

## 凝胶渗透色谱净化-高效液相色谱法测定 鱼肉中的5种激素类药物残留

谢维平\*, 欧阳燕玲, 黄盈煜, 陈春祝

(泉州市疾病预防控制中心理化检验科, 福建 泉州 362000)

**摘要**:建立了凝胶渗透色谱净化-高效液相色谱法测定鱼肉中己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇、炔诺酮、炔诺孕酮5种激素类药物残留的方法。样品用乙酸乙酯-甲醇(8:2, v/v)溶液提取,提取液经 Pharmadex LH-20 凝胶柱(450 mm × 15 mm)净化,并用甲醇-乙酸乙酯-乙酸(800:200:2, v/v/v)溶液洗脱。采用 Agilent TC-C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离净化后的样品,用乙腈-水(45:55, v/v)溶液洗脱,流速为 1.2 mL/min,双检测波长为 245 nm 和 222 nm。5种激素类药物在 0.05 ~ 2.5 mg/L 范围内有良好的线性关系( $r > 0.999$ ),检出限为 10 ~ 24 μg/kg,平均加标回收率为 60.1% ~ 89.0%,相对标准偏差为 2.0% ~ 7.4%。该方法快速、简单,可应用于鱼肉中激素类药物残留量的检测。

**关键词**:凝胶渗透色谱;高效液相色谱;激素类药物;残留;鱼肉

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)04-0388-05

## Determination of five hormone drug residues in fish tissue by high performance liquid chromatography with gel permeation chromatographic clean-up

XIE Weiping\*, OUYANG Yanling, HUANG Yingyu, CHEN Chunzhu

(Department of Physical and Chemical Analysis, Quanzhou Center for Disease Control and Prevention, Quanzhou 362000, China)

**Abstract**: A method was developed for the determination of five hormone residues in fish tissue by high performance liquid chromatography (HPLC) with gel permeation chromatographic (GPC) clean-up. The sample was extracted with ethyl acetate-methanol (8:2, v/v). The extract was cleaned-up on a Pharmadex LH-20 gel permeation column (450 mm × 15 mm) and eluted with methanol-ethyl acetate-acetic acid (800:200:2, v/v/v). The analysis was performed on an Agilent TC-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-water (45:55, v/v) as the mobile phase at a flow rate of 1.2 mL/min and the detection wavelengths were set at 222 nm and 245 nm. All of the 5 hormone residues had good linear relationships ( $r > 0.999$ ) in the range of 0.05 - 2.5 mg/L. The limits of detection (LOD) were from 10 to 24 μg/kg. The average recoveries for all the five hormone residues were from 60.1% to 89.0%, with relative standard deviations (RSDs) from 2.0% to 7.4%. The method is simple, rapid, and can be applied for the analysis of the five hormone residues in fish tissue.

**Key words**: gel permeation chromatography (GPC); high performance liquid chromatography (HPLC); hormone drugs; residues; fish tissue

激素类兽药广泛应用在动物养殖业中,其主要功能有缩短动物饲养周期、促进产品产量增长等。然而由于激素类药物的不当使用或滥用,会导致其

在动物源性产品中残留,残留的激素类药物通过食物链进入人体会产生一系列与内分泌相关的诸如生长发育障碍、出生缺陷和生育缺陷等非健康效应。

\* 通讯联系人: 谢维平, 副主任技师, 从事理化检验工作。E-mail: xweiping2000@163.com.

基金项目: 泉州市科技计划项目(No. 2008Z49)和泉州市委组织部优秀人才培养专项经费资助项目(No. 08A14)。

收稿日期: 2009-09-14

各国相继制定了相应的法律限制或禁止激素类药物在动物饲养中应用<sup>[1]</sup>。为此,开展动物源性食品中激素类药物残留分析具有重要意义。目前有关激素类兽药残留的检测方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[1,2]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[3-5]</sup>、液相色谱-质谱法(LC-MS)<sup>[6-8]</sup>等。由于动物源性食品基质复杂,所以在进行残留分析时通常需要对样品提取液进行净化,目前报道的净化技术主要有固相萃取<sup>[1,2,5-7]</sup>、液-液萃取<sup>[4,8]</sup>等方法。

