

高效液相色谱法同时测定食品中 5 种激素

涂晓明 孙 淳 北京市卫生防疫站 (100013)
罗仁才 郑兰波

摘要 建立了食品中雌三醇、雌二醇、雌酮、睾酮、孕酮 5 种激素同时分离测定的高效液相色谱分析方法。各类食品样品经固—液、液—液萃取处理后,以甲醇—乙腈—四氢呋喃—0.01mol/L 醋酸钠溶液为流动相,安眠酮为内标进行反相液相色谱分析。5 种激素分离效果良好,各组分浓度 1.0 ~ 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准曲线线性关系好,回归分析的相关系数均大于 0.999。方法的最低检测浓度:雌三醇 0.009mg/kg;雌二醇 0.038mg/kg;雌酮 0.044mg/kg;睾酮 0.020mg/kg;孕酮 0.071mg/kg。5 种激素同时分离测定的相对标准偏差小于 15%,不同浓度 5 种激素同时回收的回收率均在 80% 以上。该方法操作简便、准确、灵敏,满足实际样品测定需要。应用该方法对市场上的部分食品分析的结果表明,一些营养保健食品中含有不同成分的激素,提示有关部门应尽快制定法规进行监督管理。

关键词 高效液相色谱法 激素 食品分析

近年来,食品中激素测定方法的研究虽然进展较快,但多为气相色谱—质谱和放射免疫等方法。^{〔1~4〕}气相色谱—质谱能对多组分激素进行同时分离测定,准确灵敏度高,但仪器昂贵,分析条件要求高,许多试剂需国外进口,难以在基层推广应用;放射免疫法每次只能测定一个组分,样品需经不同前处理,费事费力,还存在放射物质对人体伤害和环境污染等问题。因此建立高效、简便、准确、灵敏、适宜推广应用的分析方法,为食品营养卫生监测及监督管理提供科学手段和依据,成为必须解决的课题。本文对高效液相色谱法同时分离测定食品中雌三醇、雌二醇、雌酮、睾酮、孕酮的实验条件及各类食品样品前处理条件进行了探讨,对部分市场样品进行了检测,获得满意结果。

1 材料和方法

1.1 仪器 Waters—810 高效液相色谱仪, 510 型泵, 490E 紫外—可见波长检测器, UBK 进样器, 810 色谱工作站;离心机;旋转蒸发仪或 K-D 浓缩仪。

1.2 试剂 所用试剂除注明特殊规格外均为分析纯。

甲醇;丙酮;乙醚;二氯甲烷;醋酸钠;醋酸;无水硫酸钠。

醋酸钠缓冲溶液 0.2mol/L 的醋酸钠溶液与 0.2mol/L 醋酸溶液逐渐混合至 pH5.2。

内标贮备液 称取安眠酮 0.1000g,用甲醇溶液溶解并定容至 100mL。此溶液每毫升含安眠酮 1.000mg。

内标使用液 取内标贮备液 2.0mL,用甲醇稀释并定容至 100mL。此溶液每毫升含安眠酮 20.00 μg 。

激素标准贮备液 分别称取雌三醇、雌二醇、雌酮、睾酮、孕酮 0.1000g,用甲醇溶解并定容至 100mL,每毫升含各种激素均为 1.000mg。

激素标准使用液 精密吸取一定量的激素标准品和内标贮备液,用甲醇配制成每毫升含各种激素为 10.00 μg ,安眠酮 2.00 μg 和每毫升含各种激素 2.00 μg ,安眠酮 2.00 μg 的两种标准使用液。

