超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中双酚 A

张建莹, 杨修斌, 罗耀, 金晓蕾, 岳振峰*, 陈波

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室,深圳 518045)

摘 要: 目的 通过优化牛奶中双酚 A 提取纯化和测定条件,建立牛奶中双酚 A(bisphenol A, BPA)的超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)定量检测方法。方法 采用乙腈作为提取剂和蛋白质沉淀剂,混合型阴离子固相萃取柱净化,采用 UPLC-MS/MS 在负离子模式下检测,内标法定量。结果 该方法在 $1~100~\mu g/L$ 范围内有良好的线性关系,相关系数 $r^2 > 0.990$,在空白牛奶基质中,不同添加水平下方法的平均回收率范围为 92%~115%,相对标准偏差为 3.7~%~6.6%;测定低限为 $1~\mu g/kg$ 。结论 此方法灵敏度高、准确、重现性好,适用于牛奶样品中双酚 A 的检测。

关键词: 双酚 A; 超高效液相色谱-串联质谱法; 固相萃取; 牛奶

Determination of bisphenol A residues in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Jian-Ying, YANG Xiu-Bin, LUO Yao, JIN Xiao-Lei, YUE Zhen-Feng*, Chen Bo

(Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

ABSTRACT: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenol A (BPA) in milk. **Methods** The residues of bisphenol in the test samples were extracted with acetonitrile. After being cleaned up with mixed anion exchange solid-phase extraction column, the residues were detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry under multiple reactions monitoring (MRM) mode via negative-ion mode and quantified by an internal standard method. **Results** The method showed a good linearity over the range of $1\sim100 \,\mu\text{g/L}$ for bisphenol A with $r^2>0.990$. The average recoveries were $92\%\sim115\%$ at three spiked levels in milk and the relative standard deviations were $3.7\%\sim6.6\%$. The limit of quantitation was $1 \,\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method is highly sensitive, accurate and reproducible, and it can be suitable for the detection of bisphenol A in milk.

KEY WORDS: bisphenol A; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; milk

1 引 言

双酚 A(bisphenol A, BPA)可用作食品包装材料、

容器内壁涂料, 起到防止酸性蔬菜和水果从内部侵蚀金属容器的作用。BPA 是雌激素的一种, 可引起雄性哺乳动物性腺发育不良、精子数量减少等, 引起雌

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011IK235)、国家科技支撑计划课题(2012BAK08B01)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2011IK235) and the National Key Technology R & D Program (2012BAK08B01)

^{*}通讯作者: 岳振峰, 男, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yuezhenfeng@163.com

^{*}Corresponding author: YUE Zhen-Feng, Professor, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China. E-mail: yuezhenfeng@163.com

性哺乳动物阴道、子宫、卵巢等形态及功能上的改变; BPA 长期少量的摄入,亦有可能对机体的遗传物质 (DNA、染色体、基因)造成损坏,导致"致突变、致畸形和致癌(三致)"等遗传毒理效应^[1,2]。因此, BPA 在食品塑料容器中残留均可能对动物和人的生殖系统、免疫系统造成危害^[3,4]。牛奶在生产过程中,由于设备的原因可能会接触到塑料制品,成品奶的很多包装材料中也可能含有 BPA。因此, BPA 可以通过各种途径进入牛奶中,危害人体健康。加拿大是发出 BPA 禁令的第1个国家,丹麦也禁止对3岁及以下婴幼儿的食品容器使用 BPA^[5]。英国、美国和意大利的专家正在寻求对婴儿产品及塑料包装禁止使用 BPA 的禁令^[6]。我国目前没有食品中 BPA 相关的限量法规与标准检测方法。

