

高效液相色谱法测定斑点叉尾鮰肌肉组织中丁香酚类化合物的残留量

王彩霞^{1,2}, 熊光权¹, 白婵¹, 王炬光¹, 王晒轩¹, 李宁¹, 王俊¹, 钜晓艳¹, 廖涛¹

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北省农产品辐照工程技术研究中心, 湖北武汉 430064)

(2. 武汉工程大学化学与环境工程学院, 湖北武汉 430073)

摘要: 为检测鲜活水产品运输过程中, 丁香酚类麻醉剂的代谢残留情况, 本研究建立了同时检测斑点叉尾鮰肌肉组织中 6 种丁香酚类化合物的高效液相色谱法。取冻干鱼肉肌肉组织用 15 mL 甲醇与乙腈体积比为 2:1 的混合溶液超声提取, 100 mg 疏水气相纳米二氧化硅净化, 过滤处理后。流动相体积比为 58% 甲醇和 42% 的 0.1% 乙酸水溶液, 流速为 0.8 mL/min, 柱温箱为 35 °C, 紫外检测波长为 272 nm, 进样量为 10 μ L, 外标法定量。6 种丁香酚类化合物在 0.02~100.0 μ g/mL 线性关系良好, R^2 均大于 0.999, 在三个不同水平的添加浓度下, 日内平均回收率在 50.52%~97.98% 之间, 相对标准偏差在 1.25%~14.56%, 方法的稳定性和重复性良好。方法的检出限在 0.026~0.121 mg/kg, 该检出限低于日本所规定的丁香酚残留限量标准, 可以用于批量鱼样中多种丁香酚类化合物的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 斑点叉尾鮰; 丁香酚; 残留量

文章编号: 1673-9078(2019)06-301-307

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.040

Determination of Eugenol Residues in Muscle Tissues of Spotted Catfish by High Performance Liquid Chromatography

WANG Cai-xia^{1,2}, XIONG Guang-quan¹, BAI Chan¹, WANG Ju-guang¹, WANG Bing-xuan¹, LI Ning¹, WANG Jun¹, ZU Xiao-yan¹, LIAO Tao¹

(1. Institute of Agro-Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Hubei Engineering Research Center for Farm Products Irradiation, Wuhan 430064, China)

(2. College of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073, China)

Abstract: In order to detect the metabolic residues of eugenol anesthetics during the transportation of fresh aquatic products, a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of six eugenol compounds in the muscle tissue of catfish (*Ictalurus punctatus*) was developed. The freeze-dried fish muscle tissue was ultrasonically extracted with a mixture of 15 mL methanol and acetonitrile (V/V, 2:1), purified by 100 mg of hydrophobic gas phase nano-silica, and filtered. The mobile phase was a mixture of methanol and 0.1% acetic acid solution (V/V, 58:42) with a flow rate of 0.8 mL/min and ultraviolet detection wavelength at 272 nm, the column temperature was 35 °C, the injection volume was 10 μ L, and the external standard method was developed. The linear relationship of six eugenol compounds was good in the range of 0.02~100.0 μ g/mL with a linear regression coefficient more than 0.999. The average intra-recovery was between 50.52% and 97.98% and the relative standard deviation was between 1.25 and 14.56% at three different addition levels. The stability and repeatability of the method were good. The detection limit of the method is 0.026~0.121 mg/kg, which is lower than the residue limit standard of eugenol in Japan. It can be used for the detection of various eugenol compounds in fish samples in batches.

Key words: HPLC; *Ictalurus punctatus*; eugenol; residues

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助 (CARS-46); 湖北省科技特派员项目; 湖北省农业科技创新中心项目 (2019-620-000-001-036)

作者简介: 王彩霞 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品保活运输

通讯作者: 廖涛 (1979-), 男, 研究员, 研究方向: 水产品加工与安全

丁香酚类化合物主要包括: 丁香酚、异丁香酚、乙酸丁香酚、甲基丁香酚、乙酰基异丁香酚、甲基异丁香酚等, 在活鱼捕捞、运输、宰杀过程丁香酚类化合物可使鱼处于镇静状态, 被广泛的应用在渔业麻醉中, 但它并不是在所有国家都被认为是合法的鱼类麻醉剂。美国国家毒理学计划(NTP)^[1]研究发现丁香酚是

