

## QuEChERS-气相色谱-串联质谱法检测软体类中 18 种酚类化合物

邢家溧<sup>1,2</sup>, 李 杨<sup>3</sup>, 郑睿行<sup>1</sup>, 徐晓蓉<sup>1</sup>, 毛玲燕<sup>1</sup>, 胡 陵<sup>4</sup>, 沈 坚<sup>1</sup>, 张书芬<sup>1</sup>, 承 海<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>宁波市产品质量检验研究院(宁波市纤维检验所) 浙江宁波 315048

<sup>2</sup>浙江万里学院生物与环境学院 浙江宁波 315100

<sup>3</sup>宁波工程学院理学院 浙江宁波 315211

<sup>4</sup>浙江方圆检测集团股份有限公司 杭州 310013)

**摘要** 因目前国内外关于水产品中多种酚类化合物的检测标准较为欠缺,且现有检测方法不能同时检测多种酚类化合物,故研究同时检测水产品中多种酚类化合物的方法。以鱿鱼为空白样品,采用改良的 QuEChERS 前处理方法,对质谱条件、提取剂和提取剂用量等条件进行优化,同时采用响应面 Box-Behnken 方法优化净化剂。结果表明,18 种酚类化合物测定方法的检出限为 0.001~0.012 mg/kg,加标回收率 83.1%~107.7%,相对标准偏差 1.9%~9.5%。将建立的方法用于实际样品的检测,结果软体类水产品中均有酚类化合物检出,其中,扇贝和缢蛏的酚类污染最严重,牡蛎、贻贝和海参次之,鱿鱼污染程度最轻。本方法的建立为国家制定酚类化合物检测标准及水产品的安全监管提供技术参考。

**关键词** 气相色谱-串联质谱; QuEChERS; 酚类化合物; 水产品; 检测

**文章编号** 1009-7848(2023)06-0367-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.036

随着人们生活水平的提高,在物质生活基本满足的当下,人们对营养健康的关注度日益上升,开始追求更高质量的生活。水产品因较高的蛋白质含量,较低的脂肪比例以及含有较多的人体必需氨基酸等特点<sup>[1]</sup>,而深受广大消费者的喜爱。当前国内外对水产品的需求量逐年提升<sup>[2]</sup>。其中牡蛎、扇贝、鱿鱼和贻贝等软体类水产品是营养价值非常高的优质食品,作为高生物价的蛋白、脂肪和脂溶性维生素来源,在人类的营养供给方面具有重要作用。它们生活于水底泥沙中或附着在水中外物上,亦或用足丝附着在浅海岩生活,为滤食性生物,以硅藻、细小的浮游动物和有机碎屑等为主

要食料,因特殊的生活环境及生活习性,故软体类水产品相比于鱼类和甲壳类被污染的风险更高。张明月等<sup>[3]</sup>对市场上常见水产品进行食用安全风险分析,其中软体类水产品的污染情况较严重。对软体类水产品中酚类化合物检测方法的研究与开发具有重要的意义。

酚类化合物以毒性大、用途广、污染程度深,且可长期残留于水和土壤环境中等特点而备受研究者的关注。环境中的酚类化合物主要来自煤焦油、塑料、染料、药品、杀菌剂和防腐剂等产品,在生产过程中通过直接排放或以工业废水的形式排放到环境中。土壤及水环境被酚类化合物污染后,一些酚类可以吸附在土壤中或变成溶解物残留在水环境和土壤中。酚类化合物不仅会直接危害人体健康,还会通过食物链进入人体内并产生富集现象,进而对人体的健康产生巨大的威胁。

然而,目前,对酚类化合物的研究主要集中在环境或水。例如,Kamal 等<sup>[4]</sup>使用固相萃取液相色谱法对木屑渗滤液中的酚类化合物进行定量。赵开勇<sup>[5]</sup>利用液相色谱-串联质谱法对环境中的酚类化合物进行定量分析。Sghaier 等<sup>[6]</sup>开发了一种通过固相萃取、衍生化和气相色谱-质谱法测定水中酚类化合物的方法。Padilla 等<sup>[7]</sup>开发了一种从废水中同时提取 13 种酚类化合物的方法。王斌<sup>[8]</sup>使用

**收稿日期:** 2022-06-03

**基金项目:** 国家市场监督管理总局科技计划项目(2020MK117); 浙江省市场监管系统科技计划项目(20210140, CY2023322); 浙江省基础公益研究计划项目(LGC20C200013); 宁波市自然科学基金项目(202003N4196, 2019A610438, 2019A610437); 宁波市泛 3315 创新团队项目(2018B-18-C); 宁波市高新精英创新团队项目(甬高科[2018]63 号); 宁波市公益类科技计划项目(2021S193); 宁波市重大科技攻关项目(2021ZDYF020179)

**第一作者:** 邢家溧,女,博士,高级工程师

**通信作者:** 承海 E-mail: 875266016@qq.com

液相色谱-串联质谱法检测烘焙食品和原材料中的双酚污染物。虽然软体类水产品中酚类化合物的检测方法也有一些报道,但是其检测的酚类化合物种类单一、数量较少,且大多需要衍生化等繁琐的前处理,耗时较长,不能满足水产品中酚类物质日常检测的要求。如黄会等<sup>[9]</sup>使用凝胶色谱结合气相色谱串联质谱法检测乌贼中3种酚类化合物,该检测方法虽涉及双酚A、烷基酚等酚类化合物,但可同时检测的酚类物数量较少,且在前处理过程中需要衍生,这极大地降低了检测效率。徐英江等<sup>[10]</sup>同样使用凝胶色谱结合气相色谱-串联质谱法测定水产品中溴酚类物质,虽然酚类物质种类有所提高,但是此处检测均为同一种类溴酚,不能满足日常水产品酚类化合物多样化检测。钟惠英等<sup>[11]</sup>开发了一种同时检测水产品中19种酚类物质的气相色谱-串联质谱法,可同时检测的酚类物质数量得到显著提高,然而,该方法使用液液萃取,不仅耗时费力,而且会消耗大量的有机试剂,不能满足日常水产品的快速检测。

针对我国当前软体类水产品中18种酚类化合物同时检测的方法缺失,本研究拟开发一种方便、快速、灵敏度高且具有良好稳定性的,能同时检测软体类水产品中18种酚类化合物的方法,该方法的建立对于保障水产品的消费安全等均具有重要的意义。

