

固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中双酚 A、 双酚 F 和双酚 S

李 星, 王 浩*, 张文超, 张 烨, 巴冬梅, 冉令磊
(国家食品质量监督检验中心 北京 100094)

摘要 为建立同时测定牛奶中双酚 A、双酚 F 和双酚 S 含量的液相色谱-串联三重四极杆质谱联用方法,将样品用氨水:乙腈溶液(1:9,体积比)溶解,超声提取,PRiME HLB 固相萃取柱净化,用安捷伦 Poroshell 120 PFP 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)分离,采用负离子多反应监测模式监测,内标法定量。在此优化条件下,牛奶中双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的定量限均为 2.0 μg/kg,平均方法回收率在 90.4%~103.1%范围,平均相对标准偏差为 2.76%~7.34%(n=6)。此方法的准确性和重复性良好,适用于牛奶中双酚 A、双酚 F 和双酚 S 含量的检测。

关键词 液相色谱-串联三重四极杆质谱; 牛奶; 双酚 A; 双酚 F; 双酚 S

文章编号 1009-7848(2022)04-0382-05 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.04.038

双酚 A(Bisphenol A, BPA)是一种常见的环境内分泌干扰物,是合成聚碳酸酯、环氧树脂、聚砜树脂等多种高分子材料的前体物质,常用于食品包装、容器内壁涂层及婴儿奶瓶的生产中^[1]。研究表明,双酚 A 对人和动物的内分泌系统、神经系统、免疫系统及生殖系统有不良影响,甚至会诱发某些癌症^[2-4]。BPA 暴露对人体健康的影响,已引起多国关注。欧盟、日本、加拿大、美国等对双酚 A 在食品接触材料中的含量做出了严格规定^[5]。2011 年,我国卫生部公告第 15 号中全面禁止生产、进口及销售含 BPA 的婴幼儿奶瓶,其它食品包装材料、容器中允许使用 BPA,然而 BPA 含量要符合相关食品安全国家标准中的规定^[6]。双酚 F(BPF)和双酚 S(BPS)作为双酚 A 的结构类似物,具有类似于 BPA 的结构和更强的酸性及稳定性,为满足市场需求,被广泛用于禁止或限制 BPA 使用的日常用品的制造,被认为是双酚 A 的“安全”替代物。然而,越来越多的研究表明双酚 S 和双酚 F 也具有与双酚 A 相似的内分泌干扰活性^[7],如雷鹏辉等^[8]发现双酚 S 和双酚 F 对斑马鱼胚胎及幼鱼早期发育有影响,对水生生物产生氧化压迫。

双酚类化合物污染饮用水、环境,并经土壤-植物系统进入食物链。奶牛食用了受污染的饲料后,牛奶中就可能会有双酚 A、双酚 F、双酚 S 的残留;生乳储存、运输及加工过程中,可能会接触到塑料制品设备,牛奶及其制品的包装材料中也可能含有 BPF、BPA、BPS,进而危害人体健康。牛奶是人们生活中的必需品,我国目前还没有对双酚 A、双酚 F、双酚 S 的国标检测方法,同时缺乏对食品中双酚 A、双酚 F、双酚 S 含量水平和污染情况的全面摸底和评估。研究牛奶中双酚 A、双酚 F、双酚 S 的检测方法具有重要现实意义。

目前,国内外测定双酚类化合物的方法主要有气相色谱-质谱法^[9]、液相色谱法^[10]及液相色谱-串联质谱法等^[11]。液相色谱仪的灵敏度不高,在检测过程中容易出现假阳性。气相色谱-质谱法前处理繁琐,样品测定时间较长,不适于大量样品的快速测定。高效液相色谱-串联质谱法具有前处理简单,抗干扰能力强,灵敏度较高等优点,被广泛应用。目前,利用液相色谱-质谱联用法测定牛奶中 BPA 的研究较多,如张建莹等^[12]通过优化牛奶中双酚 A 的提取纯化和测定条件,建立牛奶中双酚 A 的超高效液相色谱-串联质谱检测方法。然而,有关同时测定牛奶中双酚 A、双酚 F 和双酚 S 含量的方法未见报道。本文采用氨水乙腈超声提取并去除蛋白,通过 RiME HLB 固相萃取柱除去脂肪,氮吹富集,采用高效液相色谱-串联质谱法测

