

使用 Agilent Bond Elut QuEChERS 进行样品制备后使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱和 Agilent Poroshell 120 液相色谱柱对虾中的激素进行测定

应用报告

食品

作者

Rongjie Fu 和 Andy Zhai
安捷伦科技（上海）有限公司
中国上海浦东英伦路 412 号，
邮编 200131

摘要

本研究开发了一种使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱测定虾中激素的方法。同时还开发并优化了一种使用 QuEChERS 提取虾中 13 种激素的样品制备方法。结果表明，使用 QuEChERS 处理样品，后使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm)进行 HPLC 分析适用于虾中激素化合物的测定。13 个目标化合物完全分离，色谱图中没有显示其它干扰。方法回收率在 91.6% 到 107.2% 之间，相对标准偏差(RSDs)在 0.15% 到 3.5 % 之间。



Agilent Technologies

前言

当前有一些激素和激素类物质能显著提高喂食动物的生长率和饲料利用率。在一些国家，激素是一种常见的食品添加剂，同时认为在限量使用的情况下是安全的。尽管如此，长期摄入糖皮质激素可能导致高血糖、骨质疏松、出生缺陷及免疫功能下降等后果。其它激素如雌激素、雄激素和孕激素都具有致癌作用，能导致乳腺癌、卵巢癌和细胞癌。因此在其它一些国家严禁上述物质的使用，尤其是雌激素。在之前的一篇应用报告中已描述了一种使用 Agilent Bond Elut OPT SPE 柱进行样品前处理，然后使用配备 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 色谱柱的高效液相色谱法测定鲫鱼中激素的新方法[1]。

尽管 QuEChERS 方法目前常用来消除植物源性食品中的基质干扰，如极性的有机酸、糖类和脂类，但同时它也有消除其它食品基质如肉类和海产品中干扰的能力。基于食品基质和目标化合物的化学性质，为得到精密和准确的结果，有必要对原方法做一些修改。本文的目标就是扩展 QuEChERS 方法将其运用于海产品中兽药残留的检测。使用 Agilent Bond Elut QuEChERS EN 缓冲提取试剂盒（部件号 5982-5650）和针对肉类药物残留的分散-SPE 15 mL 试剂盒（部件号 5982-4956）分析虾中的 13 种激素（表 1）。对回收率和重现性进行了方法验证。

使用全新开发的装填了 2.7 μm 表面多孔材料的 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱用于这 13 种常见激素得分离。这种色谱柱与装填了亚 2 μm 全多孔材料色谱柱具有几乎同样的柱效，可用于快速和高分辨率分析。

表 1. 本文中使用的激素

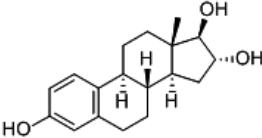
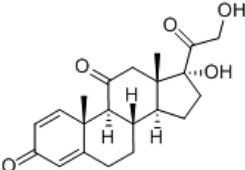
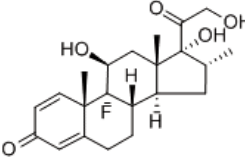
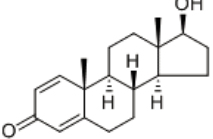
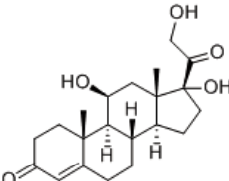
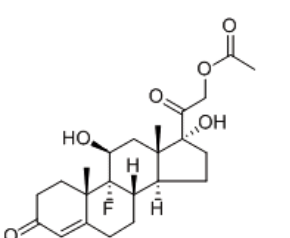
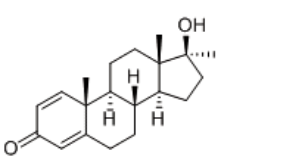
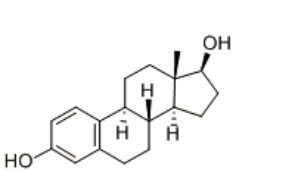
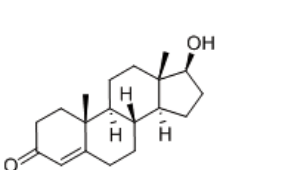
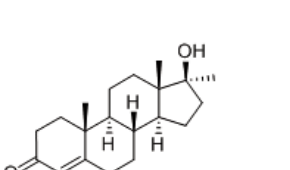
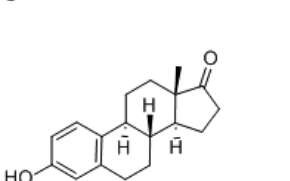
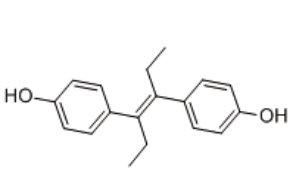
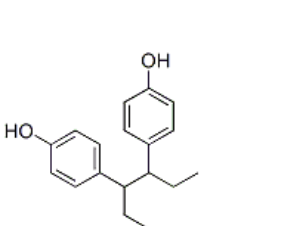
序号	化合物	CAS 号	结构
1	雌三醇	50-27-1	
2	泼尼松	53-03-2	
3	地塞米松	50-02-2	
4	勃地酮	846-48-0	
5	氢化可的松	50-23-7	

