

用 SampliQ OPT 固相萃取-液相色谱法测定鱼类（鲫鱼）中的激素

应用报告

食品安全

作者

Chen-Hao Zhai and Yun Zou
安捷伦科技公司
上海市外高桥保税区英伦路 412 号
200131
中国

Rou-Nan Jin
第二军医大学
上海市长海路 259 号 200093
中国

摘要

本研究优化了鲫鱼（*Carassius carassius*）肉中 16 种激素（雌三醇、氢化泼尼松、氢化可的松、强的松、甲基氢化泼尼松、倍他米松、地塞米松、醋酸曲安奈德、孕三烯酮、醋酸氢化泼尼松、醋酸氢化可的松、醋酸强的松、雌二醇、醋酸可的松、甲基睾酮、雌酮）的固相萃取（SPE）/高效液相色谱（HPLC）提取和测定方法。结果表明，用安捷伦 SampliQ OPT（60 mg，3 mL）固相萃取，并用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）进行 HPLC 分析，适用于对这类化合物的提取。方法的回收率为 76.2 到 106.1%，相对标准偏差（RSD）为 1.7 到 8.9%。



Agilent Technologies

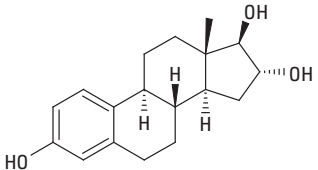
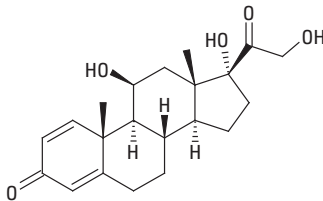
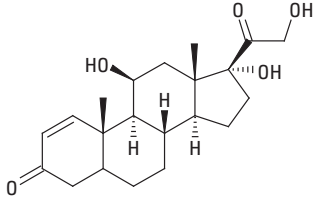
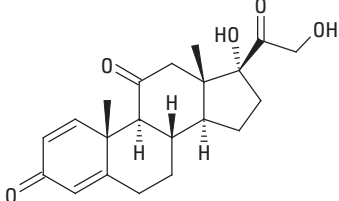
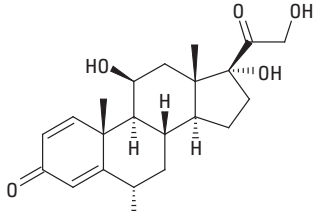
前言

食品安全问题日益受到人类世界的关注。许多添加到食品中的化学物质都对人类健康构成了潜在威胁。激素是常见的食品添加剂。长期使用糖皮质激素将导致高血糖、骨质疏松、先天畸形和免疫功能衰退。其它激素，如雌激素、雄激素和孕激素是致癌物质，

可导致乳腺癌、卵巢癌和细胞癌。许多国家的法规都明确限定了食品中这些化合物的残留量。

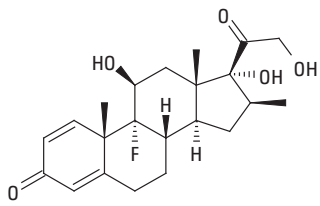
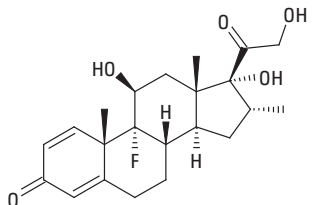
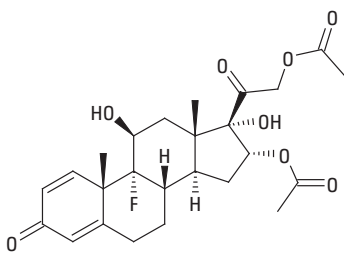
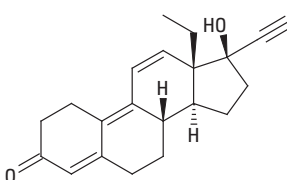
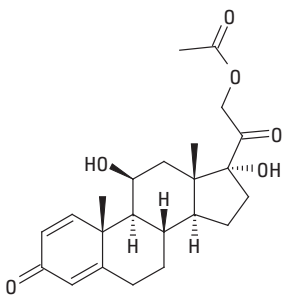
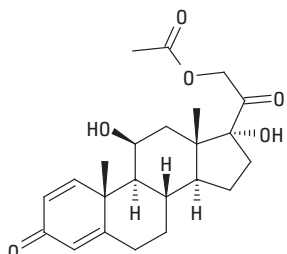
我们用 Agilent SampliQ OPT SPE 小柱，从鲫鱼肉中提取了 16 种激素（表 1），并建立了这 16 种化合物的 HPLC 测定方法。

