

以高效能液相層析儀檢測飼料中之乙烯雌酚

陳素芬、劉其和*、郭美月、蘇杰夫

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要

本實驗係以高效能液相層析儀配合光二極體偵測器 (HPLC/PDA) 分析飼料中之乙烯雌酚 (diethylstilbestrol) 含量, 又為避免低濃度時造成誤判, 以高效能液相層析質譜儀 (HPLC/MS) 再確認。飼料樣品以甲醇當萃取液, 經震盪、離心、濃縮上清液, 殘渣以 70% 甲醇溶解, 應用 Oasis® HLB 卡匣去除干擾物質, 最後用甲醇沖提, 沖提液以高效能液相層析儀檢測。結果顯示, 飼料添加 0.5 ppm、1 ppm、3 ppm、5 ppm, 所得回收率為 80.8% - 107.5%。若僅以光二極體偵測器檢測時, 其最低檢測極限為 0.03 ppm, 以質譜偵測器檢測時, 其最低檢測極限可達 0.005 ppm。結果顯示, 本研究所開發的高效能液相層析儀檢測飼料中乙烯雌酚之方法便捷、經濟而可行, 可成為飼料中乙烯雌酚的檢驗方法之一。

關鍵字：高效能液相層析儀、乙烯雌酚、飼料

緒言

乙烯雌酚是 1938 年英國內科醫師德布查爾斯 (Charles.Dodds et al.) 等所開發之合成雌激素。由於具有比天然雌激素更強效果、生產便宜、能夠口服等優點, 遂被廣泛應用於預防流產、早產以及減輕更年期障礙症狀 (1)。由於乙烯雌酚對於牛、雞及綿羊具有顯著促進生長作用及提高飼料利用率, 於 1941 年起曾廣泛應用在農業方面, 但因致癌之故其後被美國食品藥物管理局禁止使用 (2)。

近年來以氣相層析質譜儀 (GC/MS) 檢測乙烯雌酚之方法已被廣泛應用, 但由於 GC/MS 前處理過程繁雜且須經衍生化後才能偵測, 因此液相層析質譜儀 (LC/MS) 檢測方法已成為新的發展趨勢 (3、4、5)。由於質譜儀具有高靈敏度、高解析度、專一性等優點, 但因價格昂貴、維護費用高, 若應用於例行檢測業務上相對成本亦高。因此本研究嘗試開發以廣泛應用之高效能液相層析儀配合光二極體偵測器, 分析飼

料中之乙烯雌酚含量, 再配合質譜儀進行再確認。本實驗之目的在於開發更便捷且經濟的方法, 以檢測飼料中乙烯雌酚含量, 以便應用於飼料查驗管理, 從而防範乙烯雌酚的違法使用, 確保畜產品安全及消費者健康。

材料及方法

1. 儀器設備及器材：

溶液輸送系統及自動採樣注射器：Alliance 2695 (Waters, USA)

光二極體偵測器：Waters 2996 Photodiode Array Detector

質譜偵測器：ZQ4000 (Waters, USA)

層析資料處理系統：Waters Empower Software

分析管柱：Atlantis® C18 5 μm, 4.6x150mm

超音波震盪器：BRANSON 8510

離心機：KUBOTA 5010 (雙鷹企業, 台灣)

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

減壓濃縮機：HEIDOLPH WB2001/VV2011
固相萃取匣：Oasis®HLB 3cc/60mg Extraction cartridge (Waters, USA)

2. 標準品及試藥

標準品：diethylstilbestrol (Sigma)

溶劑：甲醇 (Merck)、蒸餾水

3. 檢量線之製作

(1)將乙烯雌酚標準品以甲醇稀釋成濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ 之標準原液。取適量之標準原液，以甲醇分別稀釋成 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 等 5 種濃度之工作液，HPLC/PDA 分析條件之移動相為 methanol : H₂O = 65 : 35，流速設定為 1 mL/min，偵測波長為 240 nm，每種濃度注入 20 μL ，重複分析三次，測定波峰面積以製作檢量線。

