

己烯雌酚残留的三种检测方法比较研究

陈眷华¹, 王文博², 徐在品¹, 毛以智³, 卢占军¹

(1. 贵州大学动物科学学院动物医学系, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 400044; 3. 贵州省遵义市畜牧局, 贵州 遵义 563000)

摘要: 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)是一种在畜牧业生产中广泛应用的人工合成的非甾体类雌激素。在己烯雌酚长期生产实践中研究发现, 己烯雌酚具有以生殖毒性为主的严重毒副作用。本实验就高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的、荧光分光光度计法(fluorescence spectrophotometer, FS)、毛细管电泳法(capillary zone electrophoresis, CZE)三种检测方法作比较。旨在寻找一种快速、高效、可行的动物组织中己烯雌酚残留检测方法。实验表明高效液相色谱法最小检出量为 6.25×10^{-3} mg/ml, 荧光光度法的最小检出量 8.04×10^{-3} mg/ml, 毛细管区带电泳法的检测所用时间为4min, 具有较快的检测速度, 仪器便宜、方法简便、准确、试剂用量小, 而且废液容易处理、污染小。可见CZE法在基层实际检测中是一种有效、可行的检测方法。

关键词: 己烯雌酚; 高效液相色谱; 荧光分光光度计; 毛细管区带电泳

Comparison Study on Three Methods to Assay DES Residue with HPLC, FS and CZE

CHEN Juan-hua¹, WANG Wen-bo², XU Zai-pin¹, MAO Yi-zhi³, LU Zhan-jun¹

(1. Department of Animal Medicine, College of Animal Science and Veterinary, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Faculty of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Guizhou Animal Husbandry Bureau of Zunyi, Zunyi 563000, China)

Abstract: Diethylstilbestrol is artificially produced and widely used as a estrogenic hormone in stock breeding production. In the long period of using DES, the seriousness of toxic hazard to the genital system has been discovered. In this experiment the three methods of HPLC, FS, CZE were compared in order to find a highly sensitive, quick and feasible method especially suitable for detecting residue quantity of DES in animal tissues. The results showed that the minimum detectable quantity of HPLC and FS was 6.25×10^{-2} and 8.04×10^{-2} mg/ml respectively. The CZE was characterized by being quick, economic, simple, accurate with little

收稿日期: 2005-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10572029)

作者简介: 陈眷华(1948-), 男, 副教授, 主要从事动物性食品安全的研究。

- HPLC[J]. *Clin Chem*, 1994, 40(9): 1707-1712.
- [10] 丁怡, 唐星. 柱前衍生化HPLC法测定百多宁注射液中的脂肪酸含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 2(1): 29-32.
- [11] 吕志华, 于广利, 王远红, 等. 卤虫卵壳营养成分分析[J]. *水产科学*, 2004, 23(1): 42-44.
- [12] 徐秀兰, 蒋企洲, 胡磊军, 等. 卤虾中蛋白质和脂肪酸组成的研究[J]. *中国生化药物杂志*, 1997, 18(6): 289-291.
- [13] Marangon A G, Rousseau D. Engineering triacylgly: The role of interesterification[J]. *Trends in Food Sci and Techno*, 1995, 6: 329-335.
- [14] Kl inkesorn U, Chinachoti P, Sophanodora P. Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Food Chemistry*, 2004, 87: 415-421.
- [15] 乔国平, 王兴国. 分子蒸馏技术及其在油脂工业中应用[J]. *粮食与油脂*, 2005, (5): 25-27.
- [16] 傅红, 裴爱咏. 分子蒸馏法制备鱼油多不饱和脂肪酸[J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, 2(6): 617-621.
- [17] 鲁云霞, 汪渊. 山西和天津卤虫卵的生化组分分析[J]. *生物学杂志*, 2003, 20(5): 26-28.

quantity of reagent required and small liquid waste disposed, so only slightly polluted. Hence according to the actual national conditions, the CZE is an effective and feasible method applicable in grass roots.

