

# 中空纤维膜液相微萃取-液相色谱法测定 己烯雌酚

朱小红<sup>1\*</sup>, 盛喜霞<sup>2</sup>, 马鹏飞<sup>1</sup>, 惠卫甲<sup>1</sup>, 刘海静<sup>1</sup>

(1. 陕西省食品药品检验所, 西安 710061;

2. 兵器工业卫生研究所, 西安 710065)

**摘要:** **目的** 建立鸡肉中己烯雌酚残留的中空纤维膜液相微萃取-液相色谱分析方法。**方法** 对影响萃取富集效率的实验条件进行优化, 采用聚丙烯中空纤维膜, 以叔丁基甲基醚为萃取溶剂, 萃取溶剂用量 20  $\mu\text{L}$ , 萃取温度 35  $^{\circ}\text{C}$ , 萃取时间 30 min, 搅拌速率为 500 r/min, 萃取液 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴, 氮气吹干后用流动相溶解, 取 10  $\mu\text{L}$  进行液相色谱检测。**结果** 该方法对己烯雌酚的富集倍数为 40 倍, 己烯雌酚在 7.814~97.670  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99, 检测限( $S/N=3$ )为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 实际样品中的加标回收率为 78.07%~88.46%, 相对标准偏差为 0.99%~8.36%。**结论** 本方法灵敏、简便, 适用于鸡肉中己烯雌酚残留的检测。

**关键词:** 中空纤维膜液相微萃取; 液相色谱; 己烯雌酚; 鸡肉

## Determination of diethylstilbestrol by hollow fiber-based liquid phase microextraction coupled with high pressure liquid chromatography

ZHU Xiao-Hong<sup>1\*</sup>, SHENG Xi-Xia<sup>2</sup>, MA Peng-Fei<sup>1</sup>, XI Wei-Jia<sup>1</sup>, LIU Hai-Jing<sup>1</sup>

(1. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710061, China;

2. Institute of Industrial Hygiene of Ordnance Industry, Xi'an 710065, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an analytical method for the determination of diethylstilbestrol in chicken by hollow fiber-based liquid phase microextraction coupled with high pressure liquid chromatography(HPLC). **Methods** Some main experimental parameters that affected the extraction efficiency were optimized. Methyl tert-butyl ether 20  $\mu\text{L}$  was selected as both the extraction solvent and the impregnation solvent. The extraction was carried out at 35  $^{\circ}\text{C}$  with a stirring rate of 500 r/min for 30 min. The extract was dried under nitrogen stream at 40  $^{\circ}\text{C}$ . The dried residue was dissolved in the mobile phase. Methyl tert-butyl ether 10.0  $\mu\text{L}$  was then injected into HPLC for further analysis. **Results** The enrichment factor of diethylstilbestrol was 40. The method showed good linearity over the range of 7.814~97.670  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for diethylstilbestrol with  $r>0.999$ . The limit of detection were 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $S/N=3$ ). The recoveries were 78.07%~88.46% with relative standard deviations of 0.99%~8.36%. **Conclusion** This method is sensitive, simple and suitable for determination of diethylstilbestrol in chicken.

**KEY WORDS:** hollow fiber based liquid phase microextraction; high pressure liquid chromatography; diethylstilbestrol; chicken