一种潜在致癌物质, 甲基丁香酚对于啮齿动物有致癌作用, 因此美国没有批准丁香油及其成分(包括丁香酚、异丁香酚或甲基丁香酚)作为一种食品鱼的麻醉剂, 我国到目前为止并未对其作出相应说明; 相比之下, 新西兰、日本和澳大利亚^[2-4]已经批准丁香酚或异丁香酚作为合法鱼类麻醉剂, 因为它们很快从鱼肌肉组织中代谢干净。这种分歧表明, 丁香酚类化合物作为食用鱼类麻醉剂存在较大争议, 近期 Ke^[5]等首次在我国调查鱼片中丁香酚、异丁香酚、甲基丁香酚的含量, 结果发现在海水鱼中和淡水鱼中检测到麻醉剂的频率分别为 19.4%和 4.7%, 说明我国水产品中丁香酚类药物残留检出率较高。而现阶段人们对于这一问题的关注度越来越高, 因此, 建立一种同时检测水产品中多种药物残留的检测方法变得尤为重要。

为了达到这一目的, 多种分析检测手段已被应用到水产品中的药物残留检测。在检测过程中, 样品预处理是保证测定结果准确的最关键步骤之一, 经过预处理的水产品样品, 基质中杂质大量减少, 明显的降低了该检测方法的检出限^[6], 目前, 应用广泛的预处理方法主要包括: 液液萃取(LLE)^[7]、固相萃取(SPE)^[8]、快速溶剂萃取(ASE)^[9]、分子印迹固相萃取法(MIPs-SPE)^[10]等, 这些方法均存在自身缺陷, LLE 和 ASE 需要大量有机溶剂对目标化合物进行提取, 而 SPE、MIPs-SPE 操作步骤繁琐, 耗时较长。分散固相萃取(DSPE)是近年来发展迅速的一种前处理手段, 它因具有快速、操作简便、费用低廉、高效、且安全等特点变得越来越受欢迎, 自 2003 年 Anastassiades^[11]提出这种样品前处理方法, 目前已被广泛应用到食品、环境水样和土壤污染物等领域多残留检测。Li^[12]等开发了一种基于混合溶剂沉淀和分散固相萃取(DSPE)结合的灵敏净化方法, 可以同时提取鱼胆汁中的 24 种个人护理品, 采用气质联用法可以灵敏的检测出 16 种生物杀灭剂、4 种合成麝香和 4 种苯并三唑。近年来, 该净化方法也被应用于水产品肌肉组织中丁香酚含量的检测, Peng^[13]等提出了一种新型的分散固相萃取技术, 并对 8 种分散固相萃取剂进行筛选, 结合超高效液相色谱-质谱法对虾、蟹、鲤鱼等水产品肌肉组织中丁香酚含量进行检测, 该方法具有检测限低、回收率高、分析时间短等特点, 因此在用于水产品中微量丁香酚残留的检测具有一定优越性。本文采用分散固相萃取技术对斑点叉尾鲴提取液进行净化, 高效液相色谱法检测, 可以同时检测鱼体肌肉组织中 6 种丁香酚类麻醉剂的残留。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

斑点叉尾鲴(约 500 g)购于武汉市白沙洲大市场, 实验前, 先将购买回的鱼暂养 2~3 d。实验前, 将鱼样宰杀、放血、取肉、去皮, 自来水冲洗后用蒸馏水洗, 然后用干净纱布擦去肌肉表面的水渍, 用绞肉机搅碎, 取肉浆平铺在铁盘中, 在冻干机中冷冻干燥 60 h, 记录鱼肉冻干前后的质量, 计算失水率; 将冻干后的鱼肉, 用粉碎机粉碎, 过 0.45 mm 的筛, 将粉碎后的冻干鱼样装入自封口袋中, 做上标记备用。

