

海能仪器：猪和牛脂肪中孕酮残留量的测定（液相色谱法）

醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮为合成的孕激素类药物，有明显的孕激素和抗雄激素作用，可抑制排卵。孕激素对垂体促性腺激素的释放有一定的抑制作用，动物实验表明有死胎率增加和致畸作用，副作用有：（1）恶心、头晕、倦怠；（2）突破性出血；（3）孕期服用，会增加女性后代的男性化作用。孕激素类药物能增强体内物质沉积和改善生产性能，可以很快产生显著和直接的经济效益，因此，对生产者有很大的吸引力。畜牧业中使用孕激素类药物（非治疗用途）已有很长的历史，但人类长期食用含有激素的肉制食品，即使含量甚微，亦会明显影响机体的激素平衡，而且有致癌危险，对幼儿造成发育异常等危害。因此，开发一种能检测孕酮残留量的方法是十分必要的。本文采用高效液相色谱法对牛和猪脂肪样品中的孕酮进行检测。

1 试剂与仪器

1.1 试剂 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准品，乙腈，甲醇，乙酸乙酯，其他试剂为分析纯。水由净化系统制得。

（1）标准储备液： $1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，分别准确称取 $0.05\ \text{g}$ 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准品于 $50\ \text{ml}$ 容量瓶中，用甲醇定容。于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存，可使用一年。

（2）混合中间溶液 I： $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，分别吸取 $10.0\ \text{ml}$ 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮标准储备液于 $100\ \text{ml}$ 容量瓶中，用甲醇定容。于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存，可使用一年。

（3）混合中间溶液 II： $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，取 $1.0\ \text{ml}$ 混合中间溶液 I 于 $100\ \text{ml}$ 容量瓶中，用甲醇定容。于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存，可使用半年。

（4）混合标准工作液：分别吸取 10 、 20 、 40 、 80 、 $100\ \mu\text{l}$ 混合中间溶液 II 添加到 980 、 970 、 950 、 910 、 $890\ \mu\text{l}$ 的乙腈—水（ $65:35$ ）中，再加入 $10\ \mu\text{l}$ 0.2% 盐酸溶液，混匀，得到浓度为 $0.010\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.020\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.040\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.080\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 混合标准工作液，供液相色谱测定，当日使用。

1.2 仪器 LC7000 液相色谱系统，LC7011泵体，LC7020 紫外—可见检测器，Hanon-Clarity 色谱软件。氮吹仪；海能全自动固相萃取装置；低温离心机；涡旋混匀器；CN 固相萃取柱。

2 测定步骤

2.1 试样的制备与保存

2.1.1 试样的制备 把大约 $5\ \text{g}$ 的猪或牛脂肪组织切成小块，然后放入底部塞有玻璃棉的漏斗中，放入 $150\ \text{ml}$ 的烧杯中，将烧杯置于微波炉内。根据所熬制脂肪量，使用最大功率，加热 $30\sim60\ \text{s}$ ，如果脂肪没有融化，可在间隔 $30\sim60\ \text{s}$ 以后重复加热 $30\sim60\ \text{s}$ ，直到有液体脂肪流出，通过漏斗滴入烧杯中。把熬制好的脂肪油放入样品瓶中，密封，并做上标记。

2.1.2 样品的保存 把熬制好的脂肪油样品置于 $-18\ ^\circ\text{C}$ 中，冷冻保存。

2.2 提取 称取熬制好的脂肪油 $2.00\pm0.01\ \text{g}$ ，置于 $50\ \text{ml}$ 具塞离心管中，加入 $5\ \text{ml}$ 乙腈，于 $60\ ^\circ\text{C}$ 水浴中保温 $3\ \text{min}$ 以使固体脂肪溶化，涡旋振摇 $1\ \text{min}$ ，在 $-5\ ^\circ\text{C}$ 下离心 $7\ \text{min}$ （离心力 $1160\ \text{g}$ ），吸取上清液至 $15\ \text{ml}$ 带塞聚丙烯离心管，再在沉淀物中加入 $5\ \text{ml}$ 乙腈重复提取一次，合并上清液。在合并的乙腈提取液中加入 $2\times2\ \text{ml}$ 正己烷，涡旋振摇 $1\ \text{min}$ ，于 $-5\ ^\circ\text{C}$ 中离心 $5\ \text{min}$ （离心力 $1160\ \text{g}$ ），弃去正己烷层。乙腈提取液于 $60\ ^\circ\text{C}$ 中用氮吹仪吹干，残渣待皂化。

