



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105044249 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201510357173.3

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.06.25

G01N 30/06(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 王桂丽

申请公布号 CN 105044249 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(73)专利权人 中华人民共和国福清出入境检验检疫局

地址 350300 福建省福州市福清市清荣大道口岸园区

(72)发明人 丁立平 蔡春平 郑香平 张睿 郭菁 许仁杰

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

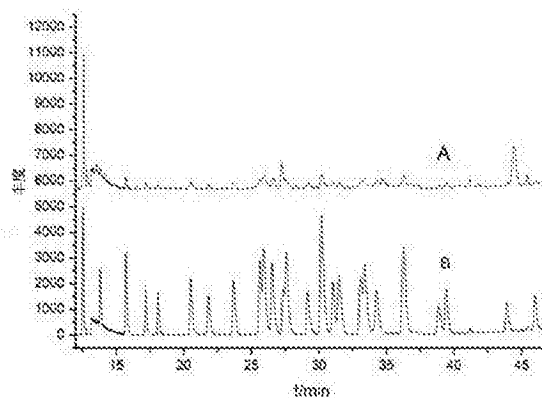
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒及其应用。所述的试剂盒由试剂I和试剂II组成；试剂I由以下原料混合而成：氯化钠1.0 g；无水硫酸钠2.0 g；水合铝酸碳酸镁2.0 g；试剂II由以下原料混合而成：酸化硅胶4.0 g，无水硫酸钠2.0 g。在检测水产品中28种多氯联苯时，采用本发明所研制的试剂盒及其应用方法，不需要配备昂贵的去除样品中脂肪的前处理设备，以及使用复杂、低效率、低通量的柱层析前处理过程，具备检测速度快、灵敏度高、选择性强、准确性高等优点，可满足于常规实验室对水产品样品中28种多氯联苯的检测需要。应用本发明可同时测定水产品样品中28种多氯联苯的含量，具有简便、快捷、准确等特点。



1. 一种水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒,其特征在于:所述的试剂盒由试剂I和试剂II组成;试剂I由以下原料混合而成:氯化钠1.0 g;无水硫酸钠2.0 g;水合铝酸碳酸镁2.0 g;试剂II由以下原料混合而成:酸化硅胶4.0 g,无水硫酸钠2.0 g;所述的28种多氯联苯为:PCB8、PCB18、PCB28、PCB52、PCB44、PCB66、PCB101、PCB81、PCB77、PCB123、PCB118、PCB114、PCB153、PCB105、PCB138、PCB126、PCB187、PCB128、PCB167、PCB156、PCB157、PCB180、PCB169、PCB170、PCB189、PCB195、PCB206、PCB209;试剂I的配制方法为:于50 mL具塞塑料离心管中称取氯化钠1.0 g,无水硫酸钠2.0 g,水合铝酸碳酸镁2.0 g,涡旋混匀;试剂I中水合铝酸碳酸镁其纯度为99.5%,平均粒径1.5 μm ;试剂II的配制方法为:

1) 酸化硅胶的配制:于500 mL烧杯中称取硅胶60.0 g,向其中添加浓硫酸40.0 g,研磨混匀,得到酸化硅胶100.0g;

2) 称量50.0 g无水硫酸钠,并连同步骤1)中得到的酸化硅胶装入圆底烧瓶中,并将烧瓶用旋转蒸发器旋转1 h~2 h,使之混和均匀无结块;

3) 于50 mL具聚乙烯瓶盖玻璃瓶中称取6.0 g上述混合物,密封保存;试剂II中酸化硅胶的粒径范围48~75 μm 。

2. 一种如权利要求1所述的水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒的应用,其特征在于:包括以下步骤:

1) 样品中多氯联苯的提取:在装有试剂I的离心管中加入水产品样品,采用二氯甲烷、正己烷的混合溶剂对多氯联苯进行高速匀浆提取,离心,取上清液;混合溶剂中二氯甲烷、正己烷的体积比为1:1;

