

气相色谱-质谱法分析鸡肝中己烯雌酚残留量

吴银良, 刘素英, 单吉浩, 王海

(农业部畜禽产品质量监督检验测试中心, 北京 100026)

[收稿日期] 2004-12-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2005)11-0008-03 [中图分类号] S859.84

[摘要] 采用基质固相分散、液液分配、固相萃取相结合的方法提取并净化鸡肝中残留的己烯雌酚, 用 *N*-甲基, *N*-三甲基硅烷三氟乙酰胺 (MSTFA) 衍生化, 毛细管气相色谱/质谱联用 (选择离子检测模式, 检测离子 m/z 为 383, 397, 412, 413) 对衍生物检测分析, 内标法定量, 建立了对鸡肝中己烯雌酚残留量定性、定量分析的方法。不同添加浓度的己烯雌酚在鸡肝中的平均添加回收率在 67.2% ~ 90.2% 之间, 批内和批间变异系数在 3.88% ~ 10.36% 之间, 检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[关键词] 基质固相分散; 己烯雌酚; 残留; 鸡肝; 气相色谱-质谱法

己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES) 属 1,2-二苯乙烯类化合物, 是同化激素的一种。在养殖中具有通过蛋白质同化作用提高食欲的功效, 被用来提高饲料转化率, 促进畜禽生长。人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、卵巢癌等疾病^[1,2]。我国已于 1999 年 1 月禁止在动物生产中使用 DES, 并将其作为是兽药残留监控的重点对象。

气相色谱-质谱法 (GC/MS) 在国际上已成为包括 DES 在内的同化激素类药物检测中普遍采用的确证方法。但目前我国畜禽产品中 DES 的含量检测采用 HPLC 法^[3], 检测限只有 0.25 mg/kg 。质谱确证方法尚未建立。由于动物肝组织样品前处理复杂, 这方面的研究在国内也鲜见相关报道^[4]。本试验对鸡肝中的 DES 残留的前处理技术和质谱检测技术进行了研究, 建立了步骤为基质固相分散-液液分配-固相萃取-衍生化-质谱检测在内的前处理技术和质谱检测技术。所建立的方法前处理技术净化效果非常好, 方法检出限达到 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1 材料和方法

1.1 色谱仪及色谱条件

1.1.1 色谱仪 Agilent 6890-5973 气相色谱-质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; HP-5 MS 石英毛细管色谱柱, 30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$, 膜厚 0.25 μm 。

1.1.2 气相色谱条件 载气为高纯 He , 恒流 1 mL/min ; 色谱柱起始温度 160 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min 后以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min ; 进样口温度 270 $^{\circ}\text{C}$, 不分流进样, 进样量 1 μL 。

1.1.3 质谱条件 EI 源, 源温 200 $^{\circ}\text{C}$, 电子能量 70 eV , 传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 检测电压 200 V ; 选择离子检测模式, 检测离子 m/z 为 383, 397, 412 和 413。

1.2 试剂和材料

1.2.1 对照品与试剂 DES 对照品, 纯度 99.8%, 批号 0088-9806 中国药品生物制品检定所; 二氯酚 (DCP) 对照品, 纯度 99.8%, 批号 C1245000Q 德国 Sigma 公司。乙腈、甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.2.2 标准储备液 准确称取 DES 和 DCP 各 10 mg 用甲醇溶解并稀释到 100 mL , 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。

1.2.3 衍生化试剂 将乙腈、*N*-甲基, *N*-三甲基硅烷三氟乙酰胺 (MSTFA)、三甲基氯硅烷 (TMCS) 以为 12:8:1 的体积比混合, 现配现用。

1.2.4 其他 C_{18} 键合固定相 (40~63 μm), 迪马公司; supelco LC-18 硅胶固相萃取柱, 500 mg 3 mL 。

1.3 样品处理

1.3.1 提取 称取 0.5 g (精确到 0.01 g) 匀浆后的鸡肝组织样品于玻璃研钵中, 然后加入约 2 g 的

C₁₈填料,用研杵研磨使其混合均匀,放置 1 h 左右,均匀装入 10 mL 的底端垫有滤纸的带刻度的注射器中,上端再垫一层滤纸,用活塞轻压至 3.5 mL 左右。然后用 8 mL 正己烷分两次洗涤研钵和研杵,加到柱子上,利用重力进行润洗。再用 8 mL 乙酸乙酯分两次洗研钵和研杵,同样加入柱子进行洗脱,流速为 1~2 mL/min。收集乙酸乙酯洗脱液。

