

同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定 动物性食品中的双酚 A、壬基酚及辛基酚

牛宇敏^{1,2} 张 晶^{1,2} 张书军³ 邵 兵^{*1,2}

¹(首都医科大学公共卫生与家庭医学学院, 北京 100069)

²(北京市疾病预防控制中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013)

³(科技部 21 世纪议程管理中心, 北京 100038)

摘 要 建立了动物性食品肉、蛋和奶中双酚 A、壬基酚和辛基酚的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。比较了固相萃取法(SPE)和凝胶渗透色谱法(GPC)两种前处理技术,探讨了前处理过程中目标化合物背景污染的来源。最终采用乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V)超声提取,经 GPC 净化后进行超高效液相色谱串联质谱分析。3 种目标化合物的线性范围为 0.25~1600 $\mu\text{g/L}$, 相关系数 $R^2 > 0.999$; 对肉和鸡蛋样品,方法的定量限(LOQ)为 0.2 $\mu\text{g/kg}$; 奶粉样品的 LOQ 为 0.4 $\mu\text{g/kg}$ 。目标化合物在 3 个不同水平的加标回收率为 85.9%~117.0%, $\text{RSD} < 20\%$ 。应用本方法对市售动物性食品肉、蛋和奶进行了分析,壬基酚的检出率最高,含量为 0.27~1357 $\mu\text{g/kg}$,此外还检出了双酚 A。

关键词 动物性食品; 凝胶渗透色谱; 双酚 A; 壬基酚; 辛基酚; 超高效液相-串联质谱

1 引 言

双酚 A(Bisphenol A, BPA)、壬基酚(Nonylphenol, NP)和辛基酚(Octylphenol, OP)已被证明具有内分泌干扰效应^[1,2], BPA 作为生产塑料的原料, NP 和 OP 作为增塑剂和表面活性剂原料等被广泛用于各种产品,可通过多种途径污染食品。目前在纯净水^[3]以及鱼虾等水产品^[4,5]、肉及肉制品^[6]、奶类^[7,8]及谷物^[9]等多种食物中都检测到这类物质。BPA、NP 和 OP 的亲脂性较强,易在高脂肪、高蛋白的动物性食品中富集。联合国粮食与农业组织/世界卫生组织(FAO/WHO)专家会议^[10]对 30 篇文献进行调研,发现高脂肪食物中 BPA 的含量高于其它食物; Lu 等^[11]对台湾 466 件食品进行调查,发现肉类的 NP 和 OP 含量高于其它食品。监测 BPA 等污染物在动物性食品中的存在水平具有重要意义。

NP 和 BPA 在环境中普遍存在,有研究者报道 Milli-Q 超纯水中 BPA 的浓度约为 1~8 pg/L ^[12,13]。此外,样品预处理实验用塑料器皿和橡胶制品等都会迁移出大量 NP 和 BPA^[3,9],对分析结果造成干扰。Kuch 等^[14]在对地表水和饮用水中的环境雌激素酚类物质进行分析时,用二次蒸馏水或反渗透水作为质量控制样品,结果在过程空白中检出 200~400 pg/L 的 OP、NP 和 BPA。在食品分析方面,尽管目前已有大量的文献报道了检测方法,但是有关分析过程中的质量控制涉及较少,其后果可能导致监测数据失真,造成评估过程中食品安全风险的误判。鉴于此,本实验在探讨不同样品处理过程提取效果的同时,考察了实验操作中目标化合物背景污染的来源,最终采用凝胶渗透色谱(GPC)净化,同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)分离检测,实现了肉、蛋、奶中痕量 BPA、NP 及 OP 的同时测定。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

Waters ACQUITYTM超高效液相色谱仪、XevoTM TQ 质谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); CHIST ALPHA2-4, LDplus 型冻干仪(德国 CHIST 公司); BüCHI MixerB-400 均质器(瑞士 BüCHI 公司); Accuprep MPS 凝胶渗透色谱仪(美国 J2 Scientific 公司); 4011 型数字旋转蒸发仪(德