## 1 试验方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

TSQ 8000 Evo 气相色谱-三重四极杆质谱联用仪、TG-5MS 毛细管色谱柱(30m 色谱柱)、ST8 高速离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Vortex 3 自动漩涡混合器,德国 IKA 公司;Milli-Q Academic 超纯水仪,美国 Millipore 公司;KQ-500E 超声波清洗仪,中国宁波海曙科盛超声设备有限公司;VORTEX 1 多功能涡旋混合器,德国 IKA 公司;TURBOVAP 96 多功能全自动氮吹浓缩仪,瑞典 Biotage 公司。

试验用的软体类(鱿鱼、扇贝、牡蛎、贻贝、缢蛭、海参),购于宁波市江北区路林市场。乙腈、丙酮,色谱纯,购自德国 Merck 公司;正己烷,分析纯,购自中国天津市致远化学试剂有限公司;二氯

甲烷,色谱纯,购自中国江苏永华化学科技有限公司;无水硫酸镁、氯化钠,分析纯,购自中国国药化学试剂有限公司;十八烷基甲硅烷基(C18)、中性氧化铝(AL-N)、Z-Sep<sup>+</sup>,购自中国上海安谱实验科技股份有限公司。

辛基酚(OP),购自北京百灵威科技有限公司;双酚A(BPA),购自国药集团化学试剂有限公司;2-溴苯酚(2-BP)、4-溴苯酚(4-BP)、2,4-二溴苯酚(2,4-DBP)、2,6-二溴苯酚(2,4-DBP)、2,4,6-三溴苯酚(2,4,6-TBP)、2-硝基酚(2-Nitrophenol)、4-甲基-2-硝基酚(4-Methyl-2-nitrophenol)、3-甲基-4-硝基酚(3-Methyl-4-nitrophenol)、2-硝基-3-甲基苯酚(3-Methyl-2-nitrophenol)、2,6-二甲基-4-硝基酚(2,6-Dimethyl-4-nitrophenol)、4-硝基酚(4-Nitrophenol)、3-硝基酚(3-Nitrophenol),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;6-硝基间甲酚(5-Methyl-2-nitrophenol),购自上海麦克林生化科技有限公司;2,4-二硝基苯酚(DNP)、4,6-二硝基邻甲苯酚(2-Methyl-4,6-dinitrophenol)、壬基酚(NP),购自上海安谱实验科技股份有限公司。

### 1.2 标准溶液的配制

准确称取18种酚类标准品10.0 mg(精确至0.01 mg),分别用甲醇定容至10 mL,摇匀,配制成1 mg/mL的储备液,于4℃冰箱中保存、备用。

分别准确吸取10 mL 2,4-二硝基苯酚、4-硝基酚、4,6-二硝基邻甲苯酚、3-甲基-4-硝基酚4种酚类储备液和1 mL 其余14种酚类储备液于10 mL 容量瓶中,混合均匀后用甲醇稀释且定容至刻度,摇匀,配制成10/100 μg/mL的混合标准中间液,并置于4℃冰箱中密封保存,备用。(其中2,4-二硝基苯酚、4-硝基酚、4,6-二硝基邻甲苯酚、3-甲基-4-硝基酚4种酚类为100 μg/mL,其余酚类为10 μg/mL)。

### 1.3 样品的制备及其前处理

提取:称取粉碎后的软体类样品10 g,置于50 mL 塑料离心管中,添加2 mL 超纯水和10 mL 乙腈,涡旋分散40 s,随后,向管中添加2 g NaCl和3 g MgSO<sub>4</sub>,涡旋振荡5 min,然后超声10 min,高速离心5 min。

净化:收集上清液至装有305 mg C18、230

mg Z-Sep<sup>+</sup>、200 mg A-N 的 15 mL 离心管中。涡旋振荡约 10 min 后,取 5 mL 上清液,氮吹浓缩至约 0.8 mL,乙腈定容至 1 mL。最后,经有机滤膜过滤,用 GC-MS/MS 进行测定。

#### 1.4 仪器分析条件

GC 条件:进样口温度为 260 ℃;载气为高纯氮(纯度 ≥99%),流速 1.2 mL/min。程序升温条件:初始柱温 70 ℃,维持 1 min,然后以 8 ℃/min 升至

160 ℃,再以 3 ℃/min 升至 200 ℃,最后以 40 ℃/min 升至 300 ℃,保持 3 min;进样模式为不分流进样,进样体积为 1 μL。

MS 条件:电子轰击(EI)离子源;离子源温度为 240 ℃;传输线温度为 250 ℃;电子能量:70 eV;溶剂延迟:10 min;选择离子监测(SIM)方式。监测特征离子见表 1。

表 1 18 种酚类化合物的保留时间、定量离子和定性离子

Table 1 Retention time, quantitative ion and qualifier ion of 18 phenolic pollutants

化合物	保留时间(RT)/min	定量离子/ $m \cdot z^{-1}$	定性离子/ $m \cdot z^{-1}$
2-溴苯酚	5.87	172	65, 93, 174
2-硝基酚	6.92	139	65, 109
2-硝基-3-甲基苯酚	8.59	136	77, 153
4-甲基-2-硝基酚	8.89	153	77, 136
6-硝基间甲酚	9.11	153	77, 136
4-溴苯酚	9.51	172	65, 93, 174
2,4-二溴苯酚	10.57	252	143, 250, 254
2,6-二溴苯酚	11.08	252	143, 250, 254
3-硝基酚	12.60	139	65, 93
2,4-二硝基苯酚	13.06	107	184, 154
4-硝基酚	13.50	139	65, 109
3-甲基-4-硝基酚	14.47	136	77, 153
辛基酚	14.86	135	107, 136, 206
4,6-二硝基邻甲酚	14.97	198	105, 121
2,6-二甲基-4-硝基酚	15.35	167	91, 137
2,4,6-三溴苯酚	15.58	330	62, 143, 332
壬基酚	20.93	107	108, 220
双酚 A	27.13	213	119, 218