1.3.2 净化 加入 3 mL 10% 的碳酸钠溶液至 1.3.1 项下收集的乙酸乙酯洗脱液中,涡流振荡 20 s, 3 000 r/min 离心 2 min, 弃去下层溶液,再加入 3 mL 10% 碳酸钠溶液至有机相中,同前操作后转移有机相至干净试管中,在 50 ℃ 左右的水浴中经 N₂ 吹干。将吹干后的残渣用体积比为 1:1 的二氯甲烷/乙酸乙酯混合溶剂 100 μL 溶解并转移到已经 5 mL 正己烷和 5 mL 二氯甲烷/乙酸乙酯混合溶剂预处理的硅胶柱上,先用 5 mL 正己烷润洗,然后将柱子抽干,再用体积比为 1:1 的二氯甲烷/乙酸乙酯混合液 5 mL 洗脱,收集洗脱液,在 50 ℃ 左右的水浴中用 N₂ 吹干。

1.3.3 衍生化 在 1.3.2 项下净化后的样品中加入 100 μL 内标溶液,用 N₂ 吹干,然后加入 100 μL 配置好的衍生化试剂,振荡混合,封口,在 60 ℃ 烘箱中衍生 15 min,加入 100 μL 正己烷混合后进行气质分析。

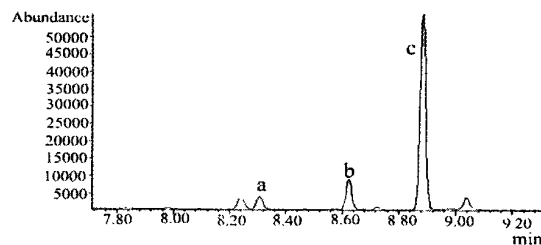
1.4 线性试验 将 100 mg/L 的标准储备液用甲醇逐步稀释成 2.5、10、50、100、250、1 000 μg/L 的 DES 标准工作液,各取 200 μL 分别置于 5 mL 带盖的试管中,再分别加入 100 μL 浓度为 50 ng/mL 的内标溶液,用 N₂ 吹干。各加入 100 μL 衍生化试剂,充分振荡后密封,在 60 ℃ 烘箱中衍生 15 min 后,加入 100 μL 正己烷混匀后进行气质分析。

1.5 添加回收率试验 添加回收率实验样品处理同 1.3 项,添加浓度分别为 1、2.4 和 10 μg/kg。

2 结果

2.1 色谱分离 在上述色谱条件下,得到标准溶液和样品图谱见图 1、图 2 和图 3。从图 1 和图 2 中可知,在所用的色谱条件下,分析物可以得到很好的分离,未发现杂质色谱峰的干扰,反式 DES、DCP 和顺式 DES 的 TMS 衍生物的出峰时间依次为 8.31、8.64 和 8.91 min。

2.2 标准曲线 本研究中采用内标法定量,因 DES 的 TMS 衍生物的顺反式比例无法固定,因此在计算峰面积时,采用顺反式 DES 的衍生物峰面积



a 反式己烯雌酚 TMS 衍生物; b 二氯酚 TMS 衍生物;
c 顺式己烯雌酚 TMS 衍生物

图 1 己烯雌酚标准溶液 (100 μg/L) 经衍生化后的色谱图

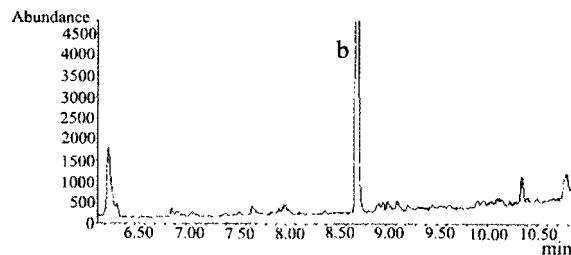


图 2 鸡肝空白样品色谱图

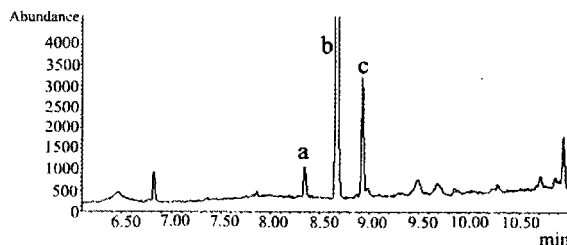


图 3 鸡肝添加样品 (4 μg/kg) 色谱图 (412 离子)

相加的方法来确定 DES 的 TMS 衍生物峰面积。在 2~1 000 μg/L 浓度范围内, DES 浓度 (x) 和顺反式 DES 衍生物峰面积之和与内标峰面积的比值 (y) 成线性关系, 其线性方程为 $y = 0.0117x - 0.0271$, $r^2 = 0.9996$ 。

