

- 2131-2137.
- [11] SEGADE S R , TYSON J F. Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C18 modified [J]. *Talanta* ,2007 ,71 (4) : 1696-1702.
- [12] SÁNCHEZ D M , MARTIN R , MORANTE R , MARTIN J. Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Talanta* , 2000 52(4) : 671-679.
- [13] MARGETINAVA J , HOUSERAVA-PELCOVA P , KUBAN V. speciation analysis of mercury in sediments zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following by solid phase extraction [J]. *Anal Chim Acta* 2008 615: 115-123.
- [14] RAMALHOSA E , SEGADE S R , PEREIRA E , et al. simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determination by high performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry [J]. *Anal Chim Acta* , 2001 448: 135-143.
- [15] REYES L H , MIZANUR R G M , FAHRENHOLZ T , et al. Comparison of methods with respect to efficiencies , recoveries and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish [J]. *Anal Bioanal Chem* 2008 390 (8) : 2123-2132.
- [16] ORTIZ A I C , ALBARRAN Y M , RICA C C. Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples [J]. *J Anal At Spectrom* , 2002 ,17: 1595-1601.

实验技术与方法

超高效液相色谱-质谱法测定动物性膳食中全氟辛烷磺酸和全氟辛酸

刘嘉颖^{1,2}, 王雨昕¹, 李敬光¹, 赵云峰¹, 吴永宁¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 北京市朝阳区疾病预防控制中心, 北京 100021)

摘要:目的 建立三类动物性膳食中典型全氟有机化合物的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定方法。方法 实验优化了样品提取方法和液相色谱质谱条件。样品经冷冻干燥后用甲醇提取, 弱阴离子交换固相萃取柱净化; 使用 C₁₈ 色谱柱, 甲醇和 2 mmol/L 醋酸铵水溶液为流动相进行分离; 采用 ESI 负离子源并在多反应监测模式 (MRM) 下进行测定。结果 目标化合物的回收率为 82% ~ 115%, 检测限分别为 76 ~ 129 pg/g 干重和 88 ~ 319 pg/g 干重。运用该方法分析了 9 份膳食样品, 三类样品中均检出目标化合物。结论 本方法简便快速、准确可靠, 灵敏度足以满足动物性膳食样品的检测。

关键词: 全氟有机污染物; 全氟辛烷磺酸; 全氟辛酸; UPLC-MS/MS; 食品污染物; 食品安全

中图分类号: O657.72; X836 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2011)06-0539-05

Quantitative determination of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoic acid in animal food by UPLC-MS/MS

Liu Jiaying , Wang Yuxin , Li Jingguang , Zhao Yunfeng , Wu Yongning
(National Institute of Nutrition and Food Safety , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 100050 , China)

Abstract: Objective To establish a method for detecting perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in three kinds of animal food. **Methods** Samples were extracted by methanol and cleaned-up by SPE in a WAX

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(20607021)

作者简介: 刘嘉颖 女 硕士 研究方向为食品安全 E-mail: liujiaying17@yahoo.cn

通信作者: 李敬光 男 副研究员 研究方向为食品安全

column. The analytes were separated and detected on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) by C_{18} column with mobile phase of methanol and 2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution, and performed with negative EST at multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The average recoveries were 82% ~ 115%. The detection limits of PFOS were 76 ~ 129 pg/g dry weight and that of PFOA were 88 ~ 319 pg/g dry weight. Target compounds were confirmed successfully in 3 of 9 animal food samples. **Conclusion** The method is easy, robust and sensitive for detecting PFOS and PFOA in animal food.