2) 净化:将步骤1)得到的上清液加入装有试剂II的离心管中,涡旋、离心,取上清液,浓缩,定容,过滤和气相色谱质谱分析测试,采用基质匹配工作溶液校正定量;气相色谱条件:色谱柱:HP-5MS毛细管,30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm ;载气:高纯氦气,99.999%,恒流模式,柱流速:0.80 mL/min;进样量:2.00 μL ,不分流进样;进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$;柱温升温程序:初始温度80 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min,以15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至190 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min,以2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至260 $^{\circ}\text{C}$,保持10 min,以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至300 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min;质谱条件:电子轰击离子源,EI源,电子轰击能量70 eV,单四极质量分析器;离子源温度230 $^{\circ}\text{C}$;四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$;传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

3. 根据权利要求2所述的水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒的应用,其特征在于:所述的步骤1)中水产品样品的加入量为2.0 g,用量为30~40 mL;所述的高速匀浆条件为:以10000~15000 rpm分散匀浆提取1~3min。

4. 根据权利要求2所述的水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒的应用,其特征在于:步骤2)中所述的涡旋、离心为:涡旋0.5~2min,以转速4000~5000r/min转速离心3~5min;上清液在35~45 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸干。

水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域,涉及水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 多氯联苯(PCBs)是一类人工合成的有机化合物,在自然条件下难以分解,具有很高的残留性,已经被列为环境持久污染物之一。该类物质可以在动物的脂肪内富集,对生物有“致畸、致突变、致癌”危害,且其化学性质稳定、难于被降解,同时可通过多种载体进行迁移,并通过食物链向人体内富集。全球环境监测系统/食品规划部分(GEMS/Food)中规定了7种多氯联苯同系物异构体作为PCBs污染状况的指示性单体(Indicator PCBs),世界卫生组织(WHO)又对食品中12种具有平面结构的类二噁英多氯联苯的毒性当量因子做出规定,同时美国国家标准与技术研究院(NIST)和国家海洋和大气局(NOAA)对其他的9种多氯联苯在环境样品、水生生物体内的含量及其毒性均高度关注。

[0003] 我国对食品中多氯联苯污染物的危害也高度关注,于2015年5月1日出台了新的食品中多氯联苯含量测定的国家标准(GB 5009.190-2014),其中包括7种指示性多氯联苯和12种具有平面结构的二噁英类结构多氯联苯。

[0004] 可见,多氯联苯已成为危害人类健康的重要因素并引起了人们广泛、高度的关注。多个国家和地区对食品中多氯联苯类物质均设定了相应的最大残留限量(MRL),其中欧盟对油脂、动物肉类及其制品、奶粉、水产品及其制品等多种产品设定了最大残留量值要求,我国也将水产动物及其制品中的残留限量设定为0.5 mg/kg。

[0005] 当前关于食品中多氯联苯的检测方法中,前处理提取方法主要集中于索氏提取法、振荡提取法、加速溶剂提取法、微波辅助提取法及超声波辅助提取法等;常用的净化方法有固相萃取法、凝胶渗透色谱结合固相萃取法、基质固相萃取法及酸处理法等。实际上,现有的标准和文献报道方法中对于水产品样品中此规定的28种多氯联苯含量未给出较快速的检测前处理方法,存在对前处理设备要求高、选择性差、前处理操作步骤繁琐、检测耗时长、效率低等缺点,难以满足我国相关检测机构对水产品中多氯联苯快速检测筛查的需求。

[0006] 我国是水产品生产、加工和进出口大国,对水产品中该类物质检测的需求量巨大,因此,针对水产品中28种多氯联苯含量的快速检测的需求,开发出实用的快速检测前处理试剂盒及其应用方法具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于针对现有水产品中28种多氯联苯检测前处理技术中存在的慢速、低效、高成本、低通量等不足,开发一种操作简便、灵敏度高、结果准确且能够满足28种多氯联苯含量同时定量检测的前处理试剂盒及其应用。该试剂盒及其应用不需要配备昂贵的去除样品中脂肪的前处理设备,以及反复使用复杂、低效率、低通量的柱层析前处理过