目前, 国内外奶和奶制品双酚 A 的检测方法主 要有电化学法、液相色谱法和液-质联用法[5-12]、气相 色谱法和气-质联用法。化学发光法可以定性检测, 但无法定量:液相色谱法只能依靠化合物的保留时 间和光谱定性, 易受杂质干扰。液-质联用法采用保 留时间与特征离子对比例对已知目标物进行定性和 定量分析,准确性和灵敏度优势明显。根据文献调研 统计, 牛奶中双酚 A 的液相和液质联用测定方法的 前处理方式大致可分为直接提取、固相萃取(solid phase extraction, SPE)及微萃取方式^[9]。直接提取法一 般采用溶剂提取并离心的方法,操作简便、省时,同 时具有良好的提取率。为了更好地评价 BPA 在食品 中的含量,建立食品中快速、灵敏和高效的分析方 法就显得比较重要。本研究比较了不同的萃取溶剂 及 SPE 柱对萃取效果的影响, 以乙腈为提取溶剂, 混合阴离子萃取柱作为固相萃取柱、优化了前处理 条件和仪器条件、建立了 UPLC-MS/MS 检测牛奶中 双酚 A 浓度的方法、将该方法应用于实际牛奶样品 的检测。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

Waters XEVO TQS 型超高效液相色谱串联四极杆质谱仪, 配电喷雾离子源(美国 Waters 公司), 配Waters 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Waters Oasis MAX 混合型阴离子固相萃取小柱(美国 Waters 公司); 离心机(德国 Sigma 公司); 固相萃取真空装置

(美国 Agilent 公司);氮吹浓缩仪(美国 Caliper 公司)。

标准物质: 双酚 A(DE.R 公司), 纯度≥97%; 氘 代双酚 A-D16(Bisphenol A-D16, BPA-D16, 内标物, 购自 DE.R 公司)。乙腈、甲醇(Merck 公司)、乙酸铵 (Sigma 公司)为色谱纯; 氯化钠、氨水为分析纯。

0.1%氨水溶液: 吸取 0.10 mL 氨水, 加入 100 mL 去离子水中, 混匀。2.0% 氨水-甲醇溶液: 吸取 2 mL 氨水, 加入 98 mL 甲醇中, 混匀。60%甲醇-水溶液: 量取 60 mL 甲醇, 加入 40 mL 去离子水中, 混匀。

标准储备溶液: 准确称取适量的双酚 A 和氘代双酚 A-D16(BPA-D16), 分别用甲醇配制成浓度为 1.0~mg/L 和 0.10~mg/L 的标准储备溶液, 避光 4~ $^{\circ}$ 保存。

标准曲线系列溶液: 分别吸取适量的双酚 A 和 氘代双酚 A-D16(BPA-D16)标准储备溶液, 用 60%甲醇水配制成双酚 A 浓度为 0、 1、 5、 10、 25、 50 和 $100~\mu g/L$,内标物浓度为 $25~\mu g/L$ 的基质混合标准工作溶液。当天配制。

市售盒装牛奶。

2.2 超高效液相色谱与质谱条件

色谱柱: Waters UPLC BEH $C_{18}(1.7~\mu m,~50~mm\times2.1~mm)$ 。流动相 A: 水; 流动相 B: 甲醇; 梯度 洗脱程序: $0\sim2~min$,流动相 B 从 5.0%线性增至 35.0%; $2\sim4~min$,流动相 B 线性增至 95.0%; $4\sim5~min$,流动相 B 线性降至 5%,并保持 4~min。流速为 $0.3~\mu L/min$ 。柱温 $40~\mathbb{C}$,进样量 $5~\mu L$ 。

电喷雾电离负离子模式(electron spray ionization, ESI'),多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM);离子源离子喷雾电压: -3000 V;辅助气流速: 800 L/h;碰撞气: 氩气;幕帘气流速: 50 L/h;离子源温度: 110 °C;辅助气温度: 350 °C;双酚 A 测定的其他质谱参数见表 1。

2.3 样品前处理

2.3.1 样品提取

称取均质试样 5 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 具塞玻璃离心管中,加入内标液(1 mg/L)62.5 μ L,再加入 2 g 氯化钠,25 mL 乙腈超声提取 30 min,9500 r/min 离心 10 min。吸取 10 mL 上清液于 15 mL 的具塞玻璃离心管中,45 ℃水浴中氮气吹至约 0.2 mL,加入 5 mL 0.1%氨水溶液,振荡混匀。

	表 1 双酚 A 测定的质谱参数
Table 1	Agent parameters of mass spectrometry for the determination of bisphenol A

