

高效液相色谱法同时测定保健品中 15 种激素

徐惠金, 吴映璇, 欧阳少伦*

(广东检验检疫技术中心, 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广州 510623)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定保健品中雌三醇、雌二醇、雌酮、己烯雌酚、泼尼松龙、氢化可的松、可的松、倍他米松、地塞米松、曲安奈德、醋酸泼尼松、睾酮、甲基睾酮、氯倍他索丙酸酯、黄体酮等 15 种激素的分析方法。**方法** 用甲醇直接溶解提取, C₁₈ 固相萃取柱净化, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 流量为 1.0 mL/min, 采用二极管阵列检测器双波长检测, 波长分别为 204、245 nm。**结果** 15 种激素的线性范围为 0.1~5 mg/L, 相关系数 $r > 0.99$, 添加回收率为 85.0%~105%之间, 相对标准偏差 < 5%, 定量限 0.05 mg/kg。**结论** 该方法简便、快捷、准确, 适用于保健品中 15 种激素的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 保健品; 激素; 样品前处理; 二极管阵列检测器

Determination of 15 kinds of hormones in health products by high performance liquid chromatography

XU Hui-Jin, WU Ying-Xuan, OUYANG Shao-Lun*

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 15 kinds of hormones in health products by high performance liquid chromatography. **Method** Health products sample were extracted in methanol, purified by C₁₈ column, acetonitrile/water was used as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min and detected at the wavelength of 204, 245 nm. **Results** There were good linear relationships over the range of 0.1-5 mg/L for all the hormones ($r > 0.99$). The recoveries were ranged from 85.0% to 105%. The relative standard deviations were less than 5%. The limits of quantitation were 0.05 mg/kg. **Conclusion** This method is simple, rapid, and accurate, which is applicable to simultaneous determination of 15 kinds of hormones in health products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; health products; hormones; sample pretreatment; diode array detector

1 引言

随着生活水平的不断提高, 人们越来越重视保健品中的质量问题, 保健品的消费越来越高, 特别是大城市, 人民对保健品的质量安全较为关注。

激素俗称荷尔蒙, 是调节人体生理功能的化合物, 大量的研究证实, 过多摄入激素影响人体糖、脂肪、蛋白和盐等物质的代谢^[1]; 长期食用添加激素的保健品会对人体产生有害作用^[2], 激素失去平衡会导致皮毛、精神、睡眠、生理等发生紊乱, 生育能力下降, 并有致癌危险。糖皮质

基金项目: 农业农村部标准立项课题(2014NY197)

Fund: Supported by Agricultural and Rural Ministry Standards Project (2014NY197)

*通讯作者: 欧阳少伦, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。Email: oysl@iqtc.cn

*Corresponding author: OUYANG Shao-Lun, Senior Engineer, Technical Center of Guangdong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.66, Huacheng avenue, Tianhe District, Guangzhou 510623, China. Email: oysl@iqtc.cn

激素有抗炎、抗过敏等治疗作用,在临床各科均有广泛应用^[3,4]。但作为保健品长期食用或随意使用会导致代谢紊乱,可表现为高血压、高血脂、糖尿病、骨质疏松等不良反应^[5]。

保健品市场中出现多种改善更年期症状、美容、延缓衰老、减轻各类痛症等保健产品,有些不法商家为了增强其效果违规添加激素威胁人体健康^[3]。另一方面,以动物性原料生产的保健品中含有激素残留,因激素可做动物生长促进剂被养畜业所使用。我国保健品标准中规定保健品不以治疗疾病为目的,对人体不产生任何急性、亚急性或慢性危害的食品^[6]。雌激素类、孕激素类、具有雄激素和糖皮质激素效应的物质添加在保健品中长期对人体产生不良反应和耐药性。因此,保健品中激素的检测对监控保健品的品质、保障人民对保健品的安全信用具有非常重要的意义。