程,具备检测速度快、灵敏度高、选择性强、准确性高等优点。

[0008] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 除非另有说明,本发明所采用的百分数均为质量百分数,使用试剂均为分析纯。

[0010] 一种水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒,由试剂I和试剂II组成;试剂I由以下原料混合而成:氯化钠1.0 g;无水硫酸钠2.0 g;水合铝酸碳酸镁2.0 g;试剂II由以下原料混合而成:酸化硅胶4.0 g,无水硫酸钠2.0 g。

[0011] 试剂I中水合铝酸碳酸镁其纯度为99.5%,平均粒径1.5 μ m。

[0012] 试剂I的作用为去除溶剂提取过程中被共提取出的极性物质,减小后续净化步骤的难度;减少极性物质对色谱分析系统的污染,减少色谱系统维护成本。

[0013] 试剂II中酸化硅胶的粒径范围48~75 μ m。

[0014] 试剂II的作用为去除提取过程中的脂肪酸类物质、蛋白质类物质及部分脂溶性色素。

[0015] 试剂I的配制方法为:于50 mL具塞塑料离心管中称取氯化钠1.0 g,无水硫酸钠2.0 g,水合铝酸碳酸镁2.0 g,涡旋混匀。

[0016] 试剂II的配制方法为:

[0017] 1)酸化硅胶的配制:于500 mL烧杯中称取硅胶60.0 g,向其中添加浓硫酸40.0 g,研磨混匀,得到酸化硅胶100.0 g;

[0018] 2)称量50.0 g无水硫酸钠,并连同步骤1)中得到的酸化硅胶装入圆底烧瓶中,并将烧瓶用旋转蒸发器旋转1 h~2 h,使之混和均匀无结块;

[0019] 3)于50 mL具聚乙烯瓶盖玻璃瓶中称取6.0 g上述混合物,密封保存。

[0020] 一种如上所述的水产品中28种多氯联苯快速检测前处理试剂盒的应用,包括以下步骤:

[0021] 1)样品中多氯联苯的提取:在装有试剂I的离心管中加入水产品样品,采用二氯甲烷、正己烷的混合溶剂对多氯联苯进行高速匀浆提取,离心,取上清液;

[0022] 2)净化:将步骤1)得到的上清液加入装有试剂II的离心管中,涡旋、离心,取上清液,浓缩,定容,过滤和气相色谱质谱分析测试,采用基质匹配工作溶液校正定量。

[0023] 所述的步骤1)中水产品样品的加入量为2.0 g,混合溶剂中二氯甲烷、正己烷的体积比为1:1,用量为30~40 mL;所述的高速匀浆条件为:以10000~15000 rpm分散匀浆提取1~3min。

[0024] 步骤2)中所述的涡旋、离心为:涡旋0.5~2min,以转速4000~5000r/min转速离心3~5min;上清液在35~45 $^{\circ}$ C旋转蒸干。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0026] ①本发明能应用于水产品中28种多氯联苯含量的同时快速测定,可以解决现有技术对前处理设备要求高、前处理操作步骤繁琐、检测耗时长、效率低等缺点;

[0027] ②本发明具有检测速度快,灵敏度高、准确率高、选择性好、对前处理设备要求低、在常规检测实验室中适应性好等优点;

[0028] ③操作方法简便、回收率高、重现性好。

附图说明

[0029] 图1为试剂I和试剂II及其组合而成的试剂盒包装图；

[0030] 图2 为28种多氯联苯的标准色谱图；按照时间顺序从左至右PCBs的编号顺序为：PCB8、PCB18、PCB28、PCB52、PCB44、PCB66、PCB101、PCB81、PCB77、PCB123、PCB118、PCB114、PCB153、PCB105、PCB138、PCB126、PCB187、PCB128、PCB167、PCB156、PCB157、PCB180、PCB169、PCB170、PCB189、PCB195、PCB206、PCB209；