化合物名称	参考保留时间(min)	碎片离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	采集时间(s)	碰撞气能量(eV)	锥孔电压(V)
BPA	3.77	227.2>212	227.2>212	0.1	20	49
		227.2>133			26	
BPA-D16	3.74	241.2>223	241.2>223	0.1	17	49
		241.2>142			25	49

2.3.2 固相萃取净化

吸取所有混合溶液于使用前依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化处理过的弱阴离子固相萃取柱中, 待样液以低于 1 mL/min 的流速全部通过固相萃取柱; 再吸取 5 mL 0.1%氨水淋洗管子并加到固相萃取柱中, 待溶液完全通过小柱后抽干 10 min; 最后用 10 mL 2.0 %氨水-甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液于 50 ℃水浴中氮吹至近干, 用 60%甲醇-水溶液定容至 1 mL, 旋涡混匀 1 min, 上机测定。

3 结 果

3.1 提取溶剂的选择

双酚 A 溶于乙醇、丙酮、乙醚、苯及稀碱液等,微溶于四氯化碳,几乎不溶于水。牛奶中含有大量的蛋白质和糖类。根据相似相溶的原理,实验选取弱极性的溶剂作为提取溶剂。考察了二氯甲烷、乙腈、乙酸乙酯及丙酮作为提取溶剂对双酚 A 的提取效率,结果表明,采用二氯甲烷、乙腈,可以得到较高的提取效率,其提取率在80%以上。用甲醇、二氯甲烷、丙酮和乙酸乙酯做提取溶剂时,共提物较多,特别是糖类及酯溶性成分易被提取出来,影响下一步的净化以及最终检测的灵敏度。乙腈一方面能沉淀蛋白质而脂肪提出又很少,又有利于后续的盐析和净化。选用乙腈作为提取溶剂,既可以保证提取效率,又可以避免从样品中提出大量干扰物质。本实验采用乙腈作为提取溶剂。

3.2 净化条件的选择

乙腈能够将样品中的双酚 A 提取出来,可以使样品中的蛋白失活沉淀,但同时容易将一些脂溶性杂质提取出来,因此在测定前需对提取液进行净化。本方法测定的双酚 A 的结构中存在两个羟基,在碱性环境下以阴离子的形式存在于溶液中,本实验选择使用 Waters Oasis MAX 混合型阴离子固相萃取小

柱进行净化。

通过试验不同比例的氨水-甲醇溶剂的洗脱效果, 结果表明, 采用 2 %氨水-甲醇溶液, 双酚 A 能够得到较好的洗脱, 故实验选择 2 %氨水-甲醇溶液。试验比较了不同淋洗体积(3、5、8、10 mL)后发现, 随洗脱剂体积增大到 8 mL 后, 被测物及内标物的回收率已基本达到稳定值, 如洗脱体积过大会使下一步的浓缩时间延长, 为避免浓缩时间过长造成损失及节省试剂, 最终选择洗脱体积为 10 mL。洗脱溶液的洗脱曲线见图 1。

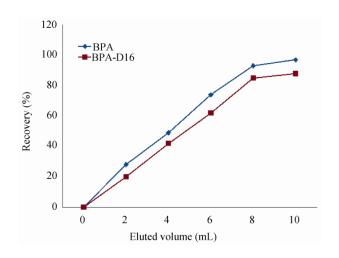


图 1 洗脱溶液的洗脱曲线图

Fig. 1 Effects of eluted solution volumes on BPA and BPA-D16

3.3 色谱分离条件研究

为了优化流动相,对比了甲醇-5 mmol/L 乙酸铵水溶液(pH 6.4)、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液(pH 6.4)、甲醇-水溶液、乙腈-水溶液做流动相的色谱效果。试验表明:采用甲醇-5 mmol/L 乙酸铵水溶液(pH 6.4)、乙腈-乙酸铵水溶液(pH 6.4)这两种流动相,双酚 A 的峰形不好且灵敏度不高;乙腈-水溶液和甲醇-水做为流动相药物的峰型都很高,但甲醇-水做为流