凝胶渗透色谱(GPC)方法作为一种通用的样品净化技术已经成功应用于农药的多残留分析,近年来也有应用于药物多残留分析的报道<sup>[9-11]</sup>,但应用于激素类药物的残留分析报道很少。GPC净化技术主要是基于分子大小的原理进行分离的,它具有重现性好、回收率高、适用于多残留分析等特点。探索GPC净化技术应用于药物残留分析对建立药物多残留分析平台具有重要的意义。因此,我们建立了应用GPC净化技术并结合HPLC检测鱼肉中包括己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇、炔诺酮、炔诺孕酮等5种药物残留分析的方法,取得了较为满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Beckman 125 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD,美国Beckman公司),Accuprep 凝胶渗透色谱仪(美国J2 Scientific公司),Sigma 2-5K离心机,组织匀浆机,超纯水系统,EYELA旋转蒸发仪(日本东京理化株式会社),中压玻璃柱(500 mm × 15 mm,上海楚柏实验设备公司),超声波清洗器,Pharmadex LH-20 葡聚糖凝胶(18~111 μm,美国Amersham Biosciences公司)。

甲醇、乙腈、乙酸乙酯(HPLC级,美国TEDIA公司),无水硫酸钠为分析纯,水为超纯水。药物对照品:己烯雌酚(diethylstilbestrol, 0033-9805)、雌二醇(estradiol, 10182-0103)、炔雌醇(ethinylestradiol, 10052-0107)、炔诺酮(norethisterone, 0053-9303)、炔诺孕酮(norgestrel, 10028-9907)购自中国药品生物制品检定所。

样品为购自市场的新鲜昌鱼、鲫鱼和草鱼。

### 1.2 凝胶渗透色谱柱

称取15 g LH-20 葡聚糖凝胶浸泡在70 mL 乙酸乙酯-甲醇(2:8, v/v)溶液中并过夜,吸胀后的凝胶仍保持在液面下。将吸胀的凝胶转移至中压玻璃柱内,用乙酸乙酯-甲醇(2:8, v/v)作淋洗剂,在重力作用下流经凝胶柱,填充高度为450 mm,稳定后

两端压紧。将制备的凝胶柱装于凝胶色谱仪上,用乙酸乙酯-甲醇(2:8, v/v)溶液以2.0 mL/min 流速冲洗凝胶柱30 min,稳定后待用。

### 1.3 样品提取

准确称取5.00 g 经粉碎、混匀的鱼肉组织样品,加入盛有5 g 左右无水硫酸钠的离心管中,搅匀,使样品成疏松状,再加入35 mL 乙酸乙酯-甲醇(8:2, v/v)溶液,置于组织匀浆机中,在10 000 r/min 条件下匀浆5 min 后,于超声波清洗器中超声10 min,然后在3 500 r/min 条件下离心5 min,收集提取液;分离后的残渣再用15 mL 乙酸乙酯-甲醇(8:2, v/v)溶液提取一次,合并两次提取液,于旋转蒸发仪浓缩至干,蒸干的样品用5.0 mL GPC 流动相溶解,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液待净化。

### 1.4 样品净化

将上述滤液装入进样瓶,置于凝胶渗透色谱仪中。凝胶色谱净化条件:色谱柱为自制的LH-20 凝胶色谱柱;流动相为乙酸乙酯-甲醇-乙酸(200:800:2, v/v/v),流速为2.0 mL/min,进样量为2.5 mL;检测波长为254 nm。弃去前20 min 的洗脱液,收集20~35 min 的洗脱液;将收集的洗脱液置于旋转蒸发仪浓缩至干后,用2.0 mL HPLC 流动相溶解,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液供高效液相色谱分析。

### 1.5 HPLC 条件

色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub> 反相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:水-乙腈(55:45, v/v),流速1.2 mL/min;柱温:30 °C;扫描波长:200~360 nm;双紫外检测波长:222 nm 和 245 nm;进样量:100 μL;外标法定量。

### 1.6 标准溶液及样品测定

准确称取10.0 mg(精确至0.1 mg)5种药物标准品,用甲醇溶解并定容至10.0 mL,分别配制质量浓度为1.00 g/L的5种激素类药物标准储备液。取5种激素类药物储备液各1.00 mL于10 mL容量瓶中,用甲醇定容,得到5种激素类药物的混合标准溶液(100 mg/L),再用流动相配制质量浓度分别为0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 2.5 mg/L的系列混合标准溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化