表 1. 本文中使用的激素 (续)

6	醋酸氟氢可的松	514-36-3	
7	美雄酮	72-63-9	
8	雌二醇	50-28-2	
9	睾酮	58-22-0	
10	甲睾酮	58-18-4	
11	雌酮	53-16-7	
12	己烯雌酚	56-53-1	
13	己烷雌酚	84-16-2	

实验部分

试剂和化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或分析级。激素标准品购自 NICPBP (中国药品与生物制品检定所)。虾购自本地市场。

用甲醇制备标准储备液(1 mg/mL)并在冰箱中(-20 °C)储存。标准储备液用甲醇稀释制得系列标准溶液。每周新配制标准溶液并于 4 °C 以下保存。

仪器及材料

Agilent Bond Elut QuEChERS EN 提取试剂盒, 部件号 5982-5650, 适用于肉类中药物残留的 Agilent Bond Elut QuEChERS 分散 SPE 试剂盒, 15 mL, 部件号 5982-4956 (Agilent Technologies Inc., DE, USA)。飞鸽牌离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

HPLC 方法

仪器	配备 DAD 检测器的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪	
色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0×100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-302)	
流速	0.8 mL/min	
进样量	10 μL	
柱温	30 °C	
检测波长	230 nm	
流动相	水-乙腈梯度	
时间 (min)	% 水	% 乙腈
0	80	20
6	50	50
8	10	90

样品制备

样品制备步骤包括样品均质、萃取/分配和分散 SPE 净化。

将购于当地超市的虾洗净并切成小块。然后将虾块彻底粉碎均质, 在 20 °C 下储存。称取 $5\text{ g} \pm 0.05\text{ g}$ 虾匀浆样品, 置于 50 mL 离心管中。离心 30 s, 将粘附于管内壁的样品离心到管底。每份样品在需要时加入适量的 QC 加标溶液。然后涡旋样品 30 s, 再分别加入 5 mL 水, 涡旋 10 s 混匀。然后每管加入 10 mL 乙腈。加盖并手动振摇 30 s。每管中加入 Agilent Bond Elut QuEChERS EN 提取盐包 (部件号 5982-5650)。盖紧离心管并剧烈振摇 1 min。在 4 °C 条件下以 4000 rpm 的速度离心 5 min。

取 6 mL 上层乙腈溶液, 转移至适用于肉类药物残留的 Agilent Bond Elut QuEChERS 分散 SPE 15 mL 萃取管 (部件号 5982-4956) 中。该 15 mL 分散 SPE 萃取管含 150 mg C18 和 900 mg 无水 MgSO_4 。盖紧离心管并涡旋 1 min。将该 15 mL 萃取管在 4 °C 下以 13000 rpm 的速度离心 3 min。取 4 mL 萃取液转移至另一个试管中, 在 35 °C 下用氮气吹干。接着用 2 mL 1:4 的乙腈/水溶液复溶。然后涡旋并超声 10 min, 后用 0.22 μm 醋酸纤维素滤头 (部件号 5185-5990) 过滤。将过滤后的干净样品转移至自动进样瓶中。盖紧瓶盖, 充分涡旋后进行高效液相分析。

