

朱金兰,王 菁,潘迎辉,等. 气相色谱-串联质谱法测定水产品中己烯雌酚的含量[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):328-330.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.104

气相色谱-串联质谱法测定水产品中己烯雌酚的含量

朱金兰¹,王 菁¹,潘迎辉¹,冯亚明²

(1. 江苏省泰州市农林畜水产品检测中心,江苏泰州 225300; 2. 江苏省农业科学院泰州农科所,江苏泰州 225300)

摘要:采用气相色谱-串联质谱法测定水产品中己烯雌酚的含量。改进了水产品中己烯雌酚的前处理,样品用乙腈、正己烷和乙酸乙酯提取,无需通过固相小柱萃取,直接经 BSTFA-TMCS 吡啶溶液 50℃ 衍生;经过 DB-5MS (30 m×0.25 mm,0.25 μm)毛细色谱柱分离,再经过双重四级杆质谱仪选择离子扫描(m/z :383、397、412、413),用气质联用仪检测其衍生物从而间接检测己烯雌酚。以 trans-DES 衍生物做定量物质,在 0.01~0.15 μg/kg 浓度范围获得良好线性($r^2=0.999\ 8$);3 个添加浓度(0.5、1.5、2.5 μg/kg)下的平均回收率为 73.4%~95.4%,标准偏差为 2.5%~6.0%。

关键词:气相色谱-串联质谱法;水产品;己烯雌酚;测定方法

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0328-03

渔药残留引起的水产品污染不仅与公众的健康密切相关,而且直接影响产业界的经济利益和各种贸易,已成为公认的农业问题和环境问题。己烯雌酚属激素类药物,在水产养殖上的主要作用是添加在饲料中促进鱼类等生长,然而己烯雌酚作为一种人工合成的具有雌激素作用的化学物质,对人类的危害逐渐被人们发现,许多科学试验证实了己烯雌酚是一种致癌物质,对人和动物的健康危害较大,1979 年包括我国在内的世界各国开始严格控制己烯雌酚作为治疗药物使用,并禁止使用己烯雌酚作为饲料添加剂^[1]。但是,因为价格低廉,在利益的驱动下,一些不法商贩在渔业生产过程中仍然使用己烯雌酚,以致严重威胁食品安全,危害人类的健康。目前,己烯雌酚检测方法有酶联免疫法、气相色谱-质谱法。这些方法在某种程度上有存在着假阳性的可能。气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)^[2]测定己烯雌酚在抗干扰能力、

准确度、精密度等方面具有优势,尤其在低浓度水平的定性和定量方面优势更明显。本试验采用气相色谱-串联质谱法测定水产品中的己烯雌酚含量,前处理稍作改进,并且无需固相萃取小柱净化,方法简便,结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 仪器

ThermoFisher TSQ 8000 EVO 型三重四级杆串联气相色谱-质谱仪, EI 离子源,正负 CI 源及放空易更换维护离子源的真空锁定装置,带有 Xcalibur 质谱软件。

TLL 型组织匀浆机;Vortex QL-901 型涡旋振荡器;KQ-700E 型超声波清洗器;R-205/V 旋转蒸发仪;氮吹仪。

1.2 试剂

乙腈、乙酸乙酯、甲醇、正己烷都为色谱纯;100 g/L 碳酸钠(分析纯)溶液:称取 10 g 无水碳酸钠溶于 100 mL 水中制得。

己烯雌酚储备液:准确称取己烯雌酚标准品 0.010 g(纯度≥99%),用甲醇溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,即浓度为 100 μg/mL 的标准储备液,置于-18℃冰箱中保存,有效期

收稿日期:2015-09-12

基金项目:江苏省水产三新工程项目(编号:Y2015-15)。

作者简介:朱金兰(1972—),女,江苏海安人,高级农艺师,主要从事农畜水产品质量检测。E-mail:903416119@qq.com。

[6] 刘小文,高晓余,何月秋,等. 几种微量元素对茶树生理及茶叶品质的影响[J]. 广东农业科学,2010(6):162-165.

[7] 王宝森,刘 杰,郭俊明,等. 茶叶中七种金属元素的测定及成分分析[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):136-138.