#### 1.5 统计方法及数据处理

使用仪器自带的软件 Trace Finder SP1GQ 计算各目标物的方法检出限,利用该软件得到各酚类化合物的标准曲线方程及相关系数。处理后的数据采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,作图采用 Origin 8.6 软件,响应面分析使用 Design-Expert. 11.1 软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

试验初期,为了节省初期调试每一种目标化合物的最佳质谱参数时间,在调试的过程中,气相条件设置比较简单,进样口温度 260 ℃,迅速升

温,方便快速将酚类化合物标准品吹出从而进入质谱分析。分别取 18 种酚类单标,采用全扫描模式进样,质荷比扫描范围为 50~350,通过各个目标物的峰质谱谱图与仪器自带谱库进行比对,初步确定 18 种酚类化合物对应的特征性定量离子及其保留时间,找出一到两个丰度最高的离子碎片,以待后续优化,如图 1 所示。

在此基础上,本试验采用 SIM 模式扫描分析样品中的目标酚类化合物,该模式只对待测组物质离子信号进行定量定性采集,很大程度上提高了对目标化合物的检测灵敏度,减少了杂质的干扰,从而使试验结果更加准确可靠。如图 1 所示,18 种酚类目标物出峰良好,且都能较好地分



离,响应值也较高。

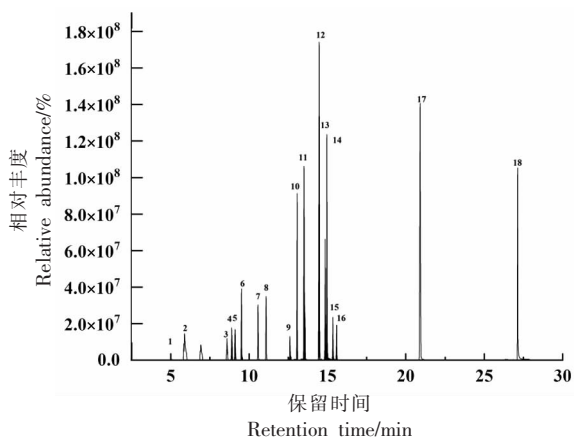
## 2.2 样品前处理的优化

**2.2.1 提取剂种类及其体积的选择** 不同的提取溶剂对目标物的提取效果不同,此外,使用不同的提取溶剂产生的杂质也会不同,而这些杂质会干扰后续的 GC-MS/MS 检测<sup>[12]</sup>,因此,选择合适的提取溶剂是提取复杂基质体系中酚类化合物的关键。本试验考察了4种常作为提取剂的有机溶剂(二氯甲烷、乙腈、丙酮、正己烷)对酚类化合物回收率的影响,结果如图2所示。

通过试验结果可以看出,丙酮和正己烷作提取剂时,酚类化合物回收率分别为61.3%~83.9%和63.0%~91.5%,均低于乙腈和二氯甲烷。二氯甲烷和乙腈提取效果相当,同时经显著性分析后发现18种酚类化合物回收率无显著性差异( $P>0.05$ )。但与乙腈相比,二氯甲烷沸点较低,在试验操作过程中易挥发,且平行性差,不利于大批量实际样本的检出,此外挥发的二氯甲烷不仅会损害实验者的健康,同时还易污染检测器和色谱柱,从而降低了柱效和检测灵敏度<sup>[13]</sup>。乙腈作为提取溶剂时,更易通过盐析与水相分层<sup>[14]</sup>,从而最大限度地提取酚类化合物,而且乙腈沉淀蛋白效果好,提取的色素、脂肪等非极性杂质含量较少,基质干扰影响小<sup>[15]</sup>,综上所述,本试验最终选择乙腈作为提取溶剂。

同时,本试验还考察了提取剂用量(7~10 mL)对试验结果的影响,结果显示,10 mL乙腈足以完全提取基质中的目标物(各酚类化合物平均加标回收率达到最优,在90.6%~108.6%之间),如果提取溶剂用量过多,基质中共萃取干扰物往往也会不断增多,从而导致基质效应也不断增强<sup>[16]</sup>,因此,本试验最终选择提取剂的用量为10 mL。

**2.2.2 盐析剂的选择** 使用氯化钠作为盐析剂时,各待测物提取回收率见表2,整体酚类化合物的回收率随着氯化钠添加量的增加而增加,当氯化钠添加量达到2 g时,回收率基本保持不变。部分酚类化合物如4-硝基酚、2,4-二硝基苯酚和4,6-二硝基邻甲苯酚,在NaCl为3 g时有下降的趋势,并随着氯化钠添加量的增加,回收率不断降低,这说明过量的氯化钠会使部分酚类化合物回收率降低。其中当氯化钠添加量为2 g时,回收率



注:按照出峰顺序分别为:1. 2-溴苯酚; 2. 2-硝基酚; 3. 2-硝基-3-甲基苯酚; 4. 4-甲基-2-硝基酚; 5. 6-硝基间甲酚; 6. 4-溴苯酚; 7. 2,4-二溴苯酚; 8. 2,6-二溴苯酚; 9. 3-硝基酚; 10. 2,4-二硝基苯酚; 11. 4-硝基酚; 12. 3-甲基-4-硝基酚; 13. 辛基酚; 14. 4,6-二硝基邻甲苯酚; 15. 2,6-二甲基-4-硝基酚; 16. 2,4,6-三溴苯酚; 17. 壬基酚; 18. 双酚A。

图1 18种酚类化合物的总离子流色谱图

Fig.1 Total ion chromatograms of 18 phenolic pollutants

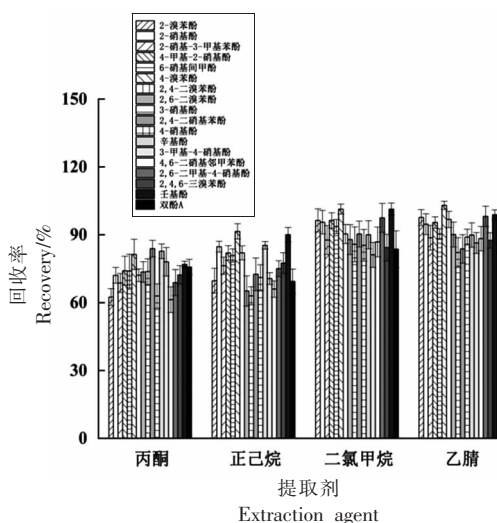


图2 不同提取溶剂对18种酚类化合物回收率的影响

Fig.2 Effects of different extraction solvents on the recoveries of 18 phenolic pollutants

