



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102735768 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201210182786. 4

3, 说明书第 1 - 53 段.

(22) 申请日 2012. 06. 06

审查员 淡美俊

(73) 专利权人 北京师范大学

地址 100875 北京市海淀区新街口外大街
19 号北京师范大学

(72) 发明人 史江红 吴唯 张晖 刘晓薇
陈庆彩 薄婷 贾彦舶

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006. 01)

G01N 30/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102331468 A, 2012. 01. 25, 权利要求 1 - 4, 说明书第 1 - 55 段.

CN 102435681 A, 2012. 05. 02, 权利要求 1 -

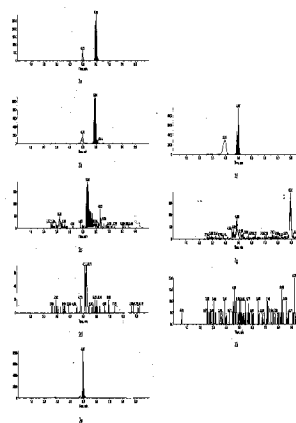
权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种畜禽粪便中雌激素及其结合体的共检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种环境中内分泌干扰物的检测技术, 特别是涉及一种采用液相色谱 - 串联质谱联用技术对复杂基质畜禽粪便样品中雌酮、 17β -雌二醇、雌三醇、 17α -乙炔基雌二醇、雌酮葡萄糖苷酸结合体、 17β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体、雌酮硫酸盐结合体和 17β -雌二醇硫酸盐结合体定量分析的技术。本方法将采集好的畜禽粪便样品, 采用快速溶剂萃取方法萃取畜禽粪便中的雌激素, 再用液液萃取和碱液提取对提取液进行预净化, 然后用 HLB 柱富集目标物, 用 Florisil 柱和 NH₂ 柱对雌激素单体和结合体分别进行净化, 最后采用液相色谱 - 串联质谱联用进行检测。该方法环境友好、易于操作、且回收率较高, 能够快速分析复杂基质畜禽粪便中痕量存在的雌激素及其结合体。



1. 一种畜禽粪便样品中雌激素及其结合体的共检测方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

(1) 固体样品提取

将采集的畜禽粪便样品进行冷冻干燥,准确称取 0.5 g 样品,用 66 mL 丙酮/甲醇=1:1 (v/v)作为萃取溶剂,用快速溶剂萃取方法提取样品中的雌激素及其结合体;然后旋转蒸发浓缩至 1 mL 左右,用氮气吹干,残渣留作净化;萃取温度为 80 °C,压力为 1500 psi,静态提取 2 次,各 8 min;

(2) 提取液预净化

a. 液液萃取净化:用 5 mL 乙腈重新溶解残渣,再加入 10 mL 正己烷漩涡混合 5 min,液液萃取去除油脂,弃去上层正己烷相,重复两次,并将乙腈相用氮气吹干;

b. 碱液净化+HLB 柱净化:用 10 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液超声溶解液液萃取净化后的残渣,然后通过 0.7 μm 的 Whatman 公司的 GF/F 玻璃纤维滤膜,重复三次;滤液与 100 mL 超纯水、6 mL 甲醇混匀后,用 4 mol/L 的盐酸调节 pH 至 3 左右,利用固相萃取装置活化 Waters 公司的 HLB 固相萃取柱,活化的顺序为:5 mL 色谱纯乙酸乙酯、5 mL 色谱纯甲醇及 10 mL 超纯水,流速为 1 mL/min,采用已活化的固相萃取柱对水样进行固相萃取富集;富集完成后,将 HLB 柱抽干,等待进一步净化;

(3) 样品二次净化

a. NH₂ 柱净化

将用 5 mL 甲醇活化过的 NH₂ 柱用固相萃取柱转接头接于干燥的 HLB 柱下方;首先用 6 mL 甲醇洗脱 HLB 柱和 NH₂ 柱串联装置,收集于 10 mL 玻璃离心管中,控制流速为 1 mL/min,记为洗脱液 1;再用 6 mL 2% 氨水甲醇溶液洗脱 NH₂ 柱上的雌激素结合体于 10 mL 玻璃离心管中,控制流速为 1 mL/min,记为洗脱液 2;洗脱液 1 与洗脱液 2 分别在氮气流下缓慢吹干;

b. Florisil 柱净化

用 5 mL 正己烷/二氯甲烷=3/1 (v/v) 溶液重新溶解氮吹干后的洗脱液 1 的残渣,然后通过预先用正己烷活化好的 Waters 公司的 Florisil 固相萃取柱,再用 5 mL 正己烷/二氯甲烷=3/1 (v/v) 淋洗,最后用 6 mL 丙酮/二氯甲烷=2/8 (v/v) 为洗脱剂洗脱至装有洗脱液 2 残渣的 10 mL 玻璃离心管中,然后将洗脱液用氮气缓慢吹干;残渣用 1 mL 甲醇定容,漩涡混合后过 0.22 μm 的尼龙滤头待测;

(4) 液相色谱-串联质谱联用分析

液相色谱-串联质谱联用仪器为:Agilent 1100 高效液相色谱系统,包括四元输液泵,美国 Agilent 公司的自动进样器,3200QTRAP 型液相色谱/串联质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI)以及 Analyst 1.4.1 数据处理软件;色谱柱:Nova-Pak C18, 3.9mm×150mm×4 μm, Waters 公司;离子源:电喷雾离子化源(ESI),负离子方式检测;离子喷射电压:-4500V;温度:450°C;源内气体 GS1 为 N₂,压力:45psi;源内气体 GS2 为 N₂,压力:45psi;气帘气体为 N₂,压力:20psi;扫描方式为多重反应监测(MRM);碰撞气为 N₂,压力:Medium;

