

同位素稀释液相色谱 - 串联质谱法测定 食品中的 5 种环境类雌激素

宁 霄, 金绍明, 唐亚利, 刘彬丽, 曹 进*, 丁 宏*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要: **目的** 利用在线捕集消除本底, 同位素稀释技术, 建立婴儿配方食品、鸡蛋、畜肉、水产品、罐头及植物油等食品中 4-壬基酚、4-正壬基酚、4-辛基酚、4-正辛基酚和双酚 A 的超高效液相色谱 - 串联质谱 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定方法。 **方法** 样品经乙腈超声提取, 官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱 (polar enhanced polymer, PEP) 净化, 超高效液相色谱 - 串联质谱进行测定, 采用电喷雾电离负离子模式 (electronic spray ion, ESI⁻), 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 内标法定量分析。并对 5 种待测组分测定中存在的本底及消除方法进行了研究。 **结果** 5 种环境类雌激素在浓度为 0.5~50 $\mu\text{g/L}$ 范围时线性关系良好, 相关系数 (r) > 0.999, 方法的定量限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$, 在 3 种加标浓度的平均回收率为 80.1%~104.8%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 小于 20%。 **结论** 该方法在样品处理过程中采用高温烘烤过的玻璃器皿, 并利用在线捕集技术等降低本底, 且灵敏度高、定性定量准确, 适用于婴儿配方食品、畜肉、水产品、罐头及植物油等中 5 种环境类雌激素的检测。 **关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 4-壬基酚; 4-正壬基酚; 4-辛基酚; 4-正辛基酚; 双酚 A

Determination of 5 environmental estrogens in food by isotopic dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

NING Xiao, JIN Shao-Ming, TANG Ya-Li, LIU Bin-Li, CAO Jin*, DING Hong*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of nonylphenol (NP), 4-n-nonylphenol (4-n-NP), 4-tert-octyl phenol (OP), 4-n-octyl phenol (4-n-OP) and bisphenol A (BPA) in infant formula, egg, meat, aquatic products, canned food and oil by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) after elimination of background with online capture and isotopic dilution technology. **Methods** The homogenized sample was extracted with acetonitrile, then the extract was cleaned-up by polar enhanced polymer (PEP) column. The analytcs were determined in the modes of electrospray positive ionization (ESI⁻) and multiple reaction monitoring (MRM) with UPLC-MS/MS and quantified by internal standard method. The

基金项目: 国家食品药品监督管理总局科研项目(1010040402229)

Fund: Supported by State Food and Drug Administration Research Project (1010040402229)

*通讯作者: 曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品分析。E-mail: caojin@nifdc.org.cn

丁宏, 主任药师, 主要研究方向为食品、保健食品以及化妆品安全检测。E-mail: dinghong@nifdc.org.cn

*Corresponding author: CAO Jin, Ph.D, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@nifdc.org.cn
DING Hong, Chief Pharmacist, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: dinghong@nifdc.org.cn

background of 5 compounds and removal methods were investigated. **Results** The 5 kinds of environmental estrogens had good linear relationships in the range of 0.5-50 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficients were larger than 0.999. The limits of quantification (LOQ) were 0.5 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries of 3 different spiked levels were 80.1%-104.8%, with the relative standard deviations less than 20%. **Conclusion** By using roast glass ware during sample pre-treatment, and with mobile phase online capture technology, the method can effectively reduce blank value. The method is highly sensitive, qualitative, quantitative and accurate, which is suitable for the determination of nonylphenol, 4-n-nonylphenol, 4-tert-octyl phenol, 4-n-octyl phenol and bisphenol A in infant formula, egg, meat, aquatic products, canned food and oil.

KEY WORDS: ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; nonylphenol; 4-n-nonylphenol; 4-tert-octyl phenol; 4-n-octyl phenol; bisphenol A

1 引 言

近年来, 环境内分泌干扰物对生态环境的不良影响易引起人们广泛的关注。其中壬基酚(nonylphenol, NP)、辛基酚(octylphenol, OP)和双酚 A(bisphenol A, BPA)已在众多的体外实验和体内实验中被证实对动物具有潜在的雌激素效应^[1-4]。随着工业化的发展, 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, 可以通过多种途径污染食品, 通过食物链进入人体, 并在生物体内积累, 对人体癌细胞生长及生殖能力均会造成严重影响^[5-8]。因此, 建立一套科学实用的检测方法, 监测此类污染物在食品中的存在水平, 从而正确评估其对人类健康的危险性十分必要。

