

## 检测分析

# 反相高效液相色谱法同时测定饲料中的10种性激素

广东医学院药学院 刘红菊 闫冲  
河北爱尔海泰制药有限公司 刘宏果

**[摘要]** 本文建立了饲料中10种性激素(己烯雌酚、雌二醇、戊酸雌二醇、苯甲酸雌二醇、炔雌醇、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、炔诺酮、氯烯雌醚、炔雌醚等)的反相高效液相色谱检测方法。饲料样品经乙腈提取后,用固相萃取法进行净化。液相色谱采用 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈和水为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,230 nm 和 280 nm 双波长检测,柱温 30 ℃。10种性激素线性关系良好,相关系数均大于 0.9998,添加回收率为 95.32%~102.5%,RSD < 1.8%。该方法简便、准确、专属性好,可作为饲料中违禁性激素的检测方法。

**[关键词]** 高效液相色谱法;性激素;饲料;固相萃取

**[中图分类号]** S816.17

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-3314(2010)18-0034-03

**[Abstract]** Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was established to simultaneously determine 10 sexual hormones (diethylstilbestrol, estradiol, estradiol valerate, estradiol benzoate, ethinylestradiol, chlormadinone, levonorgestrel, norethisterone, chlorotrianisene, quinestrol) in animal feed. 10 sexual hormones were extracted by acetonitrile, and cleaned by solid phase extraction. HPLC analysis was performed on a Shim-pack VP-ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase gradient elution (acetonitrile and water as mobile phases). The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm and 280 nm, and the column temperature was 30 ℃. In the linear range, the correlation coefficients of 10 sexual hormones were all less than 0.9998, the average recoveries were in the range of 95.32%~102.5% with corresponding RSD < 1.8%. The method was simple, accurate and reliable, and could be used to determine sexual hormones in animal feed.

**[Key words]** RP-HPLC; sexual hormones; feed; solid phase extraction

性激素为性腺分泌的一类甾体激素,包括雌激素、孕激素和雄激素。我国农业部第176号文件明确规定,禁止在动物饲料和饮用水中添加己烯雌酚、雌二醇、戊酸雌二醇、苯甲酸雌二醇、炔雌醇、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、炔诺酮、氯烯雌醚、炔雌醚等10种性激素作为动物的促生长剂使用。但由于利益驱使,仍有将性激素非法添加进饲料中的情况发生,因此必须要加强对饲料中违禁性激素的检测,从源头上控制性激素残留。

目前国内外有关激素多残留的检测方法包括高效液相色谱法(王丽芳等,2008)、高效液相色谱-质谱联用法(王超等,2007)、气相色谱法(周昕等,2006)、气相色谱-质谱联用法(曾东平等,

2008)以及酶联免疫吸附法(Fitzpatrick等,2004)等。本文建立了饲料中己烯雌酚、雌二醇、戊酸雌二醇、苯甲酸雌二醇、炔雌醇、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、炔诺酮、氯烯雌醚、炔雌醚等10种性激素的反相高效液相色谱检测方法,并用二极管阵列检测器(DAD)作为阳性确证方法,方法简便、准确,可排除普通紫外检测器的假阳性结果。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪。SUPELCO 固相萃取装置, SUPELCO 固相萃取小柱(填料为 C<sub>18</sub>, 规格 500 mg/6 mL)。己烯雌酚、雌二醇、戊酸雌二醇、苯甲酸雌二醇、炔雌醇、醋酸氯地孕酮、左炔诺孕酮、炔诺酮对照品由中国药品生物制品检定所提供,氯烯雌醚、炔雌醚对照品购于美国 Sigma 公司。乙腈、甲醇为色谱醇,水为超纯水。饲料

样品购于市场。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Shim-pack VP-ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(梯度洗脱:0~20 min,乙腈 50%~65%;20~30 min,乙腈 65%~85%;30~35 min,乙腈 85%);流速:1.0 mL/min;230 nm(用于检测雌二醇、炔诺酮、炔雌醇、己烯雌酚、左炔诺孕酮、氯烯雌醚、苯甲酸雌二醇、戊酸雌二醇、炔雌醚)和 280 nm(用于检测醋酸氯地孕酮)双波长检测;柱温:30 ℃。

**2.2 样品预处理** 取饲料 5 g, 加入 25 mL 乙腈超声处理 15 min, 过滤, 取滤液 2 mL, 加 6 mL 水混合, 上样(SPE 小柱预先用 10 mL 甲醇活化), 用 25%乙腈水溶液 10 mL 减压淋洗, 抽干, 最后用 2 mL 乙腈洗脱, 收集洗脱液, 备用。