(2)取適量之標準原液，以甲醇分別稀釋成 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 共 5 種濃度，HPLC/MS 分析條件設定為 ESI Negative Mode 之離子模式，準分子離子峰 (SIR) 為「M-H」-267，Capillary Voltage 為 3.3 KV，Cone Voltage 為 35 V，每種濃度重複分析三次，製作一檢量線。

4. 飼料中乙烯雌酚之分析：

取空白飼料，添加乙烯雌酚，使飼料中乙烯雌酚之含量分別為 0.01 ppm、0.05 ppm、0.1 ppm、0.5 ppm、1 ppm、3 ppm、5 ppm。各組飼料分別取 5 克 (3 份) 加入 40 mL 甲醇，置於超音波震盪器震盪 30 分鐘後，離心 10 分鐘 (3000 rpm)，取上清液減壓濃縮至乾，以 70% 甲醇 5 mL 溶出。取 2 mL 之溶出液注入 Oasis®HLB 3cc/60 mg 卡匣內 (預先以 3 mL 甲醇活化及 3mL 水平衡)，以 3mL 70% 甲醇洗淨後，再以甲醇 2 mL 沖提，沖提液經 0.45 μm 濾膜過濾後，注入液相層析儀測定之。

結果

依上述分析條件以 HPLC/PDA 分析乙烯雌酚標準品 5 種濃度 (0.25、0.5、1、3、5 $\mu\text{g/mL}$)，所得結果由層析圖可見於波長 240 nm 下，滯留時間 9.49 分鐘有一明顯吸收峰 (圖 1)。波峰面積之相對標準偏差介於 0.4% - 3.4% 之間，檢量線 $Y = 552.5 + 66247.2 X$ ，線性係數為 $r^2 = 0.99998$ (表 1)。

以 HPLC/MS 分析乙烯雌酚標準品 5 種濃度 (0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 $\mu\text{g/mL}$)，所得結果由質譜圖顯見其吸收峰 (圖 2)，檢量線之相關係數 $r^2 = 0.9985$ ，波峰面積之相對標準偏差介於 1.62% - 10.60% 之間 (表 3)。

最低檢測界限及最低定量界限依公式 $LOD = 3.3 \sigma / S$ 及 $LOQ = 10 \sigma / S$ (式中 σ 為回歸線在 y 軸之截距的標準差，S 為分析物檢量線之斜率)，可得最低檢測極限為 0.028 ppm，最低定量極限為 0.084 ppm。

飼料中添加乙烯雌酚 0.5、1.0、3.0、5.0 ppm 等 4 種濃度，依上述分析條件與飼料前處理方法處理分析後，結果其平均回收率為 80.8% - 107.5%，相對標準偏差介於 0.8 - 6.0% 之間 (表 2)。

於空白飼料添加乙烯雌酚 0.05 ppm，經飼料前處理以 LC/PDA/MS 偵測結果，由以 SIR (Select Ion Recording) 267 偵測特定分子量之質譜圖 (圖 5、圖 6)，相較於所得之層析圖 (圖 3、圖 4)，發現運用質譜儀檢測時，可減少雜訊干擾，降低偵測極限。

飼料中乙烯雌酚之濃度雖有添加至 0.1 ppm、0.05 ppm、0.01 ppm，但由分析所得結果發現，以 HPLC/PDA 偵測時僅能準確定量至 0.5 ppm，為免低濃度所造成誤判之困擾，遂以 HPLC/MS 進行檢測。在質譜儀檢測下，可準確定性至 0.01 ppm (圖 7)。