最高的酚类化合物种类相对最多,其回收率为80.8%~100.4%,因此,本试验选择2 g氯化钠作为盐析剂。

在选择2 g氯化钠为盐析剂的基础上,本研究进一步考察加入除水剂无水MgSO<sub>4</sub>对沉淀蛋白的效果。试验结果见表3,从试验结果中可以看

出,在添加一定的吸水剂无水  $MgSO_4$  后,除 6-硝基间甲酚、2,6-二甲基-4-硝基酚之外的个别硝基酚的回收率变化不明显外,酚类化合物总体回收率均有所提高,由此可以得出,单独使用盐析剂效

表 2 不同量盐析剂对 18 种酚类化合物回收率的影响

Table 2 Effect of different amount of salting out agent on the recovery of 18 phenolic pollutants

酚类	NaCl 用量/g				
	1	2	3	4	5
	平均回收率/%				
2-溴苯酚	77.1	84.2	83.1	80.7	81.3
2-硝基酚	90.2	98.3	99.7	96.4	95.6
2-硝基-3-甲基苯酚	70.3	80.8	79.6	84.6	91.2
4-甲基-2-硝基酚	79.1	86.5	85.3	77.6	71.0
6-硝基间甲酚	84.5	96.7	97.5	91.2	92.3
4-溴苯酚	93.2	95.2	96.1	94.3	92.1
2,4-二溴苯酚	89.3	98.6	97.3	98.6	91.5
2,6-二溴苯酚	83.7	89.5	96.7	88.3	88.3
3-硝基酚	83.1	93.2	94.4	92.3	90.4
2,4-二硝基苯酚	81.5	87.1	85.3	78.6	71.2
4-硝基酚	86.5	89.8	82.7	75.4	72.3
3-甲基-4-硝基酚	76.0	88.4	82.3	87.3	84.6
辛基酚	80.0	93.6	94.2	92.4	92.1
4,6-二硝基邻甲苯酚	83.7	89.8	86.1	79.2	72.3
2,6-二甲基-4-硝基酚	89.5	88.1	96.4	92.7	88.9
2,4,6-三溴苯酚	84.3	96.8	93.3	93.9	95.1
壬基酚	99.8	100.4	95.3	96.2	97.2
双酚 A	78.8	85.6	86.8	87.2	86.5

表 3 添加无水硫酸镁对 18 种酚类化合物回收率的影响

Table 3 Effect of adding anhydrous magnesium sulfate on the recovery of 18 phenolic pollutants

酚类	无水 $MgSO_4$ 用量/g				
	1	2	3	4	5
	平均回收率/%				
2-溴苯酚	81.5	86.3	93.2	85.6	91.2
2-硝基酚	95.6	94.4	104.3	106.2	106.0
2-硝基-3-甲基苯酚	83.5	96.1	87.6	89.2	91.5
4-甲基-2-硝基酚	87.5	92.7	91.3	86.1	80.3
6-硝基间甲酚	87.5	87.6	89.5	88.5	89.4
4-溴苯酚	91.2	92.4	94.0	86.0	93.5
2,4-二溴苯酚	86.5	96.8	91.3	91.5	90.6
2,6-二溴苯酚	96.7	89.3	93.2	90.1	93.4
3-硝基酚	88.3	93.2	90.6	91.7	91.1
2,4-二硝基苯酚	92.3	83.7	92.1	84.5	76.7
4-硝基酚	93.3	89.5	82.6	84.8	77.7
3-甲基-4-硝基酚	98.6	100.7	107.4	103.5	100.4
辛基酚	86.4	96.3	103.6	95.4	92.3
4,6-二硝基邻甲苯酚	88.3	95.6	89.0	83.2	81.6
2,6-二甲基-4-硝基酚	91.2	89.5	92.2	91.3	90.2
2,4,6-三溴苯酚	86.5	92.3	91.3	96.2	92.2
壬基酚	99.7	101.7	105.9	96.5	98.3
双酚 A	88.1	82.0	85.2	81.4	83.5

果不如混合搭配使用除水剂效果好。但随着无水  $MgSO_4$  用量的增加, 酚类化合物回收率在逐渐下降, 这可能是因为随着无水  $MgSO_4$  量的增多, 在除水的过程中放出大量的热, 导致提取剂挥发, 从而降低了酚类化合物的提取效果, 进而影响了测定结果的准确性, 这与刘勇涛等<sup>[7]</sup>得出的结果一致。当无水硫酸镁添加量为 3 g 时, 酚类化合物达到峰值的种类相对最多, 因此, 最终选择 3 g 无水硫酸镁作为除水剂。

**2.2.3 净化剂的选择** 本试验采用响应面法研究分析不同净化剂用量及其不同组合对虾肉的净化效果, 根据响应曲面法(RSM)原理, 使用 Design-Expert 软件中心复合设计(CCD)进行了三因素和三水平试验, 以对比 3 种净化剂对酚类化合物回收率的影响, 除去极端值(<70%和>110%)的各酚类化合物的均值为响应值。以酚类化合物回收率为指标, 分别考察单独使用 C18、A-N、GCB 所对应的净化效果, 分别考察 C18 用量(100, 200, 300, 400, 500, 600 mg), A-N 用量(100, 200, 300, 400, 500, 600 mg), GCB 用量(20, 40, 60, 80, 100, 120 mg)对回收率的影响, 试验设置 3 组平行, 结果取平均值。

通过以上单因素实验确定单一净化剂 C18、Z-Sep<sup>+</sup>、A-N 的最佳用量分别为 300, 200, 200 mg, 然后采用 Design-Expert 软件建立相应回归模型, 最后根据响应曲面法确定各净化剂之间交互作用以及整体对酚类化合物的影响作用。试验结果显示, 单一净化剂最终确定了 3 个不同的水平,

表 4 Box-Behnken 响应面试验设计因素水平表

Table 4 Box-Behnken experimental factor level table

水平	因素		
	A (C18/mg)	B (Z-Sep <sup>+</sup> /mg)	C (A-N/mg)
-1	250	150	150
0	300	200	200
1	350	250	250