由于激素类药物残留分析需要较高的灵敏度,因此我们采用大体积进样。但是大体积进样在增加灵敏度的同时可能会带来分离度下降、峰扩展。实

验中通过优化流动相,在选定的色谱条件下,即使进样体积达到 100 μL,也可以使 5 种激素类药物的峰形及分离良好。

用二极管阵列检测器采集各激素在 200 ~ 360 nm 范围内的光谱图,发现己烯雌酚、炔诺酮、炔诺孕酮的特征波长为 245 nm,而雌二醇和炔雌醇在 245 nm 下吸收弱,其特征波长为 222 nm。因此,采用双波长进行检测,即在 245 nm 波长下检测己烯雌酚、炔诺酮、炔诺孕酮,在 222 nm 波长下检测雌二醇和炔雌醇。图 1 为混合标准溶液的色谱图。

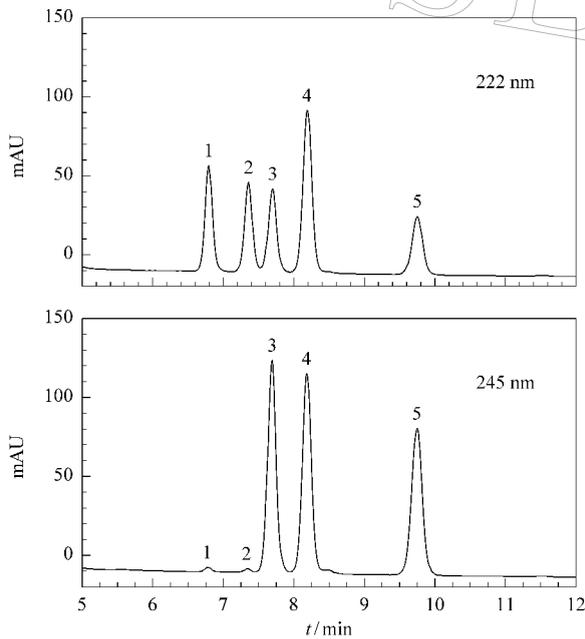


图 1 双检测波长下 5 种激素类药物混合标准溶液( 2.5 mg/L)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a mixed standard solution of 5 hormone drugs detected at double wavelengths

Peak identifications : 1. estradiol ; 2. ethinylestradiol ; 3. norethisterone ; 4. diethylstilbestrol ; 5. norgestrel.

### 2.2 凝胶渗透色谱净化

GPC 净化技术广泛应用于动物源性食品中的农药、兽药残留分析,主要采用聚苯乙烯凝胶( Bio-Beads SX3 )<sup>[9]</sup>及葡聚糖凝胶( LH-20 凝胶 )<sup>[10,11]</sup>作为固定相。由于 LH-20 凝胶是亲水亲脂性凝胶,能够使用甲醇等极性溶剂作为流动相,更适用于药物残留分析的净化。在我们以前的实验<sup>[11]</sup>中,建立了 LH-20 凝胶净化 9 种磺胺类药物残留分析的方法,并比较了 Bio-Beads SX3 与 LH-20 的净化效果,结果发现当采用聚苯乙烯凝胶时,基质组分与药物组分不能有效分离,而采用 LH-20 凝胶净化,基质组分与药物组分可以有效分离。因此,在本实验中采用 LH-20 凝胶净化样品并探讨其在激素类药物残留分析中的净化条件。

在磺胺类药物残留分析的净化方法<sup>[11]</sup>中,采用甲醇-二氯甲烷( 1:1, v/v)溶液作为洗脱溶剂,但是由于二氯甲烷的毒性较大,并且 GPC 又需要消耗较多的溶剂,因此我们试验用乙酸乙酯替代二氯甲烷作为洗脱溶剂。LH-20 凝胶除了具有分子筛作用外,还具有吸附、离子交换作用,在洗脱溶剂中加入乙酸可以排除这些作用。经过试验,我们选用甲醇-乙酸乙酯-乙酸( 800:200:2, v/v/v)混合溶液作为 GPC 的流动相。以空白昌鱼作为试验对象,测定了 5 种激素类药物及昌鱼提取物在 LH-20 凝胶柱上的流出时间(见表 1)。表 1 结果表明了 5 种激素类药物的流出时间在 18 ~ 30.5 min,而基质组分流出时间为 10 ~ 20 min,因此,在 GPC 净化时选择收集 20 ~ 35 min 的流出液,弃去其余部分。图 2 为添加了 5 种激素类药物混合标准溶液(每种激素类药物的质量浓度为 20 mg/L)的空白昌鱼提取物的 GPC 分离色谱图。从图 2 可以看出,空白昌鱼提取物中 5 种激素类药物与鱼肉基质成分在 GPC 上得到了良好的分离,从而达到了净化的效果。