目前, 我国尚未制定检测食品中 BPA、OP 和 NP 残留量的国家标准方法, 而相关文献报道检测成分单一^[9,10], 同时检测尤其是包括同分异构体(4-正壬基酚和 4-正辛基酚)的相关研究甚少, 且适用范围主要集中于包装材料及环境样品等基质^[11-13]。从检测技术看, 主要有荧光法^[14]、液相色谱法^[15,16]、气相色谱-质谱法^[17]、液相色谱-质谱法^[18-20]。其中液相色谱-质谱法因具备操作简便, 灵敏度高, 选择性好等优点而占据主流地位, 但是, 仍然存在局限性: 常采用凝胶色谱净化, 时间成本高, 且净化后样品基质效应较强, 定量时需要采用基质标曲进行校正, 可行性受限; 常规测定方法流动相本底值高, 尤其是壬基酚, 仪器灵敏度难以达到理想水平。

本研究针对上述问题采用超声提取, 固相萃取柱净化, 同位素内标稀释法定量, 超高效液相色谱-串联质谱法进行测定, 并采用在线捕集技术消除流动相本底, 降低了空白值, 提高了灵敏度, 方法定性、定量准确。同时针对污染严重的食品种类扩大了方法的适用范围, 实现了对婴幼儿配方食品、食用油、水产品、畜肉、鸡蛋、罐头等食品中双酚 A、壬基酚、辛基酚及其同分异构体共 5 种环境类激素的同时测定, 以期对食品安全性监管提供了技术支撑。

2 材料与方 法

2.1 材 料

市售乳粉、米粉、食用油、鱼、虾、畜肉、鸡蛋、罐头等 8 种基质样品。

2.2 试剂与仪器

标准物质: 4-壬基酚(含量 98%)、4-正壬基酚(含量 98%)、4-辛基酚(含量 98%)、4-正辛基酚(含量 98%)、双酚 A(含量 98%), 同位素内标: 3,6,3-壬基酚-D2(含量 98%)、正壬基酚-D4(含量 98%)、对辛基酚-13C6(含量 98%)、正辛基酚-D17(含量 98%)、双酚 A-D4(含量 98%)(天津博纳艾杰尔科技有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 氨水(26%, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

AB SCIEX 6500 型超高效液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾电离源, 美国 SCIEX 公司); AL204 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); C1450-230V 型高速离心机(日本 Hitach 公司); HSPA20-E 型超声波提取器(武汉中科公司); Cleanert PEP 固相萃取小柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司); SA8 型涡旋混合器(英国 Stuart 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 溶液的配制

(1)标准储备溶液(100 mg/L): 分别称取壬基酚(4-壬基酚和 4-正壬基酚)、辛基酚(4-辛基酚和 4-正辛基酚)和双酚 A 标准物质 10 mg(精确至 0.0001 g), 用甲醇溶解, 并转移至 100 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 标准储备液浓度为 1 mg/mL。贮存于-20 °C 冰箱中, 有效期 12 个月。

(2)混合标准中间溶液(1 mg/L): 分别准确吸取壬基酚(4-壬基酚和 4-正壬基酚)、辛基酚(4-辛基酚和 4-正辛基酚)和双酚 A 标准储备液(100 mg/L)各 1 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成 1 mg/L 的混合标准中间工作液, 置于 4 °C 冰箱中保存, 有效期 3 个月。

(3)同位素内标标准储备溶液(100 mg/L): 分别称取 3,6,3-壬基酚-D2、正壬基酚-D4、对辛基酚-13C6、正辛基

酚-D17、双酚 A-D4 同位素内标 10 mg(精确至 0.0001 g), 用甲醇溶解, 并转移至 100 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 标准储备液浓度为 1 mg/mL。贮存于-20 °C 冰箱中, 有效期 12 个月。

(4)同位素内标混合标准中间溶液(1 mg/L): 分别准确吸取 3,6,3-壬基酚-D2、正壬基酚-D4、对辛基酚-13C6、正辛基酚-D17、双酚 A-D4 同位素内标标准储备液(100 mg/L) 各 1 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成 1 mg/L 的混合标准中间工作液, 置于 4 °C 冰箱中保存, 有效期 3 个月。

(5)同位素内标混合标准工作液(100 µg/L): 分别准确吸取同位素内标标准储备液(1 mg/L)各 1 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成 100 µg/L 的混合标准工作液。临用时配制。

(6)混合标准工作溶液: 分别准确吸取混合标准中间溶液(10 mg/L)适量, 加入同位素内标混合标准中间溶液(1 mg/L), 使壬基酚(4-壬基酚和 4-正壬基酚)、辛基酚(4-辛基酚和 4-正辛基酚)和双酚 A 浓度分别为 0.5、1、5、10、20、50 µg/L 的混合标准系列工作溶液。临用时配制。

(7)氨水溶液: 0.05 % 氨水溶液(V:V): 取氨水 0.5 mL 用水定容至 1000 mL。

2.3.2 色谱条件

分析柱: Kinetex™ EVO C₁₈(50 mm×3.0 mm, 3 µm); 捕集柱: Venusil® XBP C₁₈ (50 mm×4.6 mm, 5 µm); 流速 0.4 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量为 10 µL; 流动相: A 为 0.05 % 氨水溶液(V:V), B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~9 min, 30%B~95%B; 9~14.5 min, 95%B; 14.5~14.51 min, 95%B~30%B; 14.51~18 min, 30%B。