表 1. 本研究所用的激素

序号	名称	CAS 号	Log P	结构
1	雌三醇	50-27-1	2.45	
2	氢化泼尼松	50-24-8	1.66	
3	氢化可的松	50-23-7	1.79	
4	强的松	53-03-2	2.07	
5	甲基氢化泼尼松	83-43-2	2.06	

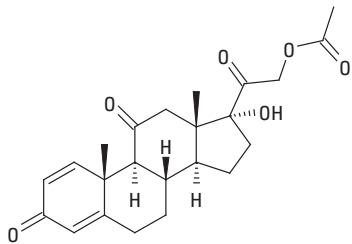
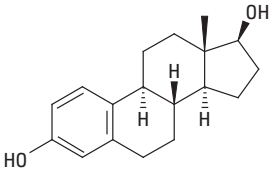
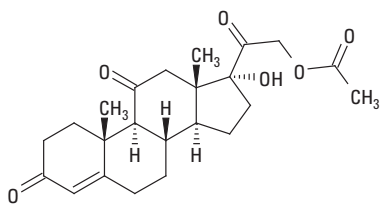
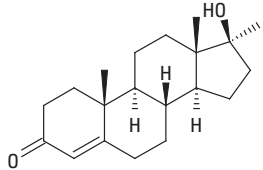
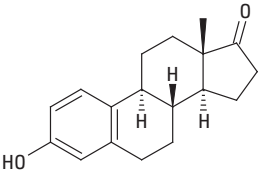
(Continued)

表 1. 本研究所用的激素

序号	名称	CAS 号	Log P	结构
6	倍他米松	378-44-9	1.93	
7	地塞米松	50-02-2	1.93	
8	醋酸曲安奈德	67-78-7	1.9	
9	孕三烯酮	16320-04-0	NA	
10	醋酸氢化泼尼松	52-21-1	NA	
11	甲基氢化泼尼松	83-43-2	NA	

(Continued)

表 1. 本研究所用的激素

序号	名称	CAS 号	Log P	结构
12	醋酸强的松	125-10-0	NA	
13	雌二醇	50-28-2	3.57	
14	醋酸可的松	50-04-4	2.35	
15	甲基睾酮	58-18-4	NA	
16	雌酮	53-16-7	4.03	

实验部分

材料与试剂

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或分析纯。激素标准品购自 NICBP (国家药品和生物制品检定所)。鲫鱼购自当地市场。

储备液 (1 mg/mL) 用甲醇配制, 冷冻 (-20 °C) 保存。储备液用甲醇稀释, 配制成工作溶液。工作溶液必须每周配制, 并保存在 4 °C 以下。

SPE 小柱为安捷伦 SampliQ OPT (3 mL, 60 mg, 部件号 5982-3036)。用配备二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1200 系列 HPLC 进行分析。分析柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (5 μm 250 mm × 4.6 mm id, 部件号 959990-902)。HPLC 分析前用 Agilent 0.45-μm PTFE Premium 注射式过滤器 (部件号 5185-5836) 过滤样品。

HPLC 条件

色谱柱:	ZORBAX Eclipse Plus C18 250 mm × 4.6 mm, 5 μm		
流速:	1.0 mL/min		
进样量:	5 μL		
柱温:	18 °C		
检测波长:	230 nm		
流动相:	水-乙腈梯度洗脱		
	时间 (分钟)	% 水	% 乙腈
	0	70	30
	10	65	35
	23	50	50
	30	20	80