测定保健品中激素的方法和相关文献中^[2,5,7-15],样品萃取步骤复杂,易导致样品乳化,难以分层萃取,且存在杂质干扰问题。检测仪器方面大多取用串联质谱仪^[9-12],仪器昂贵。本研究直接采用甲醇溶解样品,经超声、浓缩、过滤,复杂样品经 C₁₈ 固相萃取柱萃取。采用带二极管阵列检测器的高效液相色谱仪,能满足基层实验室的检测条件,二极管阵列检测器多波长同时检测,以解决各物质的紫外吸收波长不一致、单波长检测带来响应不高,分离不好等问题。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱(带二极管阵列检测器,日本岛津公司); SW 30H 超声波仪(瑞士 SONO SWISS 公司); IKA MS 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); 3-18K 高速离心机(德国 sigma 公司); 固相萃取柱(CNW 6 mL C₁₈, 上海安谱实验科技股份有限公司); 0.20 μm 津腾有机过滤膜(天津津腾公司)。

甲醇、正己烷(分析纯,广州化学试剂厂); 乙腈(色谱纯,德国莫克公司); 激素标准品(纯度>95%,德国 DR. Ehrenstorfer 公司); 实验用水为超纯水(美国 ELIX-35 CLINICAL Milipore 公司)制备。

2.2 标准溶液的配制

分别准确称 15 种激素标准品约 5 mg 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容摇匀作为标准储备液。置于冰箱中冷冻,温度设为-18℃,保存半年。

分别准确吸取适量的标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容摇匀,配成浓度 10 mg/L 混合物标准储备液。置于冰箱中冷冻,温度设为-18℃,保存半年。

混合标准工作液:分别取 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.00 mL 混合物标准储备液于 10 mL 容量瓶中,乙腈定容,摇匀。工作液浓度分别为 0.1、0.20、0.5、1、2、5 mg/L。

2.3 方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Discovery C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为水,梯度洗脱(见表 1); 检测仪器: 岛津液相色谱仪 LC-20AD(带二极管检测器); 检测波长范围: 190~500 nm; 提取波长: 204、245 nm; 柱温箱: 35℃; 流速: 1 mL/min; 分析时间: 30 min。外标法,峰面积定量测定。

表 1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution table

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
起始	30	70
15.0	30	70
16.0	55	45
22.0	70	30
23.0	30	70

2.3.2 样品的前处理

口服液类样品:准确称取 5.000 g(精确至 0.001 g)试样于 50 mL 带盖离心管中,加入 10 mL 甲醇溶解,于 45℃ 水浴的氮气浓缩器吹干,1 mL 甲醇溶解,用 0.20 μm 有机过滤膜过滤,滤液作为待测溶液。

软膏剂样品或较多杂质的样品:准确称取 2.000 g(精确至 0.001 g)加入 10 mL 20%甲醇溶解,混合均匀,超声波萃取 20 min。加入 5 mL 正己烷,混匀,离心后取下层。

下层提取液以 1 mL/min 流速注入预先用 10 mL 水和 10 mL 20%(V:V)甲醇水溶液活化的 C₁₈ 固相萃取柱,5 mL 20%甲醇淋洗,5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,于 45℃ 水浴的氮气浓缩器吹干,1 mL 甲醇溶解,用 0.20 μm 有机过滤膜过滤,滤液作为待测溶液。

2.3.3 仪器分析

分别取 10 μL 混合标准工作液、待测溶液注入高效液相色谱仪中,进行色谱分离分析,色谱数据记录入色谱仪,用岛津 LC solution 工作站处理数据,提取 204、245 nm 2 个波长的数据分析,根据色谱峰的保留时间和光谱图定性。