[8] 朱海燕,刘忠德,王长荣,等. 茶树间作系统中茶树根际微环境的研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2005(4):715-718.

[9] 段建真,郭素英. 遮荫与覆盖对茶园生态环境的影响[J]. 安徽农学院学报,1992,19(3):189-195.

[10] 刘建军,袁 丁,刘 佳,等. 间作对茶园生态及茶叶品质、产量影响研究进展[J]. 中国茶叶,2011,33(4):16-18.

[11] 肖润林,王久荣,单武雄,等. 不同遮阴水平对茶树光合环境及茶叶品质的影响[J]. 中国生态农业学报,2007,15(6):6-11.

[12] 李家贤,黄华林,何玉媚,等. 高茶多酚茶树品种的生化成分与品质性状研究[J]. 广东农业科学,2009(10):16-18,25.

[13] 李肖玲,崔 岚,祝德秋. 没食子酸生物学作用的研究进展[J]. 中国药师,2004,7(10):767-769.

[14] 郭炳莹,阮宇成,程启坤. 没食子酸与绿茶品质的关系[J]. 茶叶科学,1990,10(1):41-43.

[15] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2007:8-15.

[16] Zhang X B. Difference of polyphenols content in Anxi tieguanyin tea among different seasons and relationship between polyphenols and tea quality[J]. Agriculture Science & Technology, 2014, 15(7): 1191-1195.

[17] 唐晓波,刘晓军,王小萍. 高 EGCG 茶树品种的筛选及开发[J]. 浙江农业科学,2010(1):60-61.

[18] 吴 警,刘春莹,郭久宁,等. 绿茶和发酵茶的茶多酚组成比较[J]. 安徽农业科学,2011,39(9):5343-5345,5419.

为 6 个月。

衍生化试剂: N-O-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺 (BST-FA)/三甲基氯硅烷(TMCS) 体积比 99:1。

1.3 仪器工作条件

色谱条件: 色谱柱: DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 进样口温度: 200 ℃; 柱温: 起始温度 40 ℃, 保持 1.5 min, 以 25 ℃/min 升温至 90 ℃, 保持 1.5 min, 以 25 ℃/min 升温至 180 ℃, 保持 0 min, 以 5 ℃/min 升温至 280 ℃, 保持 0 min, 以 10 ℃/min 升温至 300 ℃, 保持 3 min; 流速: 1.2 mL/min; 进样量: 1 μL; 进样方式: 不分流进样。

质谱条件^[3]: 传输线温度 250 ℃; 离子源为 EI 源; 离子源温度 280 ℃; 监测模式 Timed; 保留时间 21.05 min; 离子对 217.2 ~ 73.1, 裂解能量 15 eV; 离子对 412.3 ~ 217.2, 裂解能量 15 eV; 离子对 412.3 ~ 383.3, 裂解能量 10 eV。

1.4 样品处理

样品制备: 鱼样取于泰州市兴农特产水产养殖合作社, -20 ℃ 保存。在提取前将样品进行均质处理。

提取和分配: 准确称取捣碎的鱼肉试样 (5.00 ± 0.01) g 于 50 mL 离心管中, 除空白外, 每 2 份样品中分别加入 3 种不同含量 (0.5、5、10 μg/kg) 的己烯雌酚双平行, 用 10 mL 乙腈提取后, 用 8 mL 正己烷和 2 mL 乙酸乙酯均质 30 s, 7 000 r/min 离心 10 min, 吸取乙酸乙酯液于 50 mL 梨形瓶中^[4]。再向残渣中加乙酸乙酯 10 mL, 重复提取样品 1 次, 合并乙酸乙酯层, 加入 3 mL 碳酸钠溶液, 于 40 ℃ 减压旋转蒸发至干, 用 2 mL 正己烷和乙酸乙酯 (体积比为 85:15) 混合溶液溶解残留物, 转移至样品瓶中, 氮气吹干, 加 100 μL 衍生化试剂, 盖塞并涡旋混合 30 s, 60 ℃ 烘箱中反应 30 min。用氮气吹干, 加入 0.5 mL 正己烷, 涡旋混合 10 s, 供分析用。