1.3 方法

高效液相色谱法同时测定食品中 5 种激素——涂晓明 孙 淳 罗仁才等

1.3.1 鱼、肉、蛋、禽等食品 取可食部分，捣成匀浆，称取 50g 左右置 250mL 具塞三角瓶中；其他固体食品则称取 25g 左右，置 250mL 具塞三角瓶中，加少量水湿润。在上述样品中加入安眠酮 20.00 $\mu\text{g/mL}$ 的内标贮备液 1.0mL，加甲醇：丙酮（1+1）混合溶液 150mL，在振荡器上振摇提取 30min，用快速滤纸过滤，残渣用少量甲醇：丙酮（1+1）混合液洗涤数次，洗液并入滤液中，于旋转蒸发仪或 K-D 浓缩仪中将溶剂蒸除，残渣用甲醇 20mL 溶解，经盛有无水硫酸钠的漏斗滤入 250mL 分液漏斗中，再用 10mL 甲醇分数次洗涤漏斗及内容物，洗液并入滤液中，加 pH5.2 的醋酸钠缓冲溶液 80mL 左右，混匀后用二氯甲烷 50、30、30mL 振摇提取 3 次，合并提取液并用无水硫酸钠脱水，在水浴上挥干溶剂，残渣用甲醇溶解并定容至 10.0mL，混匀后，以 3000r/min 速度离心 5min，取上清液供色谱分析用。

1.3.2 口服营养液等液体样品 取 100mL 左右于 250mL 分液漏斗中，加 20.00 $\mu\text{g/mL}$ 安眠酮的内标贮备液 1.0mL，混匀后，用 50% 醋酸钠溶液调 pH5.2 左右，用 50、30、30mL 乙醚振摇提取 3 次，合并提取液，水浴上挥干溶剂，残渣用 20mL 甲醇溶解。以下按 1.3.1 项下自“经盛有无水硫酸钠的漏斗滤入 250mL 分液漏斗中”起操作。

1.4 样品测定

取供色谱测定的样品溶液 10 μL ，注入液相色谱仪，以内标法定量。

1.5 色谱条件

色谱柱 HP-ODS 4.6 $\times$ 200mm；流动相 乙腈（色谱纯）：甲醇（色谱纯）：四氢呋喃（重蒸）：0.01mol/L 醋酸钠溶液（超纯水配制）=20+20+10+50；流动相流速 1.0mL/min；测定波长 270nm；检测器灵敏度 0.04AUFs；进样体积 10 μL 。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线线性关系 食品中激素含量较

低，要求方法标准曲线的浓度低而浓度范围则不需太宽。配制并测定各组分浓度相等的混合标准，其浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0 $\mu\text{g/mL}$ ，激素各组分标准曲线线性关系很好，回归分析结果见表 1，各组分标准曲线的相关系数均大于 0.999。

表 1 激素各组分标准曲线回归方程及相关系数		
组分名称	回归方程	相关系数
雌三醇	$y = 24.65 + 183.5x$	$r = 0.99993$
雌二醇	$y = 4.04 + 96.2x$	$r = 0.99999$
雌酮	$y = -2.98 + 98.5x$	$r = 0.99996$
睾酮	$y = 10.96 + 147.3x$	$r = 0.99998$
孕酮	$y = -10.42 + 71.8x$	$r = 0.99997$

2.2 最低检测量及最低检测浓度 本实验条件下，各组分最低检测量：雌三醇 9.0ng；雌二醇 38.0ng；雌酮 44.0ng；睾酮 20.0ng；孕酮 71.0ng。若取 50.0g 食品样品测定，食品中各组分的最低检测浓度为：雌三醇 0.009 mg/kg；雌二醇 0.038mg/kg；雌酮 0.044 mg/kg；睾酮 0.020 mg/kg；孕酮 0.071 mg/kg。

2.3 精密度实验 对一鸡胚样品进行 10 次测定，结果（见表 2）表明本方法对激素各组分同时测定的相对标准偏差均小于 15%，精密度良好。

表 2 精密度实验结果					$\mu\text{g/g}$
	雌三醇	雌二醇	雌酮	睾酮	孕酮
	0.381	0.361	0.140	0.124	0.342
	0.396	0.348	0.163	0.136	0.355
	0.348	0.361	0.158	0.152	0.347
	0.396	0.377	0.131	0.104	0.366
	0.381	0.316	0.152	0.138	0.390
	0.389	0.368	0.135	0.143	0.363
	0.418	0.364	0.164	0.156	0.371
	0.349	0.356	0.130	0.144	0.370
	0.354	0.342	0.151	0.149	0.390
	0.358	0.336	0.169	0.148	0.397
$\bar{x}$	0.377	0.353	0.147	0.133	0.360
s	0.0238	0.0179	0.0145	0.0155	0.0186
RSD(%)	6.4	5.1	9.9	11.7	5.1