2.3.3 质谱条件

离子源: 电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)负离子模式; 离子源温度: 650 °C; 雾化气(Gas1): 55 psi; 辅助气(Gas2): 65 psi; 气帘气(gurtain gas): 20 psi; 多反应监测扫描(multiple response monitoring, MRM)采集参数见表 1。

2.3.4 样品的预处理

(1)乳粉、米粉: 试样混合均匀, 密封并标明标记, 于-20 °C 冰箱冷藏保存。

(2)鸡蛋: 取代表性试样约 200 g, 去壳后用组织匀浆机搅拌均匀, 装入洁净容器中, 密封并标明标记, 于-20 °C 冰箱中冷藏保存。

(3)水产品、动物性肌肉: 取代表性试样约 200 g, 用匀浆机匀浆均匀, 装入洁净容器中, 密封并标明标记, 于-20 °C 冰箱中冷藏保存。

(4)植物油: 试样混合均匀, 装入洁净容器中, 密封并标明标记, 于-20 °C 冰箱中冷藏保存。

(5)罐头食品: 取罐头中固形物试样约 50 g, 用匀浆机匀浆均匀, 装入洁净容器中, 密封并标明标记, 于-20 °C 冰箱中冷藏保存。

表 1 相对分子质量和超高效液相色谱-串联质谱分析参数
Table 1 Relative molecular masses and UPLC-MS/MS parameters

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
双酚 A	227	212	-80	-25
	227	133	-80	-35
4-壬基酚	219	133	-80	-40
	219	147	-80	-40
4-正壬基酚	219	106	-80	-30
	219	119	-80	-45
4-辛基酚	205	133	-80	-28
	205	117	-80	-80
4-正辛基酚	205	106	-80	-28
	205	119	-80	-54
双酚 A-D4	231	216	-80	-28
壬基酚 4-(3,6)	221	135	-83	-44
正壬基酚-D4	223	110	-80	-28
辛基酚 4-Tert	211	139	-73	-32
正辛基酚-D17	222	108	-80	-28

2.3.5 样品的提取及净化

(1)提取

准确称取 1 g(精确至 0.01 g)样品于 15 mL 具塞玻璃试管中, 加入 0.1 mL 同位素内标混合标准工作液(100 µg/L) 和 5 mL 乙腈, 涡旋混匀, 超声提取 15 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取上层乙腈相; 残留部分再用 5 mL 乙腈重复提取 1 次, 合并乙腈相, 置冰箱-20 °C 冷冻 2 h, 取出于 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液待净化。

(2)净化

取 Cleanert PEP 固相萃取柱, 使用前用 18 mL 甲醇活化, 6 mL 水平衡。将提取项所得上清液加 30 mL 水稀释, 充分摇匀后以 1~2 mL/min 的速度上样, 弃去滤液, 用 12 mL 60% 甲醇水溶液(V:V)淋洗, 弃去淋洗液, 再用 6 mL 乙腈洗脱, 洗脱液于 50 °C 用氮气吹至近干。用 1 mL 甲醇溶解残渣, 待 LC-MS/MS 测定。