2011-09-19 收稿; 2012-01-16 接受

本文系卫生行业科研专项(No. 200902009)和“十二五”国家科技支撑计划(No. 2011BAK10B06)资助项目

* E-mail: shaobingch@sina.com

国 Heidolph 公司); Sep-Pak NH₂ (500 mg, 6 mL), Sep-Pak Silica (500 mg, 6 mL) 和 Sep-Pak Florisil (500 mg, 6 mL) 固相萃取柱(美国 Waters 公司); Varian NH₂ (500 mg, 6 mL) 固相萃取柱(美国 Varian 公司); Cleanert NH₂, Cleanert PSA, Cleanert Silica, Cleanert Florisil, Cleanert PestiCarb 和 Cleanert Alumina N 填料(天津 Agela Technologies 公司); Supelclean LC-Florisil 填料(美国 Supelco 公司)。

甲醇(LC-MS 级, 德国 Merck 公司), 乙腈、乙酸乙酯、环己烷、甲基叔丁基醚、丙酮和正己烷(HPLC 级, 美国 Dikma 公司); 无水 Na₂SO₄ (分析纯); 氨水(28%~30%, w/w, 比利时 Acros Organics 公司); 双酚 A (98.5%, 德国 Dr Ehrenstorfer GmbH 公司), 4-NP(日本 Tokyo Kasei Kogyo 公司), 4-OP(99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 同位素内标 BPA-d₄, 4-n-NP-d₄ 和 4-n-OP-d₁₇ (纯度均大于 97.8%, 加拿大 CDN 公司)。

2.2 标准溶液的配制

分别准确称取 10 mg 标准品, 以甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1000 mg/L 的标准储备液, 于 -20 °C 保存。临用时用甲醇稀释成不同浓度的标准工作液, 于 4 °C 保存。

2.3 样品前处理

动物肌肉样品用组织捣碎机捣碎均匀, 鸡蛋去壳后于 100 mL 烧杯中用玻璃棒搅拌均匀, 液态奶样品冷冻干燥后研磨均匀, 奶粉样品直接称取。分别称取肌肉、鸡蛋和奶粉样品 4.0、4.0 和 2.0 g, 于 50 mL 玻璃离心管中, 加入 10 mL 乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V) 涡旋混匀, 超声提取 15 min, 于 4 °C 以 3000 r/min 离心 15 min, 取 5 mL 上清液用于 GPC 净化。GPC 采用苯乙烯树脂 Biobead SX-3 (300×10 mm) 凝胶色谱柱, 流动相为乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V), 流速 3.0 mL/min。收集 12.5~17.5 min 组分于 100 mL 鸡心瓶中, 在 30 °C 以 120 r/min 旋转蒸发至干, 加 1 mL 甲醇。

实验中所用的器具均为玻璃材质, 使用前在马弗炉中 400 °C 烘烤 4 h。GPC 及液相色谱串联质谱仪的管线均为不锈钢或聚四氟乙烯材质。每 10 个样品做一个溶剂空白。

2.4 色谱-质谱条件

色谱和质谱分析条件采用本课题组已建立的方法^[15]。色谱柱: ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 捕集柱: Waters Isolator Column (P/N: 186004476); 柱温: 40 °C; 流动相: A 相为甲醇, B 相为 0.1% (w/w) 氨水; 流速: 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 35% A 线性升至 90% A; 2.0~5.0 min, 90% A 线性升至 99.9% A, 保持 1.9 min; 7.1 min 回到初始流动相, 保持 4 min; 进样量 5 μL。

离子源: 电喷雾离子源, 负离子模式 (ESI⁻); 毛细管电压: 2.8 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂温度: 400 °C; 脱溶剂气流量: 800 L/h; 锥孔气流量: 50 L/h。MRM 模式采集数据。