(5) 标准曲线的绘制,以外标法进行定量测定

所述的外标法标准曲线的绘制:利用分析天平准确称量雌激素及其结合体的标准品,溶于色谱纯乙腈内,配置成系列浓度的标准溶液,采用液相色谱-串联质谱联用进行分析,

分别以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得到标准曲线,用于测定样品中分析物的量;

(6) 样品回收率的测定

采集待测畜禽粪便样品,按步骤 1 对样品进行提取,再按步骤 2 进行预净化,按步骤 3 进行二次净化,紧接着用液相色谱-串联质谱联用检测,并与上述得到的标准曲线比较,通过换算最终得到待测畜禽粪便中雌激素及其结合体的值;

所述雌激素为雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇、17 α -乙炔基雌二醇,所述结合体为雌酮硫酸盐结合体、17 β -雌二醇硫酸盐结合体、雌酮葡萄糖苷酸结合体、17 β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体。

2. 如权利要求 1 所述的畜禽粪便样品中雌激素及其结合体的共检测方法,其中:雌酮、17 β -雌二醇、雌三醇、17 α -乙炔基雌二醇、雌酮硫酸盐结合体、17 β -雌二醇硫酸盐结合体的 HPLC 流动相梯度洗脱条件如表 1 所示;雌酮葡萄糖苷酸结合体、17 β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体的 HPLC 流动相梯度洗脱条件如表 2 所示:

表 1

序号	时间 min	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$	乙腈 %	氨水, 1% %	甲醇 %
0	0.00	650	7.5	85.0	7.5
1	0.20	650	7.5	85.0	7.5
2	1.20	650	10.0	80.0	10.0
3	2.00	650	15.0	70.0	15.0
4	3.00	650	49.0	2.0	49.0
5	6.10	650	50.0	0.0	50.0
6	6.20	650	7.5	85.0	7.5
7	10.00	650	7.5	85.0	7.5

表 2

序号	时间 min	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$	乙腈 %	甲酸, 0.2% %	甲醇 %
0	0.00	650	7.5	85.0	7.5
1	0.20	650	7.5	85.0	7.5
2	1.20	650	10.0	80.0	10.0
3	2.00	650	15.0	70.0	15.0
4	3.00	650	46.0	8.0	46.0
5	6.10	650	48.0	4.0	48.0
6	6.20	650	7.5	85.0	7.5
7	10.00	650	7.5	85.0	7.5

一种畜禽粪便中雌激素及其结合体的共检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及液相色谱-串联质谱联用检测技术领域,特别是涉及复杂畜禽粪便样品中雌激素及其结合体的提取、净化和仪器检测方法。

背景技术

[0002] 近年来,天然与合成雌激素雌酮 (Estrone, E1)、 17β -雌二醇 (17β -Estradiol, E2)、雌三醇 (Estrinol, E3) 和 17α -乙炔基雌二醇 (17α -Ethinyl Estradiol, EE2) 作为典型的环境中内分泌干扰物引起了学术界的广泛关注。相关研究表明,水环境中 ng/L 浓度水平即可对鱼类等水生生物构成雌性化风险。而由人和哺乳动物排放的尿液和粪便是环境中雌激素的最根本来源,其排放是不可避免的。雌激素经由肝脏代谢,主要以葡萄糖醛酸或硫酸盐结合体形式随粪尿排出,这其中包括雌酮葡萄糖苷酸结合体 (Estrone-3-glucuronide, E1-3G)、 17β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体 (E2-3G, Estradiol-3-glucuronide)、雌酮硫酸盐结合体 (Estrone-3-sulfate, E1-3S) 和 17β -雌二醇硫酸盐结合体 (Estradiol-3-sulfate, E2-3S) 等。尽管这些雌激素结合体无活性,但在污水处理厂或自然水体中大部分可分解为具有雌激素活性的雌激素单体。雌激素葡萄糖苷酸结合体在环境中容易还原为单体结构,而雌激素硫酸盐结合体不易还原,在环境中的残留浓度相对较高。

[0003] 随着人类生活水平的提高,规模化畜禽养殖规模逐渐扩大,作为雌激素最主要源头的畜禽粪便产量也逐年增加。由于降雨径流及农业有机肥的施用,畜禽粪便中雌激素对环境的污染变得不容忽视。因此,调查和研究不同养殖类型畜禽粪便中雌激素及其结合体的浓度对于该类物质排放总量的估算及源头控制具有重要意义。但畜禽粪便中基质组成极其复杂,而雌激素又痕量存在,这对样品前处理提出了较高的要求。