动相待测物的响应值更高, 因此采用甲醇-水做为流动相。通过优化梯度洗脱程序, 双酚 A 获得了较好的灵敏度和较好的峰型。

3.4 质谱测定条件的优化

分别取浓度为 5 mg/L 的双酚 A 和双酚 A-D16 标准溶液,采用流动注射进样的方式,以 30 μL/min 流速分别将标准溶液注入离子源。在负离子检测方式

下分别对其进行母离子扫描得到分子离子峰[M-H]。 再对其母离子进行子离子扫描,得到两个子离子,双 酚 A 和双酚 A-D16 的二级质谱见图 2, 3。然后分别 对锥孔电压及碰撞能量等参数进行优化,使母离子 与选取的子离子强度达到最大;继续优化电喷雾电 压、去溶剂气流速、去溶剂气温度、离子源温度,使 离子化效率达到最佳。

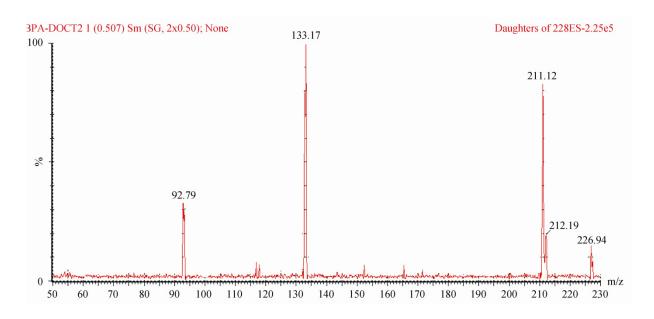


图 2 双酚 A 的二级质谱图 Fig. 2 MS/MS spectrum of BPA

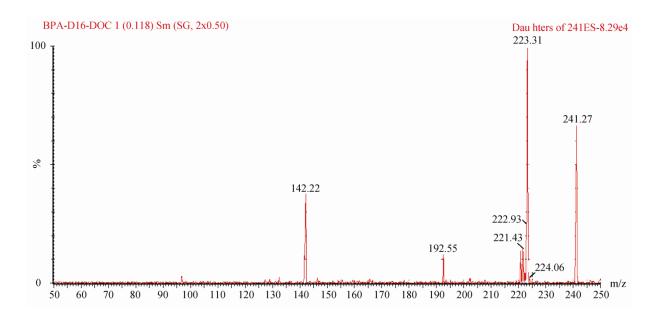


图 3 双酚 A-D16 的二级质谱图 Fig. 3 MS/MS spectrum of BPA-D16

3.5 方法的检出限、线性范围及回收率

在上述优化的实验条件下,取一系列空白样品提取液配制的标准溶液,以双酚 A 和内标物的峰面积比(Y轴)对浓度比(X轴)绘制标准曲线,得到线性回归方程及相关系数,结果见表 2,由表 2 可以看出本方法具有较宽的线性范围,线性关系良好。经过测定方法的室内实验,确定本方法对牛奶中双酚 A 的测定低限为 $1 \mu g/kg$ 。

表 2 牛奶样品基质中双酚 A 的线性关系
Table 2 Regression equation, correlation coefficient linear range of BPA

化合物	相关系数	线性方程	线性范围(μg /L)
BPA	0.9923	$Y = 1.10 \times 10^4 \ X + 5.0 \times 10^3$	1~100

对牛奶样品分别进行 3 个浓度水平的空白加标回收率实验,每个浓度水平进行 6 次平行测试,测得双酚 A 的平均回收率和精密度见表 3。不同的添加水平下方法的平均回收率范围为 92%~115%,相对标准偏差为 3.7%~6.6%。

表 3 双酚 A 的回收率及相对标准偏差

Fable 3 Recoveries and relative standard deviations of BPA (n=6)

 样品 基质	化合物	添加浓度 (µg/kg)	平均 回收率(%)	相对标准 偏差(%)
双酚A	牛奶	1.00, 10.0, 100	92, 115, 108	6.6, 3.7, 6.2

3.6 方法的特异性

采用本方法对空白和加标牛奶进行分析, 在目标化合物出峰位置没有杂质峰干扰测定, 方法的特异性可以满足检测要求。图 4 为 BPA 和 BPA-D16 在空白牛奶样品中加标量为 10 μg/kg 的多反应监测 (MRM)色谱图。