1.5 标准系列配制及测定

己烯雌酚标准工作液: 将 100 μg/mL 标准储备液稀释成 5 μg/mL 工作液, 取 5 个 50 mL 容量瓶, 分别吸取 100、200、400、1 000、1 500 μL, 配制成 0.01、0.02、0.04、0.10、0.15 μg/mL 的标准工作液。吸取一定量的己烯雌酚标准工作液于 2 mL 样品反应瓶中, 氮气吹干, 加 100 μL 衍生化试剂, 盖塞并涡旋混合 30 s, 80 ℃ 烘箱中反应 30 min。用氮气吹干, 加入 0.5 mL 正己烷, 涡旋混合 10 s, 进样 1 μg 上 GC-MS-MS 测定。

2 结果与分析

2.1 方法线性

取适量己烯雌酚, 制得 0.01、0.02、0.04、0.10、0.15 μg/mL 系列对照溶液, 经衍生供气相色谱-串联质谱法测定, 以各特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 添加浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $y = 4.47 \times 10^7 x + 3.529 \times 10^4$, 决定系数 $r^2 = 0.9998$, 从回归方程及决定系数可以看出药物浓度与色谱峰面积呈线性相关 (图 1)^[5]。

2.2 方法的灵敏度

空白试料按相同的步骤处理后, 测定结果表明, 在相应的保留时间, 空白试料对所测药物无干扰。定量限 (LOQ): 添加 25 ng/mL 己烯雌酚标准溶液 100 μL 于 5.0 g 鱼肉中 (即添加浓度为 0.5 μg/kg, 经提取后测定, 己烯雌酚的信噪比

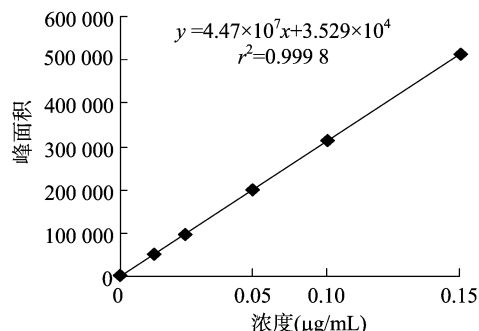


图1 己烯雌酚标准曲线

$S/N > 10$, 表明方法的定量限为 0.5 μg/kg; 检测限 (LOD): 添加 5 ng/mL 的己烯雌酚标准溶液 100 μL 于 5.0 g 鱼肉中 (即添加浓度为 0.1 μg/kg, 经提取后测定, 己烯雌酚的信噪比 $S/N > 3$, 表明方法的检测限为 0.1 μg/kg (图 2)^[6]。

2.3 方法准确度和精密度

采用标准添加法, 在空白鱼肉中添加 3 个不同浓度 (0.5、1.5、2.5 μg/kg) 己烯雌酚进行回收率试验, 各浓度进行 5 个样品平行试验, 重复 3 次, 求批内、批间相对标准, 计算结果见表 1。从表 1 中可以看出, 本方法在空白鱼肉中进行 0.5 ~ 2.5 μg/kg 的添加浓度, 方法的回收率为 73.4% ~ 95.4%, 批内、批间相对标准偏差分别为 3.7% 和 6.0% 以内。

表1 鱼肉中己烯雌酚添加回收率试验结果 (n=5)

添加浓度 (μg/kg)	回收率 (%)	批内相对 RSD (%)	批间相对 RSD (%)
0.5	75.5	3.4	5.5
	73.4	3.7	5.7
	76.6	3.5	6.0
1.5	88.6	2.9	4.8
	87.5	3.0	4.6
	84.8	3.1	4.9
2.5	91.3	3.1	4.5
	95.4	2.8	4.0
	92.6	2.9	4.5

3 结论

本试验采用气相色谱三重四极杆质谱法测定水产品中己烯雌酚, 成本低, 方法定性可靠, 定量准确, 检出限低, 为水产品中己烯雌酚残留量的测定提供了较好的方法。

参考文献:

- [1] 宫向红, 徐英江, 张秀珍, 等. 气相色谱-质谱法测定水产品中的己烯雌酚[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 168-169.
- [2] 沈美芳. 水产品中己烯雌酚残留检测方法学研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [3] 胡 鲲, 杨先乐, 张 菊. 酶联免疫法检测中华鳖肌肉中己烯雌酚[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 199-202.
- [4] 王 恒. 己烯雌酚免疫分析化学研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2006.
- [5] SC/T 3020—2004 水产品中己烯雌酚残留量的测定酶联免疫法[S].
- [6] GB/T 5009.108—2003 畜禽肉中己烯雌酚的测定[S].