基金项目: 陕西省食品药品检验所青苗项目科研基金项目

\*通讯作者: 朱小红, 女, 副主任药师。E-mail: zzxh@yahoo.com.cn

## 1 引言

己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES), 是人工合成的一种非甾体雌激素物质, 曾作为促生长剂用于畜牧业生产<sup>[1]</sup>。毒理研究表明该类物质是一种环境激素, 能够在肝脏、肌肉、蛋、奶等动物源性食品中残留, 引发少儿的发育早熟、生殖器病变与肿瘤。欧盟公布法令禁止在畜牧业生产中使用<sup>[2]</sup>, 2002年我国农业部亦将其列为禁用药<sup>[3]</sup>, 在动物性食品中不得检出<sup>[4]</sup>。残留己烯雌酚的国家标准检测方法有很多种<sup>[5-8]</sup>, 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中己烯雌酚检测限为 1.0  $\mu\text{g/L}$ <sup>[5]</sup>, 奶粉中检测限为 8.0  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[5]</sup>, 高压液相色谱-电化学检测器法测定鸡肉和鸡肝中己烯雌酚检测限为 1.0  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[6]</sup>, 酶联免疫吸附法测定猪肉、猪肝、虾中的己烯雌酚检测限均为 2.0  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[7]</sup>, 气相色谱-质谱法在鱼、虾中的己烯雌酚定量限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[8]</sup>。测定己烯雌酚残留传统的前处理方法<sup>[9]</sup>均为甲醇(乙腈)-乙酸铵提取, 正己烷-乙酸乙酯净化, 或者采用固相萃取技术, 但存在有机溶剂用量大、选择性差、需分离净化、操作繁琐费时等弊端。而动物性食品中残留的己烯雌酚含量一般很低, 需要富集才能检出, 给残留分析技术提出了更高的要求。中空纤维膜液相微萃取技术<sup>[10]</sup>(HF-LPME) (Hollow fiber liquid phase microextraction), 集采样、萃取和浓缩于一体, 具有成本低、装置简单、易与 HPLC、GC 联用等优点。对待测样品起到富集痕量组分、消除基体干扰、提高方法灵敏度的作用, 为食品基质样品处理提供了新的选择。本文采用 HF-LPME 与 HPLC 结合的技术, 建立鸡肉中己烯雌酚的分析方法, 并对影响 HF-LPME 的一些主要实验条件进行了优化。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料与仪器

己烯雌酚(批号为: 0033-9805, 99.8%)标准品(中国药品生物制品检定所);  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶(德国默克公司); Waters<sup>TM</sup> Sep-Pak C<sub>18</sub> 固相萃取柱; 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国天地公司); 水为超纯水; 正辛醇(分析纯)、正己烷(分析纯)、叔丁基甲基醚(分析纯)均购自天津科密欧化学试剂有限公司; 乙酸盐缓冲溶液(pH6.0): 称取 43.0 g NaAc·3H<sub>2</sub>O 用水溶解, 加入 25.2 g 冰乙酸, 用水定容至 1000 mL。

Waters2695-2996 HPLC, 配有二极管阵列检测器及 Empower 数据处理工作站(美国 Waters 公司); 10  $\mu\text{L}$  微量进样器(美国 Agilent 公司); AE240 电子分析天平(Mettler); BS233S 电子分析天平(Sartorius); IKA T18 匀质器(美国 Ultra Turrax 公司); Barnstead Thermolyne Cimarec 数显加热磁力搅拌器; 氮气浓缩仪(美国 Zymark 公司); 飞鸽牌 TDC-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂); VORTEX-5 涡旋混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); 聚丙烯中空纤维膜(内径为 1 mm, 壁厚为 100  $\mu\text{m}$ , 膜孔径 1.8  $\mu\text{m}$ , 膜孔率 60%, 天津大学化工学院膜研究所)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样品制备

取鸡肉可食部分于 10000 r/min 下匀浆, -18  $^{\circ}\text{C}$  以下冷冻保存备用, 分析时放至室温。

#### 2.2.2 己烯雌酚对照品及其溶液的配制

精密称取己烯雌酚标准品适量, 加甲醇配制成浓度为 244.2  $\mu\text{g/mL}$  的溶液, 作为对照品储备液, 分别取 244.2  $\mu\text{g/mL}$  的己烯雌酚 2.0、4.0、6.0、8.0、10 mL 用甲醇配制成己烯雌酚浓度分别为 7.814、15.630、23.440、31.250、97.670  $\mu\text{g/mL}$  的一系列标准溶液。

#### 2.2.3 样品处理

##### 2.2.3.1 HF-LPME 实验

自制的中空纤维膜-液相微萃取装置由微量进样器和中空纤维膜两部分组成。将中空纤维膜切成长度为 10 cm 的小段, 在丙酮中超声清洗 10 min 以去除污染物, 风干后备用。然后将中空纤维在叔丁基甲基醚中浸泡 1 min 使纤维壁微孔中充满。用注射器 A 向中空纤维中注入 20  $\mu\text{L}$  叔丁基甲基醚, 并且在中空纤维的另一端插入注射器 B 以免挥发。迅速将纤维浸入 50 mL 样品溶液中, 在室温和常压下, 启动磁力搅拌器, 搅拌速度为 500 r/min, 萃取温度为 35  $^{\circ}\text{C}$ , 萃取 30 min 后, 将中空纤维膜中的叔丁基甲基醚萃取液取出, 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴氮气吹干, 精密加入 1 mL 乙腈-水(1:1, v/v)溶液溶解残渣, 涡旋 1 min, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 取 10  $\mu\text{L}$  进行液相色谱分析。