Key words: Perfluorinated organic compounds; perfluorooctanesulfonate (PFOS); perfluorooctanoic acid (PFOA); UPLC-MS/MS; food contaminants; food safety

全氟有机化合物 (perfluorinated organic compounds, PFCs) 作为一种人造材料在工业上的应用已有几十年的历史。由于此类物质在环境和生物圈内的广泛污染以及存在潜在的人体健康危害^[1-3], 全氟辛烷磺酸 (perfluorooctanesulfonate, PFOS) 及其盐和全氟辛基磺酰氟在 2009 年 5 月召开的《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》第四次缔约方大会上被列入《斯德哥尔摩公约》。

至今, 人类对 PFOS 和全氟辛酸 (perfluorooctanoic acid, PFOA) 等典型 PFCs 人体暴露来源和途径的研究还处于初始阶段。研究显示人体可通过饮用水、房尘、室内空气以及膳食等多种途径摄入此类污染物^[4-5]。多个研究显示膳食暴露为 PFCs 最为主要的人体暴露途径^[4-7]。然而目前关于食品中 PFCs 污染情况的报道很少, 缺乏针对性的分析方法是重要原因之一。本研究采用超高效液相色谱-电喷雾-串联质谱 (UPLC-ESI-MS/MS) 结合稳定性同位素稀释技术建立了水产品、肉类和蛋类三类动物性膳食中 PFOS 和 PFOA 的检测方法。本方法准确可靠、特异性强, 为进一步开展人体暴露水平、来源和途径研究提供了有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪, Quattro Premie 三重四极杆质谱 (美国 Waters 公司); 3K15 冷冻高速离心机 (美国 Sigma 公司); 2200 超声震荡器 (Branson); FD-1 冷冻干燥仪 (北京博医康实验仪器公司); 离心浓缩仪 (美国 Thermo 公司)。

甲醇 (色谱纯, 美国 J. T. Baker 公司); 醋酸铵缓冲盐、甲酸 (色谱纯, 迪马公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水; 氨水、氢氧化钠 (优级纯, 北京化工厂); 碳酸钠 (分析纯, 北京化工厂)。

如表 1 所示 2 种目标化合物以及 2 种定量内标均来自加拿大 Wellington Laboratories (纯度 >98%)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

取 5 g (湿重) 肉类、水产或蛋类样品加入 20 μ l

表 1 全氟辛酸、全氟辛烷磺酸及同位素内标的质谱参数

Table 1 The mass parameters for PFOS, PFOA and 2 isotope internal standards

化合物名称	缩写	母离子 \rightarrow 子离子	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
全氟辛烷磺酸	PFOS	499 \rightarrow 80; 499 \rightarrow 99	50	48; 35
全氟辛酸	PFOA	413 \rightarrow 369	15	10
$^{13}C_4$ -全氟辛烷磺酸	MPFOS	503 \rightarrow 80; 503 \rightarrow 99	50	48; 35
$^{13}C_4$ -全氟辛酸	MPFOA	417 \rightarrow 372	15	10

50 μ g/ μ l 的定量内标溶液 (MPFOA, MPFOS), 混合均匀之后在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻 3 h, 再转入冷冻干燥机内干燥 24 h, 取出称重后转入 50 ml 聚丙烯离心管中, 用甲醇提取三次 (分别用甲醇 15、15 和 10 ml), 每一次充分混匀超声提取 15 min 后在 $9384 \times g$ $0\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心 15 min, 收集上层清液于另 1 支 50 ml 聚丙烯离心管中, 提取液经离心浓缩至完全干燥后加入 2% 的甲酸水溶液 8 ml, 超声提取 15 min 后在 $9384 \times g$ $0\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心 25 min, 上清液用 Waters 公司 6cc 弱阴离子交换固相萃取柱进一步净化, 最后用甲醇/水 (1:1) 定容为 200 μ l 进行仪器分析。

1.2.2 UPLC-MS/MS 测定

色谱柱采用 BEH C_{18} (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m); 柱温 $50\text{ }^\circ\text{C}$; 流速 0.4 ml/min; 进样体积 20 μ l, 满定量环模式; 流动相 A: 甲醇; 流动相 B: 2 mmol/L 醋酸铵水溶液; 梯度起始为 20% A、80% B, A 相线性增加, 在 5 min 时达到 90% A 10% B, 5.1 min 时为 100% A 并保持 0.9 min, 7 min 时恢复到起始状态, 另需 3 min 平衡系统。

质谱采用电喷雾 (ESI) 负离子化模式; 毛细管电压 0.95 kV; 离子源温 $120\text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂温度 $400\text{ }^\circ\text{C}$; 锥孔气流量 50 L/h; 脱溶剂气流量 800 L/h。定量检测采用多反应监测模式 (MRM), 所使用的锥孔电压和碰撞能量列于表 1。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