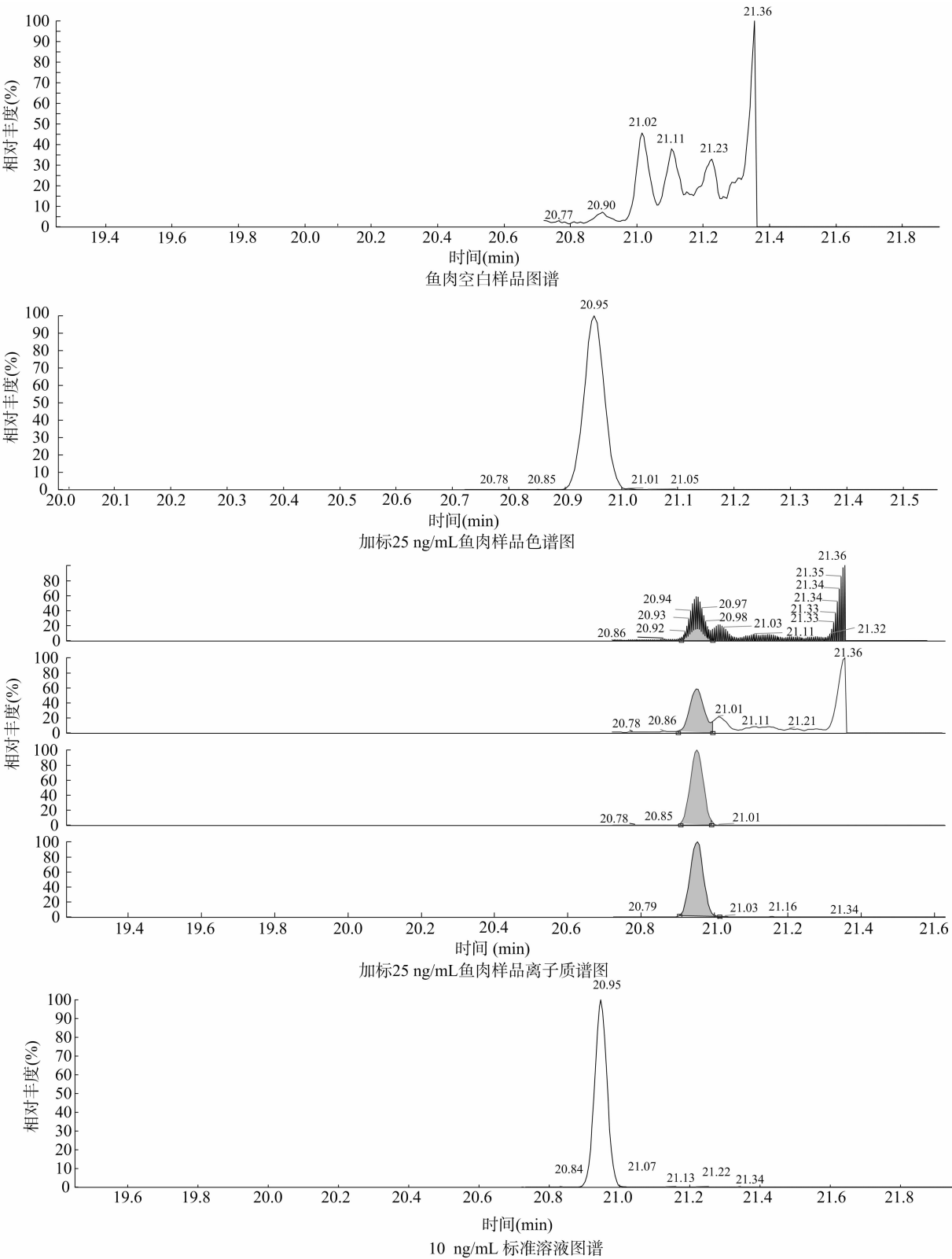


图2 己烯雌酚加标样品及标准溶液的色谱图和离子质谱图