3 结果与分析

3.1 根据保健品特点进行有效提取

市场上出售的软膏剂保健品配方中会使用多种中药的提取物,颜色较深,必须对样品进行净化处理,否则会带来很多干扰峰,难以对色谱进行有效分离,通过 C₁₈ 固相萃取柱净化大大减少干扰。另外一般商家可能在保健品中加入的激素量不大,为了达到定量浓度和光谱图的匹配要求进行样品浓缩。

3.2 线性与回收率、相对标准偏差

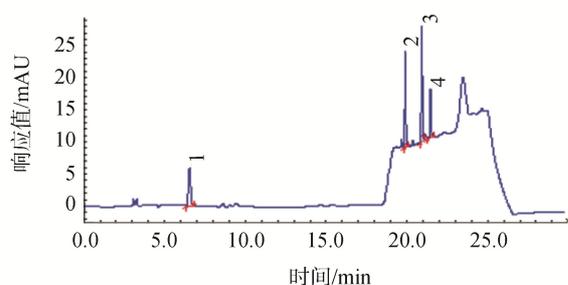
按照 GB/T 27404-2008^[16]实验室质量控制规范作相应的验证数据,在高效液相色谱仪下测定 0.1~5 mg/L 浓度时,峰面积呈线性关系,相关系数大于 0.99,回收率 85.0%~105%之间,相对标准偏差<5%,详见表 2。

表 2 工作曲线、线性方程、系数、平均回收率及相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Working curves, linear equations, coefficients, recovery rates and relative standard deviations ($n=6$)

测定项目	线性方程	线性系数	平均回收率/% 添加水平 (0.1/0.5/5.0 mg/kg)	相对标准偏差/% (0.5 mg/kg)	定量限/(mg/kg)
雌三醇	$Y=59540X-4207.7$	0.9999	89.3/92.3/89.2	2.01	0.05
雌二醇	$Y=65405X-1739.4$	0.9996	92.3/86.0/92.3	2.32	0.05
雌酮	$Y=88383X+2622.6$	0.9999	92.5/96.7/94.5	3.85	0.05
己烯雌酚	$Y=38310X+1743.5$	0.9998	89.7/102/101	3.60	0.05
泼尼松龙	$Y=12920X-1240.6$	0.9999	98.7/101/96.5	2.71	0.05
氢化可的松	$Y=4985.9X-1508.3$	0.9999	101/105/95.4	3.10	0.05
可的松	$Y=14222X-1147.7$	0.9999	89.4/90.3/96.5	3.51	0.05
倍他米松	$Y=11783X-1323.8$	0.9999	92.3/88.3/96.0	2.14	0.05
地塞米松	$Y=11418X+876.96$	0.9999	88.3/98.1/102	1.42	0.05
曲安奈德	$Y=9948.4X+3110.7$	0.9996	92.5/90.3/96.2	2.36	0.05
醋酸泼尼松	$Y=12339X+3298.6$	0.9908	96.4/103/93.5	2.47	0.05
睾酮	$Y=22400X-3238.8$	0.9999	92.3/87.6/96.8	2.01	0.05
甲基睾酮	$Y=20391X-1217.3$	0.9999	93.2/99.7/96.7	3.10	0.05
氯倍他索丙酸酯	$Y=11713X-1667.2$	0.9999	95.5/92.4/99.1	2.70	0.05
黄体酮	$Y=19488X+2211.9$	0.9999	88.7/90.4/94.2	1.34	0.05