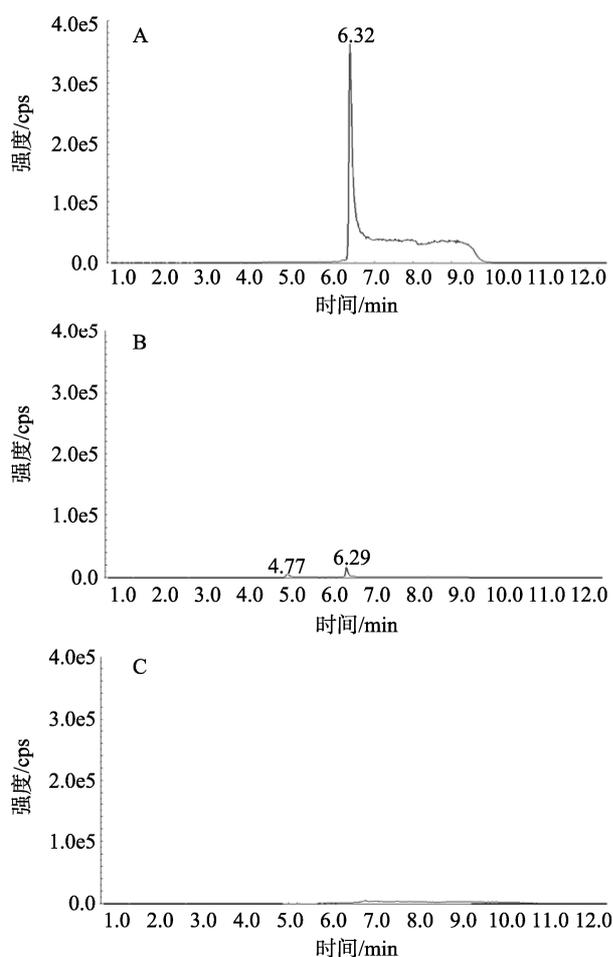
3 结果与分析

3.1 本底的存在与消除

(1)实验器皿及仪器管路本底消除 双酚 A、壬基酚和辛基酚在环境中广泛存在, 在实验器皿、仪器管路中具有较高本底, 在实验中需要加以控制。本研究分别将检测为空白的甲醇经过塑料注射器、尼龙滤膜、Q-PTFE 滤膜和 PES 滤膜, 经过检测发现, 引入的双酚 A 浓度为 1.92~24.94 ng/mL, 壬基酚的浓度为 2.95~104.1 ng/mL。因

此, 本实验所用器皿均为玻璃材质, 且不使用滤膜过滤。除此之外, 对净化过程中不可避免使用到的 Cleanert PEP 固相萃取小柱进行加倍溶剂活化, 有效地将引入的本底值降低至不影响检测结果。同时, 需将液质管路更换为不锈钢或聚四氟乙烯材质。

(2)试剂和流动相本底消除 经研究发现, 不同厂家生产的不同级别试剂, 环境雌激素含量各不相同。以壬基酚为例, 天津市唐科德科技有限公司生产的色谱级甲醇中检测出的含量为 270 ng/mL。美国 J.T. BAKER 公司生产的质谱级甲醇中检测出的含量为 2.69 ng/mL, 德国 MERCK 公司生产的质谱级甲醇中检测出的含量为 0.48 ng/mL。采用在线过滤器和进样阀之间增加一根捕集柱, 来实现流动相中目标化合物与样品中目标化合物的分离(图 1), 获得了理想的效果, 使用质谱级甲醇(德国 MERCK)作为流动相时, 未检出壬基酚。



注: A 色谱级甲醇(唐科德)谱图; B 质谱级甲醇(J.T. BAKER)谱图; C 质谱级甲醇(MERCK)在线捕集模式下的谱图。

图 1 壬基酚本底的存在与消除

Fig.1 The existence and elimination of nonylphenol background

3.2 提取溶剂的优化

由于待测组分极易在脂类成分中蓄积, 因此本文选取的研究对象均为脂肪含量较高的样品。实验选择环己烷-乙酸乙酯(1:1, V:V)、乙腈、正己烷和甲醇作为提取溶剂, 预期降低脂类物质对检测造成的影响。实验中发现加入甲醇和正己烷进行提取时, 样品挂壁严重, 尤其是奶粉样品容易发生结块, 在超声下都不易分散开, 回收率较低。当选择乙酸乙酯-环己烷作为实验的提取溶剂时, 去油效果不理想, 在提取目标物的同时, 引入更多共提取物, 干扰待测组分的检测, 影响回收率。乙腈作为提取溶剂时, 去脂效果理想且回收率较高, 综合考虑, 确定乙腈作为提取溶剂。

3.3 提取方法的优化

3.3.1 提取次数的选择

本研究采用乙腈作为提取溶剂, 以 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 虾肉基质加标样品作为研究对象, 考察了提取次数对提取效率的影响。结果显示, 用 5 mL 乙腈提取 1 次, 目标物提取不完全, 重复操作提取步骤, 第 2 次的提取量为首次提取量的 27.4%~47.7%, 第 3 次提取后, 目标物残留量很少, 辛基酚均未检出。为避免过多共提取物干扰测定, 确定提取次数为 2 次。具体结果见图 2。

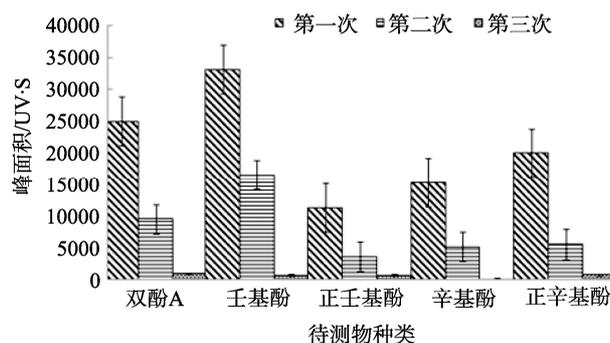


图 2 提取次数对回收率的影响 ($n=3$)