3 结果与讨论

3.1 溶剂选择及浓缩方式考察

选择实验室常用的色谱纯有机溶剂, 包括乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚、丙酮、正己烷、乙酸乙酯和环己烷, 各取 40 mL, 平均分成 2 份, 分别用氮气吹干或旋转蒸发至干, 残渣用 0.5 mL 甲醇溶解。结果表明, 旋蒸后 NP 的含量均低于仪器检出限 (0.1 μg/L), 对实验结果影响很小, 但氮气吹干的过程会引入不同浓度的 NP, 约为 0.4~1.7 μg/L, 可能由于空气中 NP 的污染造成^[16]。因此本研究选择旋转蒸发浓缩样品。

3.2 提取液的优化

考察了 10 mL 的乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚和乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V) 的提取效率。如 2.3 节所述, 样品中加标量为 25 μg/kg, 放置 30 min。乙腈、甲醇及甲基叔丁基醚处理肌肉和鸡蛋等含水基质时, 需加入无水 Na₂SO₄ 脱水后, 再超声提取, 取 1 mL 直接上机测定。使用乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V) 直接提取时, 超声离心后取 1 mL 上清液旋转蒸发至干, 以 1 mL 甲醇复溶再测定。结果如图 1 所示, 4 种提取液中, 除甲基叔丁基醚提取效率较差外, 其余 3 种提取液的提取效率相差不大, 均在 62.3%~117.8% 之间。乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V) 的回收率最高, 乙腈略优于甲醇。因此采用固相萃取净化时, 选择乙腈作为提取液, GPC 净化时选择乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V)。

3.3 净化方式的优化

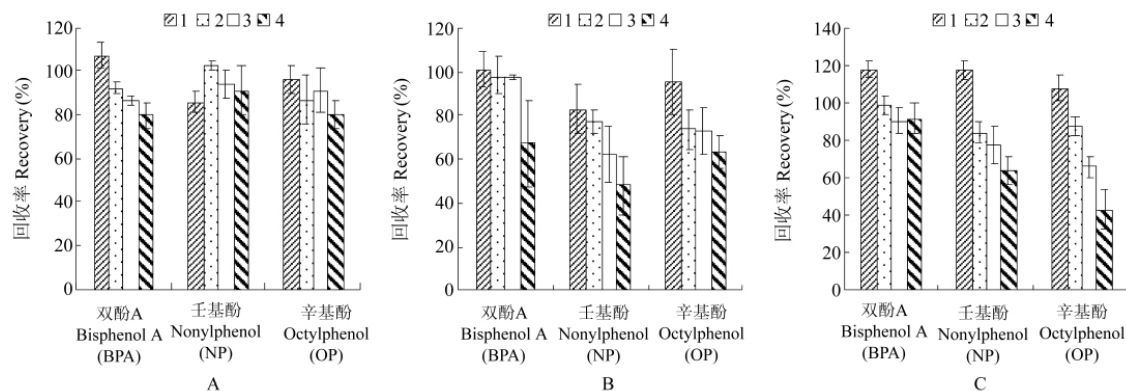


图 1 不同提取液对肌肉(A)、鸡蛋(B)和奶粉(C)中目标化合物的回收率

Fig. 1 Recoveries of target compounds in muscle (A), egg (B) and infant formula (C) using different extracting solutions

1. 乙酸乙酯-环己烷(Ethyl acetate-cyclohexane, 1:1,V/V); 2. 乙腈(Acetonitrile); 3. 甲醇(Methanol); 4. 甲基叔丁基醚(Methyl tertiary butyl ether)。

3.3.1 固相萃取法 在测定实际样品时,无论以乙腈,还是乙酸乙酯-环己烷(1:1,V/V)为提取液时,直接旋转蒸发浓缩后都有明显的脂肪残留,LC-MS/MS 测定时产生了很强的基质抑制,NP 和 OP 均大于 70% (表 1)。正相固相萃取是动物源性食品中痕量残留物富集净化常用的方法。本实验比较了 NH_2 柱、Silica 柱和 Florisil 柱。在空白对照中均检出 NP, NH_2 柱和 Florisil 柱约为 3 ng,Silica 柱约为 100 ng。

