

气相色谱法测定肉中己二烯雌酚残留量

周艳明 牛 森

(沈阳农业大学,辽宁 沈阳 110161)

摘要:为保证肉品安全,利用 GC-ECD 测定肉中己二烯雌酚残留量。样品用甲醇提取,经离心和阴离子交换柱层析净化,七氟丁酸酐衍生,气相色谱仪配电子捕获检测器测定,外标法定量。方法的检出限为 0.01 μg/g,线性范围为 0.01 ~ 100 μg/g,相关系数为 0.999 6,相对标准偏差小于 3.88%,回收率在 85.8% 以上。该方法可用于食品安全监控工作,用以测定肉品中己二烯雌酚的残留量。

关键词:肉;己烯雌酚;药物残留量;丁酸类;色谱法;气相

Determination of Dienestrol Residue in Meat by GC-ECD

ZHOU Yan-ming, NIU Sen

(Shenyang Agriculture University, Liaoning Shenyang 110161, China)

Abstract: An analytical method for determination of the residues of Dienestrol in meat by GC-ECD was developed. The sample was extracted with methyl alcohol, purified by centrifuge and anion exchange Chromatography, derivatived with heptafluorobutyric anhydride (HFBA), determined by Gas Chromatography with Electron Capture Detector and quantitated by external standard. The minimum detection limit was 0.01 μg/g, the line scope was 0.01 ~ 100 μg/g, the correlation coefficient was 0.999 6, the relative standard deviation (RSD) was < 3.88%, and the average recovery rate was 85.8%. The method can be used to determine the residues of Dienestrol in meat products.

Key word: Meat; Diethylstilbestrol; Drug Residues; Butyric Acids; Chromatography, Gas

己二烯雌酚(Dienestrol, DIE)是一种根据天然雌激素的结构特征合成的非甾体激素类人造雌激素,与己烯雌酚同为作用较强的人造雌激素。在畜牧业上,DIE最初用于对乳牛催乳,后又作为饲料添加剂,可增加食欲,促使蛋白质、钙、磷的蓄积增加;促进牲畜增重,提高饲料利用率,提高产量并使肉质鲜嫩。但研究证明,残留在畜禽肉中的己二烯雌酚

能扰乱消费者激素平衡,导致妇女更年期紊乱、生育能力下降,女童性早熟,男性女性化,并有强致癌作用,对消费者健康极为不利,是许多国家和地区明令禁用的兽药之一。DIE在肉类中残留量的测定方法在国内外少有报道,不便于其残留监测,本文建立了肉中己二烯雌酚残留量测定的气相色谱方法。

120 min 提取的异黄酮仅为 0.218%,而利用超声波提取 10 min 就达 0.371%。同时,采用乙醇加热回流法与超声波法作比较,乙醇加热回流法仍采用 80%乙醇作提取剂,料液比为 1:15,在温度为 70℃下提取 3 h,提取 2 次,提取率为 0.515% (另文撰述)。而超声波法在室温下提取 20 min (其它条件相同),大豆异黄酮的提取率可达 0.548%,说明超声波法的提取效果优异。

参考文献

- [1] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中草药,1993,24(10):548.
- [2] 张福成,林书玉,郭孝武,等. 超声萃取干燥过滤研究的新进展[J]. 声学技术,1994,13(4):155-188.
- [3] 张玉梅,孙学斌,高旭年,等. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 中国食品卫生杂志,2000,12(4):7-8.

[收稿日期:2006-05-24]

中图分类号:R15;O657;Q56 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2006)05-0418-03

作者简介:周艳明 女 教授

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 气相色谱仪:Agilent 6890N 配电子捕获检测器;色谱柱:大口径毛细管柱 15.0 m × 530 μm, 1.5 μm (SGE - 30QC5/AC 5 - 1.0);匀浆机,超声波发生器,旋转蒸发器、阴离子交换树脂 (AG 1 - X8) 层析柱。

己二烯雌酚 (Dienestrol, DIE) 纯品, Sigma 公司, 纯度: 99.99 %;

己二烯雌酚标准溶液的配制 精确称取 100 mg 己二烯雌酚纯品溶于少量甲醇中, 以 100 ml 容量瓶定容至刻度, 即得 1 000 μg/ml 标准样品储备液, 再用甲醇逐步稀释成 100、10、1、0.1 和 0.01 μg/ml 的系列标准工作溶液。

甲醇、石油醚均为农药残留级试剂; 乙酸、吡啶均为分析纯试剂; 七氟丁酸酐 (HFBA), 纯度 > 99 %。

1.2 方法

1.2.1 试样提取 肉样品混匀、绞碎, 称取 10.00 g, 用 15 ml 甲醇超声波震荡 10 min 提取, 重复 3 次, 合并提取液。收集甲醇提取液, 于 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 残渣再加入 5 ml 甲醇, 离心 10 min, 合并上清液。