1.1.2 试剂

丁香酚(CAS 号: 97-53-0)、异丁香酚(CAS 号: 97-54-1)、乙酸丁香酚酯(CAS 号: 93-28-7)、甲基丁香酚(CAS 号: 93-15-2)、乙酰基异丁香酚(CAS 号: 93-29-8)、甲基异丁香酚(CAS 号: 93-16-3), 标准品(纯度均 $\geq 99\%$, TCI), 甲醇(色谱纯, SIGMA-ALORICH; 分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯, SIGMA-ALORICH; 分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 丙酮、正己烷, 国药集团化学试剂有限公司; 水(超纯水), 石墨化碳黑(GCB, CAS 号: 1333-86-4), MACKLIN; 多壁碳纳米管(CAS 号: 308068-56-6), MACKLIN; 疏水气相纳米二氧化硅(CAS 号: 60676-86-0), MACKLIN; PSA(CAS 号: 6377975-02), Agilent; C₁₈(CAS 号: 6374889-01), Agilent; 试剂盒(CAS 号: 6388071-05), Agilent。

1.1.3 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 3K15 离心机, 美国 Sigma-Aldrich 公司; ISO 9001 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; IKA® VORTEX 3 涡旋振荡器, 美国 Sigma-Aldrich 公司; BJ-1000A 粉碎机, 德清拜杰电器有限公司; RE 52-99 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; FD5-2.5 冷冻干燥机, 美国 GOLD-SIM 公司; KQ5200DE 数字超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HSC-24A 氮吹仪, 天津市恒奥科技发展有限公司; Direct-Q® 5UV 超纯水, Millipore 公司。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 0.010 g(精确至 0.0001 g)丁香酚、异丁香酚、乙酸丁香酚、甲基丁香酚、乙酰基异丁香酚、甲基异丁香酚标准品, 用乙腈溶解, 并于棕色容量瓶中定容到 10 mL, 配制成 1 mg/mL 标准母液, 放于 -18 °C 冰箱保存, 有效期 6 个月。使用时用纯色谱纯乙腈将母液稀释成所需浓度的标准液。

1.3 实验方法

准确称取 0.500 g(精确到 1 mg)鱼粉置于 50 mL 的离心管中, 加入 100 mg 纳米二氧化硅, 再加甲醇:乙腈 (V:V) 为 2:1 的混合溶液 5 mL, 涡旋振荡 1 min, 超声 10 min 后以 10000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于另一 50 mL 离心管中, 残渣用以上步骤重复提取两次, 合并上清液, 倒入 50 mL 鸡心瓶中于 40 °C 水浴中旋蒸干, 用上述提取混合液多次清洗鸡心瓶, 将清洗液转移到 5 mL 的离心管中, 40 °C 氮吹至干。加 1 mL 乙腈重新溶解, 摇匀, 过 0.45 μm 有机滤膜, 进样检测。

1.4 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C18 色谱柱 (250×4.60 mm, 5.00 μm); 柱温: 35 °C; 流动相为甲醇:0.1%乙酸水 (V:V) =58%:42%; 流速: 0.8 mL/min; 检测器: UV 检测器; 检测波长: 272 nm; 进样量: 10 μL。

1.5 数据统计分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2010, 图表的绘制采用 Origin 9.0 软件。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

众所周知, HPLC 柱温度的增加会导致保留时间的减少, 在分离 6 种丁香酚类化合物标液过程中, 柱温箱温度的变化对分离效果有明显的影响, 在本实验中, 主要考查了 33、35、37、39、41、43 °C 等温度对于分离效果的影响, 发现随温度的升高, 丁香酚、异丁香酚、乙酸丁香酚酯、甲基异丁香酚的分离效果影响不大, 但是, 甲基丁香酚、乙酰基异丁香酚随温度升高, 先分开, 后又合并到一起, 在 35 °C 时, 分离效果最好, 即在 HPLC 分析过程中柱温箱温度保持在 35 °C。

流动相的选择过程中发现, 在相同的 HPLC 条件下, 丁香酚类化合物在甲醇中的响应比在乙腈中的响应强得多, 当水系由纯水换为 0.1% 的乙酸水溶液时, 6 种丁香酚类化合物的响应值均会明显变大, 因此, 本论文采用甲醇-0.1% 乙酸水溶液作为流动相, 当流动相比例为 V(甲醇):V(0.1% 乙酸水溶液)=58:42 时, 6 种

