

同位素稀释气相色谱-离子阱二级质谱法 测定牛奶中残留的二恶英类多氯联苯

丁罡斗^{1,2}, 李 翔¹, 刘汉霞¹, 仲维科¹, 贺银凤², 张 垚¹, 孙毅之¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025 ; 2. 内蒙古农业大学食品科学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要 建立了气相色谱-离子阱二级质谱(GC-MS/MS)测定牛奶中 12 种二恶英类多氯联苯残留的分析方法。样品经冷冻干燥处理后用加速溶剂萃取方法提取、多层硅胶柱净化和 GC-MS/MS 测定。目标化合物先用二氯甲烷-正己烷-丙酮(体积比为 4:4:2)混合溶剂在 150 ℃和 10.3 MPa 条件下循环提取,再经酸性硅胶、硅胶和碱性硅胶复合柱净化及正己烷洗脱,最后用 DB-5 毛细管柱分离、电子轰击电离源(35 eV)多反应监测模式检测,同位素稀释内标法定量(定量离子为 $[M+2-72]^+$ 和 $[M+2-70]^+$)。12 种化合物的标准曲线的线性相关系数均大于 0.999 9,线性范围为 0.2 ~ 400 pg/ μ L;同位素内标的回收率范围为 39% ~ 129%,相对标准偏差为 5% ~ 22%;方法的检出限(以脂肪含量计)为 3 ~ 11 pg/g。

关键词 :气相色谱-离子阱二级质谱;同位素稀释;多氯联苯残留量;牛奶

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)01-0029-06 栏目类别 :研究论文

Determination of dioxin like polychlorinated biphenyl residues in milk using isotope dilution gas chromatography- ion trap tandem mass spectrometry

DING Gangdou^{1,2}, LI Xiang¹, LIU Hanxia¹, ZHONG Weike¹,

HE Yinfeng², ZHANG Yao¹, SUN Yizhi¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China ;

2. Department of Food Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract : A method for the determination of dioxin like polychlorinated biphenyl (DL-PCB) residues in milk has been developed using high resolution gas chromatography coupled with ion trap mass spectrometry (GC-MS/MS-IT). Analytical procedure consisted of accelerate solvent extraction (ASE), lipid removal with acidic silica and clean-up using anthropogenic isolation column packed with multilayer silica. The analytes were separated on a DB-5 capillary column, detected with multiple reaction monitor mode (MRM) and quantified using internal standard calibration curve of isotope dilution technique. The correlation coefficients of calibration standard solution were above 0.999 9 for all the DL-PCBs. The recoveries and relative standard deviations of labeled compound solution were in the oranges from 39% to 129% and from 5% to 22%, respectively. The detection limits in the range from 3 to 11 pg/g (fat) were established for the 12 DL-PCBs.

Key words : gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry (GC-MS/MS-IT); isotope dilution ; polychlorinated biphenyl residues ; milk

二恶英类多氯联苯(DL-PCBs)是一类与二恶英毒性作用机制相似的持久性有机污染物,它们的化学性质稳定且很难被生物降解。DL-PCBs 可通过食物链浓缩放大后被人体吸收而对人体健康产生巨大的危害作用(致癌、致畸、致突变等)^[1],因此食

品中 DL-PCBs 残留问题备受国际社会关注。世界卫生组织规定了 12 种 DL-PCBs(国际纯粹与应用化学联合会编号为 :PCB 77,81,105,114,118,123,126,156,157,167,169,189)的毒性当量因子(*TEF*),并于 1997 年和 2005 年两次对二恶英及

收稿日期 2007-07-09

第一作者 :丁罡斗,硕士研究生。Tel : (010)85745898, E-mail : dinggangdou@163. com.

通讯联系人 :仲维科,博士,副研究员。Tel : (010)85767344, E-mail : wkzhong@21cn. com.

