

一种新型毛细管色谱柱在 2,3,7,8-TCDD 检测中的应用

李吉平¹, 刘林娜¹, 周爽², 陈悦鸣², 刘文森¹, 孙玉成¹, 高宏伟^{1,*}, 宋日哲²
(1. 军事医学科学院军事兽医研究所 吉林 长春 130062; 2. 长春市疾病预防控制中心 吉林 长春 130033)

摘要: 本实验利用 DB-Dioxin 毛细管色谱柱和 GC-ECD 成功建立了鱼肉组织中 2,3,7,8-四氯代二苯并-P-二噁含量的检测方法。采用 Bio-beads S-X3 凝胶色谱柱和多色谱纯化对样品进行前处理, 以 DB-Dioxin 毛细管色谱柱进行分离, ECD 对鱼肉组织中的 2,3,7,8-TCDD 进行检测。结果该方法在 1.5~100pg 范围内呈线性关系 ($R^2=0.9999$), 标准回收率为 $103.2\% \pm 3.04\%$, 变异系数为 2.95%, 其最低检测限为 1pg。2,3,7,8-TCDD 和其衍生物及样品中的杂质分离良好。

关键词: 毛细管色谱柱; GC; 2,3,7,8-TCDD

Detection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin in Fish Meat with A New Type Capillary Chromatographic Column

LI Ji-ping¹, LIU Lin-na¹, ZHOU Shuang², CHEN Yue-ming², LIU Wen-sen¹, SUN Yu-cheng¹,
GAO Hong-wei^{1,*}, SONG Ri-zhe²

(1. Institute of Veterinary Science, Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China;
2. Center Disease Prevention and Control of Changchun City, Changchun 130033, China)

Abstract: The study aimed to set up a method of GC-ECD (electron capture detector) and DB-Dioxin capillary chromatographic column for the detection of 2,3,7,8-TCDD in fish meat. Sample was purified by Bio-beads S-X3 GPC, separated in DB-Dioxin capillary column and detected by GC-ECD. The results showed that the detection of 2,3,7,8-TCDD has better linearity in the range of 1.5 to 100 pg ($R^2=0.9999$). The average standard recovery rate is $103.2\% \pm 3.04\%$ with variation coefficient 2.95%. The detection limit is 1pg. It was demonstrated that 2,3,7,8-TCDD is well separated from sample.

Key words: capillary chromatographic column; GC; 2,3,7,8-TCDD

中图分类号: 0657.71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0543-04

二噁英是一种有毒的含氯化合物, 是目前世界已知的有毒化合物中毒性最强的。它的致癌性极强, 还可引起严重的皮肤病和伤及胎儿^[1-2]。因其具有明显的致癌性、生殖毒性和免疫毒性, 二噁英及其类似物的污染在国际上一直受到关注。2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(2,3,7,8-TCDD)是最典型和毒性最强的物质。据专家研究, 长期食用含有二噁英的食品会患上淋巴瘤、肺癌等癌症, 而摄入较低含量的二噁英也能引起糖尿病和婴儿的发育残缺。

目前, 在二噁英的分析方法中, 常使用 DB-5 MS 毛细管色谱柱对样品进行分离, 由于 DB-5MS 对 2,3,7,8-

TCDD 和 2,3,7,8-TCDF 难以分离, 因此一些具有一定极性的特殊色谱柱如 DB-225、SP-2330 等^[3]对二噁英类化合物的分离起到了一定的作用。在实验中发现, DB-Dioxin 毛细管色谱柱对 2,3,7,8-TCDD 有较好的分离能力, 故此开展研究。

1 材料与与方法

1.1 材料

鱼肉 市购。

1.2 试剂

1,2,3,7,8-五氯代二苯并-P-二噁英(1,2,3,7,8-PeCDD)、

收稿日期: 2008-05-02

基金项目: 长春市科学技术局资助项目(05SF15)

作者简介: 李吉平(1964-), 男, 副研究员, 研究方向为生物毒素、食品安全。E-mail: pingjili@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 高宏伟(1961-), 男, 教授, 硕士, 研究方向为生物毒素。E-mail: gaohongweighth@hotmail.com

1,2,3,4,7,8-六氯代二苯并-P-二噁英(1,2,3,4,7,8-HeCDD)、1,2,3,7,8,9-六氯代二苯并-P-二噁英(1,2,3,7,8,9-HeCDD)、1,2,3,4,6,7,8-七氯代二苯并-P-二噁英(1,2,3,4,6,7,8-HpCDD)和1,2,3,4,6,7,8,9-八氯代二苯并-P-二噁英(1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD)标准品含量均为50 µg/ml Accu Standard公司; 2,3,7,8-TCDD (99%) Cerrilliant公司;二氯甲烷、正己烷为色谱纯级试剂 BiqbeadsS-X3Bio-Rad公司;酸性氧化铝、氟罗里硅土均为国产层析用填料。