討論

本實驗主要應用固相萃取技術進行飼料之前處理後，以高效能液相層析儀配合光二極體偵測器進行檢測飼料中乙烯雌酚的含量。本實驗曾參考文獻中〔4、6〕所使用之 C18 Vac 及 Oasis®HLB 二種固相萃取卡匣進行試驗後，發現 SPE C18 Vac 回收率為 84.2%，Oasis®HLB 回收率為 99.7%，顯示在此條件下 Oasis®HLB 滯留效果較 C18 Vac 為佳。另外也曾嘗試運用不同極性溶劑（如：乙甯、乙醚、丙酮、氯仿等）萃取飼料中乙烯雌酚，結果發現當使用之溶劑極性愈低時，會同時將飼料中油脂萃取出，導致淨化困難，因此在考慮去油脂與相關有機溶劑之環保問題下，遂選用甲醇作為萃取液。在飼料前處理過程中減壓濃縮步驟，應是影響本次實驗回收率之主因，未來可嘗試大容量之固相萃取匣直接進行淨化，減少濃縮回溶所造成之損失，應可再提高回收率。

本實驗最初以 HPLC/PDA 檢測飼料中乙烯雌酚含量，於結果顯示飼料中添加乙烯雌酚濃度愈低時，其回收率反而愈高（表 2），推測可能因藥品濃度愈低，相對基質之干擾也愈低所致，如加強樣品前處理，去除干擾物質，回收率應可獲得改善。

飼料中添加乙烯雌酚經前處理後，以 LC/PDA/MS 偵測結果，可發現於低濃度時運用質譜儀檢測，不僅可減少雜訊干擾，降低偵測極限，亦可避免造成誤判。雖然應用質譜儀檢測時可明顯見其吸收峰，但由於經離子化過程之變異因子諸如溫度、氣體流速等影響，導致偵測結果之重覆性不佳，波峰面積相對標準偏差大於 10%（表 3），如要準確定量仍須添加內標準品加以校正，以達準確之定量結果。

參考文獻

1. 林祁麒。可怕的环境荷爾蒙。台北，安立。88-105, 2003
2. 劉朝鑫。美國 FDA 對致癌性的動物藥品及飼料添加物的態度。現代畜殖第十五卷 70 年 1 月號。43-45, 1981
3. Quintana JB, Carpinteiro J, Rodriguez I, Lorenzo RA, Carro AM, Cela R. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1024: 177-185, 2004
4. Lopea de Alda MJ, Barcelo D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A* 938: 145-153, 2001
5. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barcelo D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1045: 85-92, 2004
6. Martin Y. Determination of three anabolic compounds in calf urine by liquid chromatography with photodiode-array detection. *Analyst* 125:2230-2235, 2000

表 1、乙烯雌酚波峰重驗性及檢量線 (PDA)

濃度 (µg/mL)	0.25	0.5	1.0	3.0	5.0
三次波峰面積平均值	16927	34148	66900	198476	332221
相對標準偏差 (%)	3.40	1.40	0.80	0.30	0.40
檢量線	$Y = 552.5 + 66247.2X$				
相關係數	$r^2 = 0.99998$				

表 2、飼料添加乙烯雌酚之回收率

添加量	檢 出 值			平均值	平均回收率 (X ± RSD)
	X1	X2	X3		
5.0ppm	4.05	4.12	3.95	4.040	80.8±1.7
3.0 ppm	2.83	2.81	2.78	2.807	93.6±0.8
1.0 ppm	0.966	0.99	0.875	0.944	94.3±6.0
0.5 ppm	0.585	0.550	0.478	0.538	107±1.1

表 3、乙烯雌酚波峰重驗性及檢量線 (MS)

濃度 (µg/mL)	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005
三次波峰面積平均值	19090901	3564481	2288983	799436	277674
相對標準偏差	1.62%	10.06%	3.13%	10.60%	9.85%
檢量線	$Y = 191502.1 + 37690.2 X$				
相關係數	$r^2 = 0.9985$				