丁香酚类化合物均可以分开, 且每个峰峰形尖锐对称, 因此后续实验采用此流动相。图 1 为该条件下的 6 种丁香酚混合标品的色谱图。

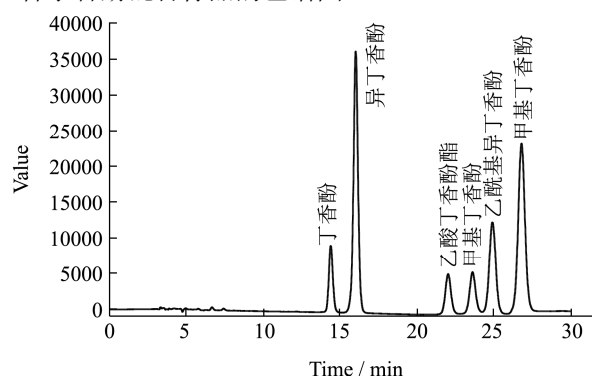


图 1 6 种丁香酚化合物标准溶液色谱图

Fig.1 Standard solution chromatogram of 6 eugenol compounds

2.2 提取剂的影响

6 种丁香酚类化合物结构相似均含有一个苯基基团, 属于脂溶性化合物, 在其残留量分析过程中, 显然选择有机试剂对目标化合物进行提取对实验结果是有益的, 根据文献知, 丁香酚属于中等级性化合物, 而丁香酚、异丁香酚、乙酸丁香酚酯、甲基丁香酚、乙酰基丁香酚、甲基异丁香酚极性依次减小。实验过程选取添加量为 0.5 mg/kg 混标的冻干空白鱼样为研究对象, 分别选用乙腈、甲醇、乙酸乙酯等有机试剂进行探索, 结果如表 1, 根据它们对丁香酚化合物的回收率, 这些提取剂可以分为两组: 极性组包含乙腈、甲醇和乙酸乙酯; 非极性组包含: 正己烷和丙酮, 非极性组中 6 种丁香酚化合物的回收率较低, 可能是非极性有机溶剂提取过程将鱼体内的大量脂质提出, 使脂质和目标化合物混合, 导致 6 种化合物回收率普遍偏低。极性组中甲醇和乙腈的提取效果明显优于乙酸乙酯, 乙腈提取液澄清透明, 但使用乙腈提取异丁香酚的回收率相对偏低, 甲醇提取 6 种化合物回收率均较高, 但甲醇含羟基基团, 与鱼样中的油脂含有相同化学基团, 提取液呈淡黄色, 浓缩后经检测发现甲醇提取液杂质峰响应较高, 会影响目标化合物的峰形效果, 即后续实验采用乙腈和甲醇按一定比例混合提取。如图 2 为乙腈和甲醇按一定比例提取的效果图, 随甲醇体积比例增高, 目标化合物的回收率先增大后减小, V(甲醇):V(乙腈) 为 2:1 为最佳体积比, 即后续实验均采用此溶液对鱼样中目标化合物提取。

表 1 不同溶剂对提取效果的影响

Table 1 The effect of different solvent on the extraction (n=3)

提取剂	麻醉剂							
	丁香酚		异丁香酚		乙酸丁香酚		甲基丁香酚	
	回收率/%	RSD/%	回收/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
乙腈	81.12	10.04	53.82	1.38	86.22	12.32	83.95	12.81
甲醇	83.29	1.30	86.22	4.82	74.93	4.83	80.23	13.52
乙酸乙酯	72.28	1.84	76.23	4.93	76.13	7.63	69.05	2.01
丙酮	84.37	7.32	60.32	10.41	-	-	85.84	23.11
正己烷	93.16	23.91	-	-	-	-	11.42	-

提取剂	麻醉剂				提取剂颜色	提取剂浑浊度	峰形	基线噪音
	乙酰基丁香酚		甲基异丁香酚					
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%				
乙腈	89.61	13.01	84.02	11.80	无色	澄清透明	尖锐对称	较小
甲醇	71.13	1.01	83.01	5.02	淡黄色	比较澄清	尖锐对称	较小
乙酸乙酯	76.72	5.32	87.72	5.23	淡黄色	非常浑浊	部分峰不对称	较大
丙酮	-	-	96.91	5.41	淡黄色	较浑浊	部分峰分离不开	很大
正己烷	92.34	15.71	-	-	淡黄色	较浑浊	部分峰分离不开	很大