[0004] 近年来,痕量有机物的仪器检测技术有了很大的提高,如气相色谱-质谱联用 (GC/MS)、气相色谱-串联质谱联用 (GC/MS/MS)、液相色谱-质谱联用 (LC/MS)、液相色谱-串联质谱联用 (LC/MS/MS) 等,具有较高的灵敏度和精确度。然而,对于实际环境样品,由于基质干扰作用,使分析方法的回收率和稳定性大大降低。如何将畜禽粪便中痕量存在的雌激素提取和净化,成为畜禽粪便中雌激素分析的一个瓶颈。因此,建立回收率高、重现性好的适用于分析复杂基质固体样品,特别是畜禽粪便中痕量存在的雌激素及其结合体的前处理方法是十分必要的。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对复杂基质畜禽粪便样品中雌激素及结合体痕量存在、基质干扰大、前处理技术难度大等问题,拟开发一种回收率高、灵敏度高、准确、快速的分析技术,实现对雌激素及结合体,例如 E1、E2、E3、EE2、E1-3S、E2-3S、E1-3G、E2-3G 的定量测定。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种畜禽粪便样品中雌激素及其结合体的共检测方法,其特征在于该方法包括如

下部分：

[0008] (1) 固体样品提取

[0009] 将采集的畜禽粪便样品进行冷冻干燥，以丙酮 / 甲醇 = 1 : 1(v/v) 为萃取剂，用快速溶剂萃取方法提取样品中的雌激素及结合体；然后旋转蒸发浓缩至 1mL 左右，用氮气吹干，残渣留作净化。本发明所述的快速溶剂萃取方法选择的温度为 80℃，压力为 1500psi，静态提取 2 次，各 8min。

[0010] (2) 预净化

[0011] a. 液液萃取净化：用乙腈重新溶解残渣，再加入正己烷漩涡混合，液液萃取去除油脂，弃去上层正己烷相，重复两次，并将乙腈相用氮气吹干。

[0012] b. 碱液净化 +HLB 柱净化：用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液超声溶解液液萃取净化后的残渣，然后通过 0.7 μm 的 Whatman 公司的 GF/F 玻璃纤维滤膜，重复三次。滤液与 100mL 超纯水、6mL 甲醇混匀后，用 4mol/L 的盐酸调节 pH 至 3 左右，利用固相萃取装置活化 Waters 公司的 HLB 固相萃取柱 (200mg, 6mL)，活化的顺序为：5mL 色谱纯乙酸乙酯、5mL 色谱纯甲醇及 10mL 超纯水，流速为 1mL/min；采用已活化的固相萃取柱对水样进行固相萃取富集。富集完成后，将 HLB 柱抽干，等待进一步净化。

[0013] (3) 样品二次净化

[0014] a. NH₂ 柱净化

[0015] 将用甲醇活化过的 Waters 公司的 NH₂ 柱 (500mg, 6mL) 用固相萃取柱转接头接于干燥的 HLB 柱下方。首先用甲醇洗脱 HLB 柱和 NH₂ 柱串联装置，收集于 10mL 玻璃离心管中，控制流速为 1mL/min，记为洗脱液 1；再用 2% 氨水甲醇溶液 (v/v) 洗脱 NH₂ 柱上的雌激素结合体于 10mL 玻璃离心管中，控制流速为 1mL/min，记为洗脱液 2；洗脱液 1 与洗脱液 2 分别在氮气流下缓慢吹干。

[0016] b. Florisil 柱净化

[0017] 用正己烷 / 二氯甲烷 = 3/1(v/v) 溶液重新溶解氮吹干后的洗脱液 1 的残渣，然后通过预先用正己烷活化好的 Waters 公司的 Florisil 固相萃取柱 (500mg, 6mL)，再用正己烷 / 二氯甲烷 = 3/1(v/v) 淋洗，最后用丙酮 / 二氯甲烷 = 2/8(v/v) 为洗脱剂洗脱至装有洗脱液 2 残渣的 10mL 玻璃离心管中，然后将洗脱液用氮气缓慢吹干；残渣用甲醇定容，漩涡混合后过 0.22 μm 的尼龙滤头待测。

[0018] (4) 液相色谱 - 串联质谱分析

[0019] 液相色谱 - 串联质谱联用仪器为：Agilent 1100 高效液相色谱系统，包括四元输液泵，自动进样器（美国 Agilent 公司）。3200QTRAP 型液相色谱 / 串联质谱仪，配有电喷雾离子化源 (ESI) 以及 Analyst 1.4.1 数据处理软件（美国 Applied Biosystem 公司）。

[0020] 色谱柱：Nova-Pak C18 (3.9mm × 150mm × 4 μm)，Waters 公司。离子源：电喷雾离子化源 (ESI)，负离子方式检测；离子喷射电压：-4500V；温度：450℃；源内气体 1 (GS1, N₂) 压力：45psi；源内气体 2 (GS2, N₂) 压力：45psi；气帘气体 (N₂) 压力：20psi；扫描方式为多重反应监测 (MRM)；碰撞气 (N₂) 压力：Medium。

[0021] (5) 标准曲线的绘制，以外标法进行定量测定

[0022] 所述的外标法标准曲线的绘制：利用分析天平准确称量雌激素及其结合体的标准物质溶于色谱纯乙腈，配置成系列浓度的标准溶液，采用液相色谱 - 串联质谱联用进行分

析,分别以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得到标准曲线,用于测定样品中分析物的量。

[0023] (6) 样品及回收率的测定

[0024] 采集某畜禽养殖场的粪便,按步骤 1 对畜禽粪便中的目标化合物进行提取,再按步骤 2 对提取液进行预净化,然后按步骤 3 对样品进行二次净化,紧接着用液相色谱-串联质谱联用检测,并与步骤 5 得到的标准曲线比较,通过换算最终得到待测畜禽粪便样品中雌激素及其结合体的含量。