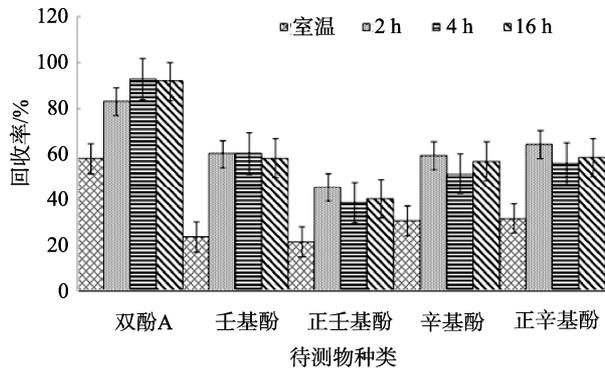
Fig.2 The effect of extraction times on the recovery($n=3$)

3.3.2 提取液温度的考察

实验考察了 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 虾肉加标样品经 5 mL 乙腈 2 次提取, 提取液在室温与冷冻处理后对目标物回收率的影响。结果显示, 提取液经 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 2 h 后, 目标物的回收率明显提高。冷冻时间继续延长, 无明显改善, 因此选择提取液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻 2 h 后净化。结果见图 3。

3.4 净化方法的优化

由于食品种类繁多, 基质复杂, 蛋白质的含量较高, 若不对样品提取液进行净化, 可能会影响待测化合物的定性和定量分析结果, 因此考虑采用操作简便的固相萃取方法对提取液净化处理。

图 3 提取液温度对回收率的影响($n=3$)Fig.3 The effect of extraction temperature on the recovery ($n=3$)

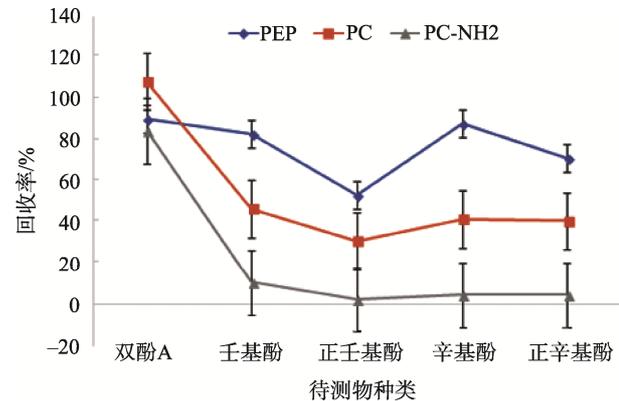
3.4.1 SPE 种类的优化

分别以待测物含 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的猪肉、虾肉及乳粉加标样品为研究对象, 通过与用甲醇配制的混合标准溶液中待测组分峰面积的比较, 对净化效果和萃取效率方面进行考察。分别比较了官能化聚苯乙烯/二乙烯苯的 Cleanert PEP 萃取柱($200 \text{ mg}/6 \text{ mL}$)、石墨化碳材质的 Cleanert PC 萃取柱($250 \text{ mg}/6 \text{ mL}$)和石墨化碳-氨基复合柱 Cleanert PC-NH₂ 3 种固相萃取柱($500 \text{ mg}/6 \text{ mL}$)。图 4 中结果表明, PC 柱和 PC-NH₂ 复合柱中仅双酚 A 回收率可满足要求, 其他 4 种回收率均较低, 可能与 PC 对壬基酚和辛基酚等物质保留过强有关。而由于 Cleanert PEP 萃取柱表面同时具有亲水性和憎水性基团, 对各种极性、非极性化合物具有较均衡的吸附作用, 因此回收效果明显优于另外 2 种, 故选择 Cleanert PEP 小柱进行净化。

3.4.2 淋洗液的优化

实验采用 50 ng 混合标准溶液过 Cleanert PEP 小柱, 使用不同淋洗液在富集待测物的同时去除杂质。通过对淋洗液中待测组分的检测, 对比考察了不同的比例和 pH 值对目标物的淋洗效果。由表 2 可知, 当淋洗液为 12 mL 60% 甲醇时对所有目标物均未造成损失, 淋洗强度相对较好,

确定为实验淋洗液。

图 4 不同固相萃取柱的淋洗效果($n=3$)Fig. 4 The effect of different SPE ($n=3$)

3.4.3 洗脱液的优化

实验分别采用乙腈、甲醇/二氯甲烷(2/8)和 1% 氨化乙腈为洗脱液, 对比了洗脱体积为 10 mL 时对目标物回收率的差异。结果显示, 相同洗脱体积下, 采用乙腈为洗脱溶剂对目标物的回收效果相对较好。因此选择乙腈为洗脱液, 继续考察洗脱液体积为 10 mL 、 6 mL 时的回收率差异。结果显示, 2 种洗脱体积对目标物回收效果无明显影响, 为避免过多的背景干扰, 选择 6 mL 乙腈对固相萃取柱进行洗脱。