本研究以 NH_2 柱为例,分别用 10, 20, 30, 40 和 50 mL 的甲醇-丙酮(1:1,V/V)预淋洗柱子,NP 的背景值未明显减少,说明大体积的洗脱液不能有效去除 NP 的干扰。本研究对固相萃取柱的不同组成部分进行了考察,即柱套、筛板以及填料。将常用的塑料柱套换成了玻璃柱套;取不同的填料(0.5 g)和筛板分别浸泡在 5 mL 甲醇-丙酮(1:1,V/V)溶液中,每隔 1 h 取 1 mL 浸泡液进行测定;弃去剩余溶液,重新加入 5 mL 甲醇-丙酮(1:1,V/V)溶液,以考察 NP 和 BPA 的溶出情况。本研究比较了 7 种填料,包括 Cleanert NH_2 ,Cleanert PSA,Cleanert Silica,Cleanert Florisil,Cleanert PestiCarb,Cleanert Alumina N 和 Supelclean LC-Florisil,发现随着浸泡时间的延长,填料中释放出的 NP 逐渐减少,最后维持在约 0.4 ng;但是筛板中 NP 会持续溶出,浓度约为 0.8 ng,因此直接使用商品化的固相萃取柱进行净化不可行。

本实验参考了文献[17],将 Florisil 填料于 130 °C 加热 16 h 可去除 NP(NP 溶出量低于 0.1 ng)。称取奶粉 2.0 g,以 10 mL 乙腈提取一次,用 10 mL 乙腈饱和的正己烷进一步去除脂肪,取乙腈层旋转蒸发至干,加 5 mL 正己烷-丙酮(8:2,V/V),转入放有 1.0 g Florisil 填料的玻璃离心管中,2500 r/min 漩涡振荡 1 min,离心后取上清液,旋蒸至干,定容并检测,基质抑制率仍然大于 50%(表 1),该方法不能达到净化目的。

3.3.2 凝胶渗透色谱法 GPC 对含油脂类的样品具有良好的净化效果,本课题组曾用 GPC 方法检测了植物油中目标化合物^[15],发现 GPC 过程中引入的 NP 低于仪器的检出限,由于该操作自动化程度高,因此背景值相对稳定,RSD<13%。本实验中,样品经乙酸乙酯-环己烷(1:1,V/V)提取,GPC 净化后,脂肪的去除率高于 90%,3 种目标化合物的基质抑制率均大于 10% (表 1)。所以最终采用 GPC 进行样品净化。实验过程的空白低于仪器的定量限(0.25 $\mu\text{g/L}$)。

3.3 线性范围和定量限

配制 3 种目标物的质量浓度为 0.25~1600 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准工作液,内标浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$,以目标组分峰面积与相应内标峰面积的比值 Y 对相应浓度 X($\mu\text{g/L}$)进行线性回归,BPA,NP 和 OP 的线

表 1 不同净化处理后奶粉中目标化合物的基质抑制率

Table 1 Matrix suppression of target compounds in infant formula after different cleanup procedures ($n=3$)

方法 Method	BPA(%)	NP(%)	OP(%)
I	26	77	79
II	3	71	52
III	7	4	0

I: 提取液直接浓缩(Extracts directly concentrated); II: Florisil 填料净化(Purified by Florisil); III: GPC 净化(Purified by GPC)。BPA: Bisphenol; NP: Nonylphenol; OP: Octylphenol。

性方程分别为 $Y=0.0684X+0.0738$, $Y=0.1027X+0.1273$ 和 $Y=0.1266X+0.0424$, 相关系数(R^2)均大于0.999。以加标样品中待测化合物色谱峰的信噪比 $S/N=3$ 对应的浓度为方法的检出限(LOD), $S/N=10$ 对应的浓度为方法的定量限(LOQ)。确定肉和鸡蛋样品中目标化合物的 LOQ 为 $0.2\text{ }\mu\text{g/kg}$, LOD 为 $0.07\text{ }\mu\text{g/kg}$; 奶粉样品中的 LOQ 为 $0.4\text{ }\mu\text{g/kg}$, LOD 为 $0.13\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

