

利用安捷倫 1290 Infinity LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 LC 管柱與樣品製備方法偵測蝦體內的賀爾蒙

應用註解

食品

作者

Rongjie Fu 與 Andy Zhai
安捷倫科技（上海）有限公司
英倫路 412 號
上海市浦東區 200131
中國

摘要

使用安捷倫 1290 Infinity LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，開發方法判定蝦體內的賀爾蒙。同時也使用 QuEChERS 開發最適合萃取蝦體內 13 種賀爾蒙的樣本製備方法。結果顯示，利用 QuEChERS 進行的樣本製備，以及使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱(3.0 mm × 100 mm，2.7 μm)進行的 HPLC 分析，適合用於偵測蝦體內的賀爾蒙化合物。13 種目標化合物均妥善分離，在層析圖中並未顯示出其他干擾。方法回收率介於 91.6 至 107.2 % 之間，相對標準差 (RSD) 則介於 0.15 至 3.5 % 之間。



Agilent Technologies

緒論

目前已有多種賀爾蒙和類賀爾蒙藥劑，能顯著提升動物生長率以及飼食的攝取效率。在某些國家，賀爾蒙是常見的食品添加物，並且控制特定化合物的使用即使被認為是屬於安全的行為。不過，長期食用葡萄糖皮質素可能造成高血糖、骨質疏鬆、先天缺陷和免疫功能下降。至於動情素、雄激素及黃體素等其他賀爾蒙則屬於致癌物質，可能造成乳癌、卵巢癌與細胞癌。因此一些其他國家嚴厲禁止使用賀爾蒙，特別是動情素。先前的應用註解事項，說明了新的鯽魚肉賀爾蒙檢測方法，使用安捷倫 SampliQ OPT SPE 管柱進行樣品製備，以及使用安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 進行 HPLC 分析 [1]。

雖然目前的 QuEChERS 方法足以移除植物來源食品產品的基質干擾，例如極性有機酸、糖類和脂質，不過本方法也可以應用於肉類或海鮮等其他食品基質。配合目標化合物和食品基質的化學特性，原始方法可能必須稍作修改，以獲得正確精準的結果。本研究的目的是將 QuEChERS 方法的應用範圍，延伸至海鮮的動物用藥殘留物。本次使用安捷倫 QuEChERS EN 緩衝萃取套組 (p/n 5982-5650)，以及適用於肉類藥物殘留物的分散式 SPE 15 mL 套組 (p/n 5982-4956)，分析蝦體內的 13 種賀爾蒙 (表 1)。方法將使用回收率和再現性進行確效。

本次使用新開發的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，外層包覆 2.7 μm 表面多孔性材料，分離上述 13 種常見的賀爾蒙。新管柱的效率幾乎等於 2-μm 以下的全多孔性材料，且能提供快速的高解析度分析。

表 1. 本研究使用的賀爾蒙

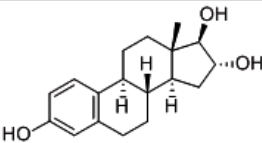
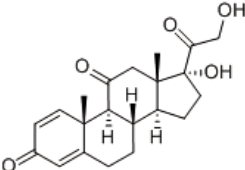
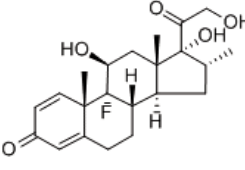
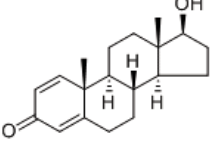
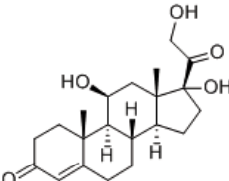
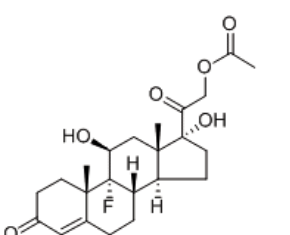
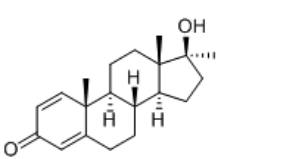
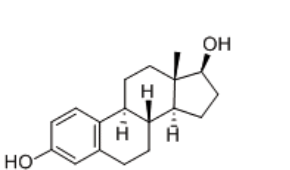
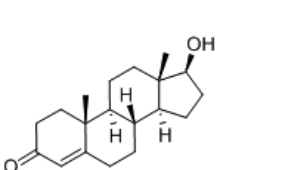
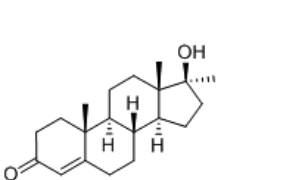
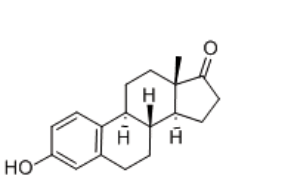
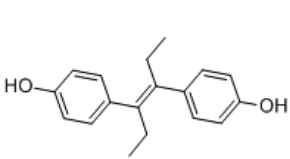
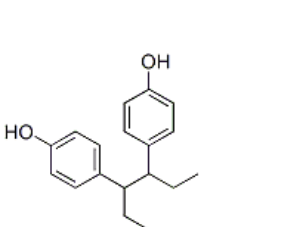
編號	化合物	CAS 編號	結構
1	雌三醇(Estriol)	50-27-1	
2	普賴松(Prednisone)	53-03-2	
3	地塞米松(Dexamethasone)	50-02-2	
4	勃地酮(Boldenone)	846-48-0	
5	氫皮質酮(Hydrocortisone)	50-23-7	