**2.3 对照品储备液的制备** 精密称取 10 种激素对照品各约 20 mg, 至 50 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。

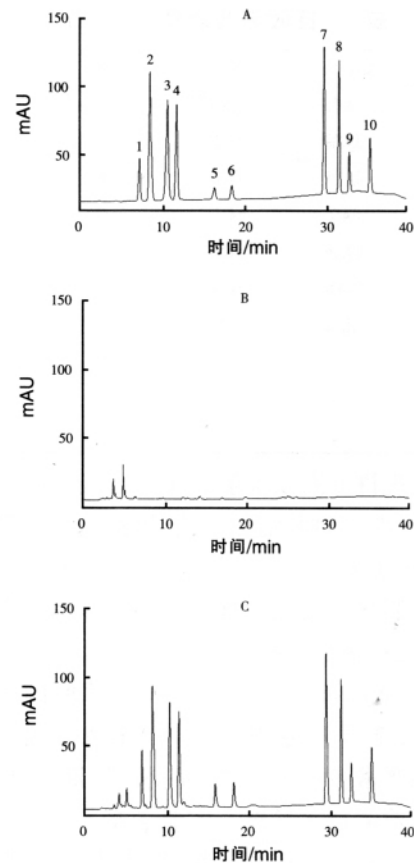
**2.4 系统适用性实验** 10 种激素在 36 min 内全部出峰, 出峰先后顺序为雌二醇、炔诺酮、炔雌醇、己烯雌酚、左炔诺孕酮、醋酸氯地孕酮、氯烯雌醚、苯甲酸雌二醇、戊酸雌二醇、炔雌醚。各激素色谱峰之间分离情况良好, 分离度均大于 1.5。饲料中的成分对测定无干扰, 色谱图见图 1。

**2.5 线性关系和检出限** 将对照品储备液进行稀释, 得到各激素浓度分别为 80、40、20、10、5、2、0.4 μg/mL 的混合对照品溶液, 在选定的色谱条件下进行测定, 以各激素的浓度( $x$ )为横坐标, 峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归, 得到线性方程。以信噪比为 3 估算检出限(LOD)。10 种激素的线性方程、相关系数和检出限见表 1。

**2.6 回收率和精密度** 称取饲料 5 g, 共 5 份, 各准确加入 10 种性激素的混合标准溶液(浓度均约 0.4 mg/mL)1 mL, 加入乙腈 24 mL, 按“2.2”项下进行处理, 并测定含量, 计算回收率, 测定结果见表 2。

**2.7 稳定性** 将添加对照品的样品溶液放置 0、2、4、8、12、24 h 时测定其浓度, 考察其稳定性, 10 种性激素 24 h 内的相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%, 说明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.8 样品测定** 按本方法检测了 12 种饲料, 通过与对照品色谱图比较保留时间和吸收光谱的形状进行定性, 未发现性激素。



注:1为雌二醇,2为炔诺酮,3为炔雌醇,4为己烯雌酚,5为左炔诺孕酮,6为醋酸氯地孕酮,7为氯烯雌醚,8为苯甲酸雌二醇,9为戊酸雌二醇,10为炔雌醚。

图 1 对照品(A)、空白样品(B)和添加对照品的样品(C)色谱图(230 nm)

表 1 10 种性激素的线性方程、线性范围、相关系数和检出限

被测成分	线性方程	线性范围/(μg/mL)	相关系数	检出限/(mg/kg)
雌二醇	$y=17342x-3.502$	0.4052 ~ 81.04	0.9999	0.6
炔诺酮	$y=60075x+29.75$	0.4228 ~ 84.56	0.9999	0.2
炔雌醇	$y=57951x-60.91$	0.4208 ~ 84.16	0.9999	0.2
己烯雌酚	$y=40857x-1.441$	0.4420 ~ 88.40	0.9999	0.3
左炔诺孕酮	$y=5777x+13.66$	0.4216 ~ 84.32	0.9997	1.7
醋酸氯地孕酮	$y=57184x+15.30$	0.4000 ~ 80.00	0.9999	0.2
氯烯雌醚	$y=54934x+18.50$	0.4272 ~ 85.44	0.9999	0.2
苯甲酸雌二醇	$y=42458x-4.388$	0.4296 ~ 85.92	0.9999	0.4
戊酸雌二醇	$y=14287x+12.70$	0.4044 ~ 80.88	0.9999	0.7
炔雌醚	$y=22750x+11.27$	0.3928 ~ 78.56	0.9999	0.6

## 3 讨论

**3.1 提取条件的选择** 10 种性激素均为非极性物质, 在甲醇、乙腈中溶解度较高。本实验考察了用甲醇和乙腈超声 15 min 提取饲料样品的提取效果, 结果发现用甲醇做提取溶剂时, 最终的供试

表2 回收率实验结果(n=5)