基金项目 :国家自然科学基金(No. 20475051)和国家质量监督检验检疫总局课题(2006IK156)资助项目。

DL-PCBs 的 TEFs 值进行评估,这 12 种化合物也被确定为食品中 PCBs 残留的检测对象。欧盟于 2006 年颁布了新的食品和饲料中二恶英和 DL-PCBs 的最大残留限量标准,其中规定牛奶及其制品中二恶英的最大残留限量为 3.0 pg/g,总二恶英和 DL-PCBs 的最大残留限量为 6.0 pg/g(以脂肪内总毒性当量计)^[2]。

在 DL-PCBs 分析方面,高分辨质谱法(HRMS)是目前公认的、可准确测定环境及食品中 DL-PCBs 的方法,但高分辨质谱仪器昂贵、维护成本高且需要专业人员进行操作,很难普及到一般的实验室。随着串联质谱技术的发展及其应用范围的扩大,这项技术也被用到了超痕量多氯代二苯并二恶英/呋喃(PCDD/Fs)和 PCBs 分析领域^[3-9],但多数研究都集中于环境样品中的 PCDD/Fs 分析^[3-8],只有少数文献报道了用串联质谱技术分析 DL-PCBs 的研究^[10-12],而其分析的样本和目标物主要为鱼体和非邻位取代 PCBs。本文建立了加速溶剂提取、多层硅胶柱净化和 GC-MS/MS 测定牛奶中 DL-PCBs 残留的分析方法。该方法成本较低且操作简便,可推广至普通实验室进行 DL-PCBs 的检测和筛选。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Finnigan 公司的气相色谱-质谱联用仪,配 Polaris Q 质谱检测器、电子轰击电离源、AS 300 自动进样器和 Xcalibur 工作站,色谱柱为 DB-5/MS(40 m × 0.18 mm × 0.18 μm);Dionex ASE 300 加速溶剂萃取(ASE)仪;日本 EYELA 旋转蒸发仪;康林 OA-SYS 吹氮浓缩仪;SIGMA 公司真空冷冻干燥仪。

¹³C 标记的 DL-PCBs 标准溶液(labeled compound solution, LCS, 含 12 种 ¹³C 标记的 DL-PCBs)、进样内标溶液(injection standard solution, ISS, 含 ¹³C 标记的 PCB101)、用于测定检测限的标准品(precision and recovery standard, PAR, 含 12 种 DL-PCBs)以及校正标准溶液(calibration standard solution, CS, 包括 CS 0.2, CS 1, CS 2, CS 3, CS 4, CS 5, 含 LCS、ISS 和 PAR)均购自加拿大惠灵顿同位素实验室有限公司,纯度 ≥ 98%;二氯甲烷、正己烷、甲苯、丙酮、甲醇、壬烷等有机溶剂均为农残级(J. T. Baker 公司),其他试剂均为分析纯;硅胶购自美国 Supelco 公司、酸性硅胶(将 45 g 浓硫酸加至 100 g 硅胶中)、碱性硅胶(将 30 g 1 mol/L 的氢氧化钠加至 100 g 硅胶中)。

1.2 样品前处理

提取 准确量取 50.00 g 牛奶,置于真空冷冻

干燥仪内,48 h 后将干燥好的粉末转移至研钵中,加入 5 g 硅藻土,充分混匀后加入 10 μL 100 pg/μL LCS,静置 2 h,然后用加速溶剂萃取仪在 150 ℃、10.3 MPa 条件下提取 8 min,并循环 3 次,所用的萃取溶剂为二氯甲烷-正己烷-丙酮(体积比为 4:4:2)混合溶剂^[8,13]。