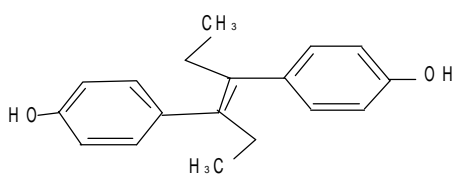
Key words : diethylstilbestrol (DES) ; high performance liquid chromatography (HPLC) ; fluorescence spectrophotometer (FS) ; capillary zone electrophoresis (CZE)

中图分类号 : S852.44

文献标识码 : A

文章编号 : 1002-6630(2006)09-0214-05

己烯雌酚(diethylstilbestrol DES)分子式为:
 $C_{18}H_{20}O_2$, 分子量: 268.36, 化学名为1, 2-双(4-羟苯基)-1, 2-二乙基乙烯, 为无色结晶或白色结晶性粉末, 在乙醇、乙醚、氯仿、脂肪油或强碱溶液中溶解, 在水中难溶、熔点169~172。结构式为:



1979年开始包括我国在内的世界各国开始严格控制DES作为治疗药物使用。并禁止使用己烯雌酚作为动物饲料添加剂(农业部文件农牧发[2001]24号)。欧盟从1986年禁止用于食品动物并限制进口其他国家用过该药的食品动物。2003年4月4日, 中华人民共和国农业部发布《2003年度动物性产品中兽药残留监控计划》(农牧发[2003]6号), 对己烯雌酚在动物性食品中要求零检出。

Remsey等在1975年报道7头阉公牛和7头小母牛每天投喂DES10mg, 连续给药60d, 在不同的停药期屠宰, 采集肌肉、肝脏、肾脏、脂肪、胆汁、血浆、尿液、粪便。组织样品用气相色谱法进行残留分析; 排泄物等同位素稀释法分析。结果表明停药1.5d后, 肌肉、血浆、心脏、脾脏均未检出DES; 停药5d, 肾脏未检出药物; 7d后肝脏未检出; 9d后胆汁未检出; 12d, 粪便和尿液未检出^[1]。

由于己烯雌酚在动物体内代谢快, 组织中浓度低, 因此其检测方法应该准确、灵敏。目前文献报道用于DES残留检测的方法很多, 主要有气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、气相色谱法(gas chromatography, GC)、放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)、酶连免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、荧光分光光度计法(fluorescence spectrophotometer, FS)、毛细管区带电泳法(capillary zone electrophoresis, CZE), 另外还有辐照分光光度法(irradiation technique, IT)和生物分析法(bioassay)。

GC-MS在检测药物时具有其独特的优点, 但使用时

仪器的专用性强, 使用的技术性要求高, 测定样品的成本也较高。RIA具有操作简便、灵敏度高、样品容量大、适于批量测定、仪器化程度高、分析成本低等优点。缺点是需要同位素防护设备, 对试验人员有一定的伤害, 仪器昂贵、假阳性率高、废液不易处理等。ELISA需要专门的试剂盒且不易保存, 对技术要求较高。由于DES具极性, 且沸点较高, 需要繁琐的衍生化步骤, 从而限制了GC的应用。Bioassay检测时间要求较长、检测下限较高。

为了寻求一种经济、简便、灵敏、特异性强的测定方法, 本实验以残留量较高的肝脏为检测对象, 分别用高效液相色谱法^[2]、荧光分光光度计法^[3]、毛细管区带电泳法^[4]对其中的DES含量进行检测, 同时以己烯雌酚片剂为参照对三种检测方法的最低检测限进行了比较。

1 最小检测量试验及标准曲线的建立

1.1 材料与方法

1.1.1 仪器与材料

高效液相色谱仪 Waters 2487, 具Waters 490紫外检测器; 色谱柱 CLC-ODS-C18(5 μ m)6.2mm \times 150mm, 不锈钢柱; F-4000荧光分光光度计 日本日立; 弹性熔硅毛细管(50 μ m \times 45cm i.d) 河北永年光纤厂; 紫外检测器 Waters 490。

甲醇、磷酸、硼砂。

0.043mol/L磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$); 己烯雌酚片 合肥久联制药有限公司 批号041004; 己烯雌酚标准品 中国药物研究所制购自湖南长沙奥克玛公司;

-环糊精(简称 β -CD, Aldrich公司): 使用时加尿素配成 5.0×10^{-2} mol/L; 溴化十六烷基三甲铵(CTMAB): 1×10^{-3} mol/L; 肉桂酸化学对照品。