以高效能液相層析儀檢測飼料中之乙烯雌酚

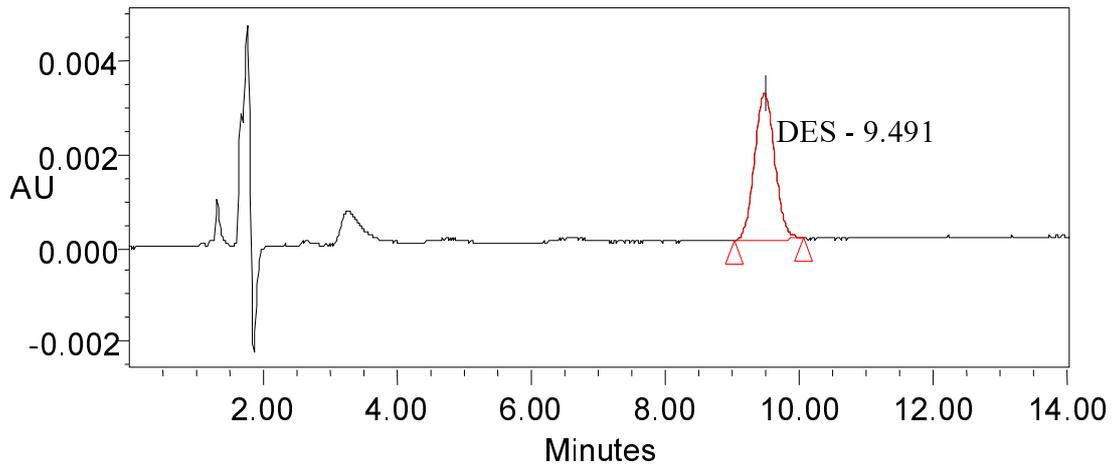


圖 1、乙烯雌酚標準品濃度 1 ppm 之層析圖

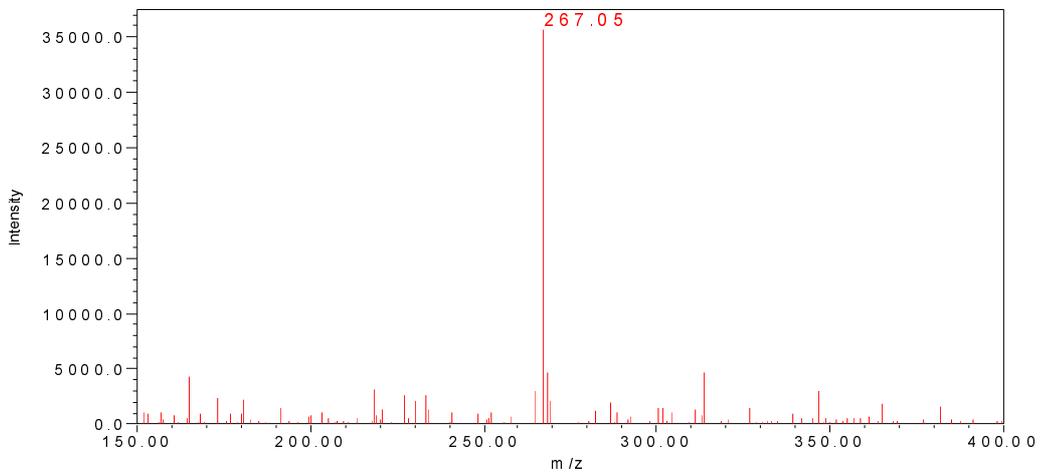
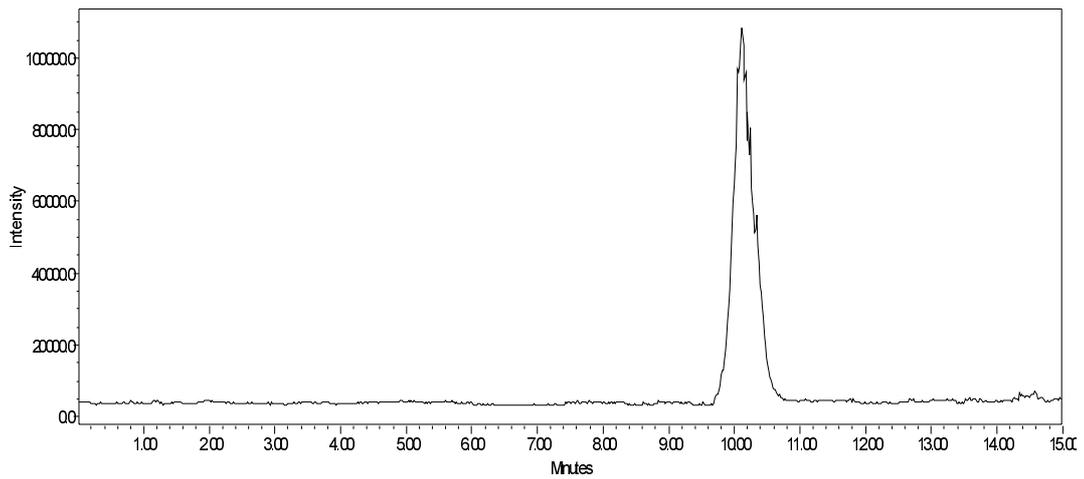