如表 4 所示。

两因素交互作用的响应面结果如图 3~图 5 所示。从图中可以看出, A、B 两因素的等高线趋于椭圆且最密集, 曲面较陡峭, 表明 C18 添加量和 Z-Sep<sup>+</sup>添加量交互作用最强, 对酚类化合物回收率响应影响较大; A、C 两因素的等高线趋于圆, 曲面最陡峭, 表明 C18 添加量和 A-N 添加量交互作用最弱, 对酚类化合物回收率响应影响最大; B、C 两因素的等高线趋于椭圆, 曲面较平缓, 表明 Z-Sep<sup>+</sup>添加量和 A-N 添加量交互作用较强, 对酚类化合物回收率响应影响相对最小。

利用模型对净化剂种类及用量进行优化, 得到酚类化合物净化剂最佳搭配为 C18 用量为 305.31 mg, Z-Sep<sup>+</sup>用量为 232.60 mg, A-N 用量为 196.69 mg, 为方便操作, 将净化剂搭配优化为: C18 用量为 305 mg, Z-Sep<sup>+</sup>用量为 230 mg, A-N 用量为 200 mg。按照此净化条件, 进行 3 次验证, 酚类化合物实际平均回收率为 107.38%, 与预测值误差仅为 1.1%, 表明模型有效可靠。

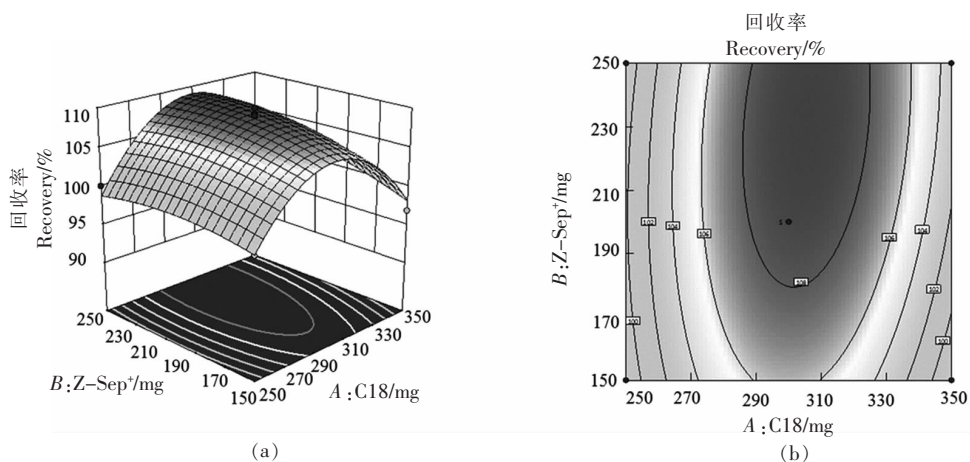


图 3 Z-Sep<sup>+</sup>和 C18 交互作用的响应面图及等高线图

Fig.3 A-response surface and contour plot of interaction between Z-Sep<sup>+</sup> and C18

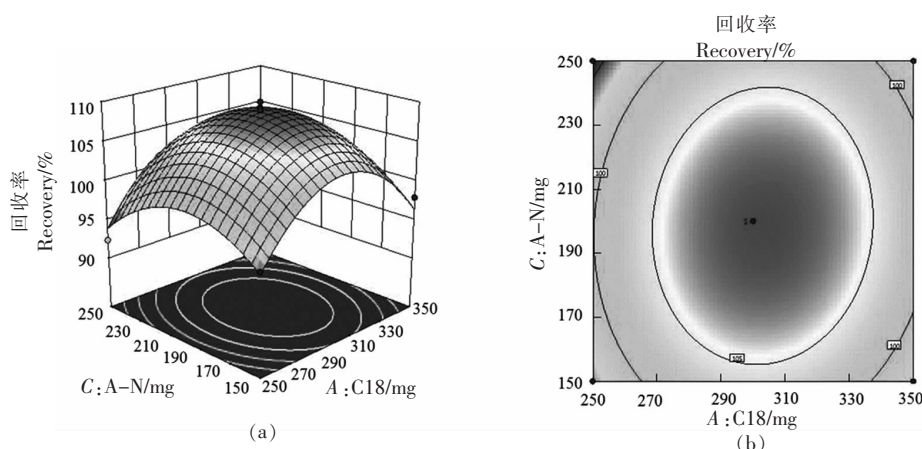
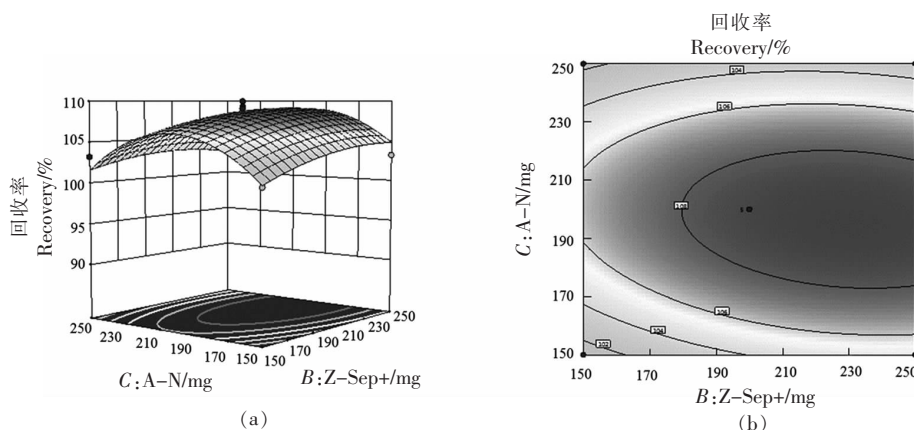


图 4 A-N 和 C18 交互作用的响应面图及等高线图

Fig.4 A-response surface and contour plot of interaction between A-N and C18

图 5 Z-Sep<sup>+</sup>和 A-N 交互作用的响应面图及等高线图Fig.5 A-response surface and contour plot of interaction between Z-Sep<sup>+</sup> and A-N