表 1 5 种激素类药物及鱼肉基质组分在凝胶柱上的流出时间  
Table 1 Elution times of hormone drugs and fish matrix on a LH-20 gel permeation column

Hormone drug	$t_{max}^*$ /min	Elution time range/min
Diethylstilbestrol	23.8	20 - 29
Estradiol	25	20 - 30
Ethinylestradiol	25.8	20.5 - 30.5
Norethisterone	21.5	18 - 28
Norgestrel	22.5	19 - 30
Matrix	14	10 - 20

\*  $t_{max}$ : the time with the maximum signal of the drug.

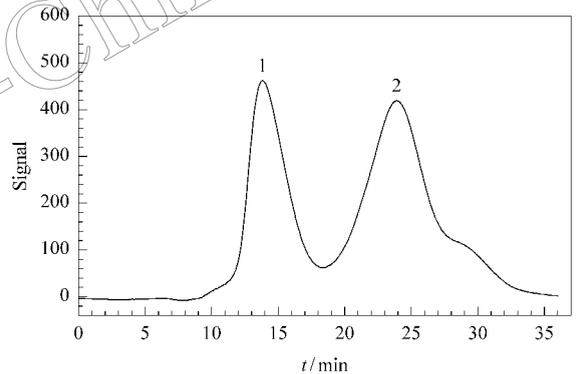


图 2 添加 5 种激素类药物混合标准溶液( 每种激素的质量浓度为 20 mg/L)的空白昌鱼提取物的 GPC 分离谱图

Fig. 2 Gel permeation chromatogram of the extract from blank fish tissue spiked with five hormone drugs ( 20 mg/L for each hormone )  
Peaks : 1. matrix ; 2. five hormone mixture.

### 2.3 凝胶渗透色谱的净化效果

动物源性食品中化学物残留分析的主要干扰物

包括脂类、蛋白质、细胞色素等。GPC 是基于分子大小进行分离的技术,己烯雌酚、雌二醇、炔雌醇、炔诺酮、炔诺孕酮的相对分子质量分别为 268、272、296、298、312,因此在 GPC 柱上可以和色素、油脂等干扰物得到分离,从而达到较好的净化效果。

图 3 为空白昌鱼肉样品及空白昌鱼肉加标样品(加标含量:1.0 mg/kg)的 HPLC 谱图,由图 3 可以看到,样品提取液经 GPC 净化后,可以得到较为干净的 HPLC 谱图。

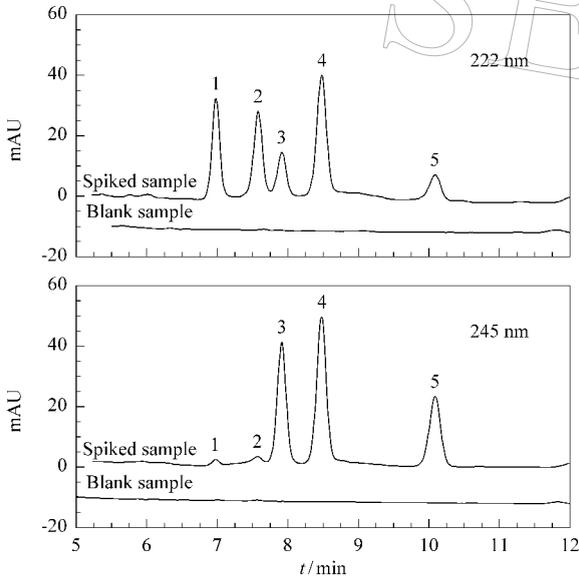


图 3 空白昌鱼肉与加标空白昌鱼肉样品(加标量为 1.0 mg/kg)色谱图

Fig. 3 Chromatograms of blank fish tissue and blank fish tissue spiked with hormones at 1.0 mg/kg with GPC clean-up

Peaks: 1. estradiol; 2. ethinylestradiol; 3. norethisterone; 4. diethylstilbestrol; 5. norgestrel.