实验使用的试剂一般系分析纯, 有机溶剂需过0.5 μ m FH滤膜, 无机试剂需过0.45 μ m滤膜。水为去离子水, 经检测均无荧光杂质。

1.1.2 检测条件(三种检测方法的条件)

1.1.2.1 高效液相色谱法

紫外检测器检测波长230nm, 灵敏度为0.04 AUFs。

流动相: 甲醇53%, 0.043mol/L磷酸二氢钠47%, 用磷酸调pH=5(其中 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 水溶液需过0.45 μ m滤膜)

流速: 1ml/min; 进样量: 10 μ l; 柱温: 20 工作间10min。

1.1.2.2 荧光分光光度计法

激发波长和发射波长狭缝宽度均为5 nm, 响应时间为2s。

1.1.2.3 高效毛细管区带电泳法

电泳条件分离电压24kV, 温度25, 虹吸进样, 高度10cm, 时间1s, 紫外检测波长214nm, 分离用缓冲液为pH9.18, 25mmol/L的硼砂溶液, 以肉桂酸为内标。精密称取干燥肉桂酸10.00mg置10ml容量瓶中, 用甲醇溶解至刻度, 即成浓度为1.00mg/ml的肉桂酸内标液, 置冰箱备用。

1.1.3 标准液配制

在50ml具塞离心管中, 分别加入不同浓度的标准液(3.0、6.0、12.0、18.0、24.0 μ g/ml)各1.0ml, 同时做空白对照。加甲醇至20.00ml, 使其测定浓度为0.00、0.15、0.30、0.60、0.90、1.20 μ g/ml, 充分搅拌, 振荡20min, 过0.5 μ m FH滤膜, 备用。

1.1.4 线性范围、相关性及其检出限

分别以三种检测方法按1.2中检测条件检测1.3中配制的标准溶液。同时视需要可以稀释溶液直至不能检出为检测下限。并求出线性方程。

1.1.5 精密度实验

用标准液进样, 进行6次分析, 以波峰面积为检测对象检验监测方法的精密度。

1.1.6 样品回收率

用标准液在高、中、低三个水平测定回收率。

1.1.7 日间和日内精密度的考察

考虑日光的影响以标准溶液进行日间和日内精密度考察。

1.1.8 主要影响因素

分别对三种检测方法的影响因素进行分析。

1.2 结果与分析

1.2.1 高效液相色谱法

1.2.1.1 线性范围、相关性及其检出限

己烯雌酚的保留时间 1.5min 线性范围0~100ng最低检出限 6.25×10^{-5} μ g/ml 回归方程:

$$Y=6.52339X+0.599847, r=0.9994.$$

1.2.1.2 精密度

进行6次分析, 其峰面积分别为50.2489、50.1029、50.9156、51.0387、50.3298、49.9891, 变异系数为0.86%。

1.2.1.3 回收率

加样0.15 μ g/ml, 回收率 84.5%, 加样0.6 μ g/ml, 回收率 87.9%加样1.2 μ g/ml, 回收率87.6%, 其回收率范围

为84.5%~100%。

1.2.1.4 日间和日内精密度

加样0.15、0.6、1.2 μ g/ml时, 其日内RSD分别为1.53%、1.08%、0.67%; 日间RSD分别为3.66%、3.53%、0.81%。

1.2.1.5 主要影响因素(检测的结果与以下几点有关系)

流动相的选择 流动相是色谱分离中最重要的一步, 直接关系到分析的灵敏度、检出限, 决定着能否将样品的组分一一洗脱分离。GB/T 14931.2-1994中规定的流动相为: 甲醇70%, 0.043mol/L磷酸二氢钠30%。本实验利用相同甲醇、0.043mol/L磷酸二氢钠溶液, 以不同配比的溶剂体系进行实验。结果显示, 以甲醇53%、0.043mol/L磷酸二氢钠47%为最佳。

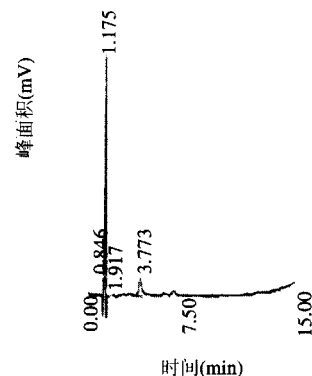


图1 DES 的高效液相色谱图
Fig.1 HPLC chromatogram of DES

流速的选择 流速的大小直接影响柱及系统的压力、各组分分离度、洗脱时间, 在流动固定之后, 选择最佳分离度和最短分析时间的流速。流速太小, 分析时间太长。流速太大, 系统的压力太高, 容易损伤仪器, 因此, 本实验以0.8、1.0、1.2ml/min流速进行实验, 得到流速在1.0ml/min为最合适。