3.3 色谱分离效果

15 种激素的液相色谱图, 分离效果良好, 分离度均 >1.5 , 见图 1、图 2。



注: 1. 雌三醇; 2. 雌二醇; 3. 雌酮; 4. 己烯雌酚。

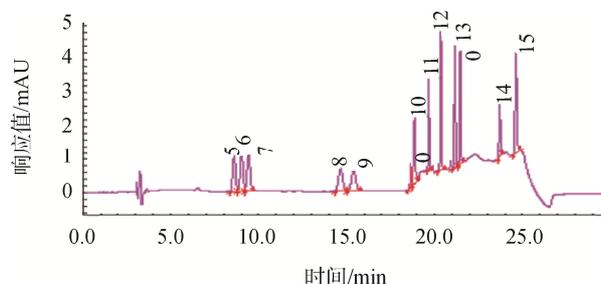
图 1 浓度为 1 mg/L 的标准液在波长为 204 nm 下采集的色谱图

Fig.1 Standard chromatogram with a concentration of 1 mg/L at 204 nm

3.4 方法可行性

目前文献^[2,5,7-15]都为单独测定甾体激素和糖皮质激素, 本研究同时对 2 类激素进行测定, 可作为检测部门筛查保健

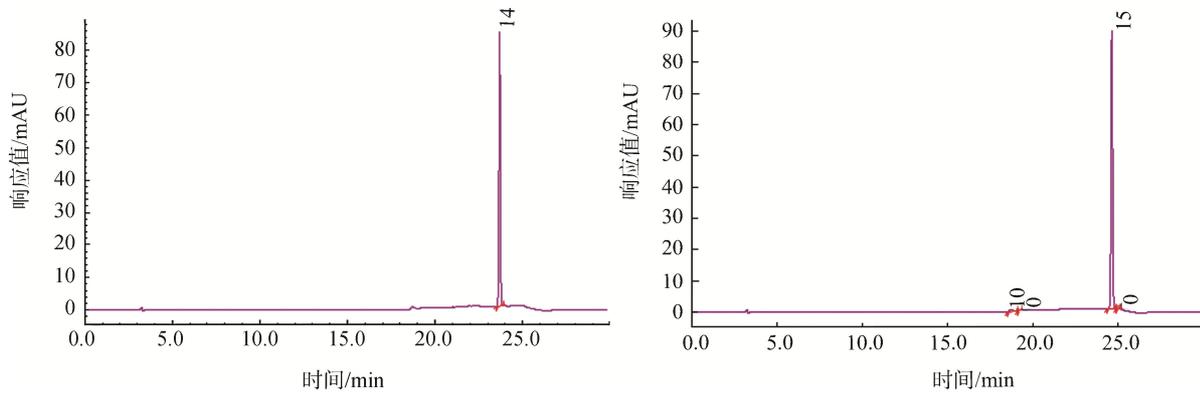
品安全性的检测依据。采用本方法对市面上 30 个保健品进行测定, 发现有 2 个样品含有黄体酮, 含量高达 28 mg/kg; 3 个样品含有氯倍他索丙酸酯, 含量高达 40 mg/kg。其中一个样品的色谱图见图 3。回收率 92.3%, 精密度 2.11%, 符合 GB/T 27404-2008^[16]实验室质量控制规范要求, 证明本测定方法可行。



注: 5. 泼尼松龙; 6. 氢化可的松; 7. 可的松; 8. 倍他米松; 9. 地塞米松; 10. 曲安奈德; 11. 醋酸泼尼松; 12. 睾酮; 13. 甲基睾酮; 14. 氯倍他索丙酸酯; 15. 黄体酮。