2.3 皂化 在残渣（2.2项）中依次加入 $4\ \text{ml}$ 正己烷、 $1\ \text{ml}$ $0.1\ \text{mol}/\text{L}$ 氢氧化钠溶液和 $0.5\ \text{ml}$ $1.0\ \text{mol}/\text{L}$ 氯化镁溶液，于涡旋混匀器上快速混匀 $10\ \text{s}$ ，在 $60\ ^\circ\text{C}$ 水浴中保温 $15\ \text{min}$ ，于 $-5\ ^\circ\text{C}$ 中离心 $5\ \text{min}$ （离心力 $1160\ \text{g}$ ），吸取上清液至 $15\ \text{ml}$ 玻璃试管。在沉淀物中再加入 $4\ \text{ml}$ 正己烷混匀后，在 $60\ ^\circ\text{C}$ 水浴中加热 $15\ \text{min}$ 后，在 $-5\ ^\circ\text{C}$ 中离心 $5\ \text{min}$ （离心力 $1160\ \text{g}$ ），合并上清液。于 $60\ ^\circ\text{C}$ 中用氮吹仪吹干，用 $1.0\ \text{ml}$ 正己烷溶解残渣，待净化。

2.4 净化 将皂化后的样液（2.3项）倒入经 $5\ \text{ml}$ 乙酸乙酯和 $6\ \text{ml}$ 正己烷预处理过的CN柱中，用 $2\times1\ \text{ml}$ 正己烷润洗玻璃试管，洗液倒入到CN柱中。待样液流过后，依次用 $5\ \text{ml}$ 正己烷和 $6\ \text{ml}$ 5% 乙酸乙酯的正己烷溶液淋洗柱子，随后打开真空泵将小柱中液体抽干，保持抽气 $2\ \text{min}$ 。最后用 $3.5\ \text{ml}$ 20% 乙酸乙酯的正己烷溶液洗脱，洗脱液收集于 $15\ \text{ml}$ 玻璃试管中，于 $60\ ^\circ\text{C}$ 中

用氮气吹干仪吹干。残余物用 $990\ \mu\text{l}$ 乙腈-水 (65:35) 涡旋溶解, 静置 $15\ \text{min}$ 后, 加入

$10\ \mu\text{l}$ 0.2% 盐酸溶液, 混匀, 供液相色谱测定。

2.5 测定

2.5.1 液相色谱条件 色谱柱: C18 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 预柱: C18 柱 ($12.5\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈-水 (65:35); 流速: $1.0\ \text{ml}/\text{min}$; 柱温: $35\ ^\circ\text{C}$; 检测波长: $292\ \text{nm}$; 进样量: $40\ \mu\text{l}$ 。

2.5.2 液相色谱测定 根据样液中 3 种孕酮的含量情况, 选定浓度相近的标准工作液, 标准工作液和样液中 3 种孕酮的响应值均应在仪器检测的线性范围内。标准工作液和样液等体积参插进样测定。在上述色谱条件下, 标准品的色谱图见图 1。