表3 准确度实验结果

	雌 三 醇		雌 二 醇		雌 酮		睾 酮		孕 酮	
本底值	0.1		0.38		0.16		0.14		0.41	
加标量	8.0	4.0	8.0	4.0	8.0	4.0	1.6	0.8	4.0	2.0
	8.03	4.56	8.41	4.12	8.14	3.67	1.84	0.85	4.43	2.08
	7.30	3.80	8.45	4.04	8.15	3.74	1.75	0.88	4.49	2.14
	6.95	3.84	7.57	3.91	7.27	4.19	1.58	0.85	3.91	2.31
	99.1	86.5	100.4	93.5	99.8	87.8	106.3	88.8	100.5	83.5
	90.0	92.5	100.9	91.5	99.9	89.5	100.6	92.5	102.0	86.5
	84.1	79.0	99.1	95.0	101.0	90.5	102.5	80.0	97.0	85.0
	88.6	88.5	96.8	99.0	101.5	95.0	96.3	97.5	95.2	89.0
回收率	92.6	95.3	95.8	83.3	100.4	85.3	96.9	96.3	88.5	95.0
(%)	82.8	79.5	95.1	96.8	98.6	100.0	101.3	93.8	89.2	88.5
	96.5	82.3	92.9	95.8	89.9	97.5	91.3	96.3	96.0	90.5
	89.6	80.5	95.0	92.3	87.8	99.0	92.5	93.8	91.2	90.0
	82.3	81.5	91.3	90.0	89.6	96.3	95.0	87.5	86.6	97.0
	85.6	93.5	89.9	88.3	88.9	100.8	90.0	88.8	87.5	95.0
χ (%)	89.1	85.9	95.7	92.6	95.7	94.2	97.3	91.5	93.4	90.0
s	5.70	6.21	3.71	4.58	5.84	5.50	5.31	5.34	5.54	4.50
RSD(%)	6.4	7.3	3.9	4.9	6.1	5.9	5.5	5.9	6.0	5.0

2.4 准确度实验 在一样品中分别加入不同浓度的激素标准液, 进行 5 种激素的同时加标回收实验, 其回收率均能达 80% 以上, 该方法准确可靠。实验结果见表 3。

2.5 样品分析 用该方法对部分食品样品进行分析测定, 采用平行样, 加标回收试验进行分析质量控制。样品检测结果 (见表 4) 表明目前市场上一些营养保健食品中含有不同成分的激素, 尽管这些食品大多数为中老年保健食品, 但长时间食用会对健康造成危害, 尤其是在一些标明老少皆宜的营养保健食品中也检出了激素, 其严重后果应引起有关部门重视, 应尽快制定相应法规进行监督管理。

2.6 食品中激素含量较低, 大量蛋白质、脂肪、有机物干扰激素提取, 根据这些物质的性质差异, 用甲醇: 丙酮混合液沉淀食品中的部分蛋白、多糖类物质, 而雌三醇、雌二醇、雌

酮、睾酮、孕酮在甲醇: 丙酮中的溶解度极好。由于上述 5 种激素在甲醇中的溶解度极好, ^[5,6] 用其他有机溶剂进行液-液分配萃取时, 应将其调至甲醇浓度 <30%。萃取剂以乙醚的萃取效果最好, 各组分的回收率均达 90% 以上, 尤其是对雌三醇的萃取率明显优于其他萃取剂。二氯甲烷次之, 各组分的回收率也能达 80% 以上, 综合诸多因素, 本文选用二氯甲烷。

2.7 有关文献^[7] 报道, 激素的液相色谱分析多以乙腈: 水为流动相梯度洗脱反相法以及用己烷: 四氢呋喃为流动相的正相法, 这些方法对雌性激素和雄性激素不能同时分离测定。本文经多次实验后确定流动相组分为甲醇、乙腈、四氢呋喃、0.01mol/L 醋酸钠溶液。各组分的比例通过正交实验初步选择后再进行个别微小调整, 使其达到最佳分离 5 种激素的