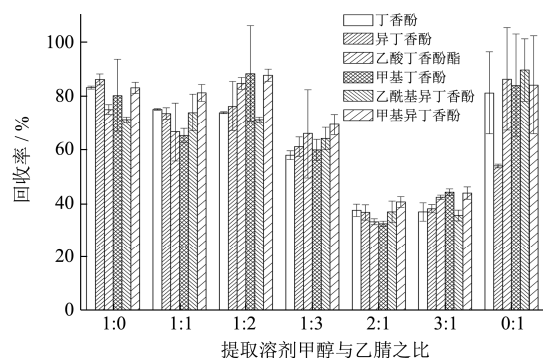


图 2 甲醇与乙腈的体积比对提取效果的影响

Fig.2 The effect of volume ratio of methanol to acetonitrile on extraction efficiency

2.3 净化剂的优化

2.3.1 不同净化剂的选择

鱼体内含有大量的蛋白质和脂质，属于基质复杂样品。对于鱼体内药物残留分析，目标化合物通过有机溶剂萃取过程，会有大量有机杂质一同被萃取出来，直接进样检测杂质会导致检测器不灵敏，因此，提取后对提取液进行净化是重要的一步，本研究采用 DSPE 法进行净化，DSPE 通常采用的净化剂有 PSA、C₁₈、GCB 等。作为复杂基质样品的吸附剂，根据基质的不同，可以有目的的添加对应的吸附剂以除去样品中的杂质。据有关报道指出^[13,14]，PSA 可以去除基质中的糖、酚和脂肪酸；C₁₈ 对于脂肪的吸附有特异性效果，GCB 能去除基质中的弱极性色素。Peng Sun^[3]通过研究 8 种不同吸附剂的不同添加量对鱼样

中丁香酚的回收率效果，发现 PSA、GCB、C₁₈ 对杂质有吸附作用，PSA、C₁₈ 处理的样品丁香酚的回收率随着吸附剂用量的增加而逐渐降低，GCB 处理的样品进行紫外吸收和质谱分析时，发现紫外信号明显降低，而总离子色谱强度几乎没有变，这与本研究的结果是相似的。如表 3 所示，本研究中选用的 6 种常用吸附剂中，当添加量为 100 mg 时，前 5 种吸附剂对目标化合物回收率均有影响，只有疏水气相纳米二氧化硅^[15]因具有比表面积大、表面吸附性强、分散性好等特点不仅可以起到净化效果，6 种目标化合物的回收率均在 65% 以上，符合农残分析要求。即后续实验采用疏水气相纳米二氧化硅净化。

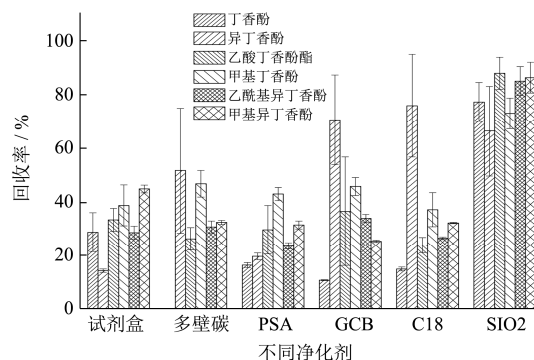


图 3 不同吸附剂对丁香酚类化合物回收率的影响

Fig.3 The effect of different adsorbents on the recovery rate of eugenol compounds

2.3.2 净化剂添加量的选择

为了在检测过程中保证检测的灵敏度又保证一定的回收率，在上述实验研究的基础上，分别考察了 50、

100、150、200 mg 疏水气相纳米二氧化硅的净化效果和回收率，图 4 为不同数量的疏水气相纳米二氧化硅对回收率的影响，结果表明随疏水气相纳米二氧化硅用量的增加，6 种目标化合物的回收率呈现先上升后下降的趋势，添加量为 100 mg 时回收率达到相对最大值，超过 100 mg 时，随添加量增大，目标化合物异丁香酚的回收率受到明显影响，综合考虑净化效果，选择添加量为 100 mg 为最佳净化剂用量。