1.3 仪器

DB-Dioxin 毛细管色谱柱 Agilent公司;GC-2010 气相色谱仪 日本岛津公司;RE-52AA 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;SORVALL Stratos离心机 科峻仪器公司;ALPHA1-2 冻干机 德国Martin Chvist公司;BS210S分析天平 德国Sartorius公司。

1.4 方法

1.4.1 标准溶液的配制

2,3,7,8-TCDD 标准储备液的配制:用正己烷作溶剂配制成36 µg/ml 标准储备液,置于冰箱中保存。

混合标准溶液配制:除2,3,7,8-TCDD外,将1.2中的6种标准品各取适量配成混合溶液,使每种标准品在混合溶液中的浓度均为5.0 µg/ml。

1.4.2 鱼肉中样品的提取

取适量鱼肉组织,经匀浆后用冻干机冻干置干燥器中保存,备用。

取10g冻干的鱼肉样品,用正己烷和二氯甲烷(1:1, V/V)浸泡24h,超声萃取。将萃取液旋转蒸发,浓缩至2~3ml,然后用正己烷定容到5ml以备纯化。

1.4.3 样品的多色谱纯化

凝胶渗透色谱(GPC)的纯化:GPC 填料为Bio-Beads SX3,经溶胀后填充到GPC柱中(30cm × 25mm),用二氯甲烷 正己烷(1:1, V/V)做洗脱液。以适当的流速(3.0ml/min)进行淋洗,收集一定时间段的淋洗液(据检测而定,一般情况下,第一级份50ml为杂质组分;收集第二级份70ml)。将淋洗液旋转蒸发至干,转移到试管中,用氮气吹扫至进样量。

酸性氧化铝柱的纯化:将130 活化的6g酸性氧化铝填料装入色谱柱中(30cm × 2.0mm),上层装1cm的无水硫酸钠。用100ml 正己烷预淋洗。洗脱条件为:二氯甲烷 正己烷(1:1, V/V)40ml,收集全部洗脱液。旋转蒸发至干,定容到2ml。

佛罗里土柱的纯化:将装入1g 佛罗里硅土填料的柱子在140 活化至少24h。用50ml 正己烷预淋洗,而后用35ml 二氯甲烷 正己烷(5:95, V/V)洗脱液洗脱,弃去洗脱液;继后用40ml 二氯甲烷洗脱,收集,即为二噁英级份。

将收集的洗脱液吹扫,定容为2ml,进行GC分析。

1.4.4 GC 分析

1.4.4.1 色谱条件

色谱柱:J & W DB-Dioxin毛细管色谱柱(60m × 0.25mm, 0.25µm);柱温升温程序:90 (2min)_{20 /min} 180 (1min)_{5 /min} 220 (0min)_{3 /min} 260 (30min)_{1 /min} 270 (30min);柱压:196.5kPa(41min)_{20kPa/min}240.7 kPa (5 min)_{20kPa/min} 370.6kPa(30min);温度:进样器280;检测器300;其他条件:吹扫流量3ml/min,尾吹气30ml/min,进样方式为无分流进样,进样量1.0µl。

1.4.4.2 2,3,7,8-TCDD的工作曲线

将2,3,7,8-TCDD标准储备液用正己烷配成0.001、0.005、0.01、0.05、0.10、0.20、1.00 µg/ml的工作液。按上述色谱条件进行测定。然后分别以2,3,7,8-TCDD的面积对相应的进样量作图制作工作曲线,并计算回归方程。

1.4.4.3 2,3,7,8-TCDD保留时间的测定

将一系列标准浓度的2,3,7,8-TCDD溶液,按上述色谱条件进行测定,计算保留时间。

1.4.4.4 重复性试验

在上述相同的色谱条件下将同一浓度的2,3,7,8-TCDD标准溶液按上述方法重复进样(n=5),检查重复情况。

1.4.4.5 标准回收率实验

将一系列浓度的2,3,7,8-TCDD标准溶液,按上述色谱条件进行测定,按回归方程求得含量,与实际进样量比较,计算标准回收率。

1.4.4.6 最低检测限的测定

将2,3,7,8-TCDD标准溶液进行一系列稀释,测定2,3,7,8-TCDD的色谱峰高,其S/N为2~3时的进样量即为该法的最低检测限。

1.4.4.7 样品中2,3,7,8-TCDD的分离

取一定量的样品,加入适量的2,3,7,8-TCDD标准溶液,按上述方法进行提取、净化,同时作空白对照,然后进行GC分析,检查2,3,7,8-TCDD与样品中其它杂质的分离情况。

