

黄雪玲, 戚隽渊, 魏厚道, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定水产品中的己烯雌酚和甲基睾酮[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 285-287. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.095

# 固相萃取-高效液相色谱法同时测定水产品中的己烯雌酚和甲基睾酮

黄雪玲<sup>1</sup>, 戚隽渊<sup>1</sup>, 魏厚道<sup>2</sup>, 郭霞<sup>1</sup>, 孙建华<sup>1</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 丁义<sup>1</sup>

(1. 上海市水产研究所, 上海 200433; 2. 上海天复检测技术有限公司, 上海 200125)

**摘要:**建立了 SPE-HPLC 同时测定水产品中己烯雌酚和甲基睾酮的方法。样品经乙酸乙酯超声提取, 正己烷脱脂, 过 C<sub>18</sub> 型固相萃取柱净化, 以甲醇-0.5% 甲酸(70:30)为流动相, 检测波长 254 nm, 外标法定量。相对标准偏差为 3.5%~5.6%, 己烯雌酚、甲基睾酮的检出限分别为 5.0、6.0 μg/kg。加标回收率在 78%~93% 之间。

**关键词:**固相萃取; 液相色谱; 己烯雌酚; 甲基睾酮

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0285-02

己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)和甲基睾酮(17-α methyltestosterone, MET)属于人工合成性激素, 人体长期摄入可产生慢性或蓄积毒性, 扰乱人体激素平衡, 造成胎体中毒等<sup>[1]</sup>。美国等西方发达国家对此类激素药物进行了严格限制; 我国农业部第 235 号公告明确将己烯雌酚和甲基睾酮列入禁止使用的药物名录。因为该类激素能够促进蛋白合成, 可大幅提高水产养殖经济效益, 所以被不法分子滥用于水产养殖领域<sup>[2]</sup>。我国曾多次在动物源性食品中检出此类违禁激素类药物残留, 出口食品也因此屡发贸易壁垒事件, 因此检测水产品中的己烯雌酚和甲基睾酮是非常有必要的。目前, 己烯雌酚和甲基睾酮的主要检测方法有液相色谱法<sup>[3-5]</sup>、液质联用法<sup>[6-10]</sup>和酶联免疫法<sup>[11-12]</sup>。液质联用法灵敏度和特异性高, 但仪器价格昂贵, 对操作人员要求较高, 一般实验室较难普及。酶联免疫法简单快捷, 但定量不准确且易出现假阳性。高效液相色谱法所用仪器价格适中, 操作简便, 而且检测的准确度和灵敏度较高, 可满足日常检测需要。现有的水产行业标准将己烯雌酚和甲基睾酮分别测定, 耗时耗力且工作量大。本试验对固相萃取净化-高效液相色谱法同时测定水产品中的己烯雌酚和甲基睾酮进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验仪器与试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1100 型); 旋转蒸发仪(N-1001 型); 离心机(5810R 型); 涡旋振荡仪; 固相萃取装置(Waters 公司产品)。

己烯雌酚标准品(SIGMA 公司产品); 甲基睾酮标准品(SIGMA 公司产品); 乙酸乙酯、乙腈、甲醇、正己烷为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent C<sub>18</sub> 型色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm)。流动相: 甲醇: 0.5% 甲酸(70:30), 等度洗脱。流速: 1.0 mL/min。检测波长: 254 nm。柱温: 35 °C。进样量: 20 μL。

#### 1.3 样品处理

1.3.1 提取 准确称取充分匀浆的样品 5.00 g(±0.02 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 25 mL 乙酸乙酯和 5 g 无水硫酸钠, 涡旋振荡 1 min, 超声提取 30 min, 7 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液至 100 mL 鸡心瓶中, 向下层残渣中再加入 15 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并上清液, 40 °C 旋蒸至干。加入 5 mL 的 40% 甲醇溶液溶解后作为备用液。

1.3.2 净化 向上述备用液中加入 2 mL 正己烷涡旋 30 s, 6 000 r/min 离心 5 min 后除去上层正己烷, 取下层提取液通过预先用 4 mL 甲醇、4 mL 水活化的 C<sub>18</sub> 柱, 再用 4 mL 的 10% 甲醇溶液淋洗, 挤干, 用 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液并于 40 °C 水浴下氮气吹干。残渣用 1.0 mL 流动相定容, 经 0.22 μm 滤膜过滤后供 HPLC 检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品处理方法的选择