[0025] 采用同样的畜禽粪便样品,按 50ng/g 的添加量加入标准溶液,进行上述预处理并测定雌激素及其结合体的含量,按照下式进行回收率计算:

[0026]

$$R = \frac{C - C_0}{50} \times 100\% \quad (1)$$

[0027] R- 回收率, %;

[0028] C- 添加标准溶液畜禽粪便样品中目标物含量, ng/g;

[0029] C_0 - 未添加标准溶液畜禽粪便样品中目标物含量, ng/g。

[0030] 其中:所述雌激素及其结合体为:雌酮 (E1)、17 β -雌二醇 (E2)、雌三醇 (E3)、17 α -乙炔基雌二醇 (EE2)、雌酮葡萄糖苷酸结合体 (E1-3G)、17 β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体 (E2-3G)、雌酮硫酸盐结合体 (E1-3S) 和 / 或 17 β -雌二醇硫酸盐 (E2-3S)。

[0031] 其中, E1、E2、E3、EE2、E1-3S 和 E2-3S 的 HPLC 流动相梯度洗脱条件见表 1; E1-3G 和 E2-3G 的 HPLC 流动相梯度洗脱条件见表 2。

[0032] 表 1 测定 E1、E2、E3、EE2、E1-3S 和 E2-3S 的流动相梯度条件

[0033]

序号	时间 min	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$	乙腈 %	氨水 (1%) %	甲醇 %
0	0.00	650	7.5	85.0	7.5
1	0.20	650	7.5	85.0	7.5
2	1.20	650	10.0	80.0	10.0
3	2.00	650	15.0	70.0	15.0
4	3.00	650	49.0	2.0	49.0
5	6.10	650	50.0	0.0	50.0
6	6.20	650	7.5	85.0	7.5
7	10.00	650	7.5	85.0	7.5

[0034] 表 2 测定 E1-3G 和 E2-3G 流动相梯度条件

[0035]

序号	时间 Min	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$	乙腈 %	甲酸 (0.2%) %	甲醇 %
0	0.00	650	7.5	85.0	7.5
1	0.20	650	7.5	85.0	7.5
2	1.20	650	10.0	80.0	10.0
3	2.00	650	15.0	70.0	15.0
4	3.00	650	46.0	8.0	46.0
5	6.10	650	48.0	4.0	48.0
6	6.20	650	7.5	85.0	7.5
7	10.00	650	7.5	85.0	7.5

[0036] 本发明的有益效果是采用快速溶剂萃取方法萃取畜禽粪便中的雌激素,再用液液萃取和碱液提取对提取液进行预净化,然后用 HLB 柱富集目标物,用 Florisil 柱和 NH₂ 柱对雌激素单体和结合体分别进行净化,最后采用液相色谱-串联质谱联用进行检测,检测限低,具有较高的灵敏度和精确度。本发明提供一种检测限低、重现性好、灵敏度高、回收率较好、操作简单易行的分析方法,适用于分析复杂基质畜禽粪便样品中的 E1、E2、E3、EE2、E1-3S、E2-3S、E1-3G、E2-3G。本方法的回收率与最低检测限,如表 3 所示:

[0037] 表 3 本方法的回收率和最低检测限

物质名称	加标 50ng/g (n=3)		方法检测限 (ng/g)
	回收率 (%)	标准偏差 (%)	
E1	84	4.6	0.1
E2	67	2.4	0.2
E3	51	6.8	0.4
EE2	68	5.1	0.2
E1-3S	72	1.7	0.5
E2-3S	95	2.2	0.5
E1-3G	64	3.8	1
E2-3G	73	5.4	1

附图说明

[0039] 图 1 为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准品溶液的色谱图

[0040] 色谱图依次为:图 1a 为雌酮、图 1b 为 17 β -雌二醇、图 1c 为雌三醇、图 1d 为 17 α -乙炔基雌二醇、图 1e 为雌酮硫酸盐结合体、图 1f 为 17 β -雌二醇硫酸盐结合体、图 1g 为雌酮葡萄糖苷酸结合体、图 1h 为 17 β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体;

[0041] 图 2 为某畜禽养殖厂鸡粪中雌激素及结合体的色谱图

[0042] 色谱图依次为:图 2a 为雌酮、图 2b 为 17 β -雌二醇、图 2c 为雌三醇、图 2d 为 17 α -乙炔基雌二醇、图 2e 为雌酮硫酸盐结合体、图 2f 为 17 β -雌二醇硫酸盐结合体、图 2g 为雌酮葡萄糖苷酸结合体、图 2h 为 17 β -雌二醇葡萄糖苷酸结合体。

具体实施方式

[0043] 下面结合实例及附图对本发明的技术方案作进一步的描述

[0044] (1) 固体样品提取

[0045] 将采集的畜禽粪便样品进行冷冻干燥,准确称取 0.5g 样品,用 66mL 丙酮 / 甲醇 = 1 : 1(v/v) 作为萃取溶剂,用快速溶剂萃取方法提取样品中的雌激素及结合体;然后旋转蒸发浓缩至 1mL 左右,用氮气吹干,残渣留作净化。本发明所述的快速溶剂萃取方法选择的温度为 80℃,压力为 1500psi,静态提取 2 次,各 8min。

[0046] (2) 样品预净化

[0047] a. 液液萃取净化:用 5mL 乙腈重新溶解残渣,再加入 10mL 正己烷漩涡混合 5min,液液萃取去除油脂等物质,弃去上层正己烷相,重复两次,并将乙腈相用氮气吹干。