净化 将提取液用旋转蒸发仪浓缩至近干,再用 50 mL 正己烷溶解并加入 15 g 酸性硅胶,充分振荡后通过装有无水硫酸钠的漏斗并将滤液浓缩至 2 ~ 3 mL。将浓缩后的滤液通过多层硅胶柱(由下至上的填料为 4 g 无水硫酸钠、2 g 硅胶、5 g 碱性硅胶、2 g 硅胶、10 g 酸性硅胶、2 g 硅胶、4 g 无水硫酸钠)并用正己烷洗涤浓缩瓶 2 ~ 3 遍,再用 100 mL 正己烷洗脱硅胶柱并收集洗脱液。将收集的洗脱液用旋转蒸发仪浓缩至约 1 mL,转移至样品瓶中,连同洗涤浓缩瓶的正己烷一起在细小氮气流下将样品浓缩至干。残渣中加入 10 μL 壬烷和 5 μL 200 pg/μL ISS,混匀,待上机检测。

1.3 分析条件

色谱条件 升温程序:100 ℃(保持 3 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 245 ℃ $\xrightarrow{2\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 270 ℃ $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 300 ℃(保持 3 min);进样口温度 280 ℃;不分流进样,进样量 1 μL;载气恒流,流量为 1.0 mL/min。

质谱条件 电子轰击离子源(EI),电子能量为 35 eV;离子源温度 250 ℃;传输线温度 280 ℃;溶剂延迟 13 min;多反应监测(MRM)模式;灯丝电流 250 μA;电子倍增器补偿电压 50 V(自动调谐值为 1 275 V);碰撞诱导解离(CID)电压 1.6 ~ 1.8 V;母离子宽度(precursor ion width)1;阱内激发能量(excitation energy) $q_z = 0.45$ 。

1.4 质量保证和控制

每批样品分析前先用标准溶液确认目标物的保留时间及子离子丰度比,分析过程中用空白组织基质(经过高分辨质谱确证的鸭肝)添加 PAR 测定方法的检出限,用硅藻土作过程空白。确认样品中目标 DL-PCBs 时需满足以下条件:保留时间与校正标准溶液中的 DL-PCBs 的保留时间相差小于 2 s;子离子丰度比与校正标准溶液中的 DL-PCBs 的子离子丰度比相差小于 20%;定性和定量的信噪比分别大于 3 和 10。同位素内标的回收率满足 EPA1668 要求(25% ~ 150%)。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的确定