图 2 浓度为 1 mg/L 的标准液在波长为 245 nm 下采集的色谱图

Fig.2 Standard chromatogram with a concentration of 1 mg/L at 245 nm



注: 14. 氯倍他索丙酸酯; 15. 黄体酮。

图 3 某样品中检出氯倍他索丙酸酯、黄体酮的色谱图

Fig.3 Chromatograms of clobetasopropionate and progesterone in samples

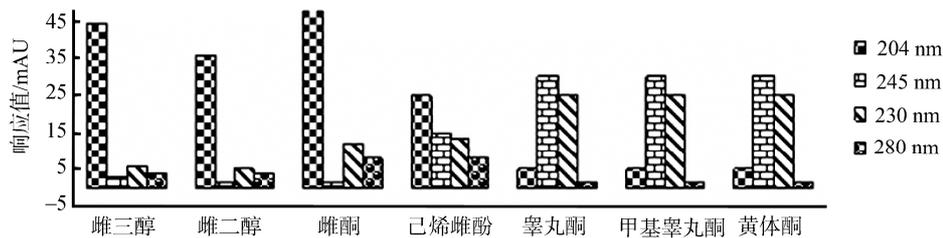


图 4 甾体激素在各吸收波长下的采集峰高

Fig.4 Collection peaks of somatic hormones at different absorption wavelengths

4 讨论

4.1 实验条件较易实施

样品处理所用提取液较为简单, 处理步骤不多, 可同时进行批量的样品测定。有些方法提取步骤多易出现乳化现象, 烦琐的前处理导致回收率不高。另外用高效液相色谱仪检测成本较低, 基本的实验室均有配备, 目前很多文献多用气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)和高效液相色谱-离子阱飞行时间质谱法(high performance liquid chromatography-ion trap time-of-flight mass spectrometry, HPLC-IT-TOF), GC-MS需要衍生化, 繁琐且耗时^[11], 这 3 种仪器都较昂贵。

4.2 采用二极管采集, 提取双波长进行定量定性

紫外/荧光法采用单波长, 不是每个物质都在荧光检测器中有响应^[2,5,7,15]。二极管阵列检测器可满足多种不同吸收波长的物质的同时测定, 满足日常检测的需要。

有些文献雌激素取用波长是 204、230、280 nm^[2,15], 雄性和孕激素特征波长是 245 nm, 糖皮质激素特征波长是 240 nm, 鉴于 15 种物质的特征波长有一定的差别, 采用多

波长检测有利于提高检测的影响值、分离度、减少干扰。

二极管检测器从 190~600 nm 采集色谱图, 在再分析处理数据时提取合适的波长, 经提取 204、230、240、245、280 nm 色谱图的响应, 从图 4 比较得出雌激素在 204 nm, 雄性、孕激素在 245 nm 的色谱图响应较高, 干扰少, 分离度高。另外糖皮质激素在 240 nm 和 245 nm 的响应值一样, 因此采用 245 nm。

液相色谱仪配二极管检测器产生的色谱图和光谱图, 峰面积作定量, 保留时间和光谱图作为定性, 双重确定检测的准确性, 减少假阳性的存在。

5 结论

本研究采用高效液相色谱法同时测定保健品中 15 种激素, 简化了样品萃取步骤, 减少试剂用量, 方法简便, 满足不同基质的样品测定, 可作日常检测方法使用。检测结果重现性强, 色谱分离度高, 回收率高, 光谱图及其一阶(多阶)导数与标准比较, 结合保留时间进行定性, 避免了仅仅依靠保留时间为依据造成误判, 提高分析结果的准确性。