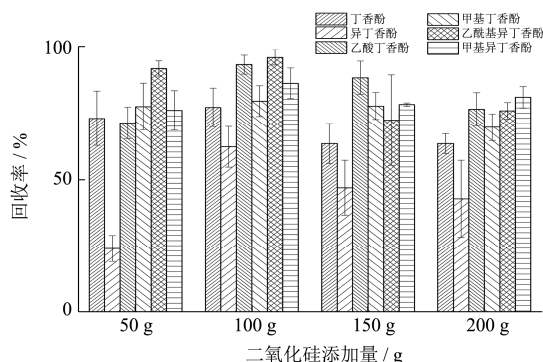


图 4 不同添加数量的 SiO₂对回收率的影响

Fig.4 The effect of dosage of the SiO₂ on the recovery rate

2.3.3 净化剂添加时间的影响

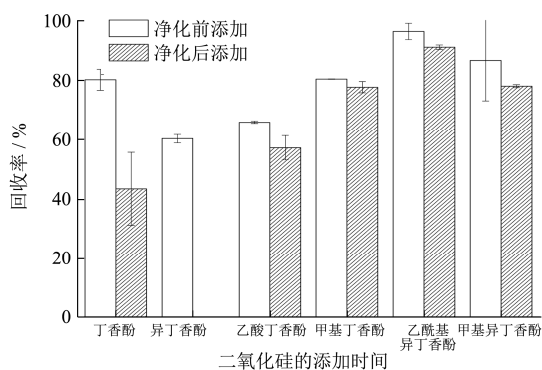


图 5 净化剂添加时间对回收率影响

Fig.5 The effect of adding time of purifying agent on the recovery rate

疏水气相纳米二氧化硅因其粒径很小，比表面积大，对杂质的吸附作用极强，对于二氧化硅的添加时间本文通过两个时期加入，分别考察其净化效果和回

表 2 六种丁香酚类化合物的线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限

Table 2 The linear equations, correlation coefficient, linear range, detection limit and limits of quantification of six kinds of clove phenol compounds

名称	标准曲线	R ²	线性范围/(μg/mL)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
丁香酚	y=0.000118826x+0.0259557	0.99998	0.08~80	0.047	0.156
异丁香酚	y=0.0000257127x+0.0273844	0.99999	0.02~20	0.053	0.175
乙酸丁香酚酯	Y=0.000139607x+0.117439	0.99999	0.1~100	0.114	0.380
甲基丁香酚	Y=0.000132006x+0.295053	0.99979	0.09~90	0.121	0.403
乙酰基异丁香酚	Y=0.0000609754x+0.0155076	0.99983	0.04~20	0.045	0.149
甲基异丁香酚	Y=0.0000281398x+0.0543832	0.99994	0.02~20	0.026	0.087

收率，当在提取过程加入二氧化硅，净化充分且此时提取液未经浓缩，净化效果和回收率均较高；当经浓缩后再加二氧化硅净化时，净化效果与上述相差不多，但回收率明显降低，综合考虑净化效果和回收率均较高，选取提取过程与净化过程同时进行的实验形式，这样既用时较短又达到了理想的实验效果，两种不同的净化剂添加时间结果如图 5。