3.5 检测条件优化

3.5.1 体系的选择

本研究首先比较了水-乙腈和水-甲醇流动相体系, 发现以水-甲醇作为流动相时, 5 种化合物响应值较高, 因此, 选择甲醇作为有机相继续优化。考虑在流动相中加入氨水或乙酸铵, 以增加 ESI-模式下化合物的电离。实验表明, 当水相添加 0.05% 氨水时, 响应值得到明显改善, 效果优于乙酸铵, 但继续增加氨水的添加浓度, 或在有机相中加入同样浓度的氨水, 响应值均降低。

表 2 不同淋洗液的淋洗效果
Table 2 Effect of different eluents

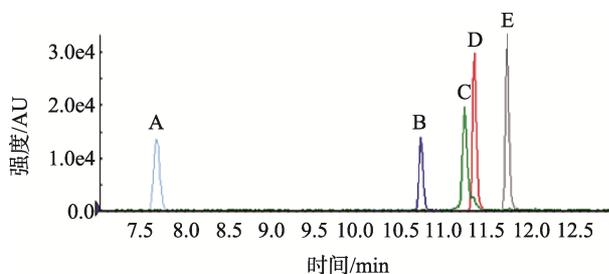
目标物	12 mL			6 mL	
	60%甲醇	80%甲醇	40%乙腈	60%乙腈	60%乙腈 (含 1%FA)
双酚 A	/	9.3 ng	1.33 ng	10 ng	9.1 ng
壬基酚	/	1.1 ng	/	/	0.45 ng
正壬基酚	/	/	/	/	/
辛基酚	/	4.5 ng	/	/	2.8 ng
正辛基酚	/	/	/	/	/

表 3 5 种环境雌激素的加标回收率与精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of 5 kinds of environmental estrogens ($n=6$)

目标物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	乳粉		鸡蛋		猪肉		虾		罐头		植物油	
		回收率 /%	RSD/%										
4-壬基酚	0.5	95.6	6.4	96.2	10.8	90.9	11.5	81.7	7.8	96.7	9.3	91.7	4.2
	5	98.8	5.6	83.4	7.2	103.0	10.1	104.0	6.2	89.5	6.2	99.6	8.0
	20	83.7	9.0	84.9	10.9	80.8	4.5	90.4	11.7	88.2	12.8	80.3	10.5
4-正壬基酚	0.5	100.5	10.2	103.0	12.0	91.6	12.5	92.2	12.6	80.5	10.2	92.2	5.9
	5	82.6	9.2	95.6	10.6	81.5	12.4	80.1	5.3	86.1	4.7	91.5	8.9
	20	90.2	7.4	91.3	11.2	101.1	8.7	94.4	8.4	99.3	8.9	83.7	6.4
4-辛基酚	0.5	88.1	10.5	84.8	6.1	89.0	10.6	94.9	6.6	101.9	5.2	95.5	8.1
	5	89.2	12.1	94.1	6.1	86.9	10.9	89.0	11.0	84.1	4.7	96.2	4.8
	20	83.5	9.3	98.8	5.5	82.4	5.2	91.6	4.8	94.4	9.9	101.8	8.5
4-正辛基酚	0.5	103.9	6.8	91.4	7.7	100.2	6.8	91.5	4.9	95.7	6.3	99.1	10.8
	5	88.1	12.7	81.7	12.1	87.9	4.3	80.9	9.0	94.7	5.4	86.2	9.2
	20	98.0	4.1	90.8	7.3	88.8	7.9	89.2	8.7	104.8	5.8	101.7	12.5
双酚 A	0.5	104.2	11.0	98.4	9.5	103.9	8.8	88.0	9.6	84.5	11.3	89.0	7.4
	5	81.7	4.6	82.7	12.5	95.9	4.6	92.5	10.5	82.4	9.0	99.1	11.1
	20	86.2	8.5	83.9	8.3	90.3	12.1	88.0	10.2	86.5	5.0	92.9	9.7

3.5.2 梯度的优化

研究发现, 目标物在高比例有机相下出峰, 且响应随着有机相比比例的上升而增强。因此, 将待测物出峰时间的有机相比比例控制为 95%。通过对比用甲醇和用猪肉空白基质配制的混合标准溶液中待测物的响应值, 发现当所有组分在短时间(4~7 min)内出峰时, 基质抑制效应明显, 通过调整流动相梯度, 将出峰时间延长至 9~15 min 时, 基质效应得到明显的改善(图 5)。



注: A: 双酚 A, B: 4-辛基酚, C: 4-壬基酚, D: 4-正辛基酚, E: 4-正壬基酚。

图 5 5 种环境雌激素的 MRM 色谱图

Fig.5 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram of 5 kinds of environmental estrogens