收稿日期: 2021-04-24

基金项目: 科技部重点科技计划项目(2017YFC1601003);
北京市科技计划项目(Z181100009318011)

作者简介: 李星(1989—),女,硕士,工程师

通信作者: 王浩 E-mail: haowang2003@163.com

定,内标法定量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛奶,北京美廉美超市。

双酚 A、双酚 F、双酚 S、双酚 A-D₄、双酚 F-¹³C₆ 和双酚 S-¹³C₁₂(纯度≥99%),TRC 公司;乙腈、甲醇、氨水均为 HPLC 级;Milli-Q 超纯水系统,上海摩速科学仪器有限公司;Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(200 mg/6cc),美国 Waters 公司;分析天平(XSE105),赛多利斯科学仪器有限公司。

Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统:配有电喷雾离子源 ESI 及 Agilent1290 II 型液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;DL-120J 型超声波清洗仪,上海之信仪器有限公司;Multi real 振荡器,厦门科睿特仪器有限公司;ucg-24c 圆形水浴氮吹仪,北京优晟联合科技有限公司。

1.2 标准溶液制备

标准和同位素内标储备液(1 mg/mL):双酚 A、双酚 F、双酚 S、双酚 A-D₄、双酚 F-¹³C₆ 和双酚 S-¹³C₁₂ 标准品各约 10 mg(精确至 0.1 mg),用甲醇溶解定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,-18℃避光保存,有效期 6 个月。

混合标准中间液(10 μg/mL):准确吸取上述储备液 1.0 mL,于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配成质量浓度为 10 μg/mL 的中间液,4℃保存,有效期 1 个月。

1.3 样品的提取

取试样 1.0 g,精确到 0.01 g,放入 10 mL 的比色管中,加入 20 μL 内标工作液,氨水:乙腈溶液(1:9,体积比)溶解并定容至刻度,涡旋混匀,超声提取 10 min,静置片刻,取 2 mL 上清液,使用 PRiME HLB 固相萃取柱进行净化。准确移取净化液 1.5 mL 于离心管中,水浴氮气吹干,0.3 mL 乙腈溶解,过 0.22 μm 的微孔尼龙滤膜至进样瓶,待测。

1.4 色谱-质谱条件

色谱条件:色谱柱:安捷伦 Poroshell 120 PFP 色谱柱(2.0 mm×150 mm,5 μm);流速:0.30 mL/min;进样体积:2 μL;流动相 A:甲醇,流动相 B:1%氨水溶液。

质谱条件:电喷雾负离子源(ESI⁻);多反应检测的检测方式(MRM);雾化气压力为 275.8 kPa;干燥气(N₂)温度为 300℃;鞘气温度为 350℃;鞘气流速为 11 L/min;毛细管电压为 3 500 V;其它参数如表 1 所示。

表 1 化合物的质谱分析参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of the compounds

化合物名称	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碎裂电压/V	碰撞电压/V
双酚 A	227.0	132.9*;212.0	120	30;17
双酚 A-D ₄	231.2	216.2	80	15
双酚 F	199.1	105.0*;93.5	120	20;25
双酚 F- ¹³ C ₆	205.1	99.0	120	25
双酚 S	249.0	108.0*;156.0	120	25;15
双酚 S- ¹³ C ₁₂	261.0	114.0	135	25

注:*. 定量离子。

2 结果与分析

2.1 优化的样品前处理方法

由于牛奶基质复杂,富含脂肪和蛋白质,因此应选取弱极性的溶剂作为提取溶剂,本试验分别比较了丙酮、乙腈、甲醇及氯仿对牛奶中蛋白质的去除效果。结果表明,乙腈去除蛋白的效果最好,同时又可以避免从样品中提取出大量其它干扰物