结果与讨论

分离

图 1 展示了采用 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分离激素标准品混合物的图谱。用 20% 乙腈溶液溶解的 13 种化合物在 8 min 内得到很好的分离。每种化合物的浓度均为 1 ppm，获得了极佳的检测灵

敏度。为了研究该分析系统对虾样品的适用性，我们将激素混合物加入经 QuEChERS 萃取后的空白样品中。调整梯度洗脱程序，使目标化合物与基质分离。图 2 显示了空白样品和 0.5 ppm 加标空白样品的色谱图。分析时间延长至 10 min，用于充分洗脱基质和非相关样品组分。整个分析时间对于该类样品基质是理想的，同时采用 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱可获得快速、高分辨率的分析结果。

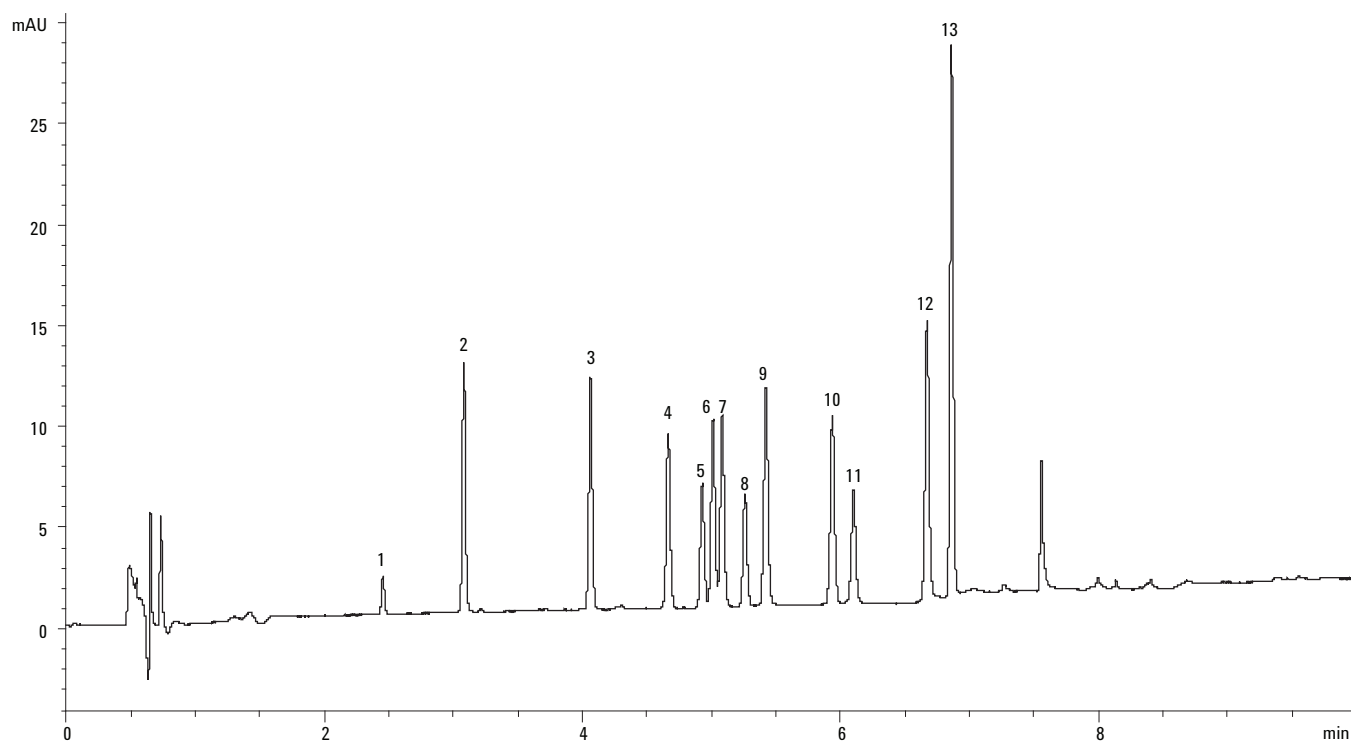


图 1. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0×100 mm, 2.7 μm 色谱柱分析 1 ppm 标准化合物 20% 乙腈溶液的色谱图