[0031] 图3 为对比例1和实施例1的对比色谱图；其中A为对比例1色谱图，B为实例1色谱图，添加的浓度水平均为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

具体实施方式

[0032] 下面结合实例对本发明作进一步地说明，但本发明的保护范围并不限于此。

[0033] 实施例1

[0034] 以鲳鱼为样品：

[0035] 于装有试剂I的50 mL具塞离心管中加入鲳鱼样品2.00 g，加入35.0 mL的二氯甲烷+正己烷(v/v=1/1)混合液，以11000 rpm高速分散匀浆提取1 min，离心管以4500 r/min转速离心5 min，取上清液；上清液全部倾倒入装有试剂II的50 mL具塞离心管中，涡旋1 min，离心管以4500 r/min转速离心5 min；上清液全部倾倒入100 mL鸡心瓶中，在40 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至近干，用2.00 mL正己烷定容并经0.22 μm 滤膜过滤，待分析。

[0036] 基质匹配工作曲线的制定：取适量的28种多氯联苯混合标准物质，用正己烷配制成1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准储备液，于-4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用；

[0037] 分别称取2.00 g的空白鲳鱼样品，按照上述方法进行提取和净化，得到空白基质的提取液。以空白基质提取液和适量的标准储备液配制得到基质匹配工作曲线，校正曲线浓度点分别为10、20、40、100、500 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；

[0038] 样品测定：

[0039] ①使用气相色谱-质谱联用仪(配备EI源)对分析样品进行测定，分析测试条件如下：

[0040] 气相色谱条件：

[0041] 色谱柱：HP-5MS毛细管(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm)；载气：高纯氦气(99.999%)，恒流模式，柱流速：0.80 mL/min；进样量：2.00 μL ，不分流进样；进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$ ；柱温升温程序：初始温度80 $^{\circ}\text{C}$ ，保持2 min，以15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至190 $^{\circ}\text{C}$ ，保持2 min，以2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至260 $^{\circ}\text{C}$ ，保持10 min，以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至300 $^{\circ}\text{C}$ ，保持1 min。

[0042] 质谱条件：

[0043] 电子轰击离子源(EI源)，电子轰击能量70 eV，单四极质量分析器；离子源温度230 $^{\circ}\text{C}$ ；四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$ ；传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$ ，各化合物出峰顺序及定量、定性离子见表1。

[0044] 应用与仪器相配的色谱工作站软件对分析数据进行采集和分析；其中基质匹配校正曲线质量浓度点分别为10、20、40、100和500 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，以工作溶液的峰面积为纵坐标(Y)，质量浓度为横坐标(X， $\mu\text{g}/\text{kg}$)绘制校正曲线；分别对空白样品、校正曲线浓度点、质控样品和实际样品进行分析测试与数据采集。

[0045] 用基质匹配校正曲线对水产品中28种多氯联苯含量进行校正，计算得到含量值。

[0046] 测定鲳鱼样品的定量和定性离子、线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量

限见表1；

[0047] 表1 鲑鱼中28种多氯联苯的定量和定性离子、线性方程、相关系数、线性范围、检出限

[0048]