参考文献

[1] Mcewen B, Akama K, Alves S, *et al.* Tracking the estrogen receptor in

- neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(13): 7093-7100.
- [2] 袁金华, 黄薇, 查河霞, 等. 高效液相色谱法同时检测化妆品中 7 种激素的条件选择及简化前处理 [J]. *环境与职业医学*, 2010, 27(8): 509-514.
- Yuan JH, Huang W, Zha HX, *et al.* Simplified pretreatment and simultaneous determination of seven sex hormones in cosmetics via high performance liquid chromatography [J]. *J Environ Occup Med*, 2010, 27(8): 509-514.
- [3] 马占俊. 糖皮质激素的临床应用[J]. *中国当代医药*, 2011, 18(14): 18-19.
- Ma ZJ. The clinical application of glucocorticoids(GC) [J]. *Chin Mod Med*, 2011, 18(14): 18-19.
- [4] 赵杰. 267 例住院患者糖皮质激素应用调查分析[J]. *中国现代应用药学*, 2011, 28(12): 1141-1144.
- Zhao J. Investigation and analysis on the application of glucocorticoid in 267 case [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2011, 28(12): 1141-1144.
- [5] 欧贝丽, 赵佳丽, 邹燕, 等. HPLC 同时测定中成药及保健品中添加的 16 种糖皮质激素[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(9): 1178-1182.
- Ou BL, Zhao JL, Zou Y, *et al.* Simultaneous determination of 16 glucocorticoids added in Chinese patent medicine and health products by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2016, 33(9): 1178-1182.
- [6] GB 16740-2014 国家食品安全国家标准-保健食品[S].
GB 16740-2014 National food safety standard-Health food [S].
- [7] 何笑荣, 邹定, 刘文芳, 等. 高效液相色谱法-二极管阵列检测器同时分析测定 11 种糖皮质激素[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(2): 109-111.
- He XR, Zou D, Liu WF, *et al.* Simultaneous determination of 11 kinds of glucocorticosteroids by HPLC-DAD [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2008, 28(2): 109-111.
- [8] 张月辉, 董慧明. HPLC-DAD 超高效液相色谱法同时测定抗风湿类中成药中非法添加的 10 种糖皮质激素[J]. *山东化工*, 2015, 44(4): 69-74.
- Zhang YH, Dong HM. Simultaneous determination of ten glucocorticoids illegally added in antirheumatic traditional Chinese medicine by HPLC-DAD and ultra performance liquid chromatography column [J]. *Shandong Chem Ind*, 2015, 44(4): 69-74.
- [9] 芦春梅, 王凤红, 胡婷婷, 等. 液相色谱法-串联质谱法测定保健品口服液中 10 种激素的研究[J]. *化学试剂*, 2015, 37(3): 243-246.
- Lu CM, Wang FH, Hu TT, *et al.* Determination of sexual hormones in healthcare dietetic liquid product by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Reag*, 2015, 37(3): 243-246.
- [10] 陈凤, 陈宇, 董培健. HPLC-MS 联用同时检测支气管类中成药中违禁添加的 11 种糖皮质激素[J]. *中成药*, 2014, 36(1): 102-106.
- Chen F, Chen Y, Dong PJ. Simultaneous determination of eleven glucocorticoids in Chinese traditional medicines for bronchus by HPLC-MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36(1): 102-106.
- [11] 杨景贤, 李波, 陈轶青, 等. 用 GC-MS 测定保健品中多种雌激素方法的研究[J]. *分析测试学报*, 2005, 24: 47-49.
- Yang JX, Li B, Chen YQ, *et al.* Determination of estrogen in health products by GC-MS [J]. *J Anal Test*, 2005, 24: 47-49.
- [12] 王美玲, 颜鸿飞, 傅善良, 等. 高效液相色谱-离子阱飞行时间质谱地保健食品中激素类成分的快速筛查和确证[J]. *色谱*, 2012, 30(10): 980-985.
- Wang ML, Yan HF, Fu SL, *et al.* Rapid screening and confirmation of hormones in health foods by high performance liquid chromatography-iontrap-time of flight tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(10): 980-985.
- [13] 吴晓敏, 史大军, 王明娟, 等. 止痛止痒类中成药中非法添加化学药物的快速鉴定方法[J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2095-2100.
- Wu XM, Shi DJ, Wang MJ, *et al.* Rapid analysis of analgesic and antipruritic illegally added in herb preparations [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36(10): 2095-2100.
- [14] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范(2015 版)[S].
State Food and Drug Administration. Technical specification for cosmetic safety (2015 Edition) [S].
- [15] 邓远玲, 褚汝流, 苏金廷, 等. 保健食品中 5 种性激素的测定[J]. *职业与健康*, 2004, 20(11): 57-58.
- Deng YL, Xuan RL, Su JT, *et al.* Determination of 5 sex hormones in health foods [J]. *Occup Health*, 2004, 20(11): 57-58.
- [16] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control standard-Food physical and chemical detection [S].

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介

欧阳少伦, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: oysl@iqtc.cn