分离

1. 称取 200 克鲫鱼肉, 匀浆, 并置洁净、密封容器中 -18 °C 下保存。
2. 取 1 g 均质样品 (精确到 0.01 g), 置 10-mL 聚丙烯离心管中, 加入 5 mL 甲醇。
3. 振摇 1 分钟。
4. 冰浴下超声提取 10 分钟。
5. 4000 r/min 转速下离心 5 分钟, 取 3 mL 上清液。
6. 置于洁净试管中, 40 °C 以下用氮气吹干。
7. 用 5 mL 含 5% 甲醇的水复溶。

SPE 净化

SPE 提取所采用的步骤如图 1 所示。Agilent SampliQ OPT 小柱先用 3 mL 甲醇, 再用 5 mL 水预处理。5 mL 提取物 (相当于 0.6 g 样品) 以 1 mL/min 的流速通过 SampliQ OPT 小柱。完全流出后, 用 5 mL 含 30% 甲醇的水冲洗小柱, 弃去全部洗脱液。抽负压 (2.0 kPa 以下) 3 分钟使小柱干燥。样品用 6 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 并于 40 °C 以下用氮气吹干。用甲醇溶解残留物, 并定容至 1.0 mL, 经 0.45 μm PTFE 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

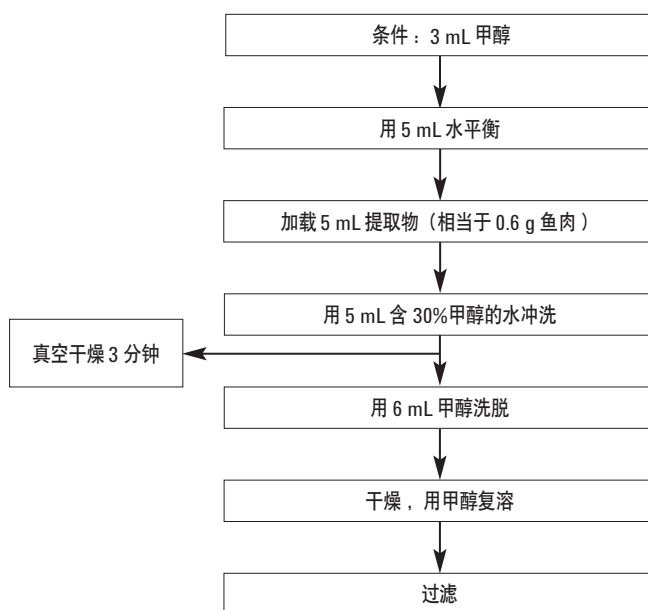


图 1. 鱼肉中激素的 SPE 提取过程

结果和讨论

线性和检测限

将储备液稀释成不同浓度, 进行 HPLC 分析。以峰面积和溶液浓度对各激素进行线性回归。信噪比在 2 和 3 之间所对应的进样浓度为检测限 (LOD)。线性范围在 1-100 mg/kg 之间。线性和 LOD 见表 2。

表2. 激素的线性和检测限

序号	化合物	回归方程	相关系数	LOD (mg/kg)
1	雌三醇	$Y = 8.096 \times -0.824$	0.9998	0.5
2	氢化泼尼松	$Y = 17.418 \times -2.088$	0.9999	0.2
3	氢化可的松	$Y = 15.746 \times -1.518$	0.9999	0.3
4	强的松	$Y = 20.192 \times -2.152$	0.9998	0.2
5	甲基氢化泼尼松	$Y = 16.986 \times -1.894$	0.9999	0.4
6	倍他米松	$Y = 20.439 \times -1.106$	0.9997	0.2
7	地塞米松	$Y = 20.176 \times -2.176$	0.9999	0.2
8	醋酸曲安奈德	$Y = 16.374 \times -1.558$	0.9997	0.4
9	孕三烯酮	$Y = 6.370 \times -0.668$	0.9998	1.0
10	醋酸氢化泼尼松	$Y = 15.589 \times -1.627$	0.9999	0.4
11	醋酸氢化可的松	$Y = 15.051 \times -1.584$	0.9999	0.4
12	醋酸强的松	$Y = 24.106 \times -2.401$	0.9997	0.2
13	雌二醇	$Y = 8.709 \times -0.635$	0.9999	0.8
14	醋酸可的松	$Y = 19.826 \times -2.336$	0.9996	0.4
15	甲基睾酮	$Y = 19.980 \times -2.209$	0.9996	0.3
16	雌酮	$Y = 10.701 \times -0.847$	0.9999	0.4