序号	分析物	定性和定量离子 m/z	线性方程	相关系数	线性范围 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	保留时间 (min)	检出限 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	PCB8	222,224,130	$Y = 3730X + 11300$	0.999	10 ~ 500	12.212	0.8
2	PCB18	256,258,186	$Y = 1780X - 2820$	0.999	10 ~ 500	13.445	1.0
3	PCB28	256,258,186	$Y = 2780X + 17600$	0.999	10 ~ 500	15.315	1.1
4	PCB52	292,290,294	$Y = 1680X + 7260$	0.999	10 ~ 500	16.626	2.0
5	PCB44	292,290,294	$Y = 1840X + 15700$	0.999	10 ~ 500	17.332	2.1
6	PCB66	292,290,294	$Y = 1960X + 17500$	0.999	10 ~ 500	19.819	2.2
7	PCB101	328,324,328	$Y = 1300X + 13100$	0.999	10 ~ 500	21.302	2.3
8	PCB81	292,290,294	$Y = 1870X + 15000$	0.999	10 ~ 500	22.813	2.5
9	PCB77	292,290,294	$Y = 1970X + 16900$	0.995	10 ~ 500	23.488	2.4
10	PCB123	328,324,254	$Y = 1360X + 13900$	0.999	10 ~ 500	24.788	2.8
11	PCB133	326,324,254	$Y = 1370X + 12000$	0.998	10 ~ 500	25.992	3.2
12	PCB114	328,324,254	$Y = 1250X + 13400$	0.999	10 ~ 500	25.869	3.3
13	PCB133	360,358,290	$Y = 860X + 13600$	0.998	10 ~ 500	26.479	3.2
14	PCB105	328,324,254	$Y = 1200X + 6740$	0.999	10 ~ 500	28.711	3.2
15	PCB138	360,358,290	$Y = 716X + 10200$	0.998	10 ~ 500	28.272	2.9
16	PCB126	328,324,254	$Y = 1070X + 20200$	0.999	10 ~ 500	29.118	3.0
17	PCB187	394,392,324	$Y = 386X + 8190$	0.999	10 ~ 500	29.278	3.2
18	PCB129	360,358,290	$Y = 331X + 10400$	0.998	10 ~ 500	30.993	3.1
19	PCB167	360,358,290	$Y = 413X + 12400$	0.998	10 ~ 500	30.414	3.2
20	PCB156	360,358,290	$Y = 702X + 3260$	0.997	10 ~ 500	31.967	3.0
21	PCB137	360,358,290	$Y = 337X + 10500$	0.997	10 ~ 500	32.308	3.8
22	PCB180	394,392,324	$Y = 423X + 7050$	0.999	10 ~ 500	33.134	3.0
23	PCB169	360,358,290	$Y = 362X + 8710$	0.998	10 ~ 500	34.892	3.0
24	PCB170	394,392,324	$Y = 332X + 7490$	0.999	10 ~ 500	35.183	4.0
25	PCB189	394,392,324	$Y = 364X + 5940$	0.999	10 ~ 500	37.350	3.5
26	PCB195	430,428,358	$Y = 266X + 3810$	0.998	10 ~ 500	38.317	3.6
27	PCB206	464,454,392	$Y = 149X + 1480$	1.000	10 ~ 500	42.868	3.2
28	PCB206	498,428,214	$Y = 124X + 1480$	1.000	10 ~ 500	44.894	4.0

[0049] 在10、20和100 $\mu\text{g/kg}$ 三个加标浓度水平下,每个水平测试六次的回收率和精密度如表2所示:

[0050] 表2鲑鱼中28种多氯联苯的加标回收率和精密度 (n=6)

序号	化合物	鲳鱼					
		10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		20 $\mu\text{g kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
		Rec %	RSD %	Rec %	RSD %	Rec %	RSD %
1	PCB8	75	2.1	101	2.2	102	2.0
2	PCB18	74	2.0	104	2.1	103	1.9
3	PCB28	81	2.1	98	2.0	99	1.8
4	PCB52	78	2.0	105	2.0	101	2.0
5	PCB44	90	2.0	103	1.9	102	1.8
6	PCB66	88	2.1	85	2.5	90	2.4
7	PCB101	89	1.9	101	2.0	95	2.0
8	PCB81	94	1.8	93	2.0	92	1.9
9	PCB77	90	2.7	90	2.0	89	2.2
10	PCB123	97	2.4	95	2.4	91	2.5
11	PCB118	95	2.5	98	2.7	94	2.2
12	PCB114	97	2.6	91	2.6	98	2.3
13	PCB153	90	2.0	101	2.0	100	2.1
14	PCB105	94	3.0	95	2.4	97	2.0
15	PCB138	95	1.9	98	2.5	99	2.1
16	PCB126	96	2.4	107	2.0	94	2.2
17	PCB187	98	3.2	100	2.1	103	2.5
18	PCB128	94	2.7	98	3.0	102	2.4
19	PCB167	100	2.4	99	2.5	99	2.2
20	PCB156	100	2.5	88	2.3	99	2.1
21	PCB157	91	4.0	92	2.4	93	3.0
22	PCB180	95	3.8	91	3.3	97	2.8
23	PCB169	92	4.0	94	3.0	95	3.1
24	PCB170	89	2.8	98	3.5	95	2.6
25	PCB189	90	3.0	103	2.7	100	2.2
26	PCB195	92	3.2	99	2.5	101	2.4
27	PCB206	88	4.0	104	2.6	94	2.8
28	PCB209	84	4.1	105	3.0	97	3.0