3.6 分析方法的评价

3.6.1 方法的线性范围、检出限和定量限

配制 5 种目标物的质量浓度为 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列混合标准工作液, 内标浓度均为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, 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 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 进行线性回归, 4-壬基酚、4-正壬基酚、4-辛基酚、4-正辛基酚和双酚 A 的线性方程分别为 $Y=1.83e+04X+2.48$ 、 $Y=1.27e+04X+3.14$ 、 $Y=2.03e+04X+2.65$ 、 $Y=5.19e+03X+0.31$ 、 $Y=1.02e+04X+3.85$, 相关系数(r)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(limit of detection, LOD), $S/N=10$ 对应的浓度为方法的定量限(limit of quantitation, LOQ)。确定婴儿配方食品、鸡蛋、畜肉、水产品、罐头及植物油样品中目标化合物的 LOQ 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOD 为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.6.2 方法的回收率与精密度

分别在空白样品中添加 3 个浓度水平的标准溶液, 每个浓度水平分析 6 次, 进行回收率和精密度实验。3 个添加水平的回收率为 80.1%~104.8%, RSD($n=6$) 为 4.1%~12.8%, 结果见表 3。

3.6.3 实际样品的测定

为考察方法的普遍适用性, 本实验随机抽取市售婴

儿配方食品、鸡蛋、畜肉、水产品、罐头及植物油 6 种基质样品共 18 份,应用本方法进行测定。结果显示,12 份样品检出了 BPA, 含量为 0.3~3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 份检出了 NP 或 4-*n*-NP, 含量为 0.6~135.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 3 份检出 OP 或 4-*n*-OP, 含量为 0.5~6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。上述结果表明,5 种待测组分广泛存在于各种食品基质中,2015 年欧洲食品安全管理局建议将此类似化合物 TDI 值由 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$ 调整为 4 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$ 。考虑到这种化合物的类雌激素效应,其健康风险影响应当引起重视。

4 结 论

本研究建立了 UPLC-MS/MS 检测食品中 4-壬基酚、4-正壬基酚、4-辛基酚、4-正辛基酚和双酚 A 的分析方法,并开展了各种降低测定本底值的研究。样本经乙腈超声提取, SPE 除酯净化,并辅以流动相在线捕集技术,有效降低空白值,提高测定灵敏度,实现了婴儿配方食品、鸡蛋、畜肉、水产品、罐头及植物油 6 类复杂样品基质中 5 种环境雌激素的同时检测,具有适用范围广泛,灵敏度高、准确度和精密度好、专属性及确证性可靠的优点,可为我国相关食品安全的检测、预警和控制提供必要的技术支持。