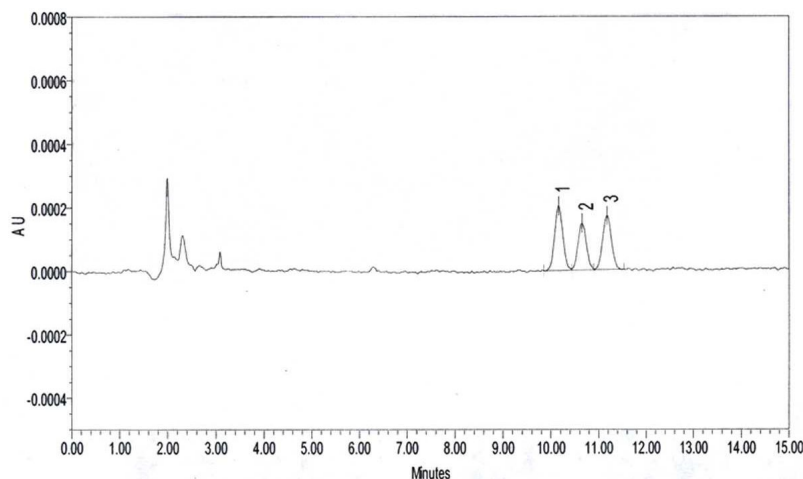


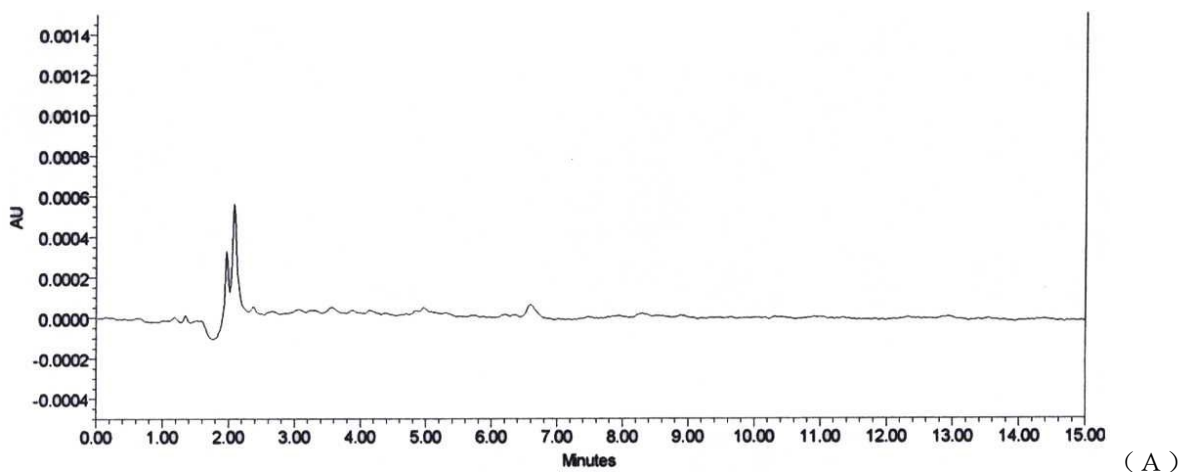
图 1 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮的色谱图 ($100\ \text{ng}/\text{ml}$)

1 — 醋酸甲地孕酮, 2 — 醋酸氯地孕酮, 3 — 醋酸美仑孕酮

3 结果与讨论

3.1 线性范围 醋酸美仑孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮浓度在 $0.010 \sim 0.10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系, 其相关系数 (r^2) 均大于 0.998 。

3.2 回收率、精密度和定量检测限 本实验以 2 种脂肪 (牛脂肪和猪脂肪) 作为样本。取适量标准品加入到 $2.0\ \text{g}$ 样品中, 使添加量相当于 10 、 20 和 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 每个添加水平各取 24 份试样 (每种脂肪各 12 份)。图 2 为空白脂肪样品和添加样品 ($10\ \mu\text{g}/\text{kg}$) 的色谱图。表 1 为醋酸美仑孕酮, 醋酸氯地孕酮和醋酸甲地孕酮外标法测得的室内回收率和精确度。表 2 为 8 家实验室的室间回收率和精确度结果。根据回收率试验, 能可靠测得的最低浓度确定定量检测限 (LOQ), LOQ 为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 满足残留限量的检测要求。