质;双酚 A、双酚 F 及双酚 S 都是负离子模式电离,为了提高离子化效率,本方法采用氨水:乙腈(1:9,体积比)溶液提取样品。

牛奶中的大部分蛋白质可通过氨水乙腈沉淀,而同时其它杂质也会被提取出来,为了避免影响目标物的分离效果,在使用氨水:乙腈(1:9,体积比)溶液提取样品后,还要进行必要的净化。分

别比较了4种固相萃取柱的净化效果,包括安杰尔 PCX(6cc/200 mg)、PRiME HLB(6cc/200 mg)、Oasis HLB(6cc/200 mg)及安杰尔 C18(6cc/200 mg)。结果表明,PRiME HLB(6cc/200 mg)固相萃取柱能吸附牛奶中的非极性干扰物质,如脂肪和磷脂,去除效率达90%以上。为了提高目标化合物检测灵敏度,本方法采用氮吹进行富集。

2.2 优化的色谱条件

2.2.1 色谱柱 分别采用资生堂 MG III-C18 色谱柱(150 mm×2.1 mm,5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm,1.8 μm)、Hypersil GOLD C18 色谱柱(50 mm×4.6 mm,1.9 μm)和 Agilent Poroshell 120 PFP 色谱柱(100 mm×4.6 mm,2.7 μm)对样品进行分离。试验发现,Agilent Poroshell 120 PFP 色谱柱(50 mm×4.6 mm,1.9 μm)的分离效果较好,有利于目标化合物与杂质的分离。

2.2.2 色谱分离条件 双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的极性不同,因此3种化合物采用流动相梯度洗脱的方式进行分离,结果显示,双酚 A 会出现假阳性的情况。基于以上试验结果,本试验采用流动相等度洗脱,流动相为甲醇和1%氨水溶液。结果表明,当甲醇和1%氨水溶液作为流动相时,双酚 A、双酚 F 及双酚 S 能在7 min 内被有效分离。图1为双酚 S、双酚 F 和双酚 A 的色谱图。

2.2.3 进样量 试验发现,当进样量为2 μL 时,灵敏度能达到要求,而且可有效延长色谱柱的使用寿命。

2.3 定量方法

基质效应是指样品中分析物易受除分析物以外的组分干扰,从而影响测定结果的准确性。本文对比牛奶提取液及色谱乙腈分别配制的含双酚 A、双酚 F 及双酚 S 标准曲线斜率的比值大小,评

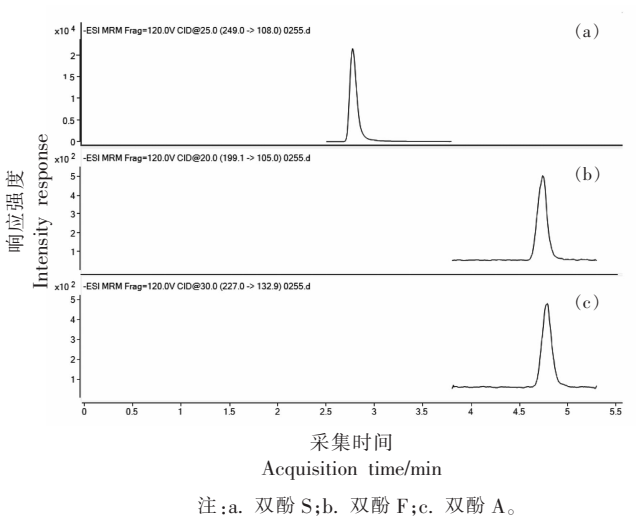


图1 双酚 S、双酚 F 和双酚 A 的标准溶液 MRM 色谱图
Fig.1 Standard solution MRM chromatogram of bisphenol S, bisphenol F and bisphenol A

