07	4.86	81.22	9.56	75.25	1.11
	8	81.53	6.32	98.65	4.02	97.12	8.23
	16	90.71	6.12	109.12	6.86	106.66	2.23
雌三醇	4	72.01	8.51	75.45	9.65	69.78	11.12
	8	78.65	4.58	89.67	6.27	95.22	2.29
	16	98.62	1.90	92.48	7.78	91.73	5.12
炔雌醇	4	84.12	8.09	78.56	10.74	72.44	9.71
	8	90.00	5.86	93.30	4.17	105.66	9.24
	16	98.56	1.45	90.12	6.36	101.04	5.74
4- <i>n</i> -壬基酚	4	87.70	8.25	81.70	7.00	84.63	8.57
	8	86.77	2.90	97.99	1.34	108.52	4.89
	16	81.05	2.27	90.29	3.30	109.23	8.22
4-辛基酚	4	78.45	9.64	76.49	11.22	71.00	8.71
	8	87.55	6.52	101.06	3.10	107.55	4.55
	16	88.87	6.12	94.75	2.98	109.62	6.75
己烯雌酚	4	67.77	6.39	78.32	6.17	81.24	4.25
	8	90.71	2.31	103.02	2.95	97.88	3.33
	16	94.52	1.54	97.42	6.10	95.06	3.96

3 小结

本研究建立了应用高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 8 种环境雌激素的方法,在所选试

验条件下,8 种化合物在 Oasis HLB 柱上均得到很好的分离。利用 ESI 源对标准品和样品进行检测,色谱出峰尖锐,没有杂峰干扰。在 5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 质量浓度范围内,峰面积 (y) 与系列混合标准溶液浓度

表5 水果中8种环境雌激素的检测结果

Table 5 Content of 8 environmental estrogens in fruit

化合物	苹果		香蕉		梨子	
	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%
双酚 A	0~3.59	97.22	0~2.76	97.22	0~5.84	94.44
雌酮	—	0.00	—	0.00	—	0.00
17 β -雌二醇	0~1.81	86.11	—	0.00	0~1.27	77.78
雌三醇	—	0.00	—	0.00	—	0.00
炔雌醇	0~2.99	77.78	0~2.75	72.22	0~2.14	66.67
4- <i>n</i> -壬基酚	0~17.04	94.44	0~16.71	97.22	0~19.89	97.22
4-辛基酚	—	0.00	—	0.00	—	0.00
己烯雌酚	—	0.00	—	0.00	—	0.00

化合物	柠檬		橘子		草莓	
	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%
双酚 A	0~3.02	94.44	0~6.92	91.67	0~3.52	94.44
雌酮	—	0.00	—	0.00	—	0.00
17 β -雌二醇	—	0.00	0~1.31	80.56	—	0.00
雌三醇	—	0.00	—	0.00	—	0.00
炔雌醇	0~1.74	33.33	0~2.87	77.78	—	0.00
4- <i>n</i> -壬基酚	0~8.91	75.00	0~26.35	94.44	—	0.00
4-辛基酚	—	0.00	—	0.00	—	0.00
己烯雌酚	—	0.00	—	0.00	—	0.00

注:—表示未检出

(*x*)线性关系良好,检出限为 0.17~0.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 67.77%~110.49%,*RSD* 为 1.08%~12.74%。本研究建立的方法具有灵敏度高、回收率高、检出限低、精密度好、重现性好、耗时少、操作简单快捷的优点,是一种新的环境友好型的样品检测技术,适用于水果中 8 种环境雌激素的定量及确证分析。

参考文献

- [1] Yoon K, Kwack S J, Kim H S, et al. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases[J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2014, 17(3):127-174.
- [2] Swedenborg E, Ruegg J, Makela S, et al. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders[J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 43(1):1-10.
- [3] 宋丹. 环境雌激素研究进展[J]. *广东化工*, 2011, 38(12):192-193.
- [4] 谭艳芳,陈锋. 环境雌激素与激素相关肿瘤研究进展[J]. *实用预防医学*, 2011, 18(1):189-192.
- [5] Cruz G, Foster W, Paredes A, et al. Long-term effects of early-life exposure to environmental oestrogens on ovarian function: role of epigenetics[J]. *J Neuroendocrinol*, 2014, 26(9):613-624.
- [6] Bhandari R K, Deem S L, Holliday D K, et al. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2015, 214(9):195-219.
- [7] 孙小红,李婕,葛安靖. 环境雌激素的生殖和发育毒性研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(4):1-2, 22.
- [8] 岳强,周建科,李路华,等. 气相色谱法研究水中壬基酚的催化光降解[J]. *化学世界*, 2008, 49(6):380-381.
- [9] 林雪霞,刘艳,张经华,等. 超高效液相色谱法测定护肤霜中 5 种不同的雌激素[J]. *中国科学(B辑:化学)*, 2009, 39(8):832-837.
- [10] 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, 16(5):791-797.
- [11] 王淑惠,张宏,杨立学,等. 羊肉中环境雌激素的气相色谱-质谱测定法[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(9):819-821.
- [12] 李雪,牟光庆,陈历俊,等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱法测定原料奶中 5 种环境雌激素残留量的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(9):293-297.
- [13] 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.
- [14] 祝伟霞,刘亚凤,袁萍,等. 液相色谱-串联质谱法快速测定婴幼儿配方奶粉中 39 种激素残留量[J]. *色谱*, 2010, 28(11):1031-1037.
- [15] 王莎莎,谭文婷,邓国宏. 环境雌激素生物学检测方法研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(1):120-122.
- [16] 中华人民共和国农业部,中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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]. 北京:中国标准出版社, 2013.
- [17] 王君,夏玮,肖永华,等. 某市动物性食品环境雌激素活性的调查与分析[J]. *公共卫生与预防医学*, 2012, 23(4):1-5.
- [18] 应永飞,朱聪英,陈慧华,等. 动物尿液中 15 种甾类同化激素的液相色谱-串联质谱同时测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(12):1308-1312.
- [19] LU J, WU J, Stoffella P J, et al. Isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry method for the analysis of alkylphenols, bisphenol A, and estrogens in food crops[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1258(19):128-135.