参考文献

- [1] Yoon K, Kwack SJ, Kim HS, *et al.* Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases [J]. *J Toxicol Environ Health B*, 2014, 17(3): 127-174.
- [2] Swedenborg E, Ruegg J, Makela S, *et al.* Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders [J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 43(1): 1-10.
- [3] Cruz G, Foster W, Paredes A, *et al.* Long-term effects of early-life exposure to environmental oestrogens on ovarian function: role of epigenetics [J]. *J Neuroendocrinol*, 2014, 26(9): 613-624.
- [4] Bhandari RK, Deem SL, Holliday DK, *et al.* Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2015, 214(9): 195-219.
- [5] 赵利霞, 林金明. 环境内分泌干扰物分析方法的研究与进展[J]. *分析实验室*, 2006, 25(2): 110-122.
Zhao LX, Lin JM. Study progress of environmental endocrine disruptors [J]. *Chin J Anal Lab*, 2006, 25(2): 110-122.
- [6] Asimakopoulos AG, Thomaidis NS, Koupparis MA. Recent trends in biomonitoring 3 of bisphenol A, 4-*t*-octylphenol, and 4-nonylphenol [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 210(2): 141-154.
- [7] 肖晶. 双酚 A 和烷基酚的检测与暴露评估[M]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2008.
Xiao J. The determination and the exposure assessment of the bisphenol A and alkylphenol [M]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2008.
- [8] 黄会, 宫向红, 邓旭修, 等. 烷基酚类化合物和双酚 A 检测方法研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2011, 1(3): 62-67.
Huang H, Gong XH, Deng XX, *et al.* Progress in detection methods of alkylphenols and bisphenol A [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2011, 1(3): 62-67.
- [9] 张敏娟, 安瑜, 唐欣, 等. 液相色谱-串联质谱法检测婴幼儿配方乳粉中双酚 A 和壬基酚[J]. *农产品加工*, 2017, 12(12): 49-55.
Zhang MJ, An Y, Tang X, *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry detection of infant formula foods bisphenol a and nonylphenol [J]. *Farm Prod Process*, 2017, 12(12): 49-55.
- [10] 李蔚, 赵秀香, 李风华. 超高效液相色谱-串联质谱法检测婴幼儿乳粉中双酚 A 和壬基酚[J]. *预防医学论坛*, 2017, 23(3): 233-235.
Li W, Zhao XX, Li FH. Simultaneous determination of bisphenol A and nonylphenol in infant milk powder by UPLC-MS/MS [J]. *Prev Med Trib*, 2017, 23(3): 233-235.
- [11] 李好, 李红萍, 孙志武, 等. 城市污水中环境雌激素的去除及环境风险评估[J]. *环境与健康杂志*, 2017, 34(4): 337-340.
Li H, Li HP, Sun ZW, *et al.* Removal and environmental risk assessment of environmental estrogens in municipal wastewater based on animal experiments [J]. *J Environ Health*, 2017, 34(4): 337-340.
- [12] 郭项雨, 李海玉, 吕庆, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定玩具中 5 种酚类内分泌干扰物[J]. *理化检验-化学分册*, 2015, 12(51): 1708-1712.
Guo XY, Li HY, Lu Q, *et al.* Simultaneous determination of 5 phenolic endocrine disruptors in toys by LC-MS/MS [J]. *Phys Test Chem Anal B*, 2015, 12(51): 1708-1712.
- [13] 刁盼盼. 分类内分泌干扰物对珠江口水体和水产动物的污染及风险评估[D]. 广州: 暨南大学, 2017.
Diao PP. Contamination and risk assessment of phenolic endocrine disrupting chemicals in water body, sediment and aquatic organisms from the Pearl River Estuary [D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- [14] 余宇燕, 庄惠生, 沙玫, 等. 荧光法测定食品包装材料中的双酚 A [J]. *分析测试学报*, 2006, 25(5): 99-101.
Yu YY, Zhuang HS, Sha M, *et al.* Fluorescence spectrophotometric determination of bisphenol a in food packing materials [J]. *J Instrum Anal*, 2006, 25(5): 99-101.
- [15] 韩灏, 邵兵, 马亚鲁, 等. 高效液相色谱法测定饮料类食品中的类雌激素[J]. *色谱*, 2005, (2): 176-179.
Han H, Shao B, Ma YL, *et al.* Determination of estrogen-like compounds in beverages by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2005, (2): 176-179.
- [16] 孙艺, 吴天伟, 崔蓉, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中壬基酚、辛基酚和 2,4-二叔丁基酚[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(15): 2164-2167.
Sun Y, Wu TW, Cui R, *et al.* Determination of nonylphenol, octylphenol and 2,4-ditertbutylphenol in animal tissue by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 26(15): 2164-2167.
- [17] 王彬, 董发勤, 代群威, 等. BSTFA-GC-MS 联用技术分析测定痕量酚类内分泌干扰物[J]. *化学研究与应用*, 2016, 28(4): 553-557.
Wang B, Dong FQ, Dai QW, *et al.* Analysis of the trace phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) based on BSTFA-GC-MS [J]. *Chem Res Appl*, 2016, 28(4): 553-557.

- [18] Liao CY, Kannan K. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China [J]. Food Addit Contam, 2014, 31(2): 319-329.
- [19] 屈芳, 吕媛, 李林, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水果中的 8 种环境雌激素[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(4): 445-450.
Qu F, Lv Y, Li L, *et al.* Determination of 8 environmental estrogens in fruits by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(4): 445-450.
- [20] 张圣虎, 张易曦, 吉贵祥, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定儿童和成人尿液中双酚 A、四溴双酚 A 和辛基酚[J]. 分析化学, 2016, 44(1): 19-24.
Zhang SH, Zhang YX, Ji GX, *et al.* Determination of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and 4-tet-octyl phenol in child and adults urine samples using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2016, 44(1): 19-24.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



宁 霄, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品分析。

E-mail: xiao200730079@hotmail.com

曹 进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品分析。

E-mail: caojin@nifdc.org.cn

丁 宏, 主任药师, 主要研究方向为食品、保健食品以及化妆品安全检测。

E-mail: dinghong@nifdc.org.cn

“饮料酒质量与品质安全”专题征稿函

饮料酒(白酒、啤酒、黄酒、葡萄酒、果露酒)工业是我国食品工业的重要组成部分, 与人民物质生活息息相关。近年来, 随着人们物质生活水平的不断提高, 对饮料酒的品质要求也在不断提升, 好喝与安全已经成为一种潮流与时尚。

近年来的塑化剂风波、勾兑门、农残门、年份门、致癌门等诸多事件或多或少地困扰着酒业发展, 饮料酒质量与品质安全问题越来越得到社会和广大消费者的关注。

鉴于此, 本刊特别策划了“饮料酒质量与品质安全”专题, 由江南大学 生物工程学院 **范文来 研究员** 担任专题主编, 围绕 **饮料酒产业发展现状、饮料酒加工过程中质量控制与品质安全管理、饮料酒质量检测标准、饮料酒中内源性 与 外源性有毒有害物质的检测方法、饮料酒包装材料等或您认为本领域有意义** 的问题展开讨论, 计划在 2019 年 4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及**范文来 研究员** 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2019 年 2 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(选择饮料酒质量与品质安全专题)

E-mail: jfoodsqa@126.com(注明饮料酒质量与品质安全专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部