[0048] b. 碱液净化+HLB 柱净化:用 10mL 浓度为 0.1mol/L 的 NaOH 溶液超声溶解液液萃取净化后的残渣,然后通过 0.7 μm 的 Whatman 公司的 GF/F 玻璃纤维滤膜,重复三次。滤液与 100mL 超纯水、6mL 甲醇混匀后,用 4mol/L 的盐酸调节 pH 至 3 左右,利用固相萃取装置活化 Waters 公司的 HLB 固相萃取柱 (200mg,6mL),活化的顺序为:5mL 色谱纯乙酸乙酯、5mL 色谱纯甲醇及 10mL 超纯水,流速为 1mL/min,采用已活化的固相萃取柱对水样进行固相萃取富集。富集完成后,将 HLB 柱抽干,等待进一步净化。

[0049] (3) 样品二次净化

[0050] a. NH₂ 柱净化

[0051] 将用 5mL 甲醇活化过的 Waters 公司的 NH₂ 柱 (500mg,6mL) 用固相萃取柱转接头接于干燥的 HLB 柱下方。首先用 6mL 甲醇洗脱 HLB 柱和 NH₂ 柱串联装置,收集于 10mL 玻璃离心管中,控制流速为 1mL/min,记为洗脱液 1;再用 6mL 2%氨水甲醇溶液洗脱 NH₂ 柱上的雌激素结合体于 10mL 玻璃离心管中,控制流速为 1mL/min,记为洗脱液 2;洗脱液 1 与洗脱液 2 分别在氮气流下缓慢吹干。

[0052] b. Florisil 柱净化

[0053] 用 5mL 正己烷 / 二氯甲烷 = 3/1(v/v) 溶液重新溶解氮吹干后的洗脱液 1 的残渣,然后通过预先用正己烷活化好的 Waters 公司的 Florisil 固相萃取柱 (500mg,6mL),再用 5mL 正己烷 / 二氯甲烷 = 3/1(v/v) 淋洗,最后用 6mL 丙酮 / 二氯甲烷 = 2/8(v/v) 为洗脱剂洗脱至装有洗脱液 2 残渣的 10mL 玻璃离心管中,然后将洗脱液用氮气缓慢吹干;残渣用 1mL 甲醇定容,漩涡混合后过 0.22 μm 的尼龙滤头待测。

[0054] (4) 液相色谱 - 串联质谱联用分析

[0055] 液相色谱 - 串联质谱联用选择的条件:Agilent 1100 高效液相色谱系统,包括四元输液泵,自动进样器(美国 Agilent 公司);3200QTRAP 串联质谱仪,配有电喷雾离子化源 (ESI) 以及 Analyst 1.4.1 数据处理软件(美国 Applied Biosystem 公司)。

[0056] 色谱柱:Nova-Pak C18(3.9mm×150mm×4 μm),Waters 公司。离子源:电喷雾离子化源 (ESI),负离子方式检测;离子喷射电压:-4500V;温度:450℃;源内气体 1(GS1, N₂) 压力:45psi;气体 2(GS2, N₂) 压力:45psi;气帘气体 (N₂) 压力:20psi;扫描方式为多重反应监测 (MRM);碰撞气 (N₂) 压力:Medium。E1、E2、E3、EE2、E1-3S 和 E2-3S 的 HPLC 流动相梯度洗脱条件见表 1;E1-3G 和 E2-3G 的 HPLC 流动相梯度洗脱条件见表 2。

[0057] (5) 标准曲线的绘制,以外标法进行定量测定

[0058] 所述的外标法标准曲线的绘制:利用分析天平准确称量 E1、E2、E3、EE2、E1-3S、

E2-3S、E1-3G、E2-3G 的标准品,溶于色谱纯乙腈内,配置成系列浓度的标准溶液,采用液相色谱-串联质谱联用进行分析,分别以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得到标准曲线,用于测定样品中分析物的量。

[0059] (6) 样品回收率的测定

[0060] 采集待测畜禽粪便样品,按步骤 1 对样品进行提取,再按步骤 2 进行预净化,按步骤 3 进行二次净化,紧接着用液相色谱-串联质谱联用检测,并与上述得到的标准曲线比较,通过换算最终得到待测畜禽粪便中 E1、E2、E3、EE2、E1-3S、E2-3S、E1-3G、E2-3G 的背景值。

[0061] 采用同样的畜禽粪便样品,按 50ng/g 的添加量加入八种目标化合物的混合标准溶液,进行预处理并测定目标化合物的含量,扣除背景值后进行回收率计算。

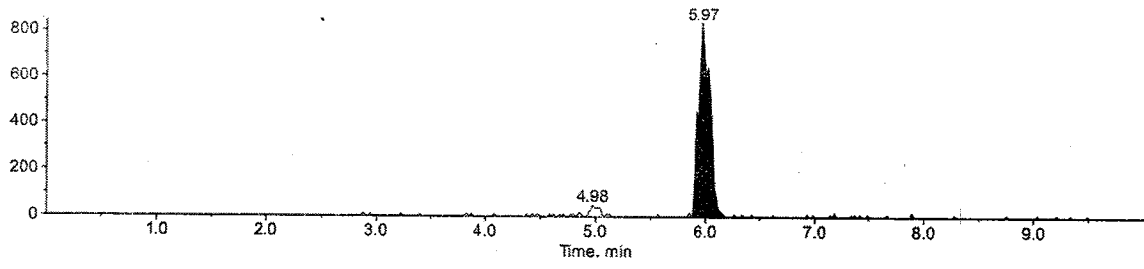
[0062] 利用本发明检测某畜禽养殖厂畜禽粪便样品中雌激素及 E1、E2、E3、EE2、E1-3S、E2-3S、E1-3G、E2-3G 的实施过程:

[0063] 采集某畜禽养殖厂新鲜的畜禽粪便样品,迅速装入洗净的装有叠氮化钠的 500mL 棕色采样瓶中并放入带有冰块保温箱内 ($< 4^{\circ}\text{C}$),带回实验室,按步骤 1 对样品进行提取,再按步骤 2 和步骤 3 进行净化,最后按步骤 4 用液相色谱-串联质谱联用检测,并与标准曲线比较,通过换算最终得到待测样品中 E1、E2、E3、EE2、E1-3S、E2-3S、E1-3G、E2-3G 的含量。

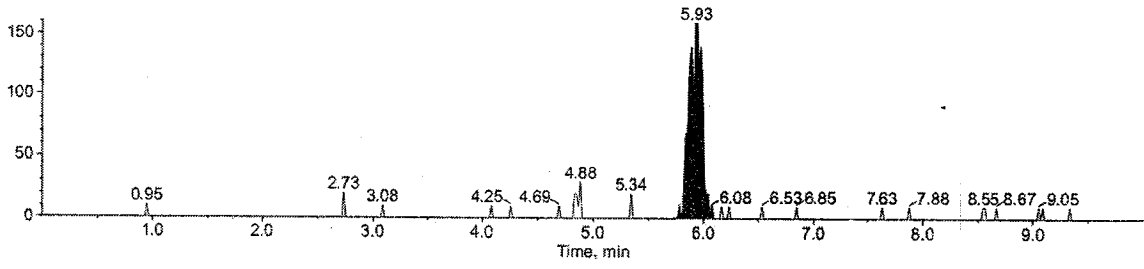
[0064] 表 3 实际畜禽粪便中八种目标物的含量 (ng/g)

物质名称	样品含量 (ng/g)				
	1-1	1-2	1-3	Mean	RSD
E1	33.3	28.2	34.1	31.8	10.1%
E2	80.6	73.8	81.0	78.4	5.2%
E3	21.4	10.4	18.4	16.7	34.0%
EE2	n.d.	n.d.	n.d.	--	--
E1-3S	73.0	71.0	83.0	75.6	8.5%
E2-3S	221	226	270	239	11.3%
E1-3G	n.d.	n.d.	n.d.	--	--
E2-3G	n.d.	n.d.	n.d.	--	--