柱温的选择 柱温是影响组分分离度因素之一, 本实验在流动相及流速固定下, 以柱温为20、30、40 进行试验, 结果表明, 随着柱温升高, 各组分保留时间大大提前, 但容易导致波峰重叠不易分辨, 本实验采用20 柱温。

波长的选择 己烯雌酚在230和280nm下都有较好的吸收。在分离条件固定下, 在D、E两个检测通道, 分别用230和280nm波长对加标样品进行检测发现230和280nm波长测定都能有效分离, 并克服共存干扰物的影响, 而230nm波长下吸收大得多, 因此本实验采用230nm波长进行检测。

1.2.2 荧光分光光度计法

1.2.2.1 线性范围、相关性及其检出限

按实验方法作出了己烯雌酚荧光分析工作曲线, 在

0~1.2μg/ml浓度范围内, 荧光强度与浓度之间呈良好的线性关系, 检测限为 $8.04 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$, 线性回归方程为:

$$Y=2.102X+0.9589, r=0.9996.$$

1.2.2.2 精密度

进行6次分析, 其峰面积分别为35.3902、35.3412、35.3019、35.4531、35.4389、35.8910, 变异系数为, 0.6%。

1.2.2.3 回收率

加样0.15μg/ml, 回收率99.8%; 加样0.6μg/ml, 回收率101.1%; 加样1.2μg/ml, 回收率97.8%。其回收率范围为97.8%~101.1%。

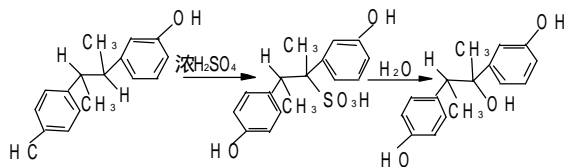
1.2.2.4 日间和日内精密度

加样0.15、0.6、1.2μg/ml时, 其日内RSD分别为1.45%、1.23%、0.59%; 日间RSD分别为3.67%、3.44%、0.64%。

1.2.2.5 主要影响因素(检测的结果与以下几点有关系)

硫酸与反应时间的关系己烯雌酚本身无荧光, 在有浓硫酸存在的条件下与水发生加成反应生成H-DES, H-DES具有荧光性质。该反应受浓硫酸的用量及反应时间的影响。当硫酸用量与己烯雌酚之比为1ml:1mg时需8~10h; 比值为10ml:1mg时90~102min即可达到最大且稳定的荧光强度。

介质对荧光光谱的影响反应产物的荧光光谱见图2。其荧光光谱随pH值的变化而变化, 在2.0mol/L H₂SO₄



强酸性溶液至pH=8.0的弱碱性溶液中, ex=262nm, em则随溶液酸度减小从388nm渐移至382nm, 加入有机溶剂、-CD或CTMAB后, ex稳定在250nm, em稳定在382nm, 即酸性介质中反应物的荧光光谱既受酸度的影响, 又受溶剂的影响。

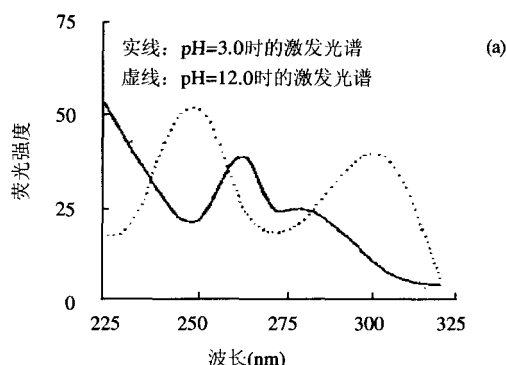
在pH > 11.0的强碱性溶液中, ex=250nm, ex=378nm。加入表面活性剂或-CD后, 激发光谱与发射光谱的峰位均不改变。在pH=8.0~11.0的弱碱性溶液中, 荧光强度远较强酸强碱性介质中的小。