表 1. 本次研究使用的賀爾蒙 (接續上頁)

6	醋酸氟氫可體松 (Fludrocortisone acetate)	514-36-3	
7	美雄酮(Metandienone)	72-63-9	
8	雌二醇(Estradiol)	50-28-2	
9	辜固酮(Testosterone)	58-22-0	
10	甲基辜固素(Methyltestosterone)	58-18-4	
11	雌酮(Estrone)	53-16-7	
12	己烯雌酚(Diethylstilbestrol)	56-53-1	
13	己雌酚(Hexestrol)	84-16-2	

實驗

試劑及化學物質

所有試劑與溶劑均為 HPLC 或分析等級。賀爾蒙標準品向 NICIPBP (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products) 購買。蝦隻於當地市場購買。

儲備溶液 (1 mg/mL) 配置於甲醇中，並保存於冷凍庫 (-20 °C)。工作溶液使用以甲醇稀釋的儲備溶液製備。工作溶液應每週重新製備，並儲存於 4 °C 以下環境。

設備與材料

安捷倫 QuEChERS EN 萃取套組 (p/n 5982-5650)，以及處理肉類藥物殘留物的安捷倫 QuEChERS 分散式 SPE 套組 (15 mL, p/n 5982-4956) (Agilent Technologies Inc., 美國德拉瓦州)。飛鵠牌離心機 (安亭科學儀器, 中國上海)。

HPLC 方法

儀器	安捷倫 1290 Infinity LC 搭配 DAD 偵測器	
管柱	安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 3.0 x 100 mm 2.7 µm (p/n 695975-302)	
流速	0.8 mL/分鐘	
注入量	10 µL	
管柱溫度	30 °C	
偵測波長	230 nm	
移動相	水—乙腈梯度沖提	
時間 (分鐘)	% 水	% 乙腈
0	80	20
6	50	50
8	10	90

樣品製備

樣品製備程序，包含樣品均質化、萃取/分離及分散式 SPE 淨化。

蝦隻由當地雜貨店購買後清洗並切成小塊。蝦塊使用食品研磨機徹底均質化，並儲存於 20 °C。秤重 5-g (± 0.05 g) 的均質化蝦樣品，放置於 50 mL 的離心試管。試管離心 30 秒後，將試管壁的樣品移往試管底部。此後樣品將於必要時添加適當的 QC 添加溶液。旋轉振盪樣品 30 秒後，加入 5 mL 的水。而後再迴旋振盪試管 10 秒進行混合。在每個試管加入 10 mL 的 ACN。試管加蓋後手搖 30 秒。在每個試管加入安捷倫 QuEChERS EN 萃取鹽類套組 (p/n 5982-5650)。樣品試管緊密加蓋，劇烈搖晃 1 分鐘。試管於溫度 4 °C 下以 4,000 rpm 轉速離心 5 分鐘。