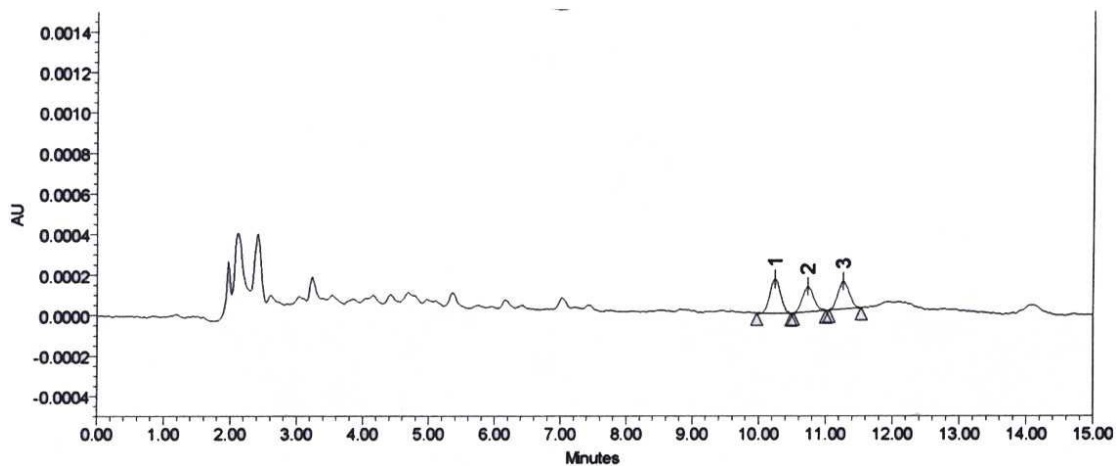
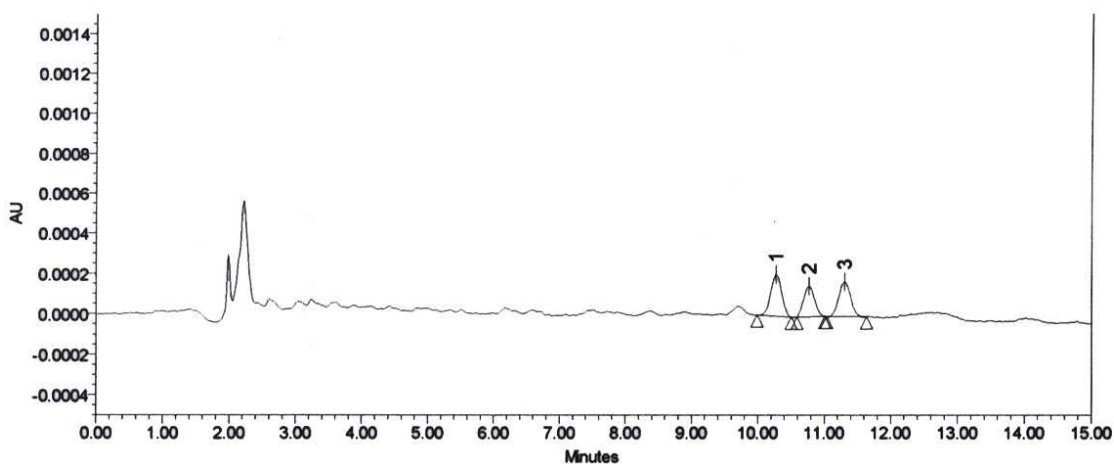
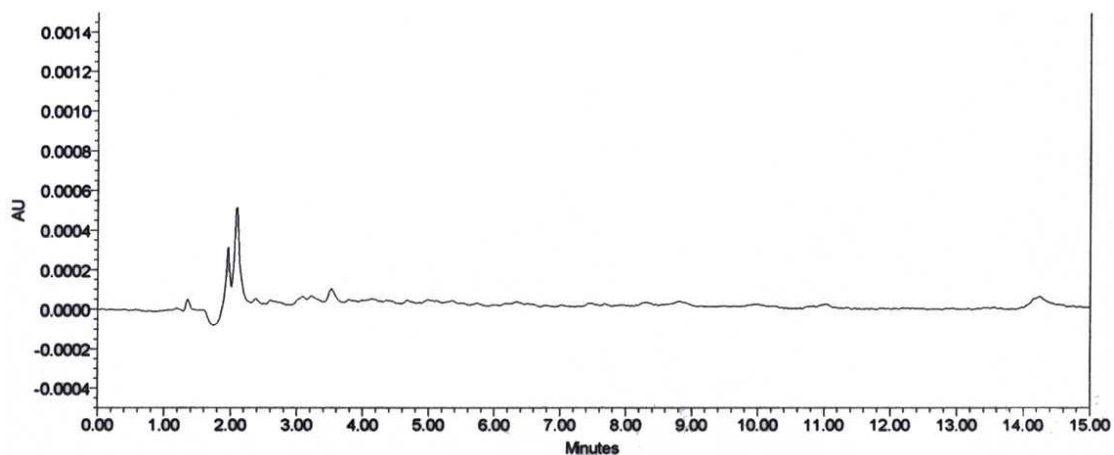


图2 空白脂肪样品和添加样品 (10 (g / kg)) 的色谱图
 A: 牛脂肪空白样; B: 猪脂肪空白样; C: 牛脂肪添加样; D: 猪脂肪添加样

表 1 室内回收率和精确度的结果
(每一添加量, n = 24)

添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率(%)			RSD(%)		
	醋酸美 仑孕酮	醋酸氯 地孕酮	醋酸甲 地孕酮	醋酸美 仑孕酮	醋酸氯 地孕酮	醋酸甲 地孕酮
10	91.8	89.1	88.1	6.0	5.5	6.0
20	87.4	86.7	89.6	5.5	4.8	4.5
50	88.8	89.0	90.2	5.1	4.7	4.7

表 8 8 实验室室间回收率和精确度的结果
(每一添加量, n = 32)

添加量 (g/kg)	平均回收率(%)			RSD(%)		
	醋酸美 仑孕酮	醋酸氯 地孕酮	醋酸甲 地孕酮	醋酸美 仑孕酮	醋酸氯 地孕酮	醋酸甲 地孕酮
10	92.9	94.2	95.0	6.3	5.4	5.4
20	86.6	87.9	89.7	7.1	3.7	4.1
50	81.4	84.7	86.0	6.1	4.0	3.7