3.4 方法的回收率和精密度

在3种基质中添加不同量的混合标准溶液,使动物肌肉(以猪肉为例)和鸡蛋样品 BPA 和 OP 的加标水平分别为 0.2 , 1.0 和 $4.0\text{ }\mu\text{g/kg}$, NP 的加标水平分别为 1.0 , 5.0 和 $20.0\text{ }\mu\text{g/kg}$; 奶粉的加标水平为肉和鸡蛋的2倍,每个水平设6个平行。按上述条件进行处理和测定,内标法计算目标物质的回收率和相对标准偏差(RSD),肉样品的回收率为 $85.9\%\sim 117.0\%$; 奶粉样品的回收率为 $97.2\%\sim 115.5\%$; 鸡蛋样品的回收率为 $93.3\%\sim 111.2\%$,具体结果见表2。选择中等浓度水平进行连续5d的加标回收实验,求得 NP, OP 和 BPA 在3种基质中的日间精密度 $<20\%$,满足食品中痕量污染物分析的要求。

表2 肉、蛋和奶粉中3种目标化合物的回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 2 Recoveries and RSDs of 3 target compounds in meat, egg and infant formula ($n=6$)

样品 Sample	化合物 Compounds	加标水平 Spiked ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	样品 Sample	化合物 Compounds	加标水平 Spiked ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
肌肉 Muscle	BPA	0.2	94.9	17.0	鸡蛋 Egg	BPA	0.2	102.7	15.0
		1.0	106.6	8.6			1.0	99.5	17.0
		4.0	85.9	4.3			4.0	103.8	6.1
	NP	1.0	103.7	6.6		NP	1.0	111.2	7.6
		5.0	117.0	6.6			5.0	93.3	5.9
		20.0	104.2	3.6			20.0	106.9	8.7
	OP	0.2	86.7	20.0		OP	0.2	111.0	13.0
		1.0	104.4	18.0			1.0	93.3	15.0
		4.0	96.9	5.2			4.0	103.3	2.9
	BPA	0.4	109.1	7.2	奶粉 Infant formula	BPA	0.4	109.1	7.2
		2.0	109.6	13.0			2.0	112.0	17.0
		8.0	102.9	10.0			10.0	103.7	9.2
奶粉 Infant formula	NP	2.0	112.0	17.0		NP	40.0	106.7	7.1
		10.0	103.7	9.2			0.4	114.8	13.0
		40.0	106.7	7.1			2.0	97.2	12.0
	OP	0.4	114.8	13.0		OP	8.0	115.5	6.4
		2.0	97.2	12.0					
		8.0	115.5	6.4					

3.5 实际样品分析

应用本方法对市售的动物性食品进行了检测。所有样品均未检出 OP; 10 份样品(包括猪肉、羊肉、鸡肉、牛肉和鱼肉)中有 8 份检出了 BPA, 含量为 $0.2\sim 4.5\text{ }\mu\text{g/kg}$, 8 份检出了 NP, 含量为 $0.5\sim 80.3\text{ }\mu\text{g/kg}$; 30 份奶粉样品中有 5 份检出 BPA, 含量为 $0.4\sim 0.9\text{ }\mu\text{g/kg}$, NP 的检出率为 100% , 但其浓度水平差异明显($1.5\sim 1360\text{ }\mu\text{g/kg}$); 13 份液奶样品中未检出 BPA, 但同样均检出 NP, 含量为 $4.9\sim 203\text{ }\mu\text{g/kg}$; 19 份鸡蛋样品中 1 份检出 BPA, 含量为 $0.35\text{ }\mu\text{g/kg}$; 3 份检出 NP, 含量为 $0.27\sim 1.09\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

上述结果表明, NP 广泛存在于肉、蛋和奶等基质中, 其中奶粉和液奶的污染较为严重。考虑到这种化合物的类雌激素效应, 乳制品中的 NP 对消费者尤其是对婴幼儿的健康风险影响应当引起重视。