## 2.4 光谱定性

HPLC-DAD 可对目标组分的光谱信息进行即时采集,得到其完整的紫外光谱图,利用光谱图可对色谱峰进行有效的定性,但当待测物浓度较低,特别是在有其他干扰物存在时,会给光谱定性带来困难。由于采用了凝胶柱净化技术,可得到较纯的目标组分提取物,使得光谱分析结果不易受其他杂质干扰,

同时还加大了进样量,增加了检测的响应值及光谱稳定性的可靠性。图 4 为空白昌鱼肉样品中添加含量为 0.10 mg/kg 的己烯雌酚所采集的样品光谱图与标准品光谱图,结果表明,即使目标组分含量为 0.10 mg/kg 时,仍能采集到较好的光谱图,光谱匹配度为 0.998 7。而炔诺酮、炔诺孕酮、雌二醇和炔雌醇与各自标准品的光谱匹配度分别为 0.996 5、0.993 0、0.993 1 和 0.968 7。

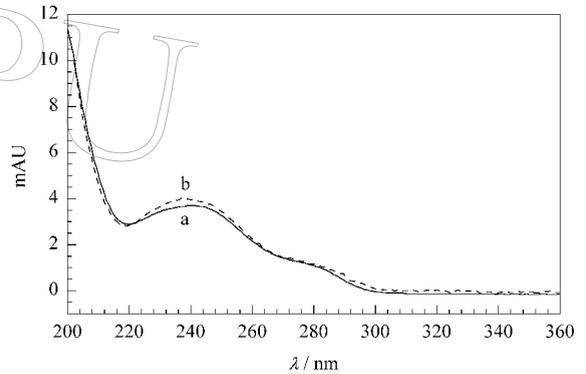


图 4 (a)标准己烯雌酚和(b)加标(0.1 mg/kg)样品中己烯雌酚的光谱比较图

Fig. 4 Spectra of diethylstilbestrol (a) obtained from library and (b) obtained from fish tissue sample spiked at 0.1 mg/kg

## 2.5 标准曲线与检出限

配制 0.05 ~ 2.5 mg/L 之间的 5 种激素类药物的系列质量浓度的混合标准溶液,按照 1.5 节的色谱条件测定,以峰面积  $Y$  对质量浓度  $X$  (mg/L) 进行线性回归,根据信噪比( $S/N$ )为 3 计算检出限(LOD),以  $S/N=10$  计算定量限(LOQ),结果见表 2。从表 2 可以看出 5 种激素类药物的线性关系良好,相关系数在 0.999 4 ~ 0.999 9 之间,5 种激素类药物的检出限在 10 ~ 24  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。同采用 LC-MS 测定结果<sup>[8]</sup>相比,本方法的检出限较高。受仪器的限制,GPC 净化应用于 LC-MS 方法未作进一步研究。由于 LC-MS 分析动物食品中兽药残留分析主要的问题是基质效应,而本文建立的 GPC 净化技术可以除去大部分基质组分,因此将 GPC 净化技术与 LC-

表 2 5 种激素类药物的线性回归方程、检出限(LOD,  $S/N=3$ )及定量限(LOQ,  $S/N=10$ )

Table 2 Regression equations, limits of detection (LOD,  $S/N=3$ ) and limits of quantification (LOQ,  $S/N=10$ ) of five hormone drugs

Hormone drug	Regression equation <sup>*</sup>	$r$	LOD/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
Estradiol	$Y = 208168X - 1049$	0.9999	0.021	0.070
Ethinylestradiol	$Y = 185780X + 4611$	0.9999	0.024	0.080
Norethisterone	$Y = 480182X - 4329$	0.9994	0.010	0.034
Diethylstilbestrol	$Y = 473791X + 335$	0.9999	0.011	0.037
Norgestrel	$Y = 411635X + 1102$	0.9998	0.015	0.048

\*  $Y$ : peak area;  $X$ : mass concentration, mg/L.