2.1.1 提取条件的选择 己烯雌酚和甲基睾酮都属于疏水性有机化合物, 易溶于大多数有机溶剂, 常用的提取剂有甲醇、乙腈、乙醚和乙酸乙酯等。甲醇与水互溶, 当甲醇作为提取剂时, 提取液中残留大量的水溶性蛋白质, 易造成净化过程中固相萃取柱堵塞。乙醚毒性大, 常作为麻醉剂使用, 沸点只有 34.8 °C, 且夏天极易挥发, 有特殊刺激性气味。从经济、环保等方面考虑, 本试验选用乙酸乙酯作为提取剂, 其回收率高, 效果理想。

2.1.2 净化条件的选择 提取后的乙酸乙酯层含有大量脂溶性杂质, SPE 柱处理被杂质干扰, 致使回收率过高(>150%)。通过比较 C<sub>18</sub>、HLB、中性氧化铝柱、MAX 柱的净化效果和回收率, 发现这 4 种 SPE 柱对己烯雌酚和甲基睾酮具有不同的吸附能力, 回收率在 45%~93% 之间, 其中 C<sub>18</sub> 柱回收率最高, 净化效果最好。

洗脱溶剂的选择对固相萃取试验的影响最大。样品提取

收稿日期: 2014-08-28

作者简介: 黄雪玲(1981—), 女, 河南周口人, 硕士, 助理工程师, 主要从事水产品药物残留检测技术研究。Tel: (021) 65482263; E-mail: butterfly032008@163.com。

液经 C<sub>18</sub>固相萃取柱净化后,分别对甲醇、乙腈和乙酸乙酯 3 种洗脱溶剂的洗脱效果进行比较。其中乙酸乙酯属于弱极性化合物,对保留在 SPE 固相萃取柱的目标化合物洗脱能力较弱,而乙腈和甲醇相比,甲醇的洗脱效果更好,回收率在 78% 以上,因此,本试验选择甲醇作为洗脱液。同时,对固相萃取柱淋洗条件的优化时发现,采用 5 mL 的 10% 甲醇溶液淋洗柱子,既能有效去除杂质,又能保证 2 种目标化合物不被洗脱,效果优于纯水。

2.2 检测波长的选择

己烯雌酚和甲基睾丸酮具有发色基团,可用紫外光进行检测。分别取 1.0 μg/mL 的己烯雌酚和甲基睾丸酮标准溶液,使用 VWD 检测器的光谱扫描功能分别进行 190 ~ 400 nm 紫外波长扫描(图 1、图 2)。己烯雌酚在 220 ~ 258 nm 有较强吸收,并于 242 nm 处达最大吸收;甲基睾丸酮在 238 ~ 256 nm 有较强吸收,并于 246 nm 处达最大吸收。虽然在波长 242、245 nm 时灵敏度最高,但空白加标样品杂质峰明显较多,且杂质峰面积较大。通过参考《水产品中甲基睾酮残留量的测定:液相色谱法》(SC/T 3029—2006),选择 254 nm 为检测波长,此条件下杂质峰相对较少,灵敏度较高。

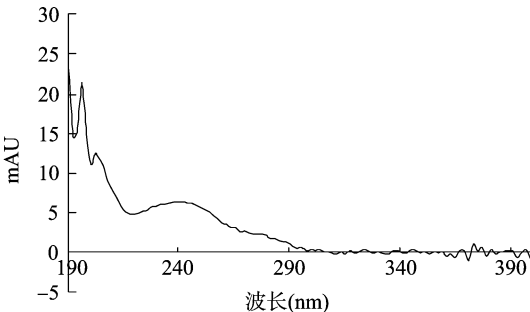


图1 己烯雌酚标准溶液的光谱扫描

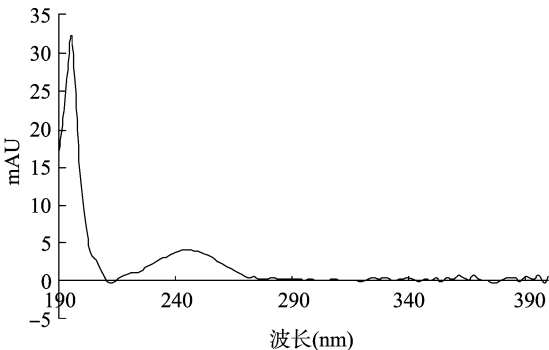


图2 甲基睾丸酮标准溶液的光谱扫描

2.3 流动相的选择

在流动相的优化过程中,固定有机相为甲醇,分别将纯水、0.5% 甲酸溶液作为水相进行比较。结果表明,水相为 0.5% 甲酸溶液时,目标物峰形较为尖锐,故本试验选择 0.5% 甲酸溶液作为水相。比较不同配比的甲醇和 0.5% 甲酸溶液以减少基质干扰的影响,结果表明,在甲醇-0.5% 甲酸溶液(体积比 70 : 30)流动相条件下,基质成分不干扰测定。

