

【化学测定方法】

鱼、虾中己烯雌酚残留的高效液相色谱法测定研究

杨敏¹, 仲娜²

(1. 山东省青岛市市北区疾病预防控制中心, 山东青岛 266011; 2. 山东省青岛市药品检验所, 山东青岛 266071)

摘要 目的: 建立了高效液相色谱分析方法对鱼、虾中己烯雌酚残留进行测定的方法。方法: ODS - C18 色谱柱, 流动相为 0.043 mol/L 磷酸二氢钠 (调 pH5.0) : 甲醇 (70:30), 检测波长 λ 为 230 nm, 外标法定量。结果: 鱼类样品中己烯雌酚在 0.03291 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.1481 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性良好, $r = 0.982164$ 。虾类样品中己烯雌酚在 0.03291 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.1975 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性良好, $r = 0.986136$ 。回收率为 99.7% ~ 104.4%; 重复进样 $RSD = 0.81\%$ ($n = 5$); 方法检出限为 2.5 $\mu\text{g/kg}$ 。结论: 高效液相色谱法测定鱼、虾中己烯雌酚残留, 方法简单, 回收率和重现性良好, 结果准确可靠。

关键词 高效液相色谱法; 己烯雌酚; 鱼、虾

中图分类号 O657.7+2

文献标识码 A

文章编号 1004-8685(2011)08-1878-02

Determination of diethylstilbestrol residues in fish and shrimp foods by HPLC

YANG Min¹, ZHONG Na²

(1. Shibei Center for Disease Control and Prevention, Qingdao 266011, China; 2. Qingdao Institute for Drug Control, Qingdao 266071, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the analysis of diethylstilbestrol (DES) residues in fish and shrimp foods based on HPLC. **Methods:** The samples were determined with ODS - C18 column, sodium dihydrogen phosphate (pH5.0) of 0.043 mol/L as mobile phase, methanol (70:30), detection wavelength at 230 nm and quantitated by external standard method. **Results:** The experiments showed a good linear relationship between 0.03291 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.1481 $\mu\text{g/ml}$ in fish food ($r = 0.982164$) and 0.03291 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.1975 $\mu\text{g/ml}$ in shrimp food ($r = 0.986136$). The recoveries for DES in fish and shrimp were 99.7% ~ 104.4%, and the $RSD = 0.81\%$ ($n = 5$). The detection limit is 2.5 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion:** The method is rapid, accurate and reliable with good recovery and repeatability, which is suitable for the analysis of DES residues in fish and shrimp foods.

[Key words] HPLC; Diethylstilbestrol; Fish; Shrimp

己烯雌酚 (diethylstilbestrol, 简写 DES) 诞生于上世纪 40 年代, 为第一个口服有活性的人工合成雌激素, 属 1,2 - 二苯乙烯类化合物, 化学名为 1,2 - 双(4 - 羟苯基) - 1,2 - 二乙烯, 俗名乙底酚, 为无色结晶或白色结晶性粉末。医学上主要用于治疗雌激素缺乏症, 但是由于其具有促进动物生长, 增加蛋白质沉积和提高饲料转化率的作用, 曾被部分养殖户当作促生长剂使用^[1]。自从人们发现通过食物长期摄入低剂量的 DES 能扰乱体内激素平衡, 导致女童性早熟, 男性女性化, 诱发女性乳腺癌等疾病, 以及引发多种与血栓有关的疾病、肝脏肿瘤、高血压、不耐葡萄糖症或勺糖尿病类似的症状、突破性出血、痛经、阴道念珠菌感染、膀胱炎、乳房肿痛、恶心、呕吐等症状后, 我国农业部早已明令禁止在畜牧养殖业中使用 DES 及其盐、酯等^[2]。目前违规使用 DES 的现象仍时有发生, 饲料中含有 DES 和动物及水产食品中 DES 残留的情况已引起了国内外的高度重视, 我国已将其作为鱼药残留监控的重点对象。

目前水产品中己烯雌酚残留量的检测方法较多, 有酶联免疫测定方法^[3]、光度法以及液相色谱 - 质谱联用法等。酶联免疫测定方法需要有己烯雌酚酶标记物以及己烯雌酚抗体, 采用叔丁基甲基醚、二氯甲烷等有机溶剂提取, C18 固相提取柱进一步纯化, 步骤繁杂, 有机溶剂相对毒性较大, 不适用于常规检测。液质法设备相对较贵, 很多地区不具备条件。本文采用高效液相色谱法对水产品中己烯雌酚残留进行了测定, 其各项方法学验证指标数据良好, 样品处理方法简单, 测定误差小, 建立了一种良好的检测方法。

1 仪器与试剂

LC - 2010C 型高效液相色谱仪; UV 检测器; AgilentBDS - C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)。

己烯雌酚对照品: 中国药品生物制品检定所提供; 磷酸二氢钠为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯; 鱼、虾: 市售。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

流动相: 0.043 mol/L 磷酸二氢钠 (调 pH5.0) : 甲醇 =

作者简介 杨敏 (1972 -), 女, 本科, 副主任技师, 主要从事食品卫生检验工作。

70:30; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35℃; 冷却架温度: 7℃; 进样量: 20 μl。