目标物采用 35 eV 能量电子电离,较采用 70 eV

能量电子电离相比,35 eV 能量可以产生更多的分子离子峰($[M]^+$ 、 $[M+2]^+$ 和 $[M+4]^+$)。将 $[M$

$+2]^+$ 选作目标化合物的母离子使之碰撞诱导解离(CID),图 1 为 12 种 DL-PCBs 的全扫描质谱图。

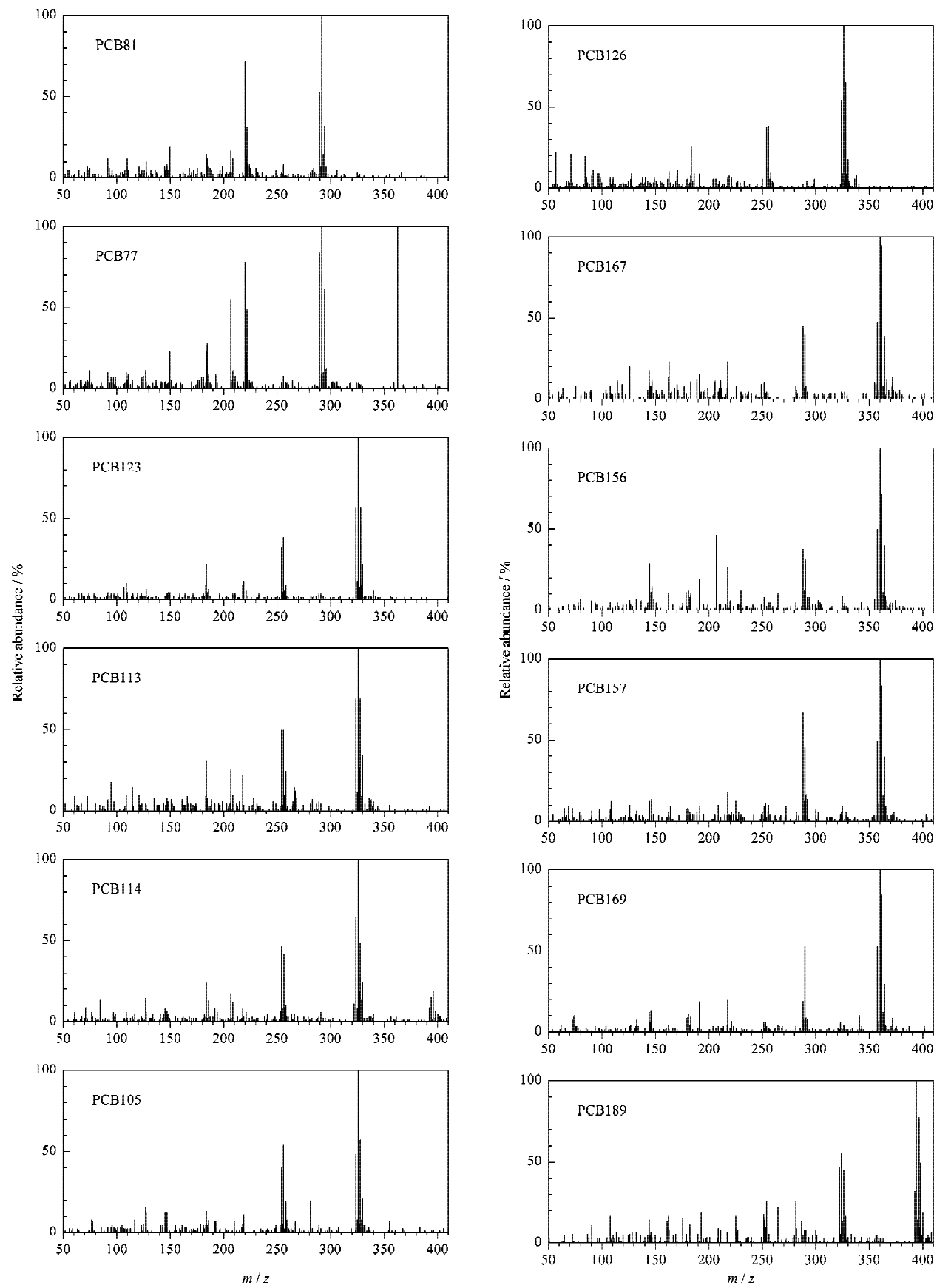


图 1 12 种 DL-PCBs 的全扫描质谱图
Fig. 1 Full scan mass spectra of 12 DL-PCBs

当 CID 电压介于 1.6 ~ 1.8 V 之间时, 二级碎片离子 $[M + 2 - 72]^+$ 和 $[M + 2 - 70]^+$ 有最高丰度。CID 电压是碰撞诱导解离过程中最重要的参数, 对