1.4.4.8 2,3,7,8-TCDD及其部分衍生物的分离情况

将2,3,7,8-TCDD标准溶液和上述部分衍生物的标准溶液进行混合,按上述色谱条件进行分析,检查2,3,7,8-TCDD及其衍生物的GC分离情况。

2 结果与分析

2.1 凝胶渗透色谱(GPC)柱纯化结果

图1为GPC柱纯化结果,从图1中可以看出样品中的油脂在14min就基本上洗脱出来,排除了大分子的脂肪对结果的影响。

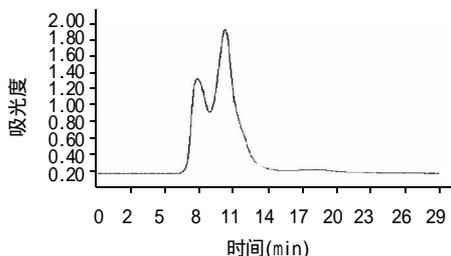


图1 GPC 纯化色谱图

Fig.1 GPC chromatogram for purifying sample

GPC 纯化被认为是处理高分子物质或大量脂肪等生物组织所必需的步骤之一。目前纯化二噁恶英类化合物的 GPC 填料最为广泛的是 Bio-Beads SX3, 它的成份为中性、带孔的聚苯乙烯珠, 依靠分子量的大小进行分离。在样品纯化中, 分子量很大的脂肪等干扰物质被提前洗脱出来, 从而与二噁英等小分子物质分离。因此, 本实验用 GPC 对样品中的脂肪进行去除并达到了很好的效果。

2.2 2,3,7,8-TCDD的工作曲线

2,3,7,8-TCDD的工作曲线(图2)在1.5~100pg范围内呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y(\text{pg}) = 0.0011 - 0.5253X$, 相关系数 R^2 为 0.9999。

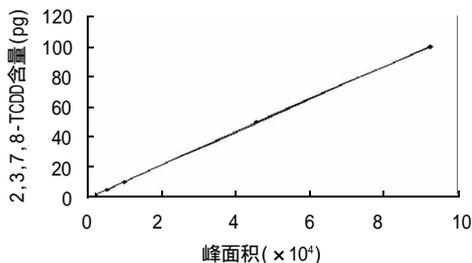


图2 2,3,7,8-TCDD的工作曲线

Fig.2 Working curve of 2,3,7,8-TCDD

2.3 2,3,7,8-TCDD的保留时间

经测定2,3,7,8-TCDD的保留时间为 $38.72 \pm 0.047\text{min}$ ($n=12$), 变异系数为 0.12%, 出峰时间稳定。标准2,3,7,8-TCDD的GC色谱图见图3。

2.4 2,3,7,8-TCDD的重复性实验

将10ng/ml的2,3,7,8-TCDD重复进样($n=5$), 其面积积分值为 9857.80 ± 112.82 , 变异系数为 1.14%(见表1)。

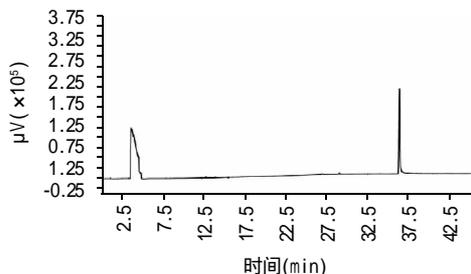


图3 标准2,3,7,8-TCDD的GC色谱图

Fig.3 GC chromatogram of standard 2,3,7,8-TCDD

由表1可见, 该检测方法重复性良好。

2.5 2,3,7,8-TCDD的标准回收率

2,3,7,8-TCDD的标准回收率实验结果见表2, 其标准平均回收率为 $103.20\% \pm 3.04\%$, 变异系数为 2.95%。

表1 标准2,3,7,8-TCDD的重复性试验

Table 1 Experimental results of repeatability of standard 2,3,7,8-TCDD

次数(n)	1	2	3	4	5
峰面积	9931	10003	9713	9801	9841
峰面积	9857.80 ± 112.82				
平均值($\bar{X} \pm \text{SD}$)	9857.80 ± 112.82				
CV(%)	1.14				

2.6 最低检测限

2,3,7,8-TCDD的S/N为2~3时的最低进样量分别为1pg, 所以该法的最低检测限为1pg, 相当于1ng/ml(图

表2 2,3,7,8-TCDD的标准回收率

Table 2 Standard recoveries of 2,3,7,8-TCDD

理论值(pg)	峰面积	回收率(%)
1.5	1947	107.76
5	5161	103.04
10	9931	103.99
50	45752	99.6
100	92830	101.59
平均回收率($\bar{X} \pm \text{SD}$)	$103.20\% \pm 3.04\%$	
变异系数	2.95%	