高效液相色谱法同时测定食品中 5 种激素—— 涂晓明 孙 淳 罗仁才等

效果。正交实验结果 (见表 5) 确定流动相各组分的比例为甲醇: 乙腈: 四氢呋喃: 0.01mol/L 醋酸钠溶液 =20:20:10:50。其中四氢呋喃比例在 12% ~ 16% 之间调节, 当样品基质复杂, 干扰峰多时, 降低四氢呋喃比例以排除杂峰对雌三醇吸收峰干扰。样品干扰峰少, 四氢呋喃比例增大可缩短样品分析周期。

表 4 部分样品测定结果 $\mu\text{g/g}$					
样品名称	雌三醇	雌二醇	雌酮	睾酮	孕酮
XX 匀浆	0.12	未检出	未检出	未检出	0.08
XX 匀浆	0.44	0.38	未检出	0.14	未检出
XXX 鸡蛋	1.10	未检出	未检出	未检出	0.36
XXX 鸡蛋	0.46	0.38	0.14	未检出	未检出
XXX 口服液	0.05	0.07	0.05	未检出	未检出
XXX 口服液	未检出	0.10	0.10	未检出	未检出
XXX 保健液	2.30	未检出	未检出	未检出	0.41
XXX 营养液	1.30	未检出	未检出	未检出	0.10
XXX 儿童营养液	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
XXX 福星	0.35	0.10	0.20	0.50	未检出
老年 XX 粉	0.90	未检出	未检出	0.04	5.85
XXX 粉	1.93	未检出	未检出	未检出	22.6
XXX 营养粉	3.80	未检出	未检出	未检出	未检出
XXX 营养粉	未检出	未检出	0.10	未检出	未检出
XXX 营养粉	0.32	未检出	0.21	未检出	未检出
XXX 营养粉	0.45	未检出	0.91	未检出	未检出
XXX 营养粉	0.30	未检出	1.45	未检出	未检出
XXX 营养粉	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

2.8 对被测激素各组分进行紫外吸收光谱扫描, 雌三醇、雌二醇、雌酮在 230nm 波长处

有较大吸收, 240 ~ 260nm 吸收最小, 270 ~ 290nm 则有一较稳定吸收; 睾酮和孕酮在 240 ~ 250nm 有最大吸收, 随着波长增加, 紫外吸收呈下降趋势, 因此多组分同时测定时可选择 230nm 或 270nm 波长测定, 前者灵敏度高, 特别是睾酮, 但杂峰干扰严重。如果所用检测器具有多波长, 可用 260 和 280nm 双波长检测, 各组分均在较灵敏的波长下测定, 而杂质干扰小。

2.9 由于被测激素性质差异较大, 为减少样品前处理中的系统误差, 使定量分析更准确, 本方法采用内标法定量。对毛地黄类, 联苯、萘、喹啉、可地松类、安眠酮等物质进行选择实验, 结果以安眠酮最好, 该内标物在各类食品中的回收率均在 95% 以上。激素标准及内标物的色谱分离情况见图 1。

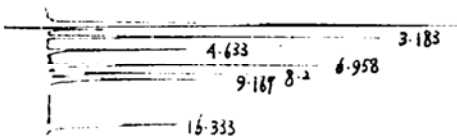


图 1 激素标准谱图

雌三醇	3.18min	安眠酮 (内标)	4.63min
睾酮	6.96min	雌二醇	8.20min
雌酮	9.17min	孕酮	16.33min

表 5 流动相组分与激素分离效果表

试验号	流动相组分比例 %				激素保留时间 min				
	甲醇	乙腈	四氢呋喃	0.01mol/L 醋酸钠	雌三醇	雌二醇	雌酮	睾酮	孕酮
1	20	10	4	66	9.80	22.61	26.00	27.75	45.00
2	20	20	8	52	3.52	7.02	8.60	10.06	16.97
3	20	30	12	38	2.59	3.98	4.63	4.93	6.97
4	40	10	8	42	3.12	5.76	6.47	6.93	11.06
5	40	20	12	28	2.25	3.18	3.20	3.36	4.31
6	40	30	4	26	2.47	3.76	3.50	3.76	5.73
7	30	10	12	48	3.29	5.35	7.07	7.63	10.12
8	30	20	4	46	3.20	7.70	7.90	8.93	18.50
9	30	30	8	32	2.46	3.66	3.60	3.90	5.75

(下接第 11 页)