圖 2、乙烯雌酚標準品 50 ppb 之質譜圖

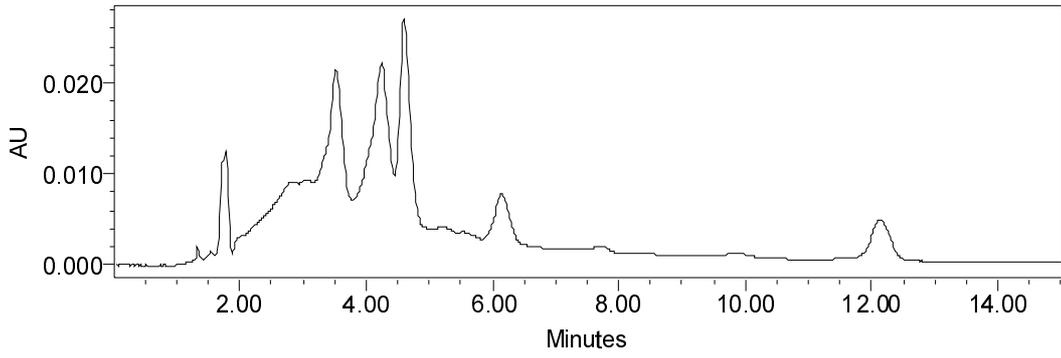


圖 3、空白飼料之層析圖

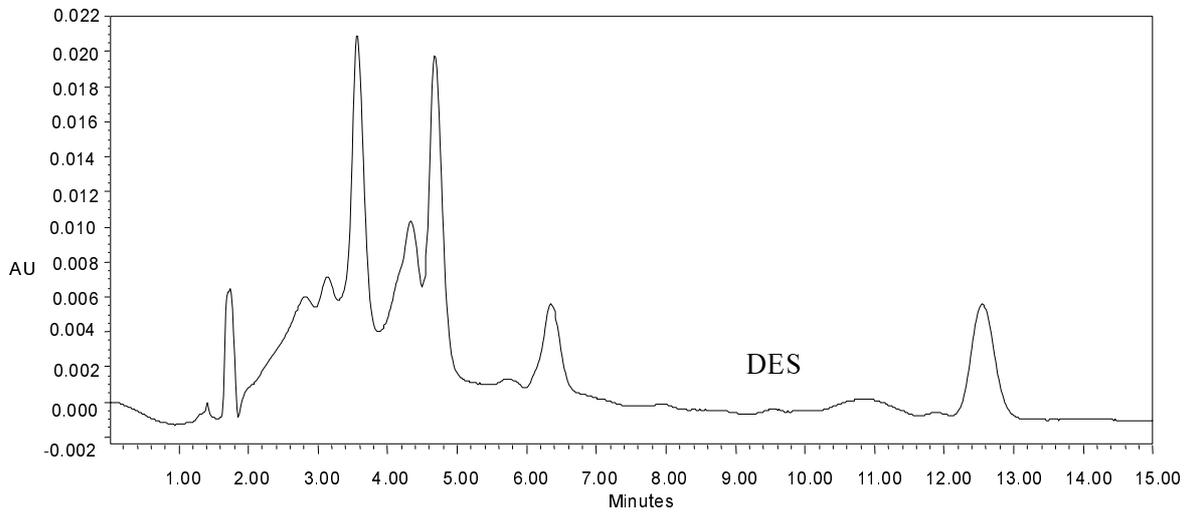


圖 4、空白飼料添加 50 ppb 標準品之層析圖

以高效能液相層析儀檢測飼料中之乙炔雌酚

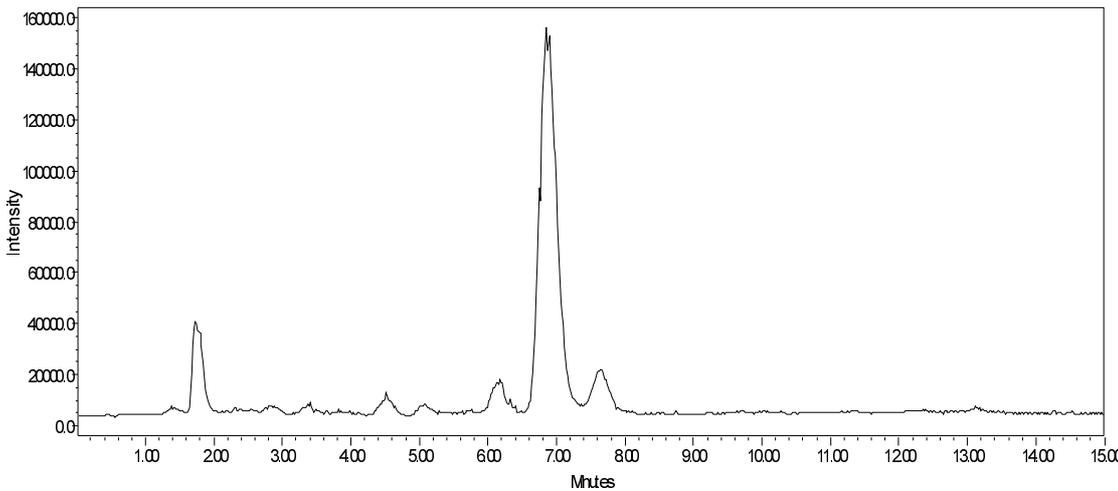


圖 5、空白飼料之質譜圖(SIR267)