介质对荧光强度的影响随溶剂极性不同, 荧光强度由小到大的顺序为: H₂O < CH₃OH < C₂H₅OH < C₃H₇OH。说明溶液非极性增强, 荧光强度增加; 溶液酸碱性对荧光强度的影响如下图3所示。

1.2.3 毛细管区带电泳法

1.2.3.1 线性范围、相关性及检出限

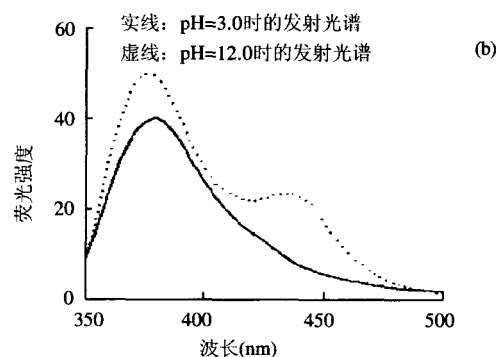
按1.2的测试条件测定, 以标准品与内标物的峰面积之比对浓度进行线性回归, 在100.0~500.0μg/ml范围内线



[DES]=1.2×10⁻⁶mol/L—pH=3.0、12.0。

图2 (a)激发光谱

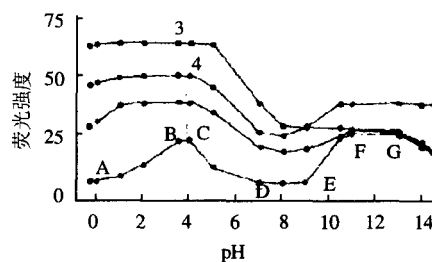
Fig.2 (a) Inspired spectrum



[DES]=1.2×10⁻⁶mol/L—pH=3.0、12.0。

图2 (b)发射光谱

Fig.2 (b) Emission spectrum



1.[β-CD]=0; 2.[β-CD]=8.0×10⁻³mol/L; 3.[β-CD]=8.0×10⁻³mol/L; 4.[CTMAB]=1.05×10⁻³mol/L, 乙醇为60%, [DES]=7.5×10⁻⁷mol/L。

图3 pH对DES的荧光强度的影响
Fig.3 The effect of pH on DES

性关系良好, 最低检测限1.0μg/ml。得回归方程:

$$Y=0.4826+13.2421X, r=0.9998.$$

1.2.3.2 精密度

进行6次分析, 其峰面积分别为21.6883、21.6974、21.7231、21.6092、21.6591、21.6899, 变异系数为0.18%。

1.2.3.3 回收率

加样50.00μg/ml, 回收率97.96%; 加样100.00μg/ml, 回收率102.31%; 加样200.00μg/ml, 回收率99.45%。其回

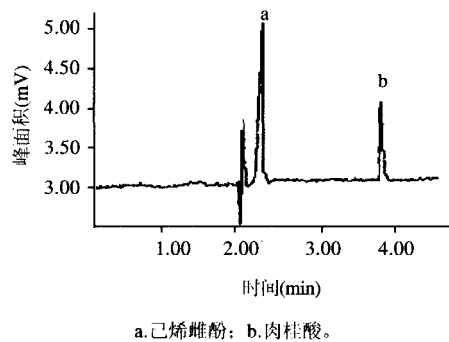


图4 DES电泳图

Fig.4 The electropherograms of DES

收率范围为97.96%~102.31%。

1.2.3.4 日间和日内精密度

加样100.0、300.0、500.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,其日内RSD分别为1.60%、1.12%、0.67%;日间RSD分别为3.75%、3.65%、0.76%。

1.2.3.5 主要影响因素

应当从内标的种类、浓度以及电压、硼酸的浓度方面进行考虑,由于实验经费及实验室条件限制未能对毛细管区带电的主要影响因素进行分析。

1.3 讨论

本试验中通过对三种不同检测方法的线性范围、相关性及检出限、精密度、加样回收率方面分别进行了对比研究得出:三种检测方法切实可靠可行。

最低检测限:HPLC法 $6.25 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$;FS法 $8.04 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$;CZE法 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 。