4 方法的应用

为了考察本方法的适用性,采用本方法对深圳市场销售的部分成品盒装牛奶中的双酚 A 进行了检测,检测结果见表 4。据表 4 可知,所抽检的盒装牛

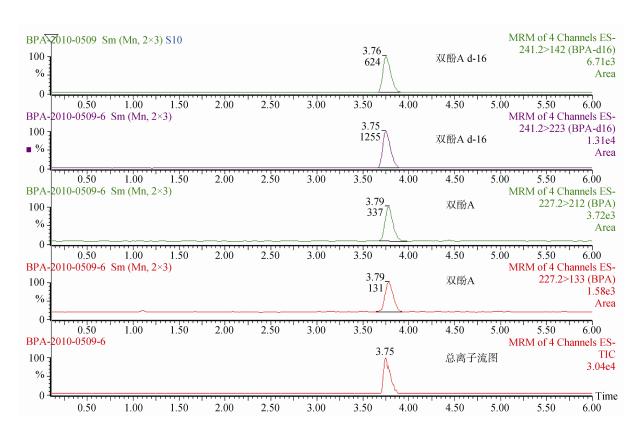


图 4 加标牛奶样品的多反应监测(MRM)色谱图(加标浓度 10.0 μg/kg) Fig. 4 MRM chromatogram of spiked milk sample

表 4 抽查牛奶样品信息和双酚 A 测定结果
Table 4 Determination results of spot milk sample information and bisphenol A

序号	样品名称	双酚 A 含量µg/kg
1	复原乳牛奶	未检出
2	朱古力牛奶	5.6
3	朱古力牛奶	4.3
4	纯牛奶	未检出
5	酸酸乳	3.2
6	原麦早餐奶	未检出
7	纯牛奶	未检出
8	优酸乳	3.6
9	乳酸奶	未检出
10	红枣枸杞牛奶	12.9
11	早餐奶	3.7

奶, 其中 5 份样品未检出 BPA, 6 份样品中 BPA 含量大于定量限 1 μ g/kg, 其中一份红枣枸杞牛奶中 BPA 含量为 12.9 μ g/kg。

5 结 论

3442

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法建立了牛奶样品中双酚 A 的定量测定和确证方法,该方法采用乙腈作为提取剂、蛋白质为沉淀剂,经混合型阴离子固相萃取柱净化,采用 UPLC-MS/MS 在负离子模式下检测,内标法定量。该方法在 $1\sim100~\mu g/L$ 范围内有良好的线性关系,相关系数 $r^2>0.990$,在空白牛奶基质中,不同添加水平下方法的平均回收率范围为 $92\%\sim115\%$,相对标准偏差为 $3.7\%\sim6.6\%$,测定低限为 $1~\mu g/kg$ 。以上充分说明本方法具有快速、灵敏和高效、重现性好等特点,测定低限、回收率和精密度均符合残留分析要求。

参考文献

- [1] 梁增辉,何世华,孙成均,等.引起青蛙畸形的环境内分泌干扰物的初步研究[J]. 环境与健康杂志,2002,19(6):419-421. Liang ZH, He SH, Sun CJ, *et al.* Preliminary study on the environmental endocrine disruptors causing malformed frogs [J]. J Environ Health, 2002, 19(6):419-421.
- [2] 汪莉, 刘红河, 李莉莎. 高效液相色谱法测定环境雌激素[J]. 实用预防医学, 2004, 11(2): 360-361.

Wang L, Liu HH, Li LS. Determination of environmental estro-

gens by HPLC [J]. Pract Prev Med, 2004, 11(2): 360-361.