1.2.2 提取液净化 在内径 0.8 cm 的具塞玻璃层析柱内装 1 cm 高的 AG 1 - X8 阴离子交换树脂, 先用 5 ml 甲醇淋洗柱。然后加入经离心的试样提取液, 控制流速每分钟 20 滴。待试样液即将全部流入树脂层时, 加入 10 ml 甲醇淋洗柱, 弃去流出液。待淋洗液即将全部流入树脂层时, 加入 25 ml 洗脱液: 甲醇 + 乙酸 (100 + 0.6), 收集柱后流出的洗脱液。

1.2.3 衍生反应 减压蒸干净化后的试样提取液, 加入 1 ml 石油醚溶解残渣, 再加入 10 μl HFBA 衍生试剂和 25 μl 吡啶催化剂, 在 70 °C 恒温水浴中反应 15 min, 取出冷却。在衍生液中加入约 5 ml 去离子水清洗衍生液, 吸取有机相, 加少许无水硫酸钠干燥, 待测。

1.2.4 色谱测定 根据己二烯雌酚的特性, 选择固定液为 5 % Phenyl Methyl Siloxane (含 5 % 苯基和 1 % 乙烯基的聚甲基硅氧烷) 的大口径开管毛细管柱 SGE - 30QC5/AC 5 - 1.0。氮气 4.2 ml/min, 纯度 > 99.99 %。检测器温度 270 °C。气化器温度 290 °C。柱温: 140 °C 保持 3 min, 再以 15 °C/min 速率升温至 270 °C, 保持 2 min。用微量注射器吸取 5 μl 试样衍生液, 注入气相色谱仪中, 测定峰面积。

校正曲线法定量, 依下式计算:

$$C(\mu\text{g/g}) = \frac{c \cdot V}{W}$$

式中: C : 试样中己二烯雌酚残留量 (μg/g); c : 测定液浓度 (μg/ml); V : 测定液体积 (ml); W : 称样量 (g)。

1.2.5 校正曲线的制作和线性范围 吸取己二烯雌酚标准系列溶液各 5 μl, 用 1.2.3 所述方法衍生后, 分别注入色谱仪, 测定 DIE 峰面积, 制做校正曲线。得线性方程为: $y = 44\,737x + 8\,264.8$, 测得相关系数为 $r = 0.9996$, 线性关系良好, 线性范围为 0.01 ~ 100 μg/ml。

2 结果与讨论

2.1 关于柱层析净化 液液萃取是一种依据分配定律的经典的净化方法, 但己二烯雌酚易溶于多数有机溶剂, 液液萃取率很低, 过程繁琐, 试剂用量也多。本文采用了阴离子交换柱层析净化法, 利用己二烯雌酚可离解为阴离子, 可被阴离子交换剂吸附, 而样品液中脂肪、色素等杂质多为中性分子, 不被阴离子交换剂吸附的特性, 将样品提取液通过阴离子交换柱时, 己二烯雌酚离子被吸附在柱上, 用纯甲醇淋洗层析柱, 因纯甲醇不含阴离子, 所以不能洗掉己二烯雌酚离子, 只能洗掉柱中滞留的样品杂质, 然后用甲醇 + 乙酸作为洗脱液, 后者含乙酸根阴离子, 可洗脱己二烯雌酚离子, 收集甲醇 + 乙酸洗脱液, 得到净化的样品液, 并得到较高的回收率, 详见表 1。

表 1 精密度和准确度 ($n = 5$)

添加量 (μg/g)	测得值 (μg/g)	RSD (%)	回收率 (%)
0.05	0.044	12.5	88.2
0.10	0.902	7.9	90.2
1.00	0.925	3.8	92.5

2.2 衍生反应的选择 己二烯雌酚极性和沸点高, 采用了以七氟丁酸酐 (HFBA) 酰化试剂的衍生法。待测化合物中的活泼氢被酰基取代, 生成极性较小、挥发性较好的衍生物, 制备方法简单。同时, 由于衍生试剂中的氟原子具有很大的电子亲和力, 在电子捕获检测器上有较高的灵敏度。在使用电子捕获检测器时, 全氟化衍生物的分析灵敏度很高, 并且衍生物的挥发性随氟的增加而增大。但若全氟酰化基链过长, 挥发性反而降低, 分析灵敏度增高不明显。本实验选择了利用七氟丁酸酐 (HFBA) 作为衍生试剂的酰化衍生方法, 达到很好的效果。衍生后, 过量的衍生试剂干扰检测, 由于衍生试剂是水溶性的, 而已二烯雌酚衍生物不溶于水, 可采用水洗的方法除去。