2.3 回收率及重复性 采用在空白中添加标准溶液的方法, 按 1.3 项样品处理方法对 DES 进行了添加回收率试验和重复性试验, 以内标法定量。每种组织在每一个添加水平上重复 4 次实验, 每次 5 个平行。实验结果 (见表 1) 表明, 各浓度点回收率在 67.2% ~ 90.2%, 批内变异系数在 5.01% ~ 10.36%, 批间变异系数在 3.88% ~ 9.36%。

2.4 检出限 按信噪比 $S/N = 3:1$ (以反式 DES 的 TMS 衍生物的峰高和噪音进行比较), 计算 DES 的检出限为 0.5 μg/kg。

3 讨论和结论

在参考丁雅韵等^[4]建立的动物组织中 DES 残

表 1 方法的回收率及批内、批间变异系数

添加浓度 <i>I</i> ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	回收率 <i>R</i> %	批内变异 系数 <i>R</i> %	批间变异 系数 <i>R</i> %
1	75.6	6.41	7.26
	67.2	10.36	
	73.8	8.97	
	80.2	9.91	
2	79.5	7.89	3.88
	72.4	6.53	
	75.8	7.41	
	77.1	6.99	
4	83.7	8.25	5.70
	74.2	8.37	
	76.1	6.62	
	81.7	4.93	
10	78.4	5.01	9.36
	72.2	6.01	
	79.1	5.83	
	90.2	4.07	

留的基体固相扩散 - 气相色谱 - 质谱分析方法中净化步骤的基础上, 将原净化步骤中使用硅藻土柱进行净化改为使用碳酸钠溶液进行液液分配进行净化, 不但大大缩短了样品的测定时间, 而且也提高了方法的灵敏度, 同时更为重要的是每个样品的前处理过程中至少能少用 40 mL 有机溶剂, 且不再使用高毒溶剂甲苯。

在研究过程中, 进行了净化步骤对方法灵敏度的影响实验。实验结果表明, 当无硅胶柱净化步骤时 DES 在鸡肝中的检出限在 5~10 $\mu\text{g/kg}$ 净化步骤中无碳酸钠溶液液液分配步骤时, 鸡肝中 DES 的方法检出限在 100 $\mu\text{g/kg}$ 左右。为达到 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 左右的检出限, 这两个实验步骤均不能舍弃。

该方法分析鸡肝中 DES 残留量与已有的一些方法相比, 具有前处理净化效果好, 灵敏度高的特点。经添加回收率实验表明, 该分析方法的检测限、回收率、重复性和线性范围均能满足现行兽药残留分析的要求。

参考文献:

[1] Gusti RM, Iwanoto K, Hathi EE. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long term health effects[J]. Ann Intern Med. 1995; 122: 778-788.

[2] Luster MI, Faith RE, McLachlan JA. Effect of in utero exposure to diethylstilbestrol on the immune response in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol. 1979; 47(2): 279-285.

[3] 食品卫生理化检验标准手册第 1 版[M]. 北京: 中国标准出版社, 1998. 268-270.

[4] 丁雅韵, 徐晓云, 谢孟峡, 等. 动物组织中己烯雌酚残留的基体固相扩散 - 气相色谱 - 质谱分析方法研究[J]. 分析化学, 2003, 31(11): 1356-1359.

Detem ination of the diethylstilbestrol residues in chicken liver
by gas chrom atography-m ass spectrom etry(GC MS)

WU Yin-liang LIU Shu-yin SHANG Jie-hao WANG Hai

(Quality Control and Inspection Center for Domestic Animal Products of MOA, Beijing 100026 China)

Abstract Diethylstilbestrol residues of trace level in chicken liver were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC MS). Sample preparation procedures included matrix solid-phase dispersion, liquid-liquid extraction(LLE) and solid-phase extraction(SPE). The detection limit was 0.5 $\mu\text{g/kg}$ the linear range was 2~1 000 $\mu\text{g/L}$, and the mean recoveries were 67.2% ~ 90.2%.

Key words matrix solid-phase dispersion, chicken liver, GC MS method, diethylstilbestrol residue

农业部正式批准的 9 家禽流感疫苗定点生产企业

哈尔滨维科生物技术开发公司、乾元浩生物股份有限公司、郑州生药厂、青岛易邦生物工程有限公司、广东永顺生物制药有限公司、肇庆大华农生物药品有限公司、辽宁益康生物药品厂、南京梅里亚动物保健有限公司、齐鲁动物保健品厂、成都精华生物制品有限公司。