1.3.1 高效液相色谱法工作曲线的相关系数 $r = 0.9994$;其相对标准差RSD 0.6% ($n=6$),回收率范围为84.5%~100%,峰面积变异系数为。HPLC法是GB/T14931.2-1994 畜禽肉中己烯雌酚的测定方法该法具有灵敏、准确、精密、杂质干扰少,具有较高可重复性、权威性等优点。但是该方法也有实验仪器昂贵、保养程序复杂、设备对环境要求较高、技术含量较高、试剂毒性较大、单个样品检测成本较高、样品前处理复杂等缺点。故该法较为适合科研单位、较高级别的检疫站所、进出口检疫等要求较高的部门作为定性、定量检测使用。

1.3.2 荧光分光光度计法平均偏差1.15%,标准偏差1.72%,回收率为97.8%~101.1%,在0~1.2 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内,荧光强度与浓度之间呈良好的线性关系, $r = 0.9996$,最低检测限为 $8.04 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ 其峰面积变异系数为。该方法有灵敏度高、回收率高、仪器操作简单、可操作性强、试剂便宜等优点,是一种新的DES检测方法,不足之处是样品前处理时间较长,所用试剂有腐蚀性。所以该方法比较适合对检测时间要求不严格的场合使用,可以作为HPLC法的补充,也可以在低一级的检疫站所推广。

1.3.3 使用毛细管区带电电泳法时己烯雌酚的迁移时间

约为2.86min,样品测试时间只需4min;所用的石英毛细管价廉,背景电解质为普通的硼砂盐,几乎不消耗溶剂且无毒,方法快速、高效、低耗、准确;因此可用于己烯雌酚制剂中己烯雌酚的定量分析。荧光法利用己烯雌酚和浓硫酸的水解产物的荧光性质,对己烯雌酚的检测达到了一个较高的水平,方法快速、高效、低耗、准确、误差小、回收率高,缺点是需要较高的电压支持。笔者认为CZE法作为低级别的己烯雌酚快速定性分析,尤其适合我国县级的畜牧局、工商部门的日常定性分析。

2 样品检测

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

由贵阳市花溪区徐家冲菜市场分批随机采集猪肝脏共120份,每份5~10g。

2.1.2 提取及净化

称取5g ($\pm 0.1\text{g}$)绞碎肝脏样品(小于5mm),放入50ml具塞离心管中,加10.00ml甲醇,充分搅拌,振荡20min,于3000r/min离心10min,将上清液移出,残渣中再加10.00ml甲醇,混均后振荡20min,于3000r/min离心10min,合并上清液,此时出现混浊,需再离心10min,取上清液过0.5 μm FH滤膜,分别编号,置入4 冰箱备用。

2.1.3 样品检测

分别取提取净化后的样品适量用高效液相色谱、荧光分光光度计、毛细管区带电电泳三种方法检测,具体方法见上文最小检测量试验及标准曲线的建立。

2.2 结果与分析

实验结果显示,三种检测方法中,高效液相色谱法检出率为4.17%,最高检出量0.9471mg/kg,最低检出量0.2058mg/kg;毛细管区带电电泳法检出率3.33%,最高检出量0.9387 mg/kg,最低检出量0.2020mg/kg;荧光光度法检出率为4.17%,最高检出量0.9127mg/kg,最低检出量0.2118mg/kg。

2.3 讨论

通过贵阳市花溪区徐家冲菜市场猪肝的检测得出:样品中DES最小残留量为0.2058mg/kg,最高残留量为0.9471mg/kg检出率为4.17%,最小残留量在毛细管区带电电泳法的检测下限之上,所以CZE法可以做为低级的己烯雌酚快速定性分析,尤其适合我国县级的畜牧局、工商部门的日常定性分析。

参考文献:

- [1] 朱蓓蕾. 动物性食品药物残留[M]. 上海科学技术出版社, 1994. 122.
- [2] 陈永红, 鲁长蒙, 陶锐, 等. 反相高效液相色谱法同时测定包销口服液中20种甾体; 激素的研究[J]. 色谱, 1996, 14(5): 342-345.
- [3] 潘祖亭, 姚礼峰, 马红燕, 等. 己烯雌酚荧光性质的研究及其分析应用[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1997, 12, 43(6).
- [4] 林培英, 武向锋, 刘荔荔, 等. 毛细管区电泳法测定己烯雌酚片剂中己烯雌酚的含量[J]. 药学实践杂志, 2002, 20(5): 289-290.