### 2.3 基质效应

基质效应 (Matrix Effect, ME) 是由目标化合物与基质中的共提干扰物竞争电离所致。非目标化合物会在色谱分离过程中抑制信号或提高待测组分的电离效率<sup>[18]</sup>。对于肉制品这种高脂肪、高蛋白等复杂基质的样品, 其基质效应会影响酚类化合物的电离, 引起信号增强或抑制, 从而影响结果的准确性<sup>[19]</sup>。因此在方法建立时均需要考察基质效应对检测结果的影响, 并且采取有效的措施减弱或消除它的影响是非常有必要的。基质效应与很多因素有关, 例如仪器种类、试验环境差异、样品浓度等都会产生不同的基质效应。一般来说,  $ME < 0.8$  表示基质抑制, 而  $ME > 1.2$  表示基质增强, 当基质效应在  $0.8 \sim 1.2$  之间时, 基质所带来的基质效应可忽略<sup>[20-21]</sup>。使用阴性样品基质提取液和纯溶剂配制相同浓度的基质匹配校准液和标准溶液,

用阴性样品 (B) 平均峰面积的响应值与纯溶剂 (A) 平均峰面积的响应值之比来体现其基质效应, 通过以下公式计算:

$$ME = \frac{B}{A} \quad (1)$$

本试验分别选取 6 种软体类水产品 (鱿鱼、扇贝、牡蛎、贻贝、缢蛭、海参), 按照 1.3 节方法进行样品前处理, 配制成  $0.4/4 \mu\text{g/mL}$  基质标准溶液进行分析, 具体结果详见图 6。18 种酚类化合物在软体类水产品中基质效应因其种类的不同而存在较大差异, 在鱿鱼和海参基质中, 18 种酚类化合物基质效应分别为  $1.53 \sim 2.62$  和  $1.33 \sim 2.42$ , 均呈现出基质增强效应; 牡蛎中溴酚类化合物和双酚 A 基质效应为  $0.44 \sim 0.73$ , 呈现出弱基质效应, 其余种类的酚类化合物均呈现基质增强效应; 缢蛭中, 辛基酚、双酚 A、2,4,6-三溴苯酚基质效应为  $0.8 \sim$



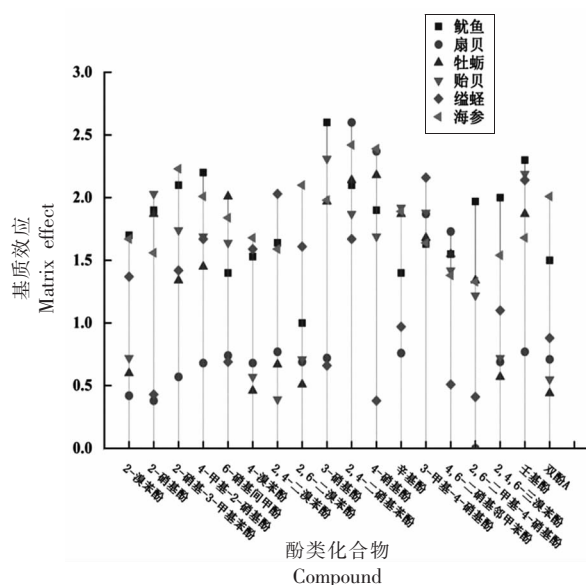


图6 不同种类软体类水产品所对应的基质效应  
Fig.6 Matrix effects of different kinds of soft aquatic products

1,2,基质效应作用较弱,可忽略;其次,对于扇贝和贻贝而言,除2,4-二硝基苯酚、4-硝基酚、3-甲基-4-硝基酚、4,6-二硝基邻甲苯酚外,均呈现基质抑制作用。

## 2.4 方法学评价

2.4.1 线性范围与方法检出限 以空白鱿鱼基质溶液作溶剂,配制18种酚类化合物系列浓度标准溶液,直接进样分析。以酚类化合物的浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制校准曲线,计算回归方程,经计算得到2,4-二硝基苯酚、4-硝基酚、4,6-二硝基邻甲苯酚、3-甲基-4-硝基酚4种酚类线性范围为1~20 mg/L;其余14种酚类物质线性范围为0.1~2 mg/L。其中前4种酚类物质加标浓度为0.2,0.8,4 mg/kg,其余14种酚类物质加标浓度为0.02,0.08,0.4 mg/kg,以3倍信噪比结合浓度外推法确定方法检出限(LOD),具体结果见表5。

表5 酚类化合物的校准曲线及相关系数

Table 5 Calibration curve and correlation coefficient of phenolic pollutants

化合物	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	线性方程	相关系数( $R^2$ )	检出限/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
2-溴苯酚	0.1~2	$y=3.291\times 10^7x-5.106\times 10^5$	0.9998	0.002
2-硝基酚	0.1~2	$y=3.125\times 10^7x-6.859\times 10^5$	0.9998	0.005
2-硝基-3-甲基苯酚	0.1~2	$y=1.165\times 10^7x-2.996\times 10^5$	0.9997	0.003
4-甲基-2-硝基苯酚	0.1~2	$y=3.459\times 10^7x-8.595\times 10^5$	0.9997	0.004
6-硝基间甲酚	0.1~2	$y=3.137\times 10^7x-7.654\times 10^5$	0.9998	0.006
4-溴苯酚	0.1~2	$y=2.763\times 10^7x-3.032\times 10^5$	0.9995	0.002
2,4-二溴苯酚	0.1~2	$y=2.150\times 10^7x-5.040\times 10^5$	0.9997	0.001
2,6-二溴苯酚	0.1~2	$y=2.327\times 10^7x-3.462\times 10^5$	0.9997	0.001
3-硝基酚	0.1~2	$y=9.423\times 10^6x-1.055\times 10^5$	0.9999	0.006
2,4-二硝基苯酚	1~20	$y=5.586\times 10^6x-9.053\times 10^5$	0.9997	0.010
4-硝基酚	1~20	$y=1.726\times 10^7x-4.387\times 10^6$	0.9997	0.012
3-甲基-4-硝基酚	1~20	$y=1.330\times 10^7x-1.287\times 10^6$	0.9998	0.007
辛基酚	0.1~2	$y=8.408\times 10^7x+5.62\times 10^5$	0.9995	0.001
4,6-二硝基邻甲苯酚	1~20	$y=8.908\times 10^6x-3.076\times 10^5$	0.9999	0.007
2,6-二甲苯-4-硝基酚	0.1~2	$y=2.465\times 10^7x-2.596\times 10^5$	0.9999	0.006
2,4,6-三溴苯酚	0.1~2	$y=8.613\times 10^6x-2.121\times 10^5$	0.9997	0.001
壬基酚	0.1~2	$y=1.588\times 10^8x-1.753\times 10^6$	0.9998	0.002
双酚A	0.1~2	$y=9.529\times 10^7x-1.337\times 10^6$	0.9997	0.001