母离子解离有直接影响。图 2 给出了不同 CID 电压对 PCB 81 母离子解离的影响。图 3 为实际样品净化后的子离子流色谱图。

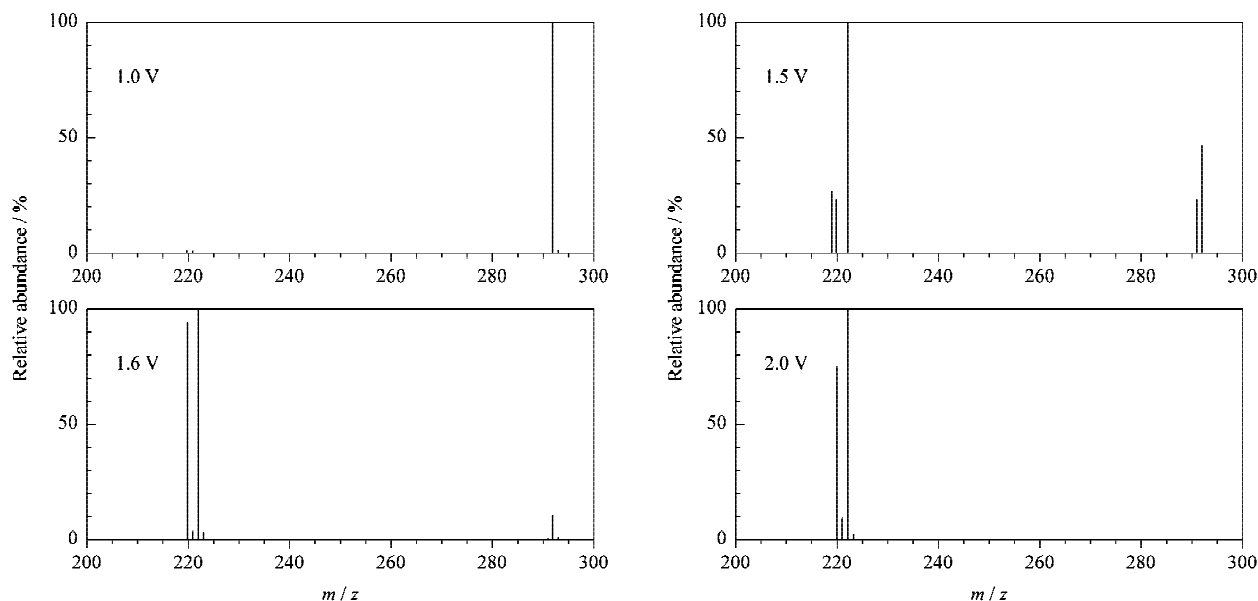


图 2 不同碰撞诱导解离电压对 PCB 81 母离子解离的影响

Fig. 2 Effect of different voltages of collision-induced dissociation on the parent ion dissociation of PCB 81