MS 相结合应该是可行的。

## 2.6 方法的回收率与精密度

用空白昌鱼肉试样进行添加回收率和精密度实验。样品中分别添加质量浓度为 0.10 和 1.0 mg/kg 的激素类药物混合标准溶液,摇匀,使标准溶液被样品充分吸收,然后按本方法进行测定,每个添加水平测定 3 次,计算平均加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果如表 3 所示。从表 3 可以看出,雌二醇、炔雌醇、己烯雌酚的回收率较好,在 74.4%~89.0% 之间,而炔诺酮、炔诺孕酮的回收率为 60.1%~66.0%。分析其原因可能在于 GPC 的切割时间,本实验中炔诺酮、炔诺孕酮的 GPC 流出时间与基质组分流出时间部分重叠,我们选择基质最后流出时间 20 min 作为 GPC 的切割时间,从而造成部分炔诺酮、炔诺孕酮的损失,导致回收率下降。为此,我们试验了将 GPC 切割时间设为 18~35 min,5 种雌激素类药物添加水平为 1.0 mg/kg 时的回收率( $n=3$ )分别为:雌二醇 86.7%,炔雌醇 87.1%,炔诺酮 84.0%,己烯雌酚 80.7%,炔诺孕酮 80.1%。然而,试验中也发现随着 GPC 切割时间的提前,加标样品的色谱图背景噪声加大,特别是在 222 nm 波长下检测的色谱图干扰较大,为保证净化效果,我们选择基质最后流出时间 20 min 作为 GPC 的切割时间,即组分接收时间为 20~35 min,而不是 18~35 min。

表 3 5 种激素类药物的加标回收率与精密度( $n=3$ )  
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of five hormone drugs ( $n=3$ )

Hormone drug	Spiked/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%
Estradiol	0.10	82.9	2.8
	1.0	84.8	2.4
Ethinylestradiol	0.10	88.7	2.0
	1.0	89.0	2.3
Norethisterone	0.10	65.5	3.8
	1.0	66.0	4.3
Diethylstilbestrol	0.10	74.4	3.8
	1.0	76.2	2.9
Norgestrel	0.10	60.1	7.4
	1.0	60.9	4.9

## 2.7 方法的应用

将建立的方法应用于 6 份实际鱼肉样品(2 份昌鱼 2 份鲫鱼 2 份草鱼)检测中,样品中均未检出待测的 5 种激素类药物,同时在检测过程中,未发现明显的干扰,表明建立的方法能够应用于鱼肉中 5 种激素类药物的残留检测。

## 3 结论

应用建立的 GPC-HPLC 法可快速、简单地测定动物源性鱼肉中 5 种激素类药物残留,5 种激素药物的加标回收率为 60.1%~89.0%,相对标准偏差为 2.0%~7.4%,表明该方法可应用于鱼肉中激素类药物残留量的检测。所建立的 GPC 净化方法为激素类药物残留分析提供了新的策略,对其他药物残留分析具有一定的参考意义。

## 参考文献:

- [1] Lin W X, Dong W F, Chen X, et al. Chinese Journal of Chromatography (林维宣,董伟峰,陈溪,等. 色谱), 2009, 27(3): 294
- [2] Chen J, Qin Y, Zhang M J. Chinese Journal of Chromatography (陈捷,秦燕,张美金. 色谱), 2006, 24(1): 19
- [3] Wang C, Ma Q, Wang X. Chinese Journal of Chromatography (王超,马强,王星. 色谱), 2006, 24(6): 654
- [4] Jiang J, Lin H, Fu X T, et al. Marine Fisheries Research (江洁,林洪,付晓婷,等. 海洋水产研究), 2007, 28(6): 67
- [5] Ma Q, Wang C, Wang X, et al. Chinese Journal of Chromatography (马强,王超,王星,等. 色谱), 2007, 25(4): 541
- [6] Qin Y, Chen J, Zhang M J. Chinese Journal of Analytical Chemistry (秦燕,陈捷,张美金. 分析化学), 2006, 34(3): 298
- [7] Wang F M, Wang P F, Tang Z X, et al. Chinese Journal of Veterinary Drug (王凤美,王培峰,汤志旭,等. 中国兽药杂志), 2009, 43(7): 6
- [8] He L M, Huang X H, Fang B H, et al. Chinese Journal of Chromatography (贺利民,黄显会,方炳虎,等. 色谱), 2008, 26(6): 73
- [9] Abuin S, Companyo R, Centrich F, et al. J Chromatogr A, 2008, 1207: 17
- [10] Roybal J E, Pfenning A P, Turnipseed S B, et al. Anal Chim Acta, 2003, 483: 147
- [11] Ouyang Y L, Xie W P, Huang Y Y, et al. Chinese Journal of Public Health (欧阳燕玲,谢维平,黄盈煜,等. 中国公共卫生), 2009, 25(5): 610