回收率和重现性

分别在鱼肉中添加 2 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 激素标样测定方法的精密度和回收率。每个浓度水平重复 6 次。空白、标准品和添加标样 (2 mg/kg) 样品的色谱图见图 2 至图 4。回收率和重现性结果见表 3。

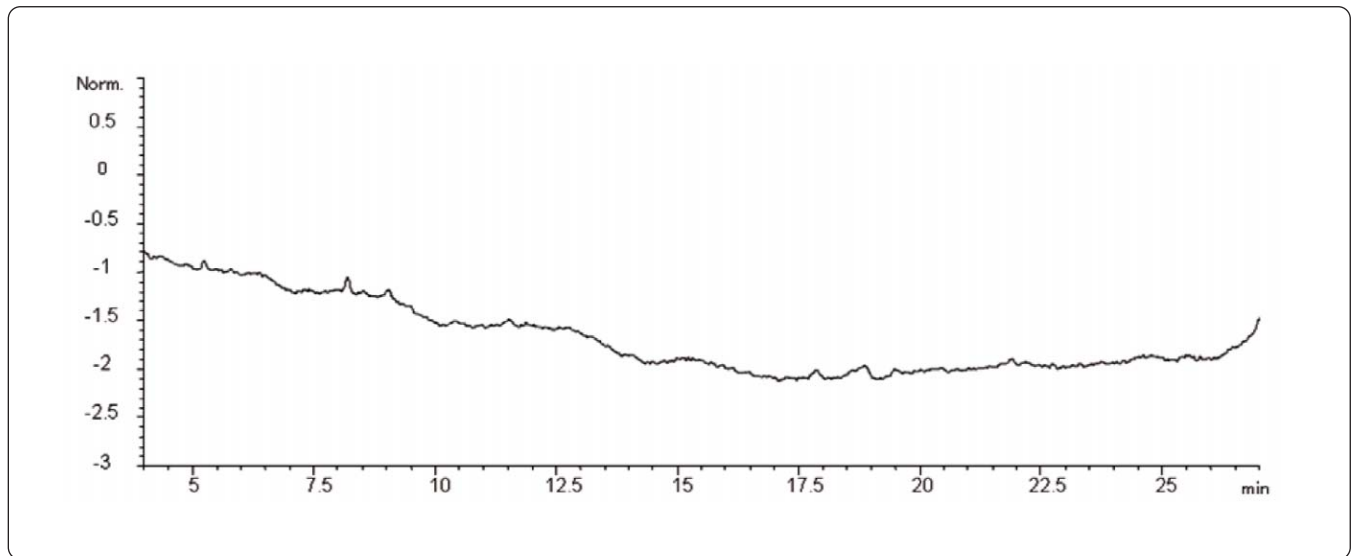
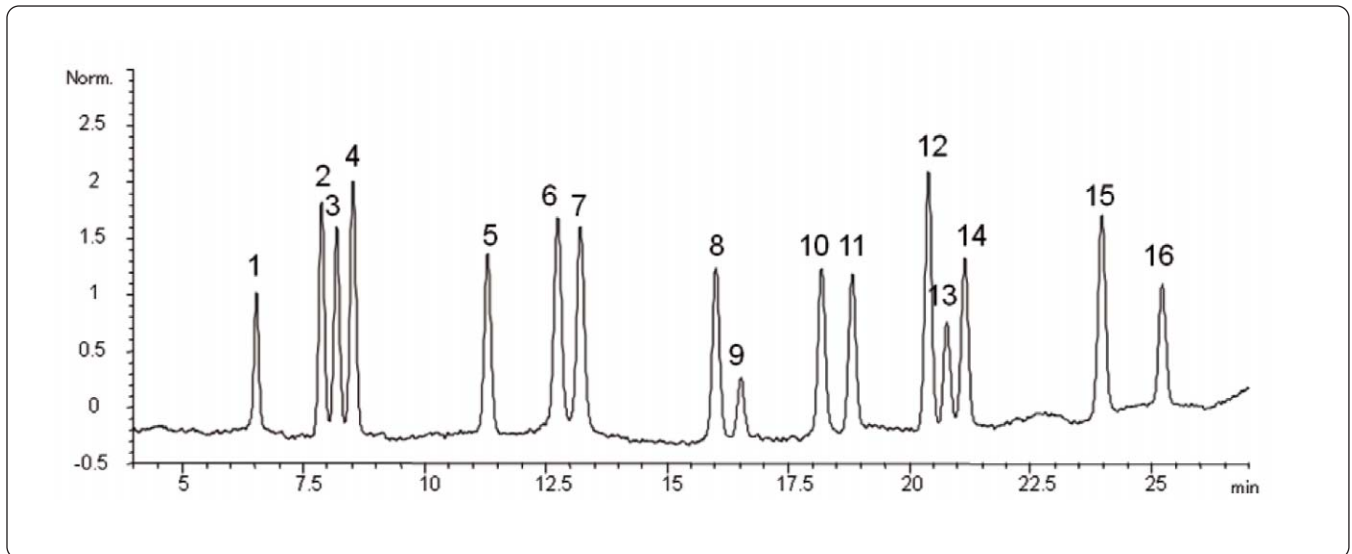
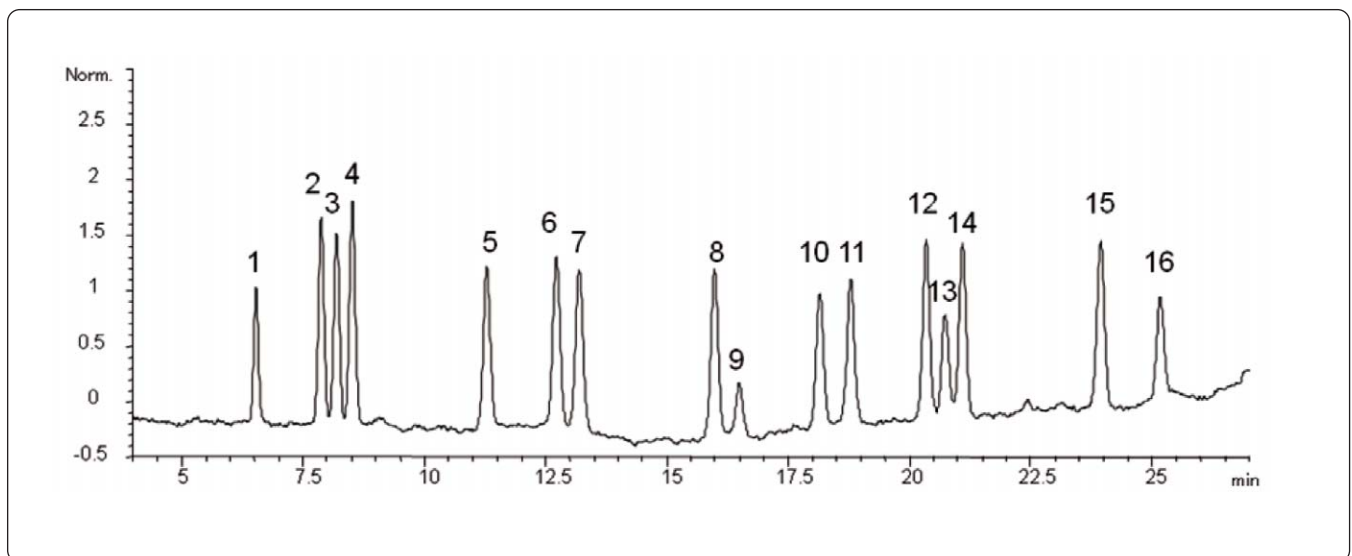