在优化条件下,0.5 μg/mL 混合标准溶液色谱图见图 3; 样品加标 0.1 mg/kg 色谱图见图 4。

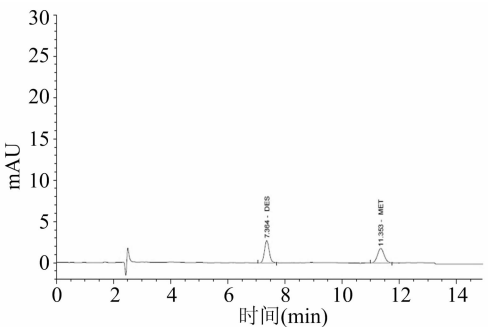


图3 0.5 μg/mL混合标准溶液色谱图

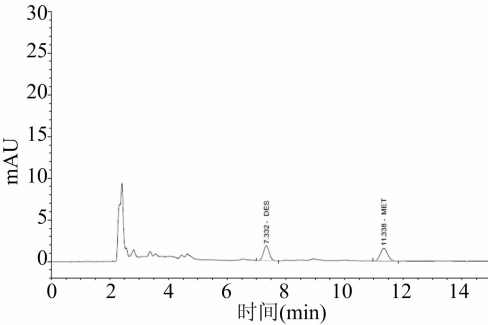


图4 样品加标 0.1 mg/kg 色谱图

2.4 准确度与精密度

以空白对虾样品为本底,分别添加 3 个不同浓度的混合标准液,放置 12 h 进行老化平衡,再用上述优化的前处理方法和色谱条件进行分析,测定该方法的加标回收率及精密度(表 1)。己烯雌酚、甲基睾丸酮的回收率分别为 78.0% ~ 86.0%、80.0% ~ 93.0%,相对标准偏差 ≤ 5.6%,表明该方法的准确度和精密度满足实际样品的分析要求。

表 1 不同加标浓度水产品中己烯雌酚和甲基睾丸酮的回收率和相对标准偏差 %

分析化合物	0.04 mg/kg		0.10 mg/kg		0.50 mg/kg	
	平均回收率	相对标准偏差	平均回收率	相对标准偏差	平均回收率	相对标准偏差
己烯雌酚	78.0	5.6	81.0	4.9	86.0	3.5
甲基睾丸酮	80.0	4.8	89.0	4.3	93.0	3.6

2.5 线性范围与灵敏度

配制己烯雌酚和甲基睾丸酮混合标准溶液,浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 μg/mL。在设定色谱条件下,各取 20 μL 进行 HPLC 分析,根据标准系列质量浓度和峰面积绘制校准曲线,并计算相关系数(表 2),结果显示:二者浓度均在 0.05 ~ 10.00 μg/mL 范围内线性关系良好, $r^2$  大于 0.999。

向阴性样品中添加标准物质以进一步考察该方法的灵敏度。经优化方法进行前处理并上机测定,以 3 倍信噪比计算该方法的检出限,得出己烯雌酚检出限为 5.0 μg/kg,甲基睾丸酮检出限为 6.0 μg/kg。

表 2 己烯雌酚和甲基睾丸酮的回归方程及相关系数

分析化合物	回归方程	相关系数
己烯雌酚	$y = 57.290\ 62 + 3.574\ 17x$	0.999 8
甲基睾丸酮	$y = 51.493\ 86 + 3.559\ 91x$	0.999 2

孟 莉,郭世英,符云鹏,等. 吉林晒烟中的生物碱组成及其对烟叶内在质量的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):287-290.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.096

# 吉林晒烟中的生物碱组成及其对烟叶内在质量的影响

孟 莉<sup>1</sup>,郭世英<sup>2</sup>,符云鹏<sup>1</sup>,邱宝平<sup>2</sup>,刘晓旭<sup>2</sup>,郭濛濛<sup>1</sup>,赵晓军<sup>1</sup>,韩富根<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学烟草学院,河南郑州 450002; 2. 红塔辽宁烟草有限责任公司,辽宁沈阳 110000)