价双酚 A、双酚 F 及双酚 S 的基质效应。结果显示,双酚 A、双酚 F 和双酚 S 在牛奶中与乙腈中的标准曲线的斜率比值分别为0.65,0.70,0.36,证明牛奶中的其它基质对双酚 A、双酚 F 及双酚 S 的定量存在电离抑制的基质效应。基于以上试验结果,采用同位素内标法校正基质效应对结果的影响,提高测定结果的准确性。本试验选择双酚 A-D₄、双酚 F-¹³C₆ 和双酚 S-¹³C₁₂ 为相应的内标物质,采用内标法定量分析。

2.4 线性范围与检出限

配制标准系列混合工作液(双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的质量浓度依次为1.0,2.0,5.0,10.0,20.0 ng/mL,二者的内标质量浓度均为10.0 ng/mL)。以双酚 A、双酚 F、双酚 S 和内标物的峰面积比(y)和对浓度比(x)绘制标准曲线。以信号与噪音的比值为3时,对应的质量浓度为检出限,比值为10时,对应的质量浓度为定量限。结果如表2所示。

表2 双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的线性参数和检出限
Table 2 Linearity parameters and detection limit of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S

化合物	线性方程	线性范围/ng·mL ⁻¹	相关系数(r)	定量限/μg·kg ⁻¹	检出限/μg·kg ⁻¹
双酚 A	y = 0.0717x-0.0036	1.0~20.0	0.9987	2.0	1.0
双酚 F	y = 0.1114x+0.0058	1.0~20.0	0.9984	2.0	1.0
双酚 S	y = 0.04197x-0.00141	1.0~20.0	0.9986	2.0	1.0

2.5 方法的回收率与精密度

称取 18 份等量的空白样品,分为 3 组,分别定量加入混合标准物质及对应的内标物质,使得双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的加标量质量浓度为 2.0,4.0,10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

按以上试验方法提取后进行测定,测定结果见表 3。结果表明,双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的平均方法回收率在 90.4%~103.1%之间,平均相对标准偏差为 2.76%~7.34%($n=6$)。

表 3 双酚 A、双酚 F 和双酚 S 的加标回收率及精密度

Table 3 Standard addition recovery rate and relative standard deviation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S

化合物	第 1 组 (2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		第 2 组 (4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)		第 3 组 (10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
双酚 A	95.4	9.04	101.6	7.34	98.1	5.24
双酚 F	96.4	8.27	92.8	6.69	96.5	3.93
双酚 S	90.4	5.31	95.6	4.57	103.1	2.76

2.6 实际样品检测

利用上述试验方法对市场销售的 10 种牛奶样品进行检测,验证方法的可靠性和适用性。结果显示,双酚 A、双酚 S、双酚 F 的测定值均低于方法检出限。

3 结论

本文建立了同时测定牛奶中双酚 A、双酚 F 及双酚 S 的液相色谱-串联质谱测定方法。该方法采用氨水:乙腈溶液 (1:9, 体积比) 沉淀蛋白, PRiME HLB 固相萃取柱净化,采用负离子多反应监测模式监测,内标法定量;在不同添加水平下,平均方法回收率在 90.4%~103.1%之间,平均相对标准偏差为 2.76%~7.34%($n=6$)。该方法具有样品前处理简单,测定快速,准确性和重复性良好,能为我国牛奶中双酚 A、双酚 F 和双酚 S 污染物残留的监管与乳品流通过程中的安全问题提供技术支持。

参 考 文 献

- [1] 曹杰, 和佳鹭, 易承学, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中双酚 A 和双酚 S[J]. 理化检验-化学分册, 2018, 54(5): 573-576.
CAO J, HE J Y, YI C X, et al. Simultaneous UHPLC-MS/MS determination of bisphenol A and bisphenol S in foods[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2018,