2.3 衍生物的稳定性 己二烯雌酚酰化衍生物溶解于石油醚后, 于室温下密封放置 1 周, 在同样的色谱条件下测定, 保留时间和峰高均无明显变化。10 mg/kg DIE 酰化衍生物于室温中 24 h 内的相对误差小于 1 % (以峰面积计算), 证明此酰化衍生物具有足够的稳定性。

2.4 灵敏度、精密度和准确度 经实测, 本方法 10 g

肉样中可检测到的最低 DIE 含量为 $0.01 \mu\text{g/g}$ ($S/N = 3$), 检出限为 0.01 mg/kg 。分别添加 0.01 、 0.10 、 $1.00 \mu\text{g/g}$ 做精密度和准确度试验, RSD $3.8\% \sim 12.5\%$ 之间; 回收率在 $88.2\% \sim 92.5\%$ 之间, 详见表 1。

2.5 色谱图 $1 \mu\text{g/ml}$ DIE 标准溶液酰化衍生物的色谱图见图 1。

添加 $1 \mu\text{g/g}$ DIE 标准品的肉样酰化衍生物色谱图见图 2。

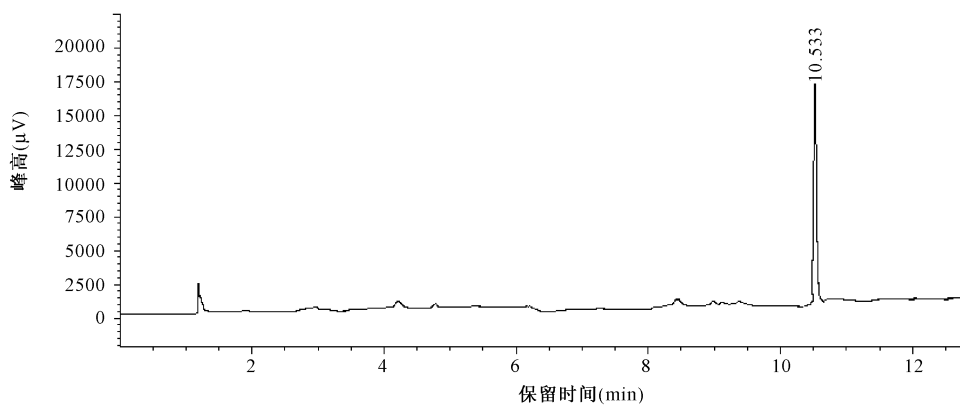


图 1 $1 \mu\text{g/ml}$ DIE 标准液的酰化衍生物色谱图 ($t_R = 10.533$)

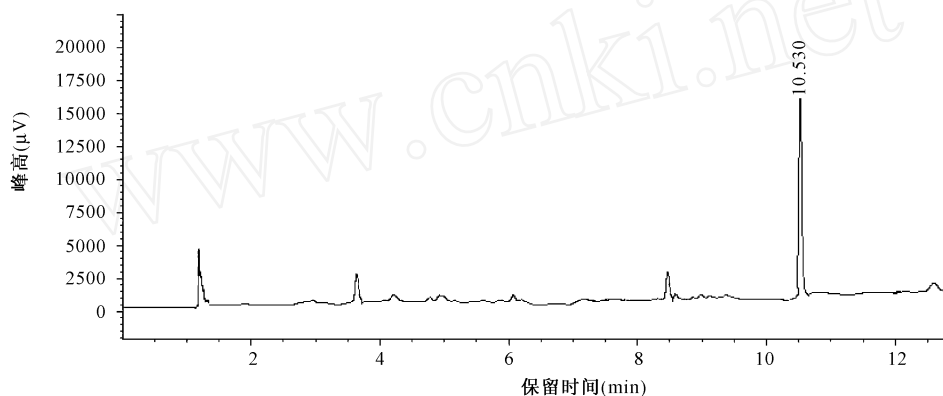


图 2 添加 $1 \mu\text{g/g}$ DIE 标准品的肉样酰化衍生物色谱图 ($t_R = 10.530$)

中图分类号: R15; O657.71; S859.84 文献标识码: B 文章编号: 1004 - 8456(2006)05 - 0420 - 03

卫生部文件

卫政法发[2006]68号

卫生部关于修改《卫生行政处罚程序》第二十九条的通知

各省、自治区、直辖市卫生厅局、新疆生产建设兵团卫生局:

根据《中华人民共和国行政处罚法》的规定和卫生行政处罚工作的实际需要,经研究,对《卫生行政处罚程序》(1997年6月19日发布、卫生部令第53号)第二十九条修改如下:

卫生行政机关应当自立案之日起三个月内作出行政处罚决定。

因特殊原因,需要延长前款规定的时间的,应当报请上级卫生行政机关批准。省级卫生行政机关需要延长时间的,由省级卫生行政机关负责人集体讨论决定。

卫生部
二 六年二月十三日