將等量 6 mL 的上層 ACN 移轉至適用於肉類藥物殘留物的安捷倫 QuEChERS 分散式 SPE 15 mL 試管 (p/n 5982-4956)。此一 15 mL 分散式 SPE 試管包含 150 mg 的 C18 和 900 mg 的無水 MgSO₄。試管緊密加蓋後旋轉振盪 1 分鐘。15 mL 試管於溫度 4 °C 下以 13,000 rpm 轉速離心 3 分鐘，4-mL 的萃取物移轉至其他試管，並以 35 °C 的 N₂ 流進行乾燥。樣品以 2 mL 的 1:4 ACN/H₂O 回溶。樣品迴旋振盪和超音波震盪 10 分鐘後，透過 0.22 µm 醋酸纖維旋轉過濾器 (p/n 5185-5990) 過濾。過濾後的透明樣品移轉至自動進樣器樣品瓶。樣品加蓋後劇烈迴旋振盪，準備進行 HPLC 分析。

結果及討論

分離

圖 1 顯示標準賀爾蒙混合物，於 Poroshell 120 EC-C18 管柱進行分離。所有 13 種化合物均於 8 分鐘內在 20% 的乙腈溶液中充分分離。每種化合物濃度均為 1 ppm，可於本濃度達到優異的靈敏度。為了研究系統對蝦樣品的適合程度，賀爾蒙混合物在

QuEChERS 萃取法之後加入空白樣品。梯度沖提方法經過調整，讓目標化合物能由基質分離。圖 2 顯示者為空白樣品和 0.5 ppm 賀爾蒙添加至空白樣品的層析圖。為了確保與樣品無關的基質成分得以沖提出來，分析時間延長為 10 分鐘。對本項樣品基質而言，整體分析時間相當優異；這是因為 Poroshell 120 EC-C18 管柱迅速達成高解析度的結果。