2.4.2 加标回收率与方法精密度 通过回收率试验,即在空白样品中添加3个加标浓度(0.02/0.2, 0.08/0.8, 0.4/4 mg/kg)下评估了该方法的准确性和

精密度。对每个加标水平进行了6次重复测试以检查其重复性(RSD),结果如表6所示,18种酚类化合物的回收率在83.1%~107.7%之间,RSD在



表 6 酚类化合物的平均加标回收率和相对标准偏差(%)

Table 6 Standard addition recovery and relative standard deviation of phenolic pollutants (%)

化合物	低加标水平		中加标水平		高加标水平	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
2-溴苯酚	95.4	2.7	94.2	3.3	90.3	2.1
2-硝基酚	94.3	4.2	90.2	5.1	95.5	3.0
2-硝基-3-甲基苯酚	97.2	6.6	102.4	5.3	100.3	7.2
4-甲基-2-硝基酚	91.2	3.7	94.2	1.9	99.7	2.4
6-硝基间甲酚	87.2	2.2	89.8	3.1	90.3	5.7
4-溴苯酚	103.2	4.5	107.7	6.1	94.5	4.2
2,4-二溴苯酚	94.1	5.3	104.6	5.2	103.2	8.6
2,6-二溴苯酚	93.2	6.6	94.6	6.9	95.1	4.8
3-硝基酚	93.3	2.4	90.2	7.0	97.3	5.5
2,4-二硝基苯酚	90.4	3.3	97.0	7.2	90.2	2.9
4-硝基酚	89.3	7.6	83.4	5.2	86.6	5.8
3-甲基-4-硝基酚	105.4	5.3	101.7	8.3	93.6	9.5
辛基酚	103.5	6.1	98.4	6.7	96.2	8.2
4,6-二硝基邻甲苯酚	83.1	9.2	86.2	8.1	84.2	2.2
2,6-二甲基-4-硝基酚	96.1	4.2	102.2	3.6	101.2	4.3
2,4,6-三溴苯酚	84.5	4.7	94.7	6.6	91.2	3.5
壬基酚	98.7	2.6	104.6	2.4	95.3	3.3
双酚 A	102.4	7.5	96.4	6.4	101.6	4.6

1.9%~9.5%之间,这表明该方法具有较好的准确度与精密度。

2.4.3 酚类化合物检测在软体类中的应用 采用本方法对购买的 6 类 48 份软体类水产品进行分析,以验证该方法的可行性。检测结果显示,扇贝和缢蛏酚类化合物检出情况最严重,共检出 2-溴苯酚、2-硝基-3-甲基苯酚、6-硝基间甲酚、2,4-二溴苯酚、壬基酚等 11 种酚类化合物,其中硝基酚类化合物检出量最多,检出率高达 63.3%,壬基酚检出量最大,达 0.062 mg/kg;牡蛎、贻贝和海参次之,共检出 12 种酚类化合物,检出质量浓度在 0.004~0.043 mg/kg 之间。鱿鱼中酚类化合物的含量相对较少,酚类化合物检出率仅为 21.6%,除 2,6-二溴苯酚、2,4,6-三溴苯酚、双酚 A 外,未检出其它酚类化合物。

### 3 结论

本研究采用气相色谱串联质谱法,建立了软体类水产品中 18 种酚类化合物的检验方法及确

证技术,同时将建立的检测方法应用于实际水产品酚类化合物的检测,所建立的检测方法可同时完成多种类酚类化合物的定性定量分析。本方法优化了前处理,省去了耗时费力的衍生步骤,可以有效去除基质中杂质的干扰,具有灵敏度高、检测效率高、简便快捷等特点,适用于大批量样本检测。

### 参 考 文 献

- [1] 李宏伟. 水产品质量现状及解决措施[J]. 农业科技, 2018(9): 205.  
LI H W. Current status of aquatic products and solution measures[J]. Science & Technology Industry Parks, 2018(9): 205
- [2] 陈金玉, 钟锐宇, 林俊弟, 等. 我国水产品质量与安全现状及对策研究[J]. 农产品加工, 2019(474): 84-86, 89.  
CHEN J Y, ZHONG R Y, LIN J D, et al. Research on the current situation of aquatic products quality and safety in China and countermeasures[J].