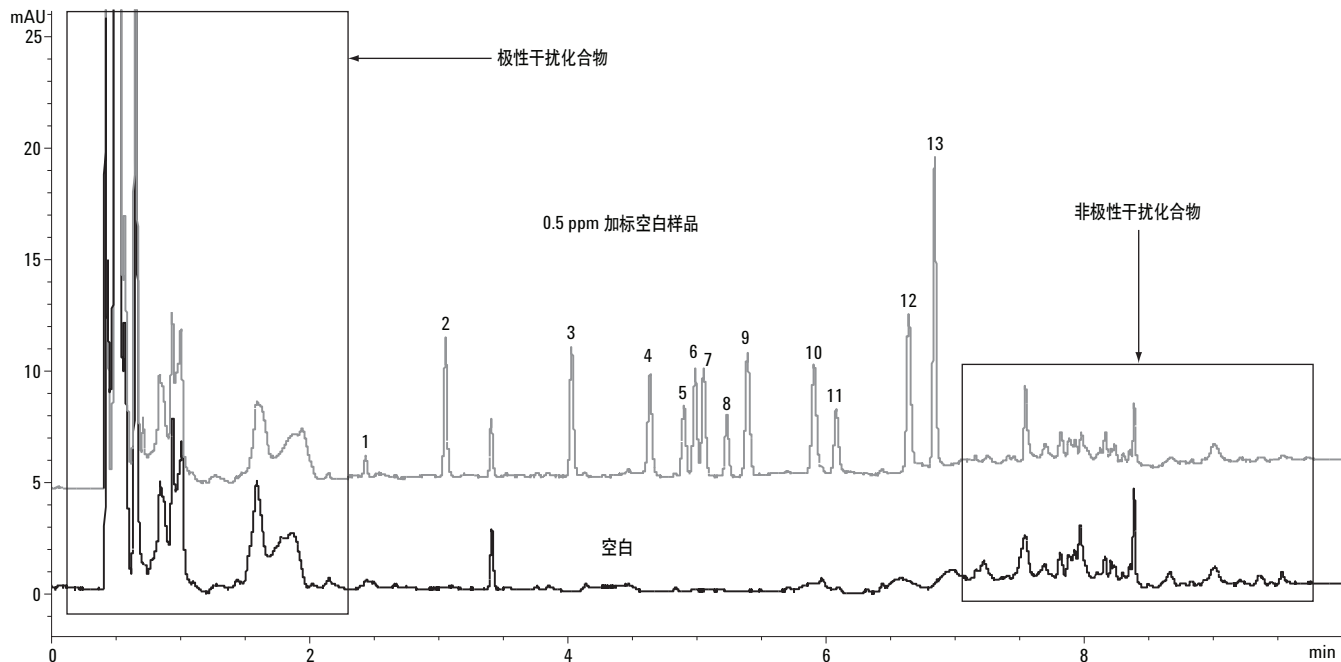


图 2. 空白和 0.5 ppm 加标空白样品色谱图

线性，检测限

用空白溶液稀释标准储备液分别至 0.5 ppm、1 ppm、2 ppm、5 ppm 和 10 ppm 作为校正标准，并对它们进行高效液相色谱分析，

绘制校正曲线。以激素峰面积对溶液浓度进行线性回归计算。以 0.5 ppm 浓度时的 3 倍信噪比作为检测限(LOD)。线性和检测限数据列于表 2。数据显示在 0.5–10 mg/kg 浓度范围内线性关系良好。