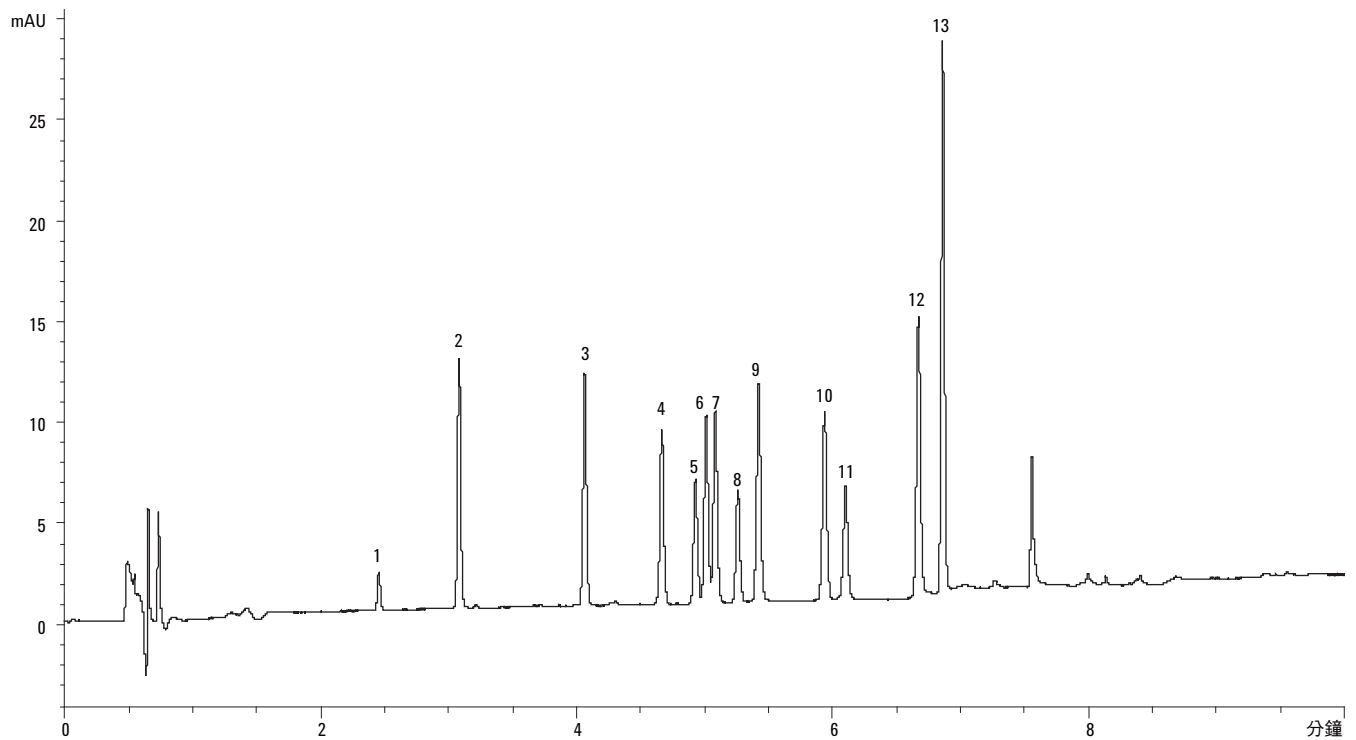


圖 1. 1 ppm 標準化合物於 20% 乙腈溶液的層析圖：使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 100 mm · 2.7 μm) 管柱

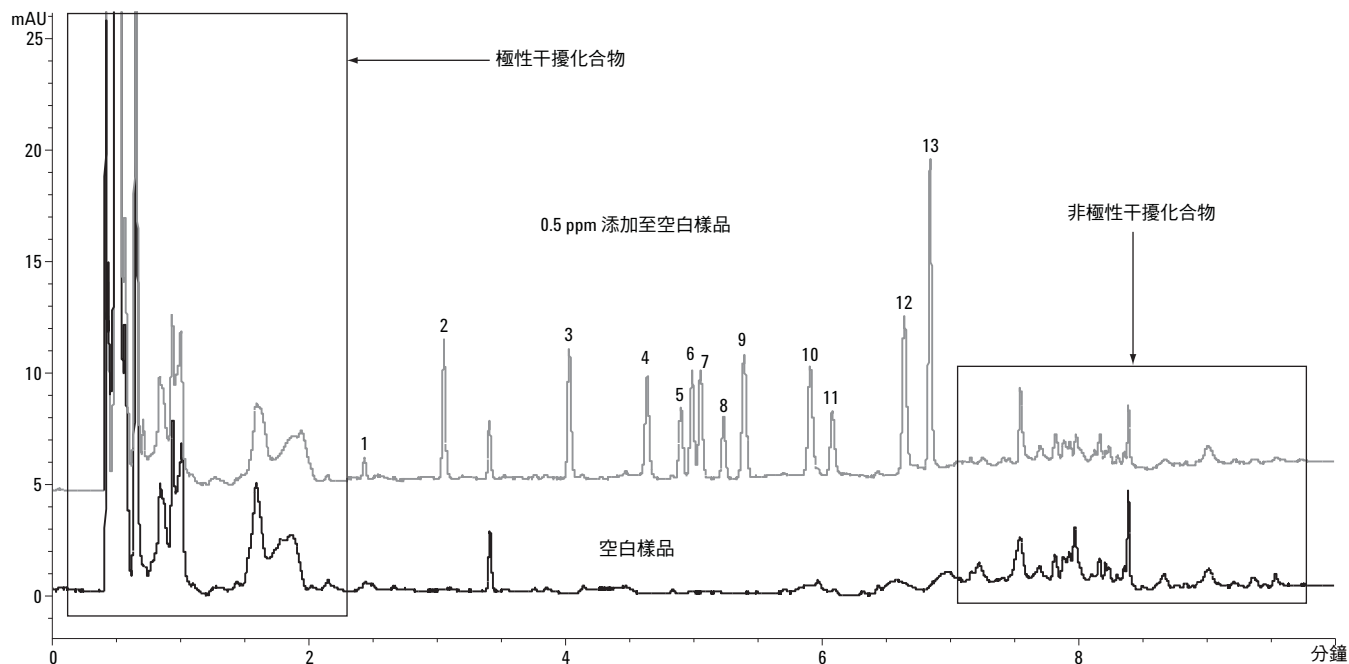


圖 2. 空白樣品及 0.5 ppm 賀爾蒙添加至空白樣品的層析圖

線性、偵測限制

儲備溶液以空白溶液稀釋為 0.5 ppm、1 ppm、2 ppm、5 ppm 及 10 ppm 標準品溶液，作為校正曲線標準品，並由 HPLC 分析製作校正曲線。依據波峰面積及溶液濃度，計算賀爾蒙的線性迴歸。

偵測限制 (LOD) 利用雜訊比 3 進行計算，以濃度 0.5 ppm 的數據為依據。表 2 顯示線性及 LOD。資料顯示 0.5–10 mg/kg 範圍內具備良好線性。