References

- 1 Tyl R W, Myers C B, Marr M C, Sloan C S, Castillo N P, Veselica M M, Seely J C, Dimond S S, Van Miller J P, Shiot-suka R N. *Toxicol. Sci.*, **2008**, 104(2): 362~384
 - 2 ZHAO Mei-Ping, LI Yuan-Zong, CHANG Wen-Bao. *Chinese J. Anal Chem.*, **2003**, 31(1): 103~109
- 赵美萍, 李元宗, 常文保. 分析化学, **2003**, 31(1): 103~109

- 3 SUN Yin, ZHANG Wei-Ya, XING Jun, WANG Cheng-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(9): 1432~1436
孙 银, 张伟亚, 邢 钧, 王承明. 分析化学, **2011**, 39(9): 1432~1436
- 4 Tsuda T, Suga K, Kaneda E, Ohsuga M. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 746(2): 305~309
- 5 Meier S, Klungsoyr J, Boitsov S, Eide T, Svardal A. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1062(2): 255~268
- 6 Shao B, Han H, Li D, Ma Y, Tu X, Wu Y. *Food Chem.*, **2007**, 105(3): 1236~1241
- 7 Maragou N C, Lampi E N, Thomaidis N S, Koupparis M A. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1129(2): 165~173
- 8 Shao B, Han H, Tu X, Huang L. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 850(1-2): 412~416
- 9 Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1137(2): 207~215
- 10 JECFA. *Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A*. **2010**; Ottawa, Canada
- 11 Lu Y Y, Chen M L, Sung F C. *Environ. Int.*, **2007**, 33(7): 903~910
- 12 Watabe Y, Kondo T, Imai H, Morita M, Tanaka N, Hosoya K. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(1): 105~109
- 13 Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 749(1): 17~23
- 14 Kuch H M, Ballschmiter K. *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35(15): 3201~3206
- 15 Niu Y, Zhang J, Wu Y, Shao B. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(31): 5248~5253
- 16 Rudel R A, Camann D E, Spengler J D, Korn L R, Brody J G. *Environmental Science & Technology*, **2003**, 37(20): 4543~4553
- 17 ZHANG Mei-Hua, YAN Wei-Liang, GAO Ya-Min, SHI Yang-Zhi. *Annual Report of Food and Drug Research*, **2010**, (1): 87~98
张美华, 颜维良, 高雅敏, 施养志. 食品药物研究年报, **2010**, (1): 87~98

Determination of Bisphenol A, Nonylphenol and Octylphenol in Animal Food by Isotopic Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

NIU Yu-Min^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}, ZHANG Shu-Jun³, SHAO Bing^{*1,2}

¹ (School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

² (Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning,
Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

³ (Administrative Center for China's Agenda 21, Ministry of Science and
Technology of the People's Republic of China, Beijing 100038, China)

Abstract A comprehensive analytical method based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) has been developed for the simultaneous determination of bisphenol A, nonylphenol and octylphenol in meat, egg, infant formula and milk. In this study, solid phase extraction (SPE) and gel permeation chromatography (GPC) were compared and the background contaminations of the target compounds from the pretreatment procedure were studied. Samples were extracted by ethyl acetate: cyclohexane (1:1, V/V) and purified by GPC. Satisfactory linearity ($R^2 > 0.999$) was obtained over the range of 0.25—1600 $\mu\text{g/L}$, with limits of quantification (LOQ) of 0.2 $\mu\text{g/kg}$ in meat and egg, and 0.4 $\mu\text{g/kg}$ in infant formula. Mean recoveries of three target compounds (spiked at three concentration levels) ranged from 85.9%—117.0%, with relative standard deviations (RSD) less than 20%. The method was applied in the analysis of meat, egg, infant formula and milk taken from Beijing. As a result, nonylphenol presented a highest detectable frequency, in the range of 0.27—1357 $\mu\text{g/kg}$. In addition, bisphenol A was also detected in this survey.

Keywords Animal producing food; Gel permeation chromatography; Bisphenol A; Nonylphenol; Octylphenol; Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry

(Received 19 September 2011; accepted 16 January 2012)