[0051]

[0052] 对比例1

[0053] 以鲳鱼为样品:

[0054] 于50 mL具塞离心管中加入与实施例1相同的鲳鱼样品2.00 g,添加100 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液2.00 mL,加入35.0 mL的二氯甲烷+正己烷(v/v=1/1)混合液,以11000 rpm高速分散匀浆提取1 min,离心管以4500 r/min转速离心5 min,取上清液;上清液全部倾倒入100 mL鸡心瓶中,在40 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至近干,用2.00 mL正己烷定容并经0.22 μm 滤膜过滤,按照实施例1中给定的测试条件进行分析。

[0055] 得到色谱图,并将其与实施例1中相同添加浓度水平(100 $\mu\text{g/kg}$)的色谱图比较,比

较图见图3。

[0056] 从图3可见,在相同添加浓度,不同前处理方式对鲳鱼中多氯联苯的检测差异显著。使用试剂盒进行处理的实施例1中多氯联苯出峰明显,而对比例1中多氯联苯均被杂质峰所掩盖,无法进行有效的定量。可见,本发明的试剂盒对水产品中多氯联苯检测前处理具有明显的净化效果。

[0057] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

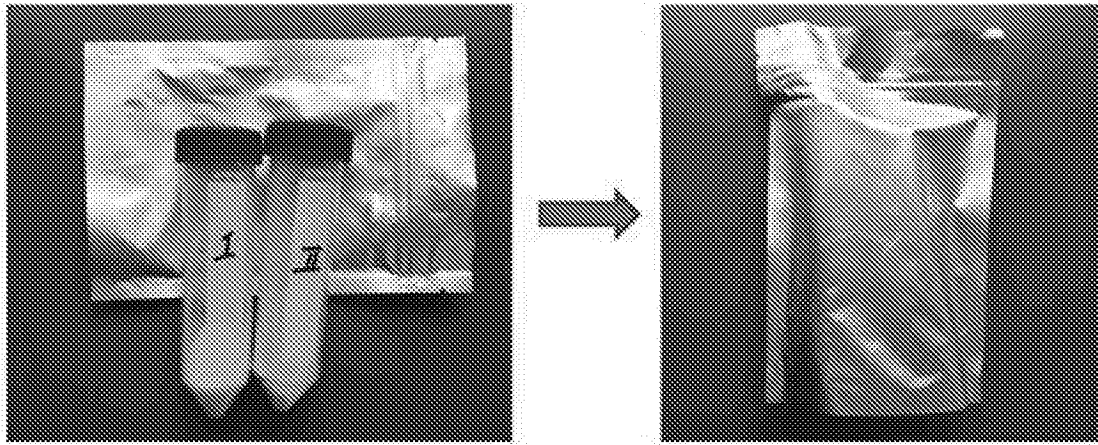


图1

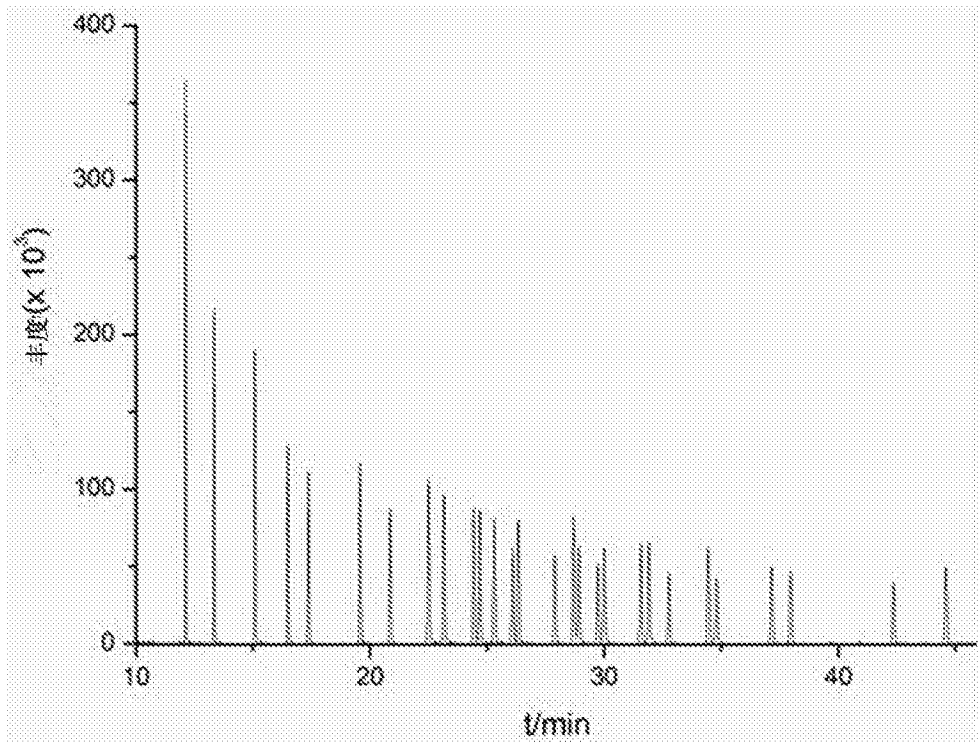


图2

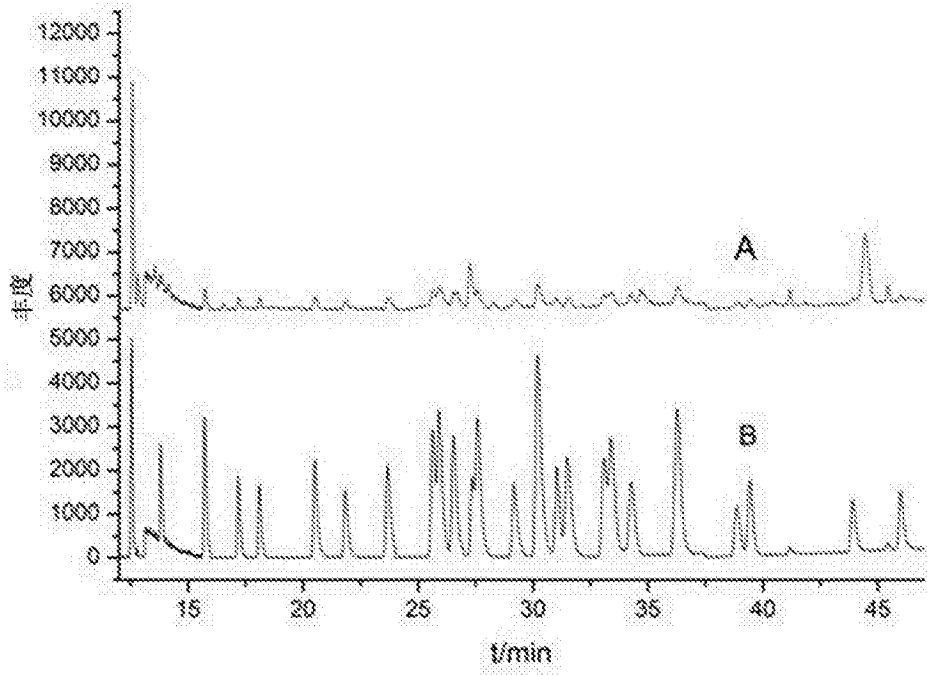


图3