表 2. 高效液相色谱法测定激素的线性和检测限

编号	化合物	回归方程	相关系数	LOD (mg/kg)
1	雌三醇	$Y = 3.331x + 0.306$	0.9997	0.22
2	泼尼松	$Y = 22.182x + 0.0212$	0.9999	0.023
3	地塞米松	$Y = 22.622x + 0.0523$	0.9999	0.0086
4	勃地酮	$Y = 18.829x + 1.955$	0.9998	0.031
5	氢化可的松	$Y = 14.085x + 0.0388$	0.9999	0.044
6	醋酸氟氢可的松	$Y = 21.152x + 0.0591$	0.9999	0.029
7	美雄酮	$Y = 22.052x + 0.0325$	0.9999	0.022
8	雌二醇	$Y = 12.377x + 0.0108$	0.9999	0.039
9	睾酮	$Y = 25.370x + 0.0748$	0.9999	0.019
10	甲睾酮	$Y = 23.149x + 0.651$	0.9999	0.033
11	雌酮	$Y = 13.641x + 0.690$	0.9999	0.057
12	己烯雌酚	$Y = 31.526x + 0.347$	0.9999	0.023
13	己烷雌酚	$Y = 51.174x + 0.224$	0.9999	0.012

注: x-浓度(ng/μL); y-峰面积

回收率和重现性

方法的精密度是通过测定在虾均质样品中添加 0.5 和 10 mg/kg 激素标准品的回收率来进行的。每个水平重复分析 6 次。图 3 为空白和加标样品 (0.5 mg/kg 和 10 mg/kg) 的色谱图。表 3 中的数据表明本文为测定虾中激素而开发的 QuEChERS 方法具有极佳的回收率和重现性。

表 3. 虾中激素测定的回收率及 RSDs

化合物	加标水平 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (n = 6, %)
雌三醇	0.5	107.2	3.5
	10	98.2	0.98
泼尼松	0.5	97.6	2.3
	10	101.7	0.58
地塞米松	0.5	101.8	0.96
	10	96.1	1.2
勃地酮	0.5	98.9	1.5
	10	96.2	1.8
氢化可的松	0.5	103.5	1.5
	10	92.3	0.23
醋酸氟氢可的松	0.5	104.3	1.9
	10	91.8	0.17
美雄酮	0.5	100.0	1.4
	10	95.6	0.25
雌二醇	0.5	99.4	1.3
	10	97.8	0.54
睾酮	0.5	98.0	0.85
	10	98.2	0.15
甲睾酮	0.5	97.1	0.99
	10	92.1	0.63
雌酮	0.5	103.4	1.2
	10	92.5	0.68
己烯雌酚	0.5	100.9	1.9
	10	97.3	0.79
己烷雌酚	0.5	98.5	1.6
	10	91.6	0.81