表 2. 經 HPLC 分析賀爾蒙的線性及 LOD

編號	化合物	迴歸公式	相關係數	(mg/kg)
1	雌三醇(Estriol)	$Y = 3.331x + 0.306$	0.9997	0.22
2	普賴松(Prednisone)	$Y = 22.182x + 0.0212$	0.9999	0.023
3	地塞米松(Dexamethasone)	$Y = 22.622x + 0.0523$	0.9999	0.0086
4	勃地酮(Boldenone)	$Y = 18.829x + 1.955$	0.9998	0.031
5	氫皮質酮(Hydrocortisone)	$Y = 14.085x + 0.0388$	0.9999	0.044
6	醋酸氟氫可體松 (Fludrocortisone acetate)	$Y = 21.152x + 0.0591$	0.9999	0.029
7	美雄酮(Metandienone)	$Y = 22.052x + 0.0325$	0.9999	0.022
8	雌二醇(Estradiol)	$Y = 12.377x + 0.0108$	0.9999	0.039
9	辜固酮(Testosterone)	$Y = 25.370x + 0.0748$	0.9999	0.019
10	甲基辜固丸素(Methyltestosterone)	$Y = 23.149x + 0.651$	0.9999	0.033
11	雌酮(Estrone)	$Y = 13.641x + 0.690$	0.9999	0.057
12	己烯雌酚(Diethylstilbestrol)	$Y = 31.526x + 0.347$	0.9999	0.023
13	己雌酚(Hexestrol)	$Y = 51.174x + 0.224$	0.9999	0.012

註：x- 濃度 (ng/uL)；y- 區域

回收率及再現性

方法精確度的判定，是以均質化蝦肉樣品(0.5 和 10 mg/kg)中添加賀爾蒙標準品的回收率為依據。在每種濃度重複進行 6 次分析。空白樣品與添加標準品(0.5 mg/kg 及 10 mg/kg)樣品的層析圖請參閱圖 3。表 3 顯示針對判定蝦體內賀爾蒙開發的 QuEChERS 方法具備優異的回收率與再現性。

表 3. 蝦體內賀爾蒙的回收率及 RSD

化合物	添加濃度 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (n = 6, %)
雌三醇(Estriol)	0.5	107.2	3.5
	10	98.2	0.98
普賴松(Prednisone)	0.5	97.6	2.3
	10	101.7	0.58
地塞米松(Dexamethasone)	0.5	101.8	0.96
	10	96.1	1.2
勃地酮(Boldenone)	0.5	98.9	1.5
	10	96.2	1.8
氫皮質酮(Hydrocortisone)	0.5	103.5	1.5
	10	92.3	0.23
醋酸氟氫可體松 (Fludrocortisone acetate)	0.5	104.3	1.9
	10	91.8	0.17
美雄酮(Metandienone)	0.5	100.0	1.4
	10	95.6	0.25
雌二醇(Estradiol)	0.5	99.4	1.3
	10	97.8	0.54
辜固酮(Testosterone)	0.5	98.0	0.85
	10	98.2	0.15
甲基辜固丸素 (Methyltestosterone)	0.5	97.1	0.99
	10	92.1	0.63
雌酮(Estrone)	0.5	103.4	1.2
	10	92.5	0.68
己烯雌酚(Diethylstilbestrol)	0.5	100.9	1.9
	10	97.3	0.79
己雌酚(Hexestrol)	0.5	98.5	1.6
	10	91.6	0.81