经过以上对鱼样提取条件和净化条件的优化，利用最佳提取条件和净化条件处理空白鱼样和加标鱼样的色谱图如图 6 和图 7 所示。

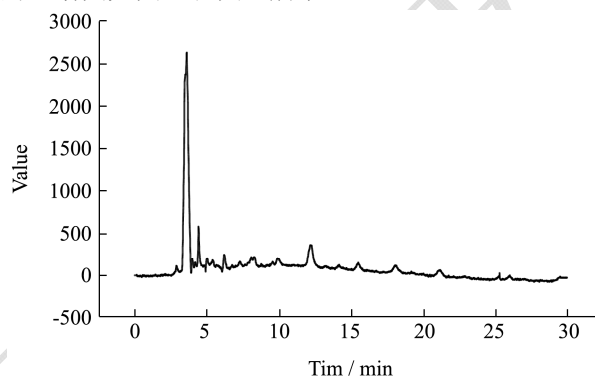


图 6 空白鲷鱼样品色谱图

Fig.6 Chromatogram of blank squid sample

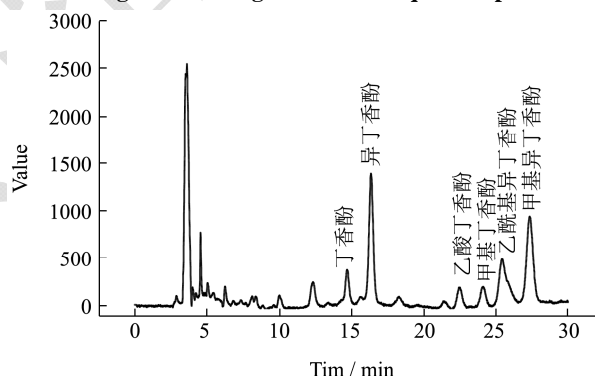


图 7 鲷鱼加标样品色谱图

Fig.7 Chromatogram of squid spiked sample

2.4 方法的线性方程、检出限、定量限

用标准溶液母液梯度稀释成一系列浓度的标准溶液,在优化好的色谱条件下进样检测,以标准溶液浓度作为横坐标,对应峰面积作为纵坐标,建立标准曲线方程,结果如表2所示,6种丁香酚类化合物在其相应的线性范围内,线性拟合关系良好($R^2 > 0.999$),空白样品加标经提取净化后,以3倍信噪比($S/N=3$)计算该方法6种目标化合物的方法检出限为0.026~0.121 mg/kg,10倍信噪比($S/N=10$)计算定量限为0.087~0.403 mg/kg,与现有有规定相比,此方法丁香酚的检出限为0.047 mg/kg,低于日本规定的最大残留限量标准($MRL=0.05$ mg/kg)^[16],异丁香酚检出限为0.053 mg/kg,低于新西兰规定的最大残留限量标准($MRL=0.1$ mg/kg)^[17],可以用于渔业中丁香油麻醉的残留检出。

2.5 鱼样的加标回收率及方法的稳定性

取空白斑点叉尾鲷背部肌肉组织冻干样品,按照上述优化好的前处理方法分别添加6种丁香酚类化合物混标,做鱼样为0.1、0.5、1 mg/kg三个水平的添加回收试验,每个水平设计6次平行实验,同时,为了验证该方法的重现性,对以上三个相同浓度添加水平进行了日间加标回收试验,结果见表3。由表可知,6种化合物在三个水平的添加下日内平均值回收率保持在

50.52%~97.18%之间,相对标准偏差在1.25%~14.56%之间,日间与日内平均回收率相差不大,保持48.95%~92.45%,相对标准偏差在3.98%~18.11%之间,该方法稳定性较好,符合渔业药残检测技术的要求。通过多水平添加浓度样品的检测验证,说明分散固相萃取前处理方法的实用性良好,为在检测技术的推广提供了有力的技术支撑。

2.6 实际样品的检测

以上分析方法得到验证后,用它来监测实际市场上获得的鱼样中丁香酚类化合物的残留剂量。鱼样分别于夏季和冬季购于武汉白沙洲大市场,结果发现所取鱼样本中除丁香酚外均未发现其他丁香酚类化合物。冬季采集的鱼样中丁香酚残留量在1.73~5.05 mg/kg之间;夏季所采集鱼样中丁香酚的含量在10.5~14.99 mg/kg,显然,夏季鱼体内丁香酚残留量明显高于冬季,这可能是由于夏季长途运鱼对温度要求严格,需要加入更大量的麻醉剂来实现远距离运输。夏季鱼样中丁香酚含量是FAO^[18]规定的丁香酚作为食品添加剂日摄入量(ADI)2.5 mg/kg的4~6倍,这一结果表明,丁香酚在中国已被私下用作食用鱼的麻醉剂且鱼上市之前残留丁香酚并未代谢到残留限量标准以下。

表3 空白样品加标回收率和相对标准偏差

Table 3 Recoveries and relative standard deviations for blank samples spiked with standards (n=6)

化合物名称	加标浓度/(mg/kg)	日内		日间	
		平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
丁香酚	0.1	52.52	1.25	51.82	11.92
	0.5	84.23	11.25	79.20	16.52
	1	90.32	6.51	87.84	14.80
异丁香酚	0.1	50.52	7.90	48.95	9.94
	0.5	72.69	9.22	68.19	17.78
	1	80.55	9.34	78.63	10.04
乙酸丁香酚	0.1	56.92	13.35	55.09	16.18
	0.5	76.15	9.49	74.09	14.90
	1	84.61	5.40	82.81	5.44
甲基丁香酚	0.1	51.47	8.74	50.21	8.70
	0.5	69.76	9.97	68.40	8.67
	1	69.97	1.96	69.75	3.98
乙酸基异丁香酚	0.1	60.34	9.58	58.57	9.60
	0.5	83.83	3.62	79.79	4.07
	1	97.18	12.35	92.45	11.13
甲基异丁香酚	0.1	55.85	14.56	53.81	18.11
	0.5	64.31	3.78	63.48	8.48
	1	72.01	3.96	71.31	4.52