图2. 鱼肉空白的色谱图



- | | | | |
|---------|-----------|------------|----------|
| 1 雌三醇 | 5 甲基氢化泼尼松 | 9 孕三烯酮 | 13 雌二醇 |
| 2 氢化泼尼松 | 6 倍他米松 | 10 醋酸氢化泼尼松 | 14 醋酸可的松 |
| 3 氢化可的松 | 7 地塞米松 | 11 醋酸氢化可的松 | 15 甲基睾酮 |
| 4 强的松 | 8 醋酸曲安奈德 | 12 醋酸强的松 | 16 雌酮 |

图3. 2 mg/kg 激素标样的色谱图



- | | | | |
|---------|-----------|------------|----------|
| 1 雌三醇 | 5 甲基氢化泼尼松 | 9 孕三烯酮 | 13 雌二醇 |
| 2 氢化泼尼松 | 6 倍他米松 | 10 醋酸氢化泼尼松 | 14 醋酸可的松 |
| 3 氢化可的松 | 7 地塞米松 | 11 醋酸氢化可的松 | 15 甲基睾酮 |
| 4 强的松 | 8 醋酸曲安奈德 | 12 醋酸强的松 | 16 雌酮 |

图4. 添加 2 mg/kg 激素标样的鱼肉样品的色谱图

表 3. SPE 提取鱼肉中激素的回收率和 RSD

化合物	添加水平(mg/kg)	回收率 (%)	RSD (n = 6,%)
雌三醇	2	100.4	2.2
	5	106.1	1.9
	10	102.4	4.4
氢化泼尼松	2	89.4	3.8
	5	90.9	7.6
	10	100.7	2.9
氢化可的松	2	85.3	6.7
	5	91.4	7.6
	10	101.4	3.4
强的松	2	82.5	7.2
	5	92.1	5.2
	10	100.7	2.9
甲基氢化泼尼松	2	83.2	8.3
	5	93.6	3.2
	10	97.4	1.7
倍他米松	2	88.3	8.9
	5	99.6	4.9
	10	100.8	3.8
地塞米松	2	79.1	4.3
	5	98.4	5.3
	10	98.4	3.9
醋酸曲安奈德	2	86.7	8.4
	5	97.6	5.9
	10	97.9	4.1
孕三烯酮	2	78.0	6.6
	5	78.8	8.1
	10	85.3	8.0
醋酸氢化泼尼松	2	86.9	7.3
	5	101.2	4.3
	10	101.9	5.7
醋酸氢化可的松	2	87.3	6.8
	5	102.7	5.1
	10	101.5	7.9
醋酸强的松	2	76.7	7.7
	5	94.1	3.5
	10	97.7	4.3
雌二醇	2	78.7	4.2
	5	94.7	3.5
	10	97.4	4.8
醋酸可的松	2	82.8	6.9
	5	87.8	6.5
	10	94.4	4.1
甲基睾酮	2	82.9	3.4
	5	91.9	4.9
	10	93.6	4.6
雌酮	2	76.2	6.4
	5	90.0	8.7
	10	93.9	5.9

结论

Agilent SampliQ OPT，一种兼具亲水和疏水特性的聚合型吸附剂，既可以保留极性化合物，又可以保留非极性化合物，为鲫鱼中多种激素化合物的纯化和富集，提供了一种简单而有效的单个小柱方法。标样的回收率和重现性（通常低于 10%）符合鲫鱼肉中激素残留检测的要求。鲫鱼中的杂质已减到最小，对各激素的分析没有干扰。

产品信息

部件号	名称
5982-3013	OPT 聚合物 – 盒装，100x 1 mL 试管，30 mg
5982-3036	OPTT 聚合物 – 盒装，50x 3 mL 试管，60 mg
5982-3067	OPT T 聚合物 – 盒装，30x 6 mL 试管，150 mg
5982-3096	OPT 聚合物 - 96 孔板，10 mg
95990-902	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 250 mm × 4.6 mm，5 μm
5185-5836	Agilent PTFE 0.45 μm Premium 注射式过滤器

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、描述和规格，如有变更，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司版权所有，2009 年

中国印刷

2009 年 4 月 1 日

5990-3845CHCN



Agilent Technologies