理论板数,按己烯雌酚峰计算, $n = 2512$; 己烯雌酚与相邻杂质峰分离度 $r = 10.1$ 。

2.2 对照品和样品溶液的制备

己烯雌酚(DES)对照品: 中检所提供。

DES 标准溶液: 取 DES 对照品 10.97 mg 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 每 ml 含 DES 1.1 mg, 贮于冰箱中。

DES 标准使用液: 取 1.0 ml DES 标准贮备液于 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 每 ml 含 DES 0.11 mg。

样品溶液的制备: 分别称取绞碎的虾、鱼肉试样各 2 份, 每份各 5.0 g, 置 50 ml 具塞离心管, 加 20 ml 甲醇, 超声、振荡、离心, 取上清液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 进样。

2.3 线性关系考察

标准曲线绘制(虾): 分别称取 5 份绞碎的虾肉试样各 5.0 g, 置具塞试管中, 分别加入标准使用液(0 μl, 6.0 μl, 12.0 μl, 18.0 μl, 24.0 μl, 36.0 μl), 加甲醇稀释定容至 20 ml,

摇匀, 使测定浓度为 0 μg/ml, 0.033 μg/ml, 0.066 μg/ml, 0.099 μg/ml, 0.13 μg/ml, 0.19 μg/ml, 制备方法同样品溶液的制备。按上述色谱条件分别进样 20 μl, 以己烯雌酚的峰面积为纵坐标, 浓度(μg/ml) 为横坐标建立标准曲线。回归方程为 $y = 0.000224158x + 0.62908$, $r = 0.982164$ 。

标准曲线绘制(鱼): 称取 5 份绞碎的鱼肉试样各 5.0 g, 置具塞试管中, 制备方法同虾。回归方程为 $y = 0.000213359x + 1.27487$, $r = 0.986136$ 。

2.4 精密度测定

取 DES 标准使用液, 重复进样 5 次, RSD 为 0.2%, 说明该方法的重现性较好。

2.5 加标回收试验

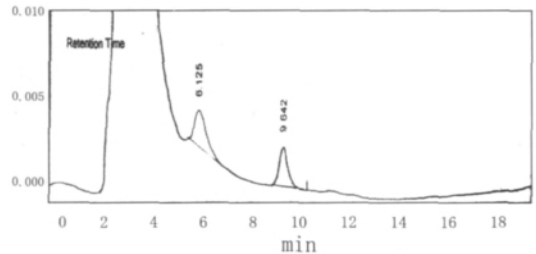
加标回收: 取本品 5.0 g 绞碎试样, 加入标准使用液 25 μl, 取已知含量(未检出) 绞碎鱼肉、虾肉试样各 3 份, 每份 5.0 g, 置 50 ml 具塞试管中, 制备方法同虾。分别加入三个水平标准混合溶液①2.5 μl, ②5.0 μl, ③7.5 μl, 匀质搅拌后, 震荡提取制备方法同样品提取。取上清液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后进样。用外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 样品中己烯雌酚加标回收试验结果

检测项目 (己烯雌酚)	样品含量 (μg)	加标水平①			加标水平②			加标水平③			三个水平 平均回收率 (%)
		添加量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	添加量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	添加量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	
鱼	未检出	2.7425	2.6810	97.75	5.4850	5.3220	97.02	8.2275	8.0970	98.41	97.73
虾	未检出	2.7425	2.6851	97.90	5.4850	5.3820	98.12	8.2275	8.0880	98.30	98.11

2.6 样品测定

取 5.0 g 绞碎鱼肉、虾肉试样各三份, 按制备方法提取。另取精密度测定对照品溶液, 进样 20 μl, 色谱图见图 1, 按外标法计算, 结果见表 2。



T = 9.642 min 时为乙烯雌酚峰

图 1 己烯雌酚 HPLC 图

表 2 样品中己烯雌酚含量

检测项目	鱼样 1 (μg/kg)	鱼样 2 (μg/kg)	鱼样 3 (μg/kg)	虾样 1 (μg/kg)	虾样 2 (μg/kg)	虾样 3 (μg/kg)
己烯雌酚	未检出	未检出	2.9	未检出	未检出	3.1

3 讨论

该实验对鱼、虾两类养殖水产品中乙烯雌酚残留的检出进行了研究, 检出峰形能够满足各项方法学验证指标, 具有专属性强、定量准确的优点, 能满足质量控制的要求。鱼、虾作为养殖量较大的两类水产品, 在养殖工艺、产品成分等方面与其他贝类、甲壳类水产品有相似之处, 因此该方法可广泛应用于养殖水产品中乙烯雌酚残留的检测。由于鱼、虾对乙烯雌酚的敏感度不同, 两类样品成分有差异, 为保证检测准确, 在实际检测中应依据各自的标准曲线。

参考文献

[1] 江希流, 华小梅, 朱益玲. 我国水产品的生产状况、质量和安全问题及其控制对策 [J]. 农村生态环境 2004, 20(2): 70-80.
[2] NY5071-2002. 渔用药物使用准则 [S].
[3] SC/T 3020-2004. 水产品中己烯雌酚残留量的测定 酶联免疫法 [S].

(收稿日期: 2011-04-26)