- [3] 周建科, 张前莉, 韩康, 等. 中老年奶粉中双酚 A 和己烯雌酚 的反相高效液相色谱测定[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 419-421.
 - Zhou JK, Zhang QL, Han K *et al.* Determination of Bisphenol A and diethylstilbestrol in Milk Powder for Middle Age and the Aged by RP-HPLC [J]. Sci Technol Food Ind, 2007, 28(2): 419–421.
- [4] 杨成对, 宋莉晖. 双酚 A 残留的检测方法研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 316-317.
 - Yang CD, Song LH. Study on determination method of bisphenol a residue [J]. Food Sci, 2008, 29(7): 316–317.
- [5] 赵艳芳,宋吉英,徐鲁斌,等.超声辅助分散液相微萃取-高效液相色谱法测定牛奶中的双酚 A[J].青岛农业大学学报:自然科学版,2011,28(2):154-156.
 - Zhao YF, Song JY, Xu LB, *et al.* Determination of bisphenol a in milk by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Qingdao Agr Univ: Nat Sci, 2011, 28(2): 154–156.
- [6] 田宏哲, 徐静. 高效液相色谱法测定牛奶中双酚 A[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 286-289.
 - Tian HZ, Xu J. Quantitative analysis of bisphenol A in milk samples by HPLC [J]. Food Sci Technol, 2012, 37(8): 286–289.
- [7] 俞晔,周强. 液相色谱-电喷雾电离串联质谱法测定牛奶中双酚 A[J]. 粮油加工, 2010, 7: 145-147.
 - Yu Y, Zhou Q. Determination of bisphenol A in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Grain Oil Proc, 2010, 7: 145–147.
- [8] 吴新华, 丁利, 肖家勇, 等.单分散磁性亚微米粒子固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的双酚 A[J]. 色谱, 2011, 29(5): 399-403.
 - Wu XH, Ding L, Xiao JY, *et al.* Determination of bisphenol A in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction of monodisperse magnetic submicron particles as adsorbent [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(5): 399–403.
- [9] 陈波,肖锋,赵琼辉,等.液相色谱-串联质谱法测定乳制品中双酚 A 及其环氧衍生物[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(3):584-594.
 - Chen B, Xiao F, Zhao QH, *et al.* Determination of bisphenol A and its epoxy derivatives in dairy products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(3): 584–594.
- [10] Khim JS, Lee KT, Kannan K, et al. Trace organic contaminants

- in sediment and water from Ulsan Bsy and its vicinity, Korea[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2001, 40: 141-150.
- [11] Heemken OP, Reincke H, Stachel B, et al. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea [J]. Chemosphere, 2001, 45: 245-259.
- [12] Rudel RA, Brody JG, Spengler JD, et al. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples [J]. J Air Waste Manag Assoc, 2001, 51: 499-513.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张建莹,硕士,高级工程师,主要 研究方向为食品质量安全检测。 E-mail: zhangjianying1001@163.com



岳振峰, 博士, 研究员, 主要研究 方向为食品质量安全检测。

E-mail: yuezhenfeng@163.com

"现代发酵工程在食品工业中的应用"专题征稿

目前、生物工程技术已经被人们广泛的应用在人类社会发展的过程中、不仅给生活和工程带来了极大的 便利、同时因其具有环境保护作用、给人们带来广阔的经济效益和良好的社会效应。发酵工程是生物技术产业 化的基础,而在食品领域发展的过程中,现代发酵工程技术也成为其中的主要内容。

鉴于此, 本刊特别策划了"**现代发酵工程在食品工业中的应用**"专题, 由**河南工业大学的黄继红教授**担任 专题主编。黄继红教授兼任中国发酵工程研究会专家组专家,中国微生物学会理事,河南省食品科学技术学会 常务理事、河南省生物工程学会副理事长、河南省微生物学会理事、国家级节能减排评估师、国家食品生产质 量安全评估师。长期从事现代发酵工程的研究。本专题主要围绕:改造传统的食品加工工艺,开发功能性食品, 新糖原的开发,微生物蛋白及生物活性小分子肽的生产,微生物油脂的生产,发酵饮料、酒类的生产,微生物 发酵生产食品添加剂等内容进行论述,或您认为本领域有意义的问题展开讨论,计划在2014年12月出版。

本刊编辑部及**黄继红教授**特邀请各位专家为本专题撰写稿件、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 2014 年 12 月 10 日前通过网站在线投稿或 E-mail 投稿。我们将快 速处理并优先发表。也可加急、投稿时请注明!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com E-mail: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部