4)。检测限相对较低。

2.7 样品中2,3,7,8-TCDD的分离

取一定量的样品, 加入适量的2,3,7,8-TCDD标准溶液, 按上述方法进行提取、净化, 同时作空白对照,

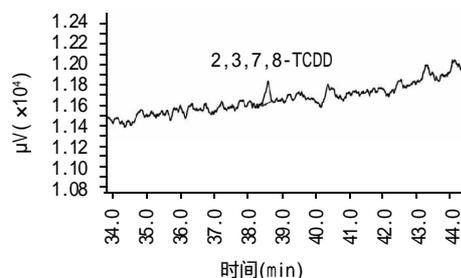


图4 2,3,7,8-TCDD的检测限

Fig.4 Detection limit of 2,3,7,8-TCDD

然后进行GC分离。由图5、6可知: 样品中2,3,7,8-TCDD和其他杂质分离良好。

2.8 2,3,7,8-TCDD及其部分衍生物的分离情况

将2,3,7,8-TCDD标准溶液和部分衍生物的标准溶液进行混合, 按上述色谱条件进行分析, 2,3,7,8-TCDD和

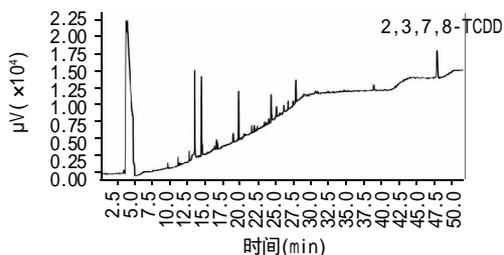


图5 空白样品的GC色谱图

Fig.5 GC chromatogram of blank sample

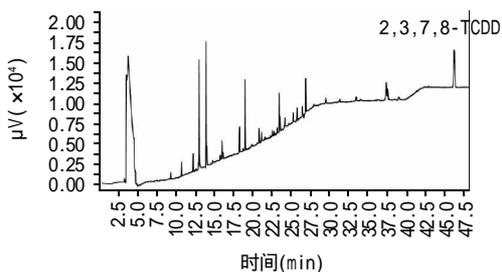


图6 空白样品加标的GC色谱图

Fig.6 GC chromatogram of blank sample spiked with 2,3,7,8-TCDD

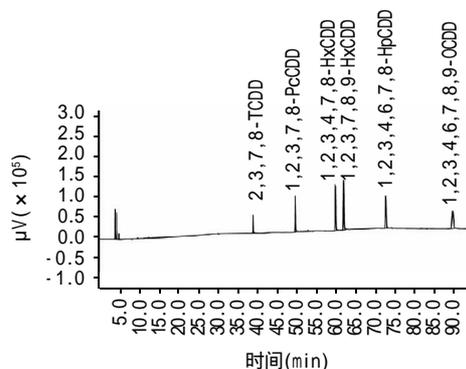


图7 2,3,7,8-TCDD及其衍生物的分离色谱图

Fig.7 GC chromatogram of 2,3,7,8-TCDD and its derivative

其衍生物分离情况良好(图7)。

3 结论

实验利用DB-Dioxin毛细管色谱柱建立了鱼肉组织样品中2,3,7,8-TCDD残留的检测方法,标准回收率为103.20%,变异系数为2.95%,最低检测限1pg,具有较高的灵敏度,可用于样品中2,3,7,8-TCDD检测的筛选工作;对样品中2,3,7,8-TCDD含量较高的检测不失为一个较好的方法,可用于2,3,7,8-TCDD组织代谢的研究。

DB-Dioxin毛细管色谱柱是一种非常适合分离2,3,7,8-TCDD的色谱柱,其可有效排除杂质对2,3,7,8-TCDD的干扰,对其他的二噁英类衍生物也能达到良好的分离效果,因此可用于环境污染物质中2,3,7,8-TCDD的分离。

DB-Dioxin毛细管色谱柱由于不耐高温(300),在进行程序升温过程中需同时进行程序升压,否则分离时间较长。

参考文献:

- [1] 马成有.二噁英环境污染问题的研究[J].中国环境管理,2007(2):19-21.
- [2] 侯蕾,陈必良.二噁英的胎盘毒性及研究进展[J].中国妇幼健康研究,2006,17(3):179-181.
- [3] US EPA, federal Register, Part , Environmental Protection Agency. Guidelines establishing test procedure for the analysis of pollutants; EPA Method 1613; Final rule, 40 CFR Part 136, 1997, 62: 48409-48421.