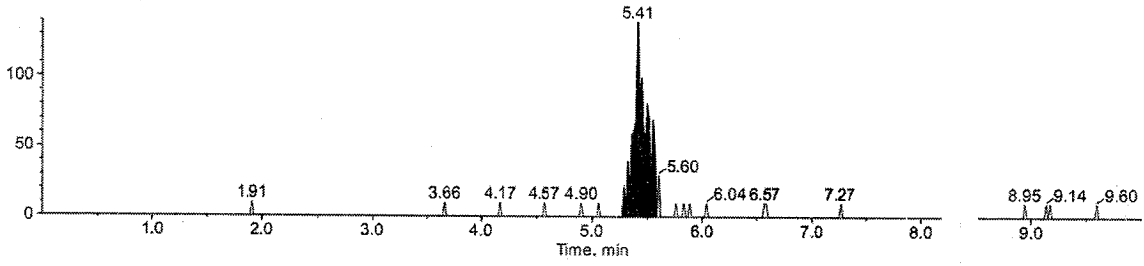
[0066] 注:n. d. 表示未检出



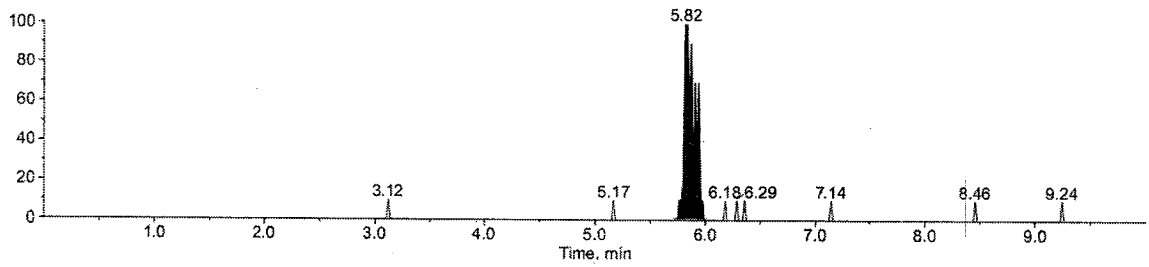
1a



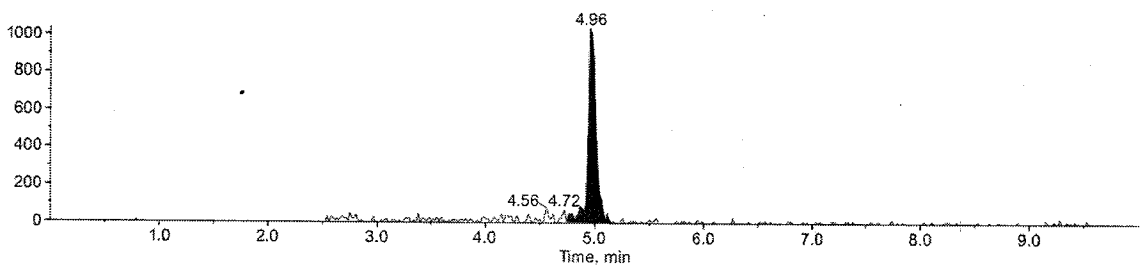
1b



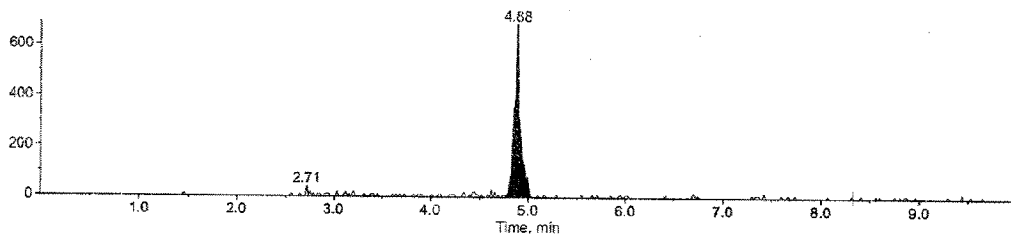
1c



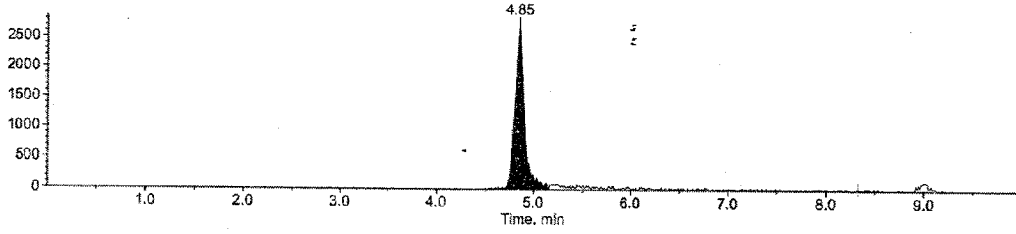
1d



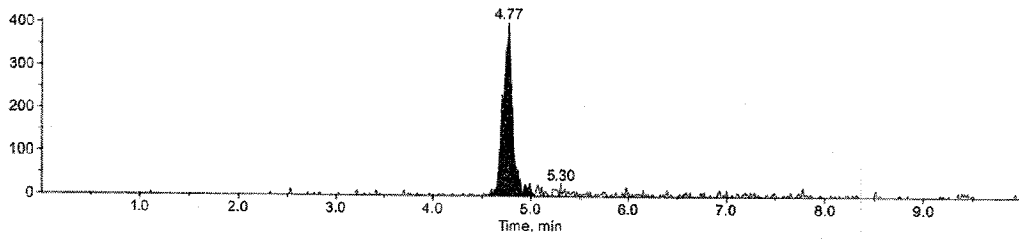
1e



1f

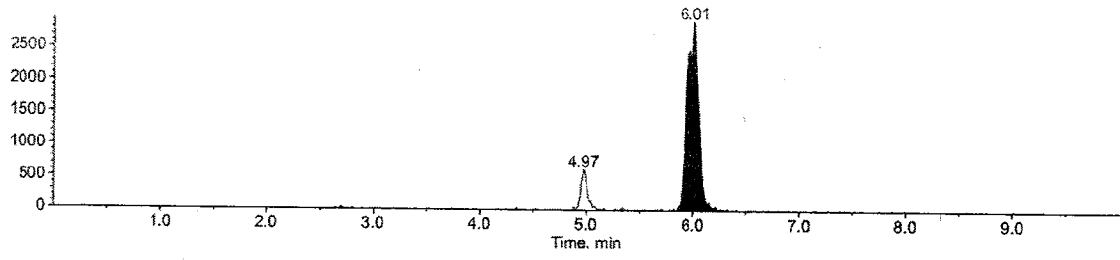


1g