##### 2.2.3.2 酶解

精密称取 2.2.1 中匀质好的试样 2 g(精确到 0.001 g), 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 6 mL 乙酸盐缓冲溶液(pH=6.0), 以 14000 r/min 均质 30 s, 加入 50  $\mu\text{L}$   $\beta$ -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶, 涡旋混匀 30 s,

置于 37 °C 恒温水浴振荡酶解 16 h, 备用。

#### 2.2.3.3 提取

向酶解后的样品溶液中加入 20 mL 甲醇, 在涡旋振荡器上涡旋混匀 2 min 后, 置于冰浴中放置 5 min, 在 5 °C 下以 5000 r/min 离心 10 min, 上清液转移至 50 mL 鸡心瓶中, 下层沉淀再用 10 mL 甲醇重复上述操作一次, 合并上清液, 将合并的上清液 40 °C 旋转蒸发至近干, 加水 10 mL, 涡旋 1 min, 混匀, 待净化。分别按照方法 1(传统的净化和浓缩方法)和方法 2(中空纤维膜液相微萃取技术)处理。

#### 2.2.3.4 萃取净化

方法 1(传统的净化和浓缩方法): 采用固相萃取装置将 6 mL 的 C<sub>18</sub> 小柱按顺序安装, 依次用 6 mL 甲醇、6 mL 水对 SPE 柱进行预处理, 将提取的溶液以 1.5 mL/min 的流速全部过柱, 然后用 5 mL 水洗涤柱子, 弃去, 再用 10 mL 甲醇洗脱(注意控制流速), 将洗脱液收集至 15 mL 离心管中, 40 °C 水浴氮气吹干, 精密加入 1 mL 乙腈-水(1:1, v/v)溶解残渣, 涡旋 1 min, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取 10 μL 进行液相色谱分析。记录己烯雌酚的峰面积, 根据线性关系计算残留量。

方法 2(中空纤维膜液相微萃取技术): 精密吸取 2.2.3.3 中提取液 250 μL, 用水稀释至 50 mL 置于 50 mL 锥形瓶中, 萃取操作同 2.2.3.1 项, 记录己烯雌酚的峰面积, 根据线性关系计算残留量。

#### 2.2.4 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX XDB-C<sub>18</sub>(5 μm, 4.6 mm×250 mm); 流动相为乙腈-水溶液, 梯度洗脱程序 0.01 min→10 min→10.1 min→18.1 min→20.1 min→23.1 min→28.1 min, 乙腈体积分数相对应为 28%→28%→38%→45%→50%→80%→28%; 检测波长: 245 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 20 °C; 进样体积: 10 μL。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 己烯雌酚的酶解

鸡肉中的己烯雌酚残留以原型药物为主<sup>[11]</sup>, 还有一定比例的共轭结合物残留。这些共轭结合物与原型药物及其它代谢物相比, 极性增强, 水溶性提高, 热稳定性降低, 前处理过程中易损失。本实验采用 β-葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶, 在乙酸盐缓冲液(pH=6.0)中酶解, 水解成游离组分, 减少了提取的损失。

#### 3.2 萃取溶剂的种类与体积

选择合适的有机溶剂是提高萃取效率的关键。本实验考察了正辛醇、正己烷、叔丁基甲基醚等溶剂对己烯雌酚的萃取效率。在己烯雌酚浓度为 15.630 μg/mL, 搅拌速度为 500 r/min, 萃取时间为 30 min 的条件下, 正己烷和叔丁基甲基醚的萃取效果相当。由于叔丁基甲基醚密度和沸点相对较低, 更利于实际操作, 最终选择叔丁基甲基醚为萃取溶剂。

溶剂的体积对分析的灵敏度影响很大。萃取溶剂体积大, 则响应值大, 有利于提高灵敏度, 但萃取的速率小, 平衡时间少; 但降低萃取溶剂和水样的体积比可以提高目标物的富集倍数。实验比较了萃取体积分别为 20、10 μL 时的萃取效果, 发现叔丁基甲基醚的萃取体积为 20 μL 效果较好。

#### 3.3 搅拌速率

对样品进行有效的搅拌可加快分析物的扩散速度, 同时减少水相与有机相之间扩散层的厚度, 从而缩短萃取平衡时间, 提高萃取效率。但如果搅拌速率过快, 纤维壁外侧容易产生气泡从而影响萃取的准确性和重现性, 增大有机溶剂在样品溶液中自身的溶解损失。通过比较, 本实验选择磁力搅拌速度为 500 r/min。