3 结论

本研究开发了用于定量测定斑点叉尾鮰组织样品中6种丁香酚类化合物的DSPE-HPLC方法,为实现尽可能低的方法检出限,对提取条件和净化条件进行了优化。使用甲醇-乙腈混合提取,100 mg 二氧化硅于提取过程中同时进行净化获得了最佳结果,该方法确立以后,通过日内与日间实验证明方法具有良好的重复性和灵敏度,分析得该方法的检出限和定量限分别为0.026~0.121 mg/kg 和0.087~0.403 mg/kg,方法的检出限低于已有规定的丁香酚最大残留限量标准,且该方法操作简单、耗时较短、未用到稀有仪器、净化剂价格低廉,可以应用到实际大规模鱼样的检测中来。同时,对于实际样品的检测分析可以证明,虽然现阶段我国并未对丁香酚类麻醉剂作出可以用于渔业麻醉运输的规定,但是渔农为达到一定的经济效益,已经开始私自使用,建议我国应尽快出台相关的法律法规,尽量将麻醉剂残留量控制在人体每天可接受的最大量之下。

参考文献

- [1] Fish Program N T. Carcinogenesis studies of eugenol (CAS No. 97-53-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies) [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 1983, 223: 1-159
- [2] Bowker J, Trushenski J, Tuttlelau M, et al. Guide to Using Drugs, Biologics, and Other Chemicals in Aquaculture [M]. American Fisheries Society Fish Culture Section, 2011
- [3] Eric Wagner, Ronney Arndt, Blaine Hilton. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide [J]. Aquaculture, 2002, 211(1): 353-366
- [4] Scherpenisse P, Bergwerff A A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1-2): 407-410
- [5] Ke C, Liu Q, Li L, et al. Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets [J]. Aquaculture, 2018, 484: 338-342
- [6] Huerta B, Jakimska A, Gros M, et al. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1288: 63-72
- [7] 赵艳,王丽敏,刘耀敏,等.冻干鲤鱼粉中恩诺沙星和环丙沙星残留测定的两种前处理方法比较[J].食品科学,2011, 32(2):227-230
- [8] ZHAO Yan, WANG Li-min, LIU Yao-min, et al. Comparison of two pretreatment methods for determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in freeze-dried salmon powder [J]. Food Science, 2011, 32(2): 227-230
- [9] Salvador A, Moreton C, Piram A, et al. On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1145(1): 102-109
- [10] 邓磊,陈芬,龚娴.快速溶剂萃取~固相萃取净化~气相色谱法测定土壤中的六六六和滴滴涕农药[J].化工管理, 2016,12:185
- [11] DENG Lei, CHEN Fen, GONG Xian. Determination of BHC and DDT pesticides in soil by rapid solvent extraction ~ solid phase extraction purification-gas chromatography [J]. Chemical Industry Management, 2016, 12: 185
- [12] 何洪健.分子印迹固相萃取技术在水产品丁香酚类麻醉剂检测中的应用[D].湛江:广东海洋大学,2016
- [13] HE Hong-jian. Application of molecularly imprinted solid phase extraction in the detection of aquatic eugenol anesthetic [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016
- [14] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(2): 412-431
- [15] Yao L, Lv Y Z, Zhang L J, et al. Determination of 24 personal care products in fish bile using hybrid solvent precipitation and dispersive solid phase extraction cleanup with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1551(25): 29-40
- [16] Sun P, Gao Y, Lian Y. Determination of eugenol in aquatic products by dispersive solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Analytical Methods, 2017, 1: 1-8
- [17] Liu J, Tong L, Meng W, et al. Determination of 135 pesticides and their metabolites in *Angelica sinensis* by ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction [J]. Se Pu, 2015, 33(12): 1257-1268

(下转第 272 页)