被测成分	加入量/mg	检测量/mg	回收率/%	RSD/%
雌二醇	0.4052	0.3862	95.32	1.1
炔诺酮	0.4228	0.4144	98.01	0.85
炔雌醇	0.4208	0.4118	97.85	1.4
己烯雌酚	0.442	0.4270	96.61	1.1
左炔诺孕酮	0.4216	0.4262	101.1	1.3
醋酸氯地孕酮	0.4000	0.4100	102.5	1.8
氯烯雌醚	0.4272	0.4099	95.95	0.92
苯甲酸雌二醇	0.4296	0.4131	96.15	1.2
戊酸雌二醇	0.4044	0.4001	98.94	0.74
炔雌醚	0.3928	0.3871	98.56	0.81

品中会出现许多杂质而影响测定,而乙腈提取的杂质要少,而且对测定无干扰。因此选择乙腈为提取溶剂。由于未发现含有性激素的饲料样品,实验室又无法制作仿真模拟样品,因此未考察超声时间的影响,直接采用提取时间15 min。

3.2 SPE 净化条件的选择 固相萃取的过程为上样、淋洗杂质、洗脱被测物。上样和淋洗过程中不能有性激素被洗脱下来,而提取溶液为纯乙腈,因此上样前需加水稀释,实验考察了上样溶液中乙腈的比例对回收率的影响。结果表明,乙腈浓度低于30%时不会将被测物洗脱下来。因此选择25%的乙腈水溶液作为上样溶液和淋洗溶液。

3.3 检测方法的选择 10种性激素的最大检测波长不尽相同,其中雌二醇、炔诺酮、炔雌醇、己烯雌酚、左炔诺孕酮、氯烯雌醚、苯甲酸雌二醇、戊酸雌二醇、炔雌醚在230 nm处吸收较强,醋酸氯地孕酮在280 nm处有最大吸收,因此选择230 nm和280 nm双波长检测法进行定量。实验采用DAD检测器检测,样品中若存在与标准品保留时间相似的色谱峰,可通过比较紫外吸收光谱进行定性,提高了定性的准确度。

#### 4 结论

本文采用反相高效液相色谱法建立了同时测定饲料中10种违禁性激素的方法。同时以乙腈作为提取剂,超声提取饲料中的10种违禁性激素。该方法操作简单,样品的杂质干扰较少,适用于饲料中性激素的多残留分析。

#### 参考文献

- [1] 王丽芳,李琼,姜佩华,等.高效液相色谱法同时测定化妆品中的5种性激素[J].精细化工,2008,25(5):479~481.
- [2] 王超,马强,王星,等.液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中的16种激素[J].分析化学,2007,35(9):1257~1262.

[3] 周昕,王江涛,赵志超.GC法测定青岛某水体中雌激素含量[J].分析测试技术与仪器,2006,12(2):104~108.

[4] 曾东平,林翠萍,曾振灵,等.气相色谱-质谱法检测猪肉中8种性激素的残留[J].中国农业科学,2008,41(9):2776~2782.

[5] Fitzpatrick J, Manning B, O'Kennedy R. Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of free trenbolone in bovine bile [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52: 4351~4360.

[通讯地址:广东省东莞市松山湖科技产业园  
新城大道1号广东医学院药学院338信箱,邮编  
523808]

(上接第29页)

验饲料的氨基酸平衡,因此,在氨基酸平衡条件下  
发酵豆粕的利用值得做进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] 艾庆辉,谢小军.水生动物对植物蛋白源利用的研究进展[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2005,36(6):929~935.
- [2] 陈京华.微生物发酵、外源酶制剂和促摄食物质对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)利用豆粕蛋白的影响:[硕士学位论文][D].青岛:中国海洋大学,2006.
- [3] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International (16th ed)[M]. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1995.
- [4] Ai Q H, Xie X J. Effects of dietary soybean protein levels on energy budget of the southern catfish, *Silurus meridionalis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, 141: 461~469.
- [5] Aragao C, Conceicao L C, Dias J, et al. Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae [J]. Aquaculture Research, 2003, 34: 1443~1452.
- [6] Berge G M, Grisdale-Helland B, Helland S J. Soy protein concentrate in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. Aquaculture, 1999, 178: 139~148.
- [7] Ostaszewska T, Dabrowski K, Palacios M E, et al. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins [J]. Aquaculture, 2005, 245: 273~286.
- [8] Refstie S, Storebakken T, Baeverfjord G, et al. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level [J]. Aquaculture, 2001, 193: 91~106.
- [9] Refstie S, Sahlstrom S, Brathen E, et al. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture, 2005, 246: 331~345.
- [10] Skrede G, Sahlstrbm S, Skrede A, et al. Effect of lactic acid fermentation of wheat and barley whole meal flour on carbohydrate composition and digestibility in mink (*Mustela vison*) [J]. Anim Feed Sci Technol, 2001, 90: 199~212.
- [11] Twibell R G, Wilson R P. Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Aquaculture, 2004, 236: 539~546.

[通讯地址:广东省湛江市麻章开发区区康中  
路,邮编:524094]