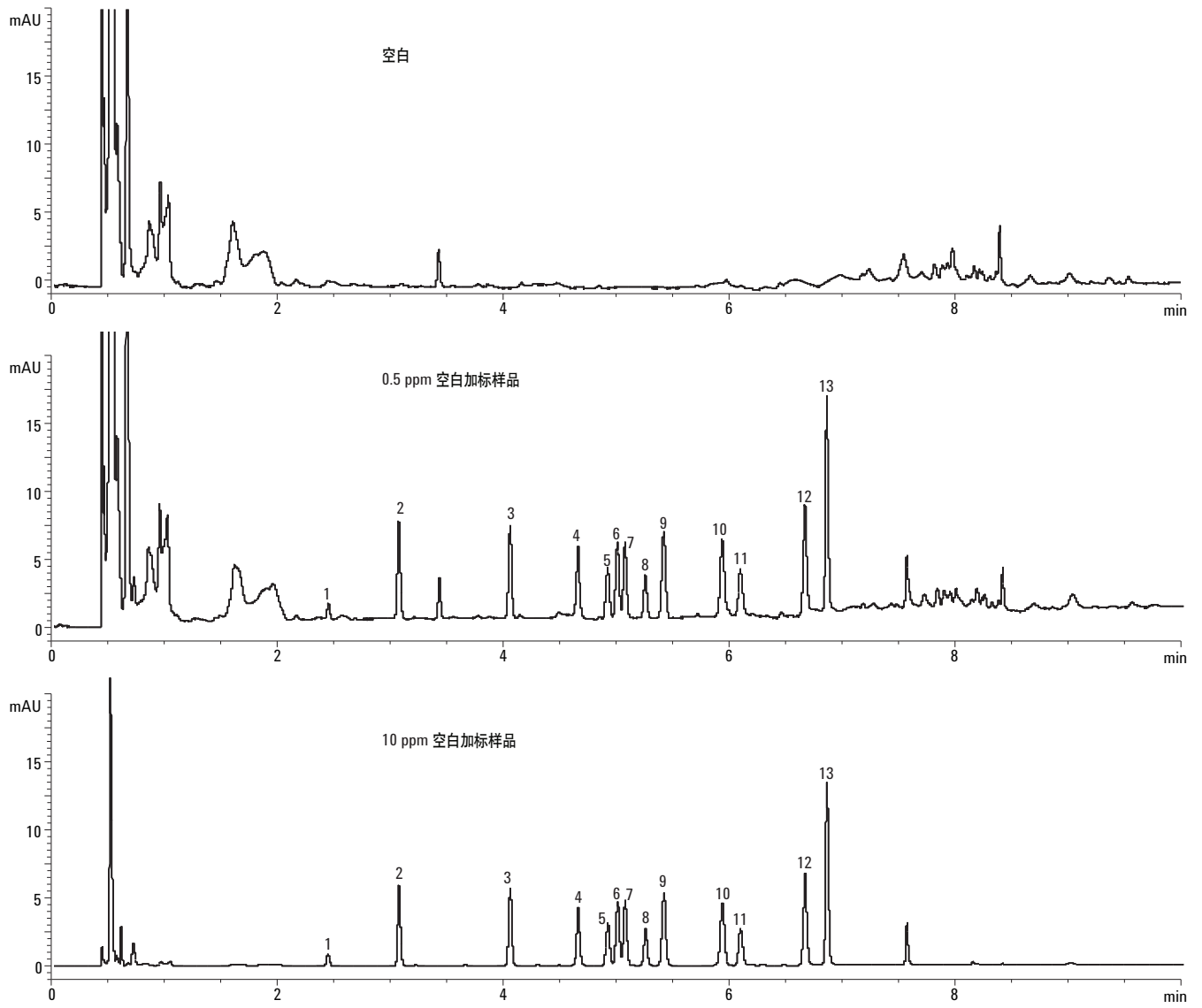


图 3. 空白虾样品和 0.5 ppm、10 ppm 空白加标虾样品色谱图

结论

Agilent Bond Elut QuEChERS 缓冲提取试剂盒和用于肉类药物残留的安捷伦分散 SPE 试剂盒能提供一个简单、快速和有效的虾样品中激素净化的方法。与其它样品前处理方法相比，如 LLE 和 SPE，QuEChERS 方法更易于操作，更快速、更省力、更经济。通过测定虾加标样品，表明使用本方法测定虾中多种激素的回收率和重现性符合方法要求。使用 Agilent Poroshell 120 色谱柱和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱能在 10 min 内成功分离 13 种激素类化合物，同时所有化合物都与基质实现良好分离。该方法适用于低 mg/kg 浓度水平下虾中激素含量的测定。

参考文献

1. Chen-Hao Zhai and Yun Zou, “用 Bond Elut OPT 固相萃取-液相色谱法测定鱼类(鲫鱼)中的激素” 安捷伦出版物, 5990-3845CHCN (2009)。

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

安捷伦公司对本材料所包含的错误，或由于提供、展示或使用本材料所造成的直接或间接损失概不负责。

本文中的信息、说明及技术指标等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012年1月6日，中国印刷
5990-6589CHCN



Agilent Technologies