**摘要:**选取吉林长春当地 3 个主栽晒烟品种为研究对象,探讨晒烟中的生物碱组成及其对烟叶内在质量的影响。结果表明:(1)各品种生物碱在叶片发育过程中持续增加,成熟后期趋于稳定,其中大白花的生物碱含量最高,青黄叶次之,大叶黄最少。晒后烟叶中生物碱总量为 4.4%~6.0%;烟碱转化率为 3.8%~11.2%;烟碱、降烟碱、假木贼碱、新烟草碱占总生物碱的比例分别为 82.00%~89.00%、3.20%~9.10%、0.53%~0.58%、6.70%~8.30%。(2)晒后烟叶的降烟碱、转化率与还原糖、总糖达到极显著负相关,生物碱总量与还原糖、总糖达到显著负相关。晒后烟叶中 4 种生物碱均与总氮呈正相关且基本达到显著水平。(3)烟碱及生物碱总量与劲头得分呈极显著负相关;降烟碱与灰色得分呈极显著负相关,与香气质、香气量得分基本达到显著负相关;假木贼碱与劲头、燃烧性得分呈显著负相关;烟碱转化率与评吸各项指标均呈负相关,且相关性接近显著水平,并与香气质、灰色得分达到极显著水平。

**关键词:**晒烟;生物碱;内在质量;相关性;化学成分

**中图分类号:** S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0287-04

生物碱是一类特殊的含氮化合物,烟草生物碱包括烟碱、降烟碱、假木贼碱和新烟草碱,其组成与含量直接影响烟草制

品的感官评吸质量、烟气特征和安全性<sup>[1-5]</sup>。烟碱是烟草特有的化学成分,具有兴奋中枢神经及末梢神经的作用。烟碱在燃烧过程中挥发,使烟气呈碱性并产生刺激性气味,对烟叶质量有负面效应。降烟碱又称去甲基烟碱,易在调制及陈化过程中进一步生化转化,如氧化生成麦斯明;降烟碱还易发生酰化产物,使烟气挥发性物质的组成及含量发生变化,从而影响烟叶的香味品质及可用性。赵永利等采用气相色谱法对我国烟叶和卷烟的生物碱组成及含量现状进行了全面分析测定,并系统研究了白肋烟烟碱转化率与卷烟感官评吸品质、烟气 TSNA 含量的关系<sup>[6-9]</sup>。对于烤烟生物碱含量与其部位、

收稿日期:2014-10-11

基金项目:中国烟草实业发展中心资助项目(编号:zysy-2010-03);红塔辽宁烟草有限责任公司资助项目(编号:20130401)。

作者简介:孟 莉(1990—),女,河南民权人,硕士研究生,主要从事烟草栽培生理生化研究。E-mail:mengli61400@163.com。

通信作者:符云鹏,教授,硕士生导师,主要从事烟草栽培生理生化研究。E-mail:ypfu01@163.com。

## 3 小结

本试验建立了固相萃取-高效液相色谱法同时测定水产品中己烯雌酚和甲基睾酮 2 种激素药物残留的方法,同单组分检测相比,样品前处理可有效缩短检测时间,节约检测成本,提高检测效率。

## 参考文献:

- [1] Vick A M, Hayton W L. Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 52(3/4): 177-188.
- [2] 李俊锁,邱月明,王 超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:256-299.
- [3] 李佩佩,梅光明,张小军,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中的甲基睾酮残留量[J]. 食品科学,2012,31(22):282-285.
- [4] 中国海洋大学,国家水产品质量监督检验中心. 水产品中甲基睾酮残留量的测定:液相色谱法[S]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [5] Jiang J, Lin H, Fu X T, et al. Preliminary validation of high performance liquid chromatography method for detection of methyltestosterone residue in carp muscle[J]. Journal of Ocean University of China, 2005, 4

(3):248-251.

- [6] Barry T P, Marwah A, Marwah P. Stability of 17 alpha-methyltestosterone in fish feed[J]. Aquaculture, 2007, 271(1):523-529.
- [7] 牛晋阳,孙 焕,李莹莹. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 10 种类固醇类激素残留[J]. 食品科学,2010,31(4):230-232.
- [8] Chu P S, Lopez M, Serfling S, et al. Determination of 17 alpha-methyltestosterone in muscle tissues of tilapia, rainbow trout, and salmon using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(9):3193-3198.
- [9] 祝瑞琳,杨 弘,肖 炜,等. 超高效液相色谱-串联质谱联用测定罗非鱼肌肉中甲基睾酮残留[J]. 食品科学,2011,32(22):243-247.
- [10] 张彩虹. 高效液相色谱法测定己烯雌酚的实验研究[J]. 中国热带医学,2006,6(2):328-329.
- [11] 胡 鲲,杨先乐,张 菊. 酶联免疫法检测中华鳖肌肉中己烯雌酚[J]. 上海水产大学学报,2002,11(3):199-202.
- [12] Lu H H, Conneely G, Crowe M A, et al. Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 570(1):116-123.