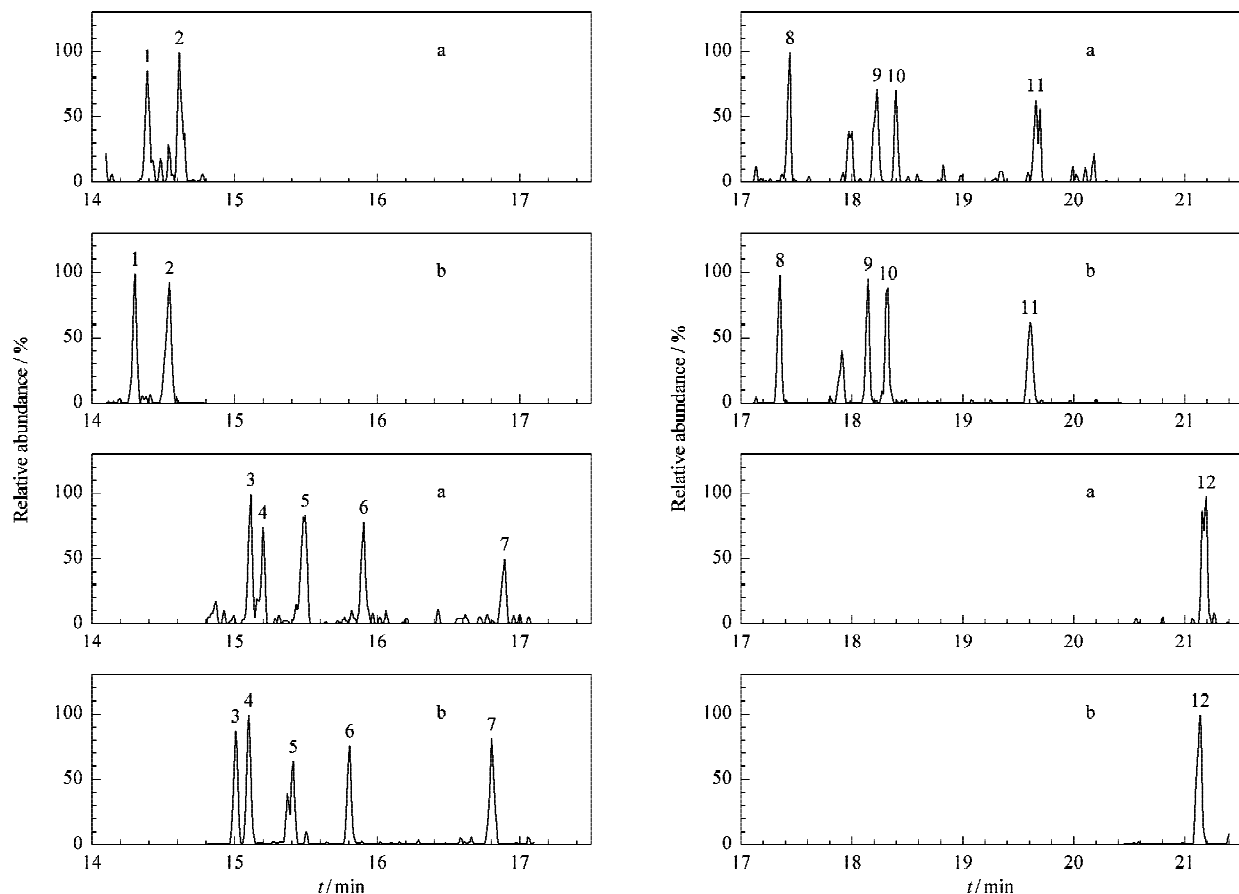


图 3 样品的子离子流 $[M + 2 - 70]^+$ 色谱图

Fig. 3 Chromatograms of product ion current $[M + 2 - 70]^+$

a. drug-free tissue fortified with 400 pg PAR ; b. labelled compound solution of 0.2 pg/ μ L.

1. PCB 81 ; 2. PCB 77 ; 3. PCB 123 ; 4. PCB 118 ; 5. PCB 114 ; 6. PCB 105 ; 7. PCB 126 ; 8. PCB 167 ; 9. PCB 156 ; 10. PCB 157 ; 11. PCB 169 ; 12. PCB 189.

2.3 计算方法

样品中各 DL-PCBs 的定量计算采用两个子离子的平均响应值^[14],相对响应因子为 5 个校正浓度(CS 0.2 ,CS 1 ,CS 2 ,CS 3 ,CS 4)下响应因子的平均值;回收率为¹³C 标记的 DL-PCBs 的回收率;最终牛奶样品中的被分析物含量以脂肪质量中总 PCBs 毒性当量计(pg/g)。计算公式如下:

$$RR = \frac{(A1_n + A2_n)C_1}{(A1_1 + A2_1)C_n}, C_{ex} = \frac{(A1_1 + A2_1)C_{is}}{(A1_{is} + A2_{is})RF},$$
$$C_{milk} = \frac{(A1_n + A2_n)C_{1-a}}{(A1_1 + A2_1)RR} \times \frac{1}{m} \times \frac{1}{N},$$
$$TEQ_{总} = \sum (C_{milk} \times TEF)$$

其中:RR 为 DL-PCBs 与其对应的¹³C 标记定量内标的相对响应因子;RF 为¹³C 标记定量内标与¹³C 标记进样内标的相对响应因子;A1_n、A2_n 分别为 DL-PCBs 的两个二级碎片离子的峰面积;A1₁、A2₁ 分别为¹³C 标记定量内标的两个二级碎片的离子峰面积;A1_{is}、A2_{is} 分别为¹³C 标记进样内标的两个二级碎片离子的峰面积;C₁ 为校正标准溶液中¹³C 标记定量内标的浓度,pg/μL;C_n 为校正标准溶液中 DL-PCBs 的浓度,pg/μL;C_{ex} 为样品提取液中¹³C 标记定量内标测定的浓度,pg/μL;C_{is} 为样品提取液中¹³C 标记