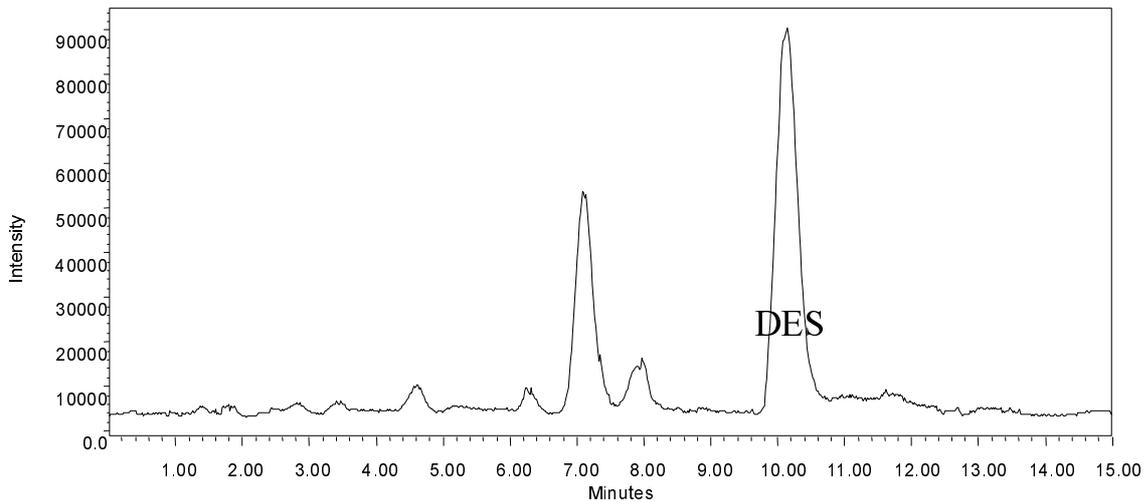
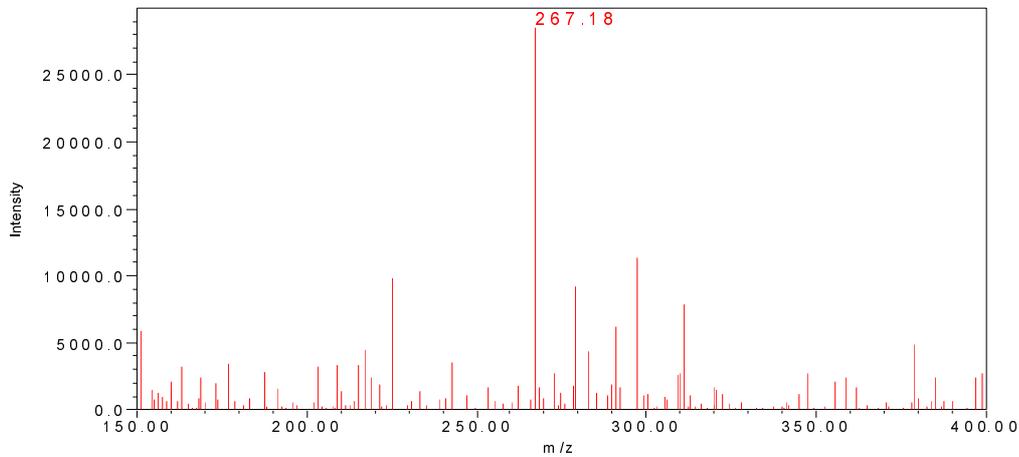