#### 3.4 萃取时间和温度

分析物在萃取平衡时的萃取量将达到最大, 操作过程必须严格控制萃取时间, 才能保证数据的重现性。通过比较, 选择萃取时间为 30 min。

萃取温度对萃取过程有着双重影响, 较高的温度增大扩散系数, 加强对流过程, 缩短平衡时间; 但同时升温会减小分析物的分配系数, 加剧萃取剂的溶解损失。通过比较, 选择萃取温度为 35 °C。

#### 3.5 盐度的影响

萃取过程中在样品溶液里加入一定量的电解质(NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等), 可以增加基体溶液的离子强度, 增大分配系数, 从而提高它们在有机相中的分配, 提高萃取效率<sup>[12]</sup>。本实验考察了 NaCl 含量为 0%、2%、5% (质量分数)时对己烯雌酚萃取效率的影响。盐浓度的增大萃取效率略有降低。因此, 本实验选择不添加 NaCl。

#### 3.6 色谱条件的优化

本实验采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 范围内对己烯雌酚标准品进行全波长扫描, 扫描结果见图 1, 确定其最佳吸收波长为 245 nm, 色谱图见图 2。

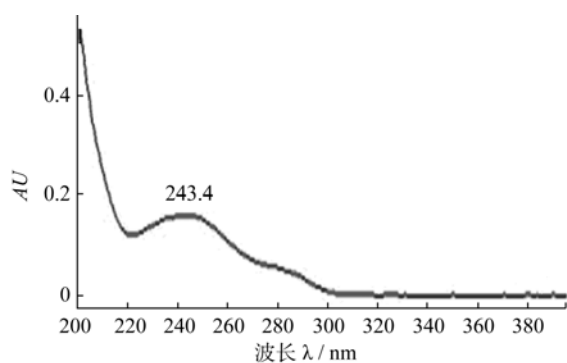


图1 己烯雌酚对照品的PDA吸收光谱图  
Fig.1 PDA spectra of diethylstilbestrol

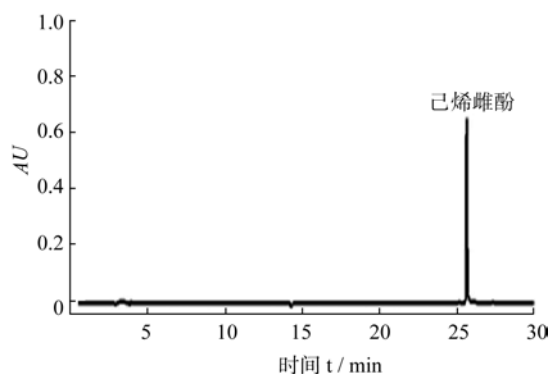


图2 己烯雌酚对照品溶液色谱图  
Fig.2 Chromatogram of reference substance of diethylstilbestrol

### 3.7 线性关系考察

分别取 2.2.2 中配制的己烯雌酚对照品系列溶液 10  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 测定。每个浓度梯度重复检测 2 次。以己烯雌酚 2 次检测的平均峰面积对溶液质量浓度进行线性回归, 得回归方程为:  $Y=34000X+17100$ ,  $R^2=0.9993$ , 线性范围为: 7.814~97.670  $\mu\text{g/mL}$ , 检测限

( $S/N=3$ ) 为 2  $\mu\text{g/kg}$ , 见色谱图 3。

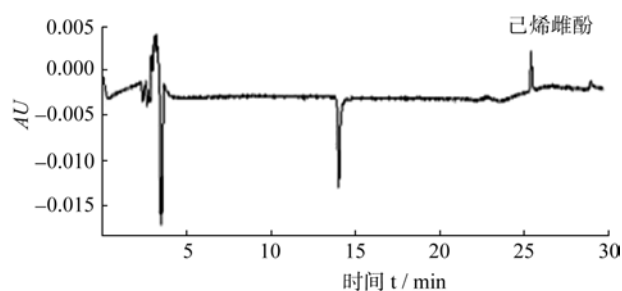


图3 液相微萃取后己烯雌酚检测限色谱图  
Fig.3 The limit of detection of diethylstilbestrol in the methyl tert-butyl ether phase after solvent microextraction

### 3.8 精密度实验

取 2.2.2 中己烯雌酚对照品溶液, 连续进样 6 次, 其保留时间和峰面积的  $RSD(n=6)$  分别为 0.018% 和 0.12%, 均小于 3%。