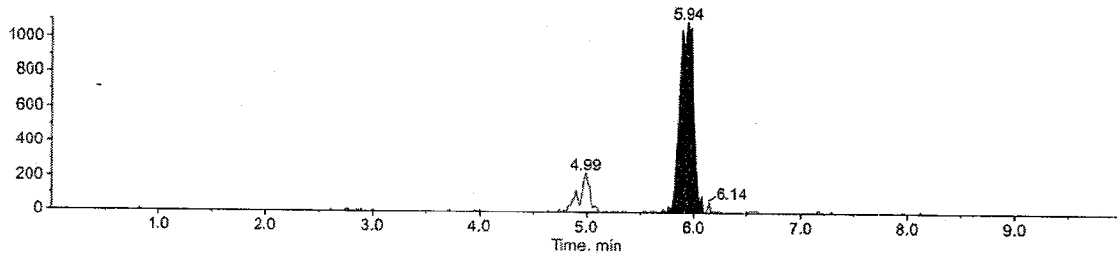


1h

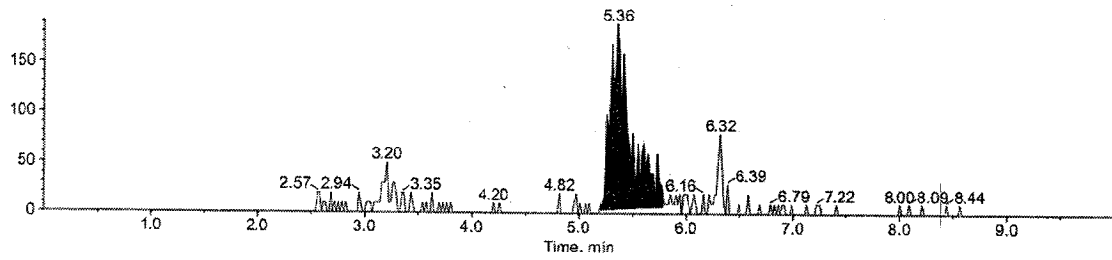
图 1



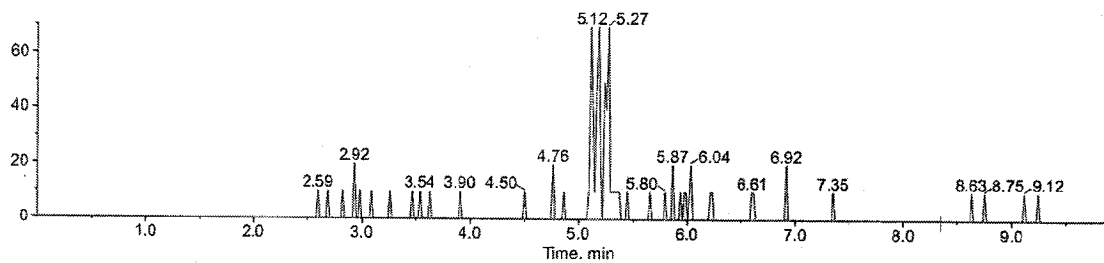
2a



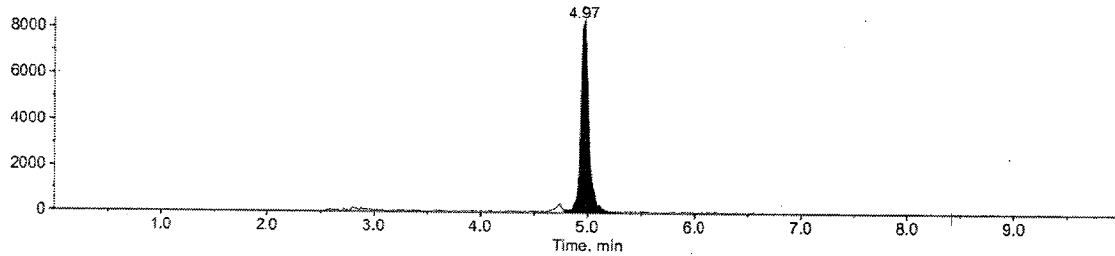
2b



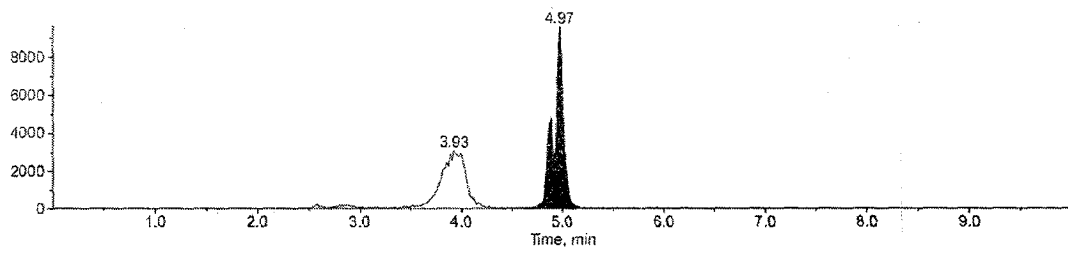
2c



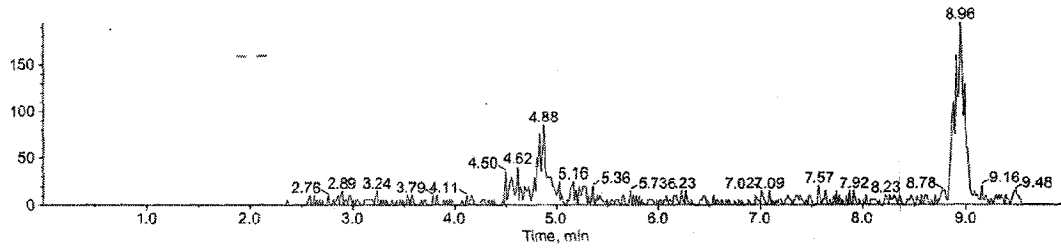
2d



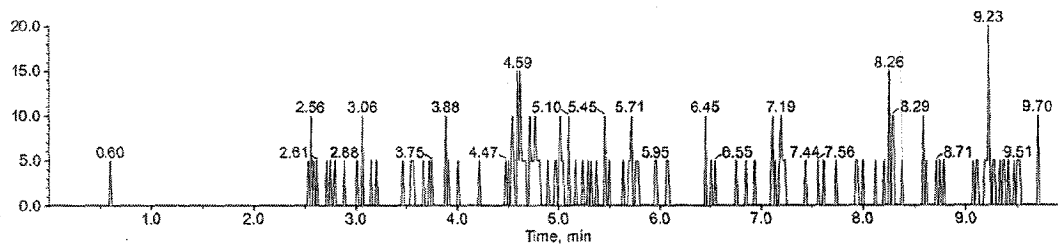
2e



2f



2g



2h

图 2