圖 6、空白飼料添加 50 ppb 標準品之質譜圖



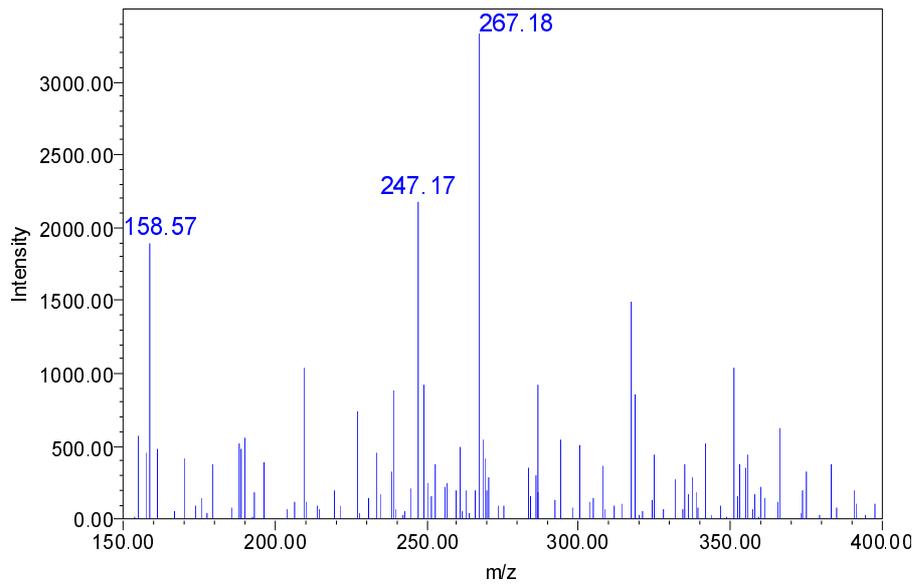
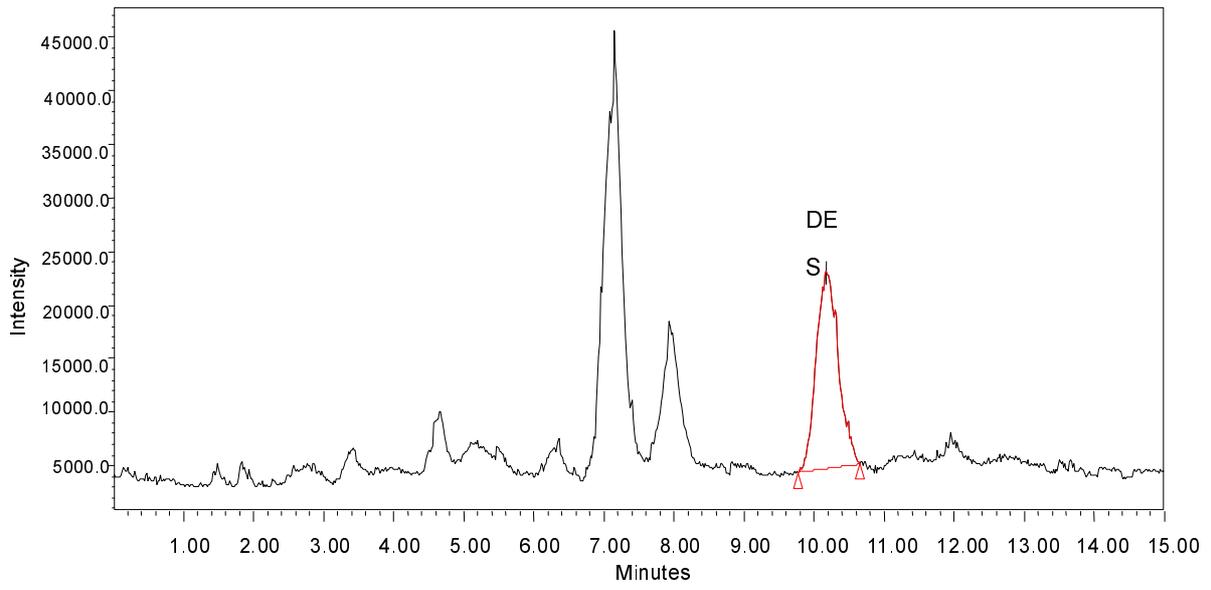


圖 7、空白飼料添加 10 ppb 標準品之質譜圖

Determination of diethylstilbestrol in feed by high performance liquid chromatography

Chen SF , Liu CH* , Kuo MY, Su JF

Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute
Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract High performance liquid chromatography equipped with photodiode array detector (HPLC/PDA) was used to measure the quantity of diethylstilbestrol in feed. To prevent the false positive reaction caused by low concentration of diethylstilbestrol in feed, high performance liquid chromatography equipped with mass spectrophotometer (HPLC/MS) was further used as a confirmation test. The samples were prepared by stirring with methanol, followed by a centrifugation step and then an evaporation step. The residual is then dissolved with 70% methanol and the aqueous solution is cleaned by the assay of solid-phase extraction (SPE) using Oasis[®]HLB to remove the matrix interference, and the eluate was obtained and analyzed by HPLC/PDC or HPLC/MS. The result showed that the average recover rates of diethylstilbestrol in the spiked samples were during the range of 80.8 - 107.5%. The Limit of Detection (LOD) of PDA was 0.03 ppm and the LOD was 0.005 ppm when the MS was used.

Key words: High Performance Liquid Chromatography, Diethylstilbestrol, Feed