进样内标的添加浓度,pg/μL;C_{1-a} 为被测牛奶中¹³C 标记的定量内标的添加量,pg;C_{milk} 为被测牛奶(以脂肪质量计)中各 DL-PCBs 的含量,pg/g;m 为称样质量,g;N 为被测牛奶的脂肪含量,%;TEQ_总 为被测牛奶(以脂肪质量计)的总毒性当量,pg/g;TEF 为被测牛奶中各 DL-PCBs 的毒性当量因子。

2.4 校正曲线、检出限、精密度及回收率

质谱条件确定后,用系列校正标准溶液(质量浓度为 0.2、1、5、50、400 pg/μL)进样,以目标化合物的质量浓度(X)对其峰面积(Y)进行线性回归,结果表明所有 DL-PCBs 的线性相关系数均大于 0.999 9。¹³C 标记的 DL-PCBs 的回收率和相对标准偏差(RSD)见表 1,其中 LCS 和 ISS 的加标量均为 1 000 pg。由于没有可利用的空白牛奶基质,故实验采用空白组织基质添加 PAR 来测定检出限。称取与牛奶干燥粉末质量相当的组织基质并添加 400 pg PAR,处理后再逐级稀释,测得定量限范围介于 0.5~2.0 pg/g 之间(S/N≥10),根据两种基质的取样量不同,计算得出牛奶样本的方法检出限为 3~11 pg/g(以脂肪含量计),用 TEF 折算成总毒性当量后满足欧盟限量要求。

表 1 校正标准溶液中各 PCBs 的分析参数及牛奶样品中¹³C 标记定量内标的回收率和相对标准偏差(n=6)

Table 1 Recoveries, RSDs of ¹³C labelled PCBs in milk and analytical parameters of PCBs in calibration standard solution (n=6)

Compound	CID voltage/V	Product ions [M + 2 - ³⁵ Cl ³⁷ Cl] ⁺ / [M + 2 - 2 ³⁵ Cl] ⁺ X (m/z)	Abundance ratio	TEF (WHO , 2005)	Recovery/%	RSD/%
PCB 81	1.6	220/222	0.98	0.0003		
[¹³ C]PCB 81	1.6	232/234	0.96		39	6
PCB 77	1.7	220/222	0.97	0.0001		
[¹³ C]PCB 77	1.7	232/234	0.97		41	5
PCB 123	1.7	254/256	0.64	0.00003		
[¹³ C]PCB 123	1.7	266/268	0.66		115	22
PCB 118	1.7	254/256	0.67	0.00003		
[¹³ C]PCB 118	1.7	266/268	0.63		80	18
PCB 114	1.7	254/256	1.04	0.00003		
[¹³ C]PCB 114	1.7	266/268	1.00		64	10
PCB 105	1.7	254/256	0.61	0.00003		
[¹³ C]PCB 105	1.7	266/268	0.64		129	18
PCB 126	1.7	254/256	0.62	0.1		
[¹³ C]PCB 126	1.7	266/268	0.62		113	17
PCB 167	1.7	288/290	0.48	0.00003		
[¹³ C]PCB 167	1.7	300/302	0.47		65	11
PCB 156	1.7	288/290	0.47	0.00003		
[¹³ C]PCB 156	1.7	300/302	0.48		116	11
PCB 157	1.7	288/290	0.46	0.00003		
[¹³ C]PCB 157	1.7	300/302	0.48		109	12
PCB 169	1.7	288/290	0.46	0.03		
[¹³ C]PCB 169	1.7	300/302	0.47		60	9
PCB 189	1.7	322/324	0.40	0.00003		
[¹³ C]PCB 189	1.8	334/336	0.38		108	18

2.5 实际样品的测定

用上述方法对从北京地区购买的牛奶样品进行分析,结果表明,市售牛奶中的 PCB 118 和 PCB 105 的含量较高,分别达 200 pg/g 和 90 pg/g(以脂肪含量计),但 12 种 DL-PCBs 的总毒性当量小于 3.0 pg/g,低于欧盟的残留限量标准。