- 54(5): 573-576.
- [2] 吴皓, 孙东, 蔡卓平, 等. 双酚 A 的内分泌干扰效应研究进展[J]. 生态科学, 2017, 36(3): 200-206.
WU H, SUN D, CAI Z P, et al. Advances in endocrine disrupting effects of bisphenol A[J]. Ecological Science, 2017, 36(3): 200-206.
- [3] SIRACUSA J S, YIN L, MEASEL E, et al. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review[J]. Reproductive Toxicology, 2018, 79: 96-123.
- [4] ACEVEDO N, DAVIS B, SCHAEFERLE C M, et al. Perinatally administered bisphenol A as a potential mammary gland carcinogen in rats[J]. Environmental Health Perspect, 2013, 121(9): 1040-1046.
- [5] European Commission. Regulation (EU) No.10 /2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food[S]. Official Journal of the European Union, 2011: 1-89.
- [6] CHENG Y. China bans BPA in babies' bottles[N]. China Daily, 2011-06-01.https://www.chinadaily.com.cn/china/2011-06/01/content_12616422.htm.
- [7] 沈杰, 刘建超, 陆光华, 等. 双酚 S 和双酚 F 在水环境中的分布、毒理效应及其生态风险研究进展[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 37-48.
SHEN J, LIU J C, LU G H, et al. A review of the occurrence, toxicology and ecological risk assessment of bisphenol S and F in aquatic environment[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 37-48.
- [8] 雷鹏辉. 环境内分泌干扰物双酚 S 和双酚 F 对斑马鱼早期发育的免疫毒性效应及致毒机理[D]. 上海:

- 上海大学, 2018.
- LEI P H. Immunotoxicity and mechanism of action of the endocrine disrupting chemicals bisphenol S and bisphenol F in zebrafish during early developmental stages[D]. Shanghai: Shanghai University, 2018.
- [9] 刘苗, 朱惠扬, 甘平胜, 等. 气相色谱-三重四级杆串联质谱法检测广州市饮用水中 3 种酚类污染物含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(2): 163-165, 173.
- LIU M, ZHU H Y, GAN P S, et al. Determination of the concentrations of 3 phenols in drinking water from Guangzhou city with gas chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(2): 163-165, 173.
- [10] 王艳婷, 于学燕, 姚蓉, 等. 食品接触材料中双酚 A 迁移与检测的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(22): 219-224.
- WANG Y T, YU X Y, YAO R, et al. The re-search development of migration and detection of bisphenol A in food contact materials[J]. Food Research and Development, 2017, 38(22): 219-224.
- [11] 黄文平, 胡霞林, 尹大强, 等. 超高效液相色谱串联质谱同时快速检测环境水体中 31 种内分泌干扰物[J]. 环境化学, 2017, 36(4): 875-884.
- HUANG W P, HU X L, YIN D Q, et al. Rapid and simultaneous determination of 31 endocrine disrupting chemicals in aquatic environment by ultra performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(4): 875-884.
- [12] 张建莹, 杨修斌, 罗耀, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中双酚 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3438-3450.
- ZHANG J Y, YANG X B, LUO Y, et al. Determination of bisphenol A residues in milk by ultra performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(11): 3438-3450.

Determination of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Milk by High Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Solid-Phase Extraction

Li Xing, Wang Hao*, Zhang Wenchao, Zhang Ye, Ba Dongmei, Ran Linglei
(China National Food & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094)

Abstract A high liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with solid phase extraction was established for the determination of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in milk. The samples were ultrasonically extracted with ammonia and acetonitrile (1:9, V/V), purified by PRiME HLB solid phase extraction column, and separated on an Agilent Poroshell 120 PFP column (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm). Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S were detected in a multiple reaction monitoring mode, and quantified by the external standard method. Under the optimized conditions, the limits of quantification of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in milk were all 2.0 μg/kg. Method recovery was at the range of 90.4%-103.1% and the relative standard deviations from 2.76%-7.34% (n=6). This method had good accuracy and reproducibility, and was suitable for the detection of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S residues in milk.

Keywords liquid chromatography tandem mass spectrometry; milk; bisphenol A; bisphenol F; bisphenol S