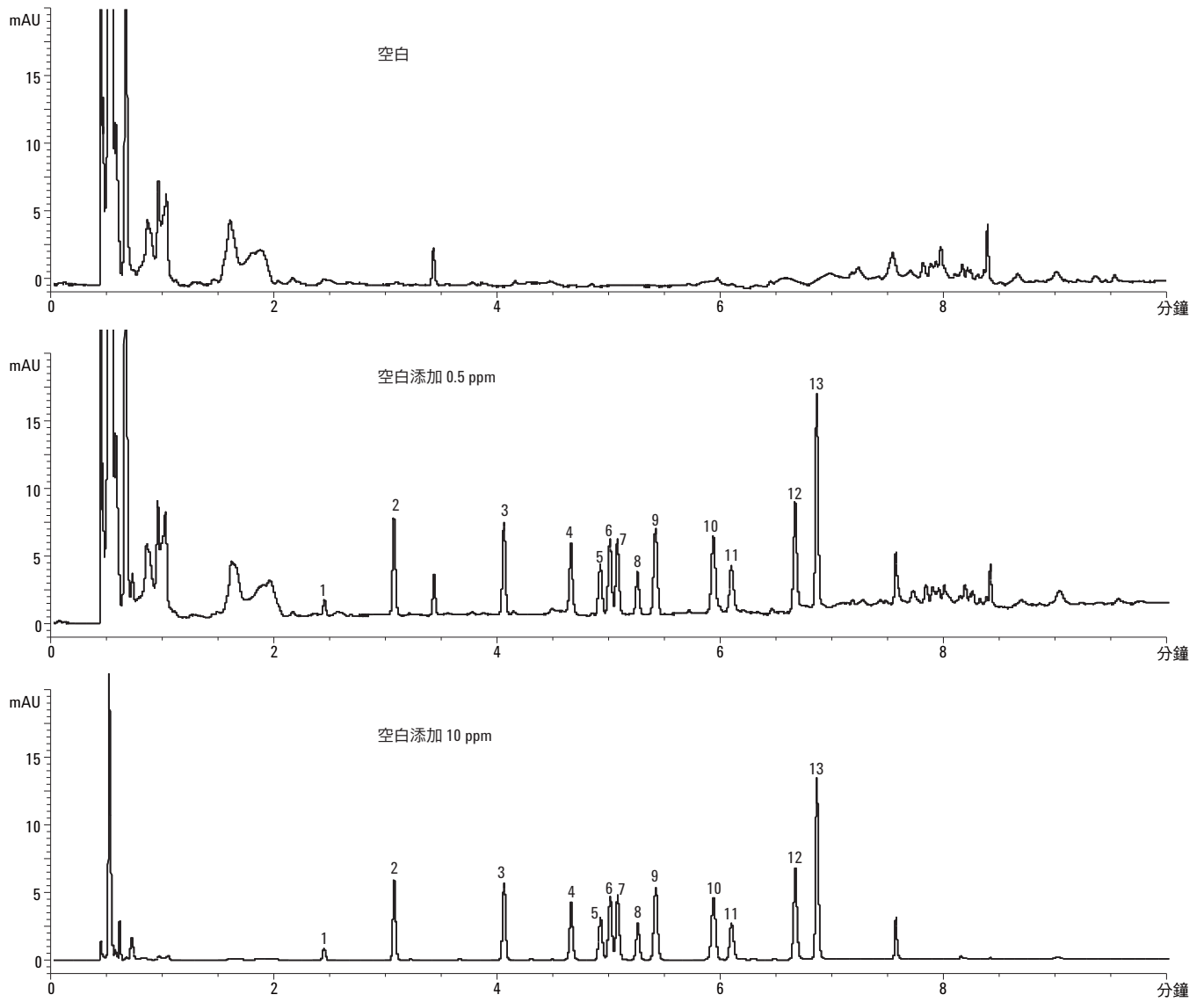


圖 3. 蝦樣品 (空白) 及蝦樣品 (添加 0.5 ppm 及 10 ppm 標準混合物) 的層析圖

結論

安捷倫 QuEChERS 緩衝萃取 EN 套組，以及適用於肉類藥物殘留物的安捷倫分散式 SPE 套組，提供了簡單、快速及有效的方法，進行蝦體內賀爾蒙的純化作業。相較於 LLE 和 SPE 等其他樣本前處理方法，QuEChERS 方法更容易處理、更快速、可節省人力，並且成本更為低廉。依據添加標準品基質的回收率與再現性，適用於偵測蝦體內多種賀爾蒙殘留物。安捷倫 1290 Infinity LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 管柱可在 10 分鐘內溶解 13 種化合物，且所有化合物均能與基質充分分離。本項開發方法適合在低濃度 (mg/kg) 範圍內，偵測蝦體內的賀爾蒙。

參考資料

1. Chen-Hao Zhai 及 Yun Zou。〈利用 SampliQ OPT 固相萃取搭配高效能液相層析偵測魚類（鯽魚）體內賀爾蒙〉 (Determination of Hormones in Fish (Carassius Carassius) by SampliQ OPT Solid Phase Extraction with High Performance Liquid Chromatography)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication)，5990-3845EN (2009)。

詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司網站：
www.agilent.com/chem

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2010 年
於美國印製
2010 年 10 月 14 日
5990-6589CHTW



Agilent Technologies