- Farm Products Processing, 2019(474): 84-86, 89.
- [3] 张明月, 商博东, 段梦茹, 等. 天津地区水产品重金属污染状况调查[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(6): 538-539.
- ZHANG M Y, SHANG B D, DUAN M R, et al. Survey on heavy metal contamination of aquatic products in Tianjin area[J]. Journal of Environment and Health, 2015, 32(6): 538-539.
- [4] KAMAL N, GALVEZ R, BUELNA G. Application of a solid phase extraction-liquid chromatography method to quantify phenolic compounds in wood-waste leachate[J]. Water Quality Research Journal of Canada, 2014, 49(3): 210-222.
- [5] 赵开勇. 多重同位素标记结合 LC-MS 定量分析环境中的酚类污染物[D]. 大连: 大连理工大学, 2019.
- ZHAO K Y. Quantitative analysis of phenolic contaminants in the environment by multiple isotope labeling combined with LC-MS[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2019.
- [6] SGHAIER R B, NET S, GHORBEL-ABID I, et al. Simultaneous detection of 13 endocrine disrupting chemicals in water by a combination of SPE-BSTFA derivatization and GC-MS in transboundary rivers (France-Belgium)[J]. Water, Air & Soil Pollution, 2017, 228(1): 1-14.
- [7] PADILLA-SÁNCHEZ J A, PLAZA-BOLAÑOS P, ROMERO-GONZÁLEZ R, et al. Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2011, 85(5): 2397-2404.
- [8] 王斌. ID-MSPD-UHPLC-MS/MS 检测烘焙食品及原料中 8 种酚类污染物[J]. 现代面粉工业, 2019, 33(4): 55-56.
- WANG B. Detection of 8 phenolic contaminants in baked goods and ingredients by ID-MSPD-UHPLC-MS/MS[J]. Modern Flour Milling Industry, 2019, 33(4): 55-56.
- [9] 黄会, 邓旭修, 张华威, 等. 凝胶渗透色谱-固相萃取-气相色谱-质谱法测定水产品中辛基酚、壬基酚和双酚 A[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 116-120.
- HUANG H, DENG X X, ZHANG H W, et al. Determination of octylphenol, nonylphenol and bisphenol A in aquatic products by gel permeation chromatography-solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2013, 34(24): 116-120
- [10] 徐英江, 张世娟, 宫向红, 等. 凝胶渗透色谱净化-气相色谱-质谱法测定水产品中的溴酚类化合物[J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 350-354, 366.
- XU Y J, ZHANG S J, GONG X H, et al. Determination of bromophenols in aquatic products by gel permeation chromatography clean-up coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2011, 32(6): 350-354, 366.
- [11] 钟惠英, 柳海, 柴丽月, 等. 气相色谱-质谱法测定水产品中 19 种氯代酚及其钠盐[J]. 分析科学学报, 2016, 32(3): 371-376.
- ZHONG H Y, LIU H, CHAI L Y, et al. Determination of 19 chlorophenols and their sodium salts in aquatic products by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2016, 32(3): 371-376.
- [12] WONG D, CHENG K-W, WANG M. Inhibition of heterocyclic amine formation by water-soluble vitamins in Maillard reaction model systems and beef patties[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 760-766.
- [13] 张艳, 苟金萍, 程淑华, 等. 枸杞中有机磷农药残留提取法优化实验[J]. 宁夏工程技术, 2004, 3(2): 163-165.
- ZHANG Y, GOU J P, CHENG S H, et al. Optimization of extraction method for organophosphorus pesticide residues in Lycium barbarum [J]. Ningxia Engineering Technology, 2004, 3(2): 163-165.
- [14] 李萍萍, 程景, 吴学进, 等. QuEChERS-气相色谱/串联质谱法同时测定杨桃中 37 种农药残留[J]. 分析科学学报, 2017, 33(3): 427-431.
- LI P P, CHENG J, WU X J, et al. Simultaneous determination of 37 pesticide residues in poppy peaches by QuEChERS-gas chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2017, 33(3): 427-431.
- [15] 周艳华, 李涛, 张鹏飞. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速测定草鱼中 7 种激素[J]. 食品与机械, 2020, 36(8): 72-76, 116.
- ZHOU Y H, LI T, ZHANG P F. Rapid determination of 7 hormones in grass carp by ultra performance liquid chromatography with quadrupole/electrostatic field orbit trap high resolution mass spectrometry[J]. Food and Machinery, 2020, 36(8): 72-

- 76, 116.
- [16] 黄武, 李红权, 刘建芳, 等. QuEChERS-气相色谱-质谱联用法同时测定水产品中 6 种丁香酚类麻醉剂的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 422-428.
- HUANG W, LI H Q, LIU J F, et al. Simultaneous determination of six eugenol residues in aquatic products by QuEChERS-Gas Chromatography-Mass Spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(2): 422-428.
- [17] 刘永涛, 余琳雪, 王楨月, 等. 改良的 QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱同时测定水产品中 7 种阿维菌素类药物残留[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1276-1285.
- LIU Y T, YU L X, WANG Z Y, et al. Simultaneous determination of seven avermectin residues in aquatic products by modified QuEChERS coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(12): 1276-1285.
- [18] PIZZUTTI I R, VELA G E M, DE K A, et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation[J]. Food Chemistry, 2016, 209(15): 248-255.
- [19] HUERTA B, JAKIMSKA A, GROS M, et al. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1288: 63-72.
- [20] DONG H, ZENG X F, BAI W D. Solid phase extraction with high polarity Carb/PSA as composite fillers prior to UPLC-MS/MS to determine six bisphenols and alkylphenols in trace level hotpot seasoning[J]. Food Chemistry, 2018, 258(30): 206-213.
- [21] WU Y L, CHEN L, XIAN Y, et al. Quantitative analysis of fourteen heterocyclic aromatic amines in bakery products by a modified QuEChERS method coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) [J]. Food Chemistry, 2019, 298(15): 125048.

### Determination of 18 Kinds of Phenolic Compounds in Mollusk Aquatic Products by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with QuEChERS

Xing Jiali<sup>1,2</sup>, Li Yang<sup>3</sup>, Zheng Ruihang<sup>1</sup>, Xu Xiaorong<sup>1</sup>, Mao Lingyan<sup>1</sup>, Hu Ling<sup>4</sup>,  
Shen Jian<sup>1</sup>, Zhang Shufen<sup>1</sup>, Cheng Hai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ningbo Academy of Product and Food Quality Inspection (Ningbo Fibre Inspection Institute), Ningbo 315048, Zhejiang

<sup>2</sup>College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang

<sup>3</sup>College of Science, Ningbo University of Technology, Ningbo 315211, Zhejiang

<sup>4</sup>Zhejiang Fangyuan Testing Group, Hangzhou 310013)

**Abstract** A method for the simultaneous determination of multiple phenolic compounds in aquatic products was investigated because there is a lack of standards for the detection of multiple phenolic compounds in aquatic products at home and abroad, and the existing detection methods cannot detect multiple phenolic compounds at the same time. A modified QuEChERS pretreatment method was used to optimize the mass spectrometry conditions, extractant and extractant dosage, and the response surface Box-Behnken method was used to optimize the clean-up agent. The results showed that the detection limits of the method for the determination of 18 phenolic compounds were in the range of 0.001-0.012 mg/kg, the spiked recoveries were 83.1%-107.7% and the relative standard deviations were 1.9%-9.5%. The method was applied to the actual samples and the results showed that phenolic compounds were detected in all molluscs, with scallops and razor clams showing the most serious phenolic contamination, followed by oysters, mussels and sea cucumbers, and squid the least contaminated. The method was developed to provide a technical reference for the development of national standards for the detection of phenolic compounds and the safety regulation of aquatic products.

**Keywords** gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS); QuEChERS; phenolic compounds; aquatic products; determination