3 结论

随着各国对食品中 DL-PCBs 残留限量标准的制定以及检测范围的扩大,少数以高分辨质谱为基础的实验室已不能完成大量食品样品的测定,急需寻找灵敏、快速、低成本的样品筛查方法。离子阱二级质谱可将目标化合物两次电离、两次选择,大大降低了背景的干扰,具有较强的专一性和灵敏度;同位素稀释、两个离子定量也可使分析结果更为准确。在分析牛奶样品时,加速溶剂萃取、多层硅胶柱净化使操作更为方便快捷,方法的检测限可满足欧盟残留限量要求。同位素稀释气相色谱-离子阱二级质谱法也可作为 DL-PCBs 残留快速筛查方法应用于其他食品的检测。

参考文献:

[1] Sun C J. Chinese Journal of Modern Preventive Medicine (孙成均. 现代预防医学), 2000, 27: 63

[2] Commission Regulation No. 199/2006. Official Journal of the European Union, 2006, 4: 2
[3] Kùchler T, Brzezinski H. Chemosphere, 2000, 40: 213
[4] Fabrellas B, Sanz P, Abad E, et al. Chemosphere, 2004, 55: 1469
[5] Kemmochi Y, Tsutsumi K, Futami K. Chemosphere, 2002, 46: 1451
[6] Kemmochi Y, Tsutsumi K, Nakazawa H. J Chromatogr A, 2003, 1016: 249
[7] Li C L, Hao Y M, Mai B X, et al. Chinese Journal of Chromatography (李春雷, 郝永梅, 麦碧娴, 等. 色谱), 2005, 23(3): 321
[8] Li X, Zhang Y, Sun Y Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (李翔, 张垚, 孙毅之, 等. 色谱), 2006, 24(4): 347
[9] Wang Y H, Chen X H, Fu X H. Chinese Journal of Chromatography (王玉红, 陈晓红, 傅小红. 色谱), 2007, 25(1): 112
[10] Malavia J, Santos F J, Galceran M T. J Chromatogr A, 2004, 1056: 171
[11] Li J G, Zhao Y F, Wu Y N. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李敬光, 赵云峰, 吴永宁. 分析化学), 2005, 33: 1223
[12] Verenitch S S, Debruyne A M H, Ikononou M G, et al. J Chromatogr A, 2007, 1142: 199
[13] Preud'homme H, Potin-Gautier M. Anal Chem, 2003, 75: 6109
[14] Hayward D G, Hooper K, Andrzejewski D. Anal Chem, 1999, 71: 212

书 讯

色谱技术丛书

气相色谱方法及应用(第二版)

汪正范等 编著

出版日期: 2007 年 2 月

页数: 340 页

定价: ¥39.00 元

本书主要介绍了色谱-质谱、色谱-傅里叶变换红外光谱、色谱-原子光谱和色谱-色谱联用技术。

书中首先简单地介绍了质谱、傅里叶变换红外光谱、原子光谱和核磁仪器的结构、工作原理,以及它们与色谱联用时对接口的一般要求。在色谱-质谱联用技术中,除了对已成为实验室中常用分析方法的气相色谱-质谱联用技术及近年来发展迅速、越来越受人们关注的液相色谱-质谱联用技术都作了较详细的介绍外,还对毛细管电泳-质谱联用技术也作了简要介绍。在色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术中,除了对已有商品仪器的气相色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术作了介绍,还对液相色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术、薄层色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术也作了简单介绍。在色谱-原子光谱联用技术中分别介绍了气相色谱和液相色谱分别与原子吸收光谱和原子发射光谱联用的进展。在色谱-色谱联用技术中介绍了气相色谱-气相色谱、液相色谱-液相色谱、液相色谱-气相色谱及其他各种不同分离模式色谱联用技术。在介绍各种联用技术时都给出了一些应用实例。

本书可供从事色谱分析的人员及大中专院校相关专业师生学习参考。

化学工业出版社

购书热线: (010) 64518888, 64519686(传真)

地址: 北京市东城区青年湖南街 13 号

电子邮件: goushu999@126.com

邮编: 100011