### 3.9 萃取回收率实验

分别取 2.2.3.4 中方法 2 制备的样品溶液, 同一个体 4 份, 向其中加入己烯雌酚对照品溶液, 分别考察低、中、高 3 个浓度(7.814、15.630、31.250  $\mu\text{g/mL}$  对照品溶液)的萃取回收率, 按照 2.2 节中方法进样, 测定己烯雌酚残留量, 平均回收率( $n=3$ ) 分别为 88.46%、78.07%、83.87%;  $RSD$  分别为 8.36%、1.87%、0.99%, 表明提取回收率稳定, 方法适用性较好。

### 3.10 样品测定

按上述方法处理并测定鸡肉 4 批, 两种方法均未检出己烯雌酚残留; 而按照方法 2 中空纤维膜液相微萃取, 杂质峰明显减少。色谱图见图 4。

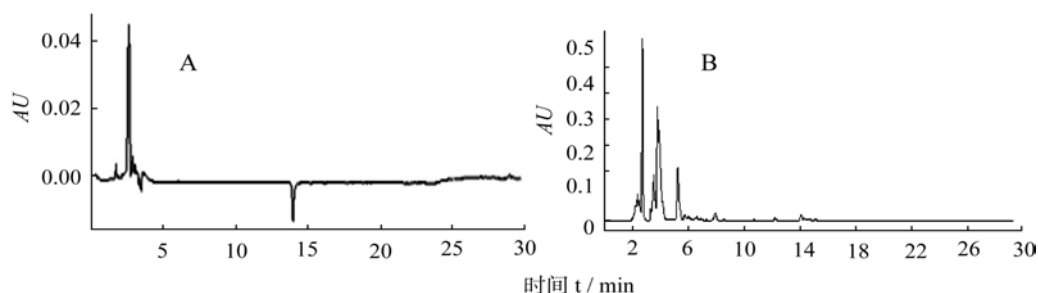


图4 样品溶液 HPLC 色谱图

Fig.4 High pressure liquid chromatograms of sample

A: 液相微萃取后; B: 液相微萃取前

注: A: Sample in the methyl tert-butyl ether phase after solvent microextraction; B: Sample in the methyl tert-butyl ether phase before solvent microextraction

### 3.11 液相微萃取对己烯雌酚富集情况的考察

取己烯雌酚浓度为 7.814  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液, 考察液相微萃取对己烯雌酚的富集情况, 结果表明, 叔丁基甲基醚相己烯雌酚的富集倍数为 40 倍。

## 4 结 论

本实验建立了鸡肉中己烯雌酚残留 HF-LPME-HPLC 确证方法, 此方法对鸡肉中己烯雌酚的检测限为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 加标回收率为 78.07%~88.46%。实验结果表明, 该方法操作简单、能够富集待测样品痕量组分、消除基体干扰, 可以满足对食品中己烯雌酚残留样品前处理和检测的要求, 为建立此类标准和监控方法提供依据。

### 参考文献

- [1] 朱蓓蕾. 动物性食品药物残留 第一版[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 72-98.
- [2] The Council of the European Union. Council Directive 81/602 / EEC[S]. 1981.
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 176 号、第 193 号.
- [4] 动物性食品中兽药最高残留限量(农业部第 235 号公告)5 GB/T 22992-2008, 牛奶和奶粉中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].

- [5] GB/T 20433-2006, 鸡组织中己烯雌酚残留的测定 高效液相色谱-电化学检测器法[S].
- [6] 农业部 1163 号公告-1-2009, 动物性食品中己烯雌酚残留检测酶联免疫吸附测定法[S].
- [7] 农业部 1163 号公告-9-2009, 水产品中己烯雌酚残留检测气相色谱-质谱法[S].
- [8] 农业部 1031 号公告-4-2008, 鸡肉和鸡肝中己烯雌酚残留检测气相色谱-质谱法[S].
- [9] 赵汝松, 徐晓白, 刘秀芬. 液相微萃取技术的研究进展[J]. 分析化学, 2004, 32 (9): 1246.
- [10] 秦燕, 陈捷, 张美金. 动物鸡肉组织中甾类同化激素多组分残留的液相色谱-质谱检测方法[J]. 分析化学研究报告, 2006, 34(3): 298-302.
- [11] Vora-Adesak N, Varanusupakuli P. A Simple Supported Liquid Hollow Fiber Membrane Microextraction for Sample Preparation of Trihalomethanes in Water Samples[J]. J Chromatogr A, 2006, 1121: 236-241.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



朱小红, 女, 副主任药师。  
E-mail: zzxh@yahoo.com.cn