质谱的电离模式采用电喷雾 (ESI) 负离子化模式, 根据一级质谱显示的分子离子峰的丰度分别对

毛细管电压、离子源温度、脱溶剂温度等质谱参数进行优化。

为了达到更好的灵敏度和精密度,采用了MRM模式,选择目标化合物的二级子离子进行定性与定量。PFOA经碰撞裂解,丢掉2个氧原子和1个碳原子形成1个子离子 m/z 369,而PFOS经碰撞裂解后产生2个子离子,质量数分别为 m/z 80和 m/z 99,其中 m/z 80的子离子响应较高,大约为子离子 m/z 99的两倍,然而实验发现动物性膳食基质中 m/z 80的子离子存在较为严重的杂质干扰,因此最终选择 m/z 99的子离子进行定量。

2.2 前处理方法的选择

全氟有机化合物的物化性质较为特殊,不溶于水相也不溶于有机相,而甲醇为此类物质较为常用的提取试剂。国外有文献报道对于膳食样品仅用甲醇提取浓缩后进行仪器分析^[7]。但由于中外饮食习惯的关系,与国外食品相比,中国烹调后食品基质更为复杂,甲醇提取的同时无法避免带入大量共溶出物质,严重干扰了PFCs的检测。近年来关于采用SPE技术净化分析环境和生物样品中PFCs的报道日益增加,除了分析水、血液、母乳等液体样品之外也有文献报道采用SPE方法处理动物组织和脏器样品^[8-9]。本实验室采用SPE技术已经建立了母乳中PFCs的分析方法^[10],取得了很好的分析效果,因此本研究尝试采用SPE方法处理动物性总膳食样品。然而直接用2%甲酸水溶液提取水产品、肉类和蛋类之后用SPE处理很容易造成固相萃取柱的过载,而仅仅依靠减少取样量会显著降低方法的灵敏度,阻碍了实际总膳食样品中PFCs含量的检测。为解决这一问题,尝试增加冷冻干燥和甲醇提取两个步骤,冷冻干燥在浓缩样品的同时可去除水分对下一步甲醇提取的影响,有效地提高了提取效率,提取液经浓缩后运用SPE技术净化,从而保证了方法的高灵敏度和准确度。

甲醇提取的条件选择:比较2%甲酸甲醇溶液和纯甲醇的提取效率,分别用两种提取液处理加标基质(烹调后的猪肉,加标水平为2 ng/g样品干重),结果显示,采用2%甲酸甲醇溶液作为提取液,PFOS与PFOA的回收率分别为85%和78%,而用纯甲醇提取两种目标化合物的回收率为82%和85%,由此可见,2%甲酸甲醇溶液和纯甲醇的提取效率相当。然而2%甲酸甲醇溶液中的甲酸增加了浓缩提取液的时间,因此最终选择纯甲醇作为提取液。考察甲醇提取次数对回收率的影响,用纯甲醇提取膳食样品(烹调过的猪肉,加标水平为2 ng/g

样品干重)三次,每次的提取液体积均为15 ml,得到三份提取液。将这三份提取液分别进行SPE净化后,进行仪器分析,分别计算绝对回收率。如表2所示,第一次甲醇提取的效率约占三次提取总效率的80%,第二次提取的效率大约为第一次提取效率的20%,第三次提取率不足5%,可见三次甲醇提取已经得到较为满意的结果,继续增加提取次数对提取效率的影响不大,因此最终采用三次甲醇提取,并将三次甲醇提取液的体积分别定为15、15和10 ml。

表2 三次甲醇提取加标猪肉样品中目标化合物的绝对回收率

化合物	第一次甲醇提取		第二次甲醇提取		第三次甲醇提取		总回收率 (%)
	回收率	权重 ^a	回收率	权重 ^a	回收率	权重 ^a	
PFOS	64	80	14	18	2	2	80
PFOA	67	80	13	16	3	4	84

注:^a为提取的权重为每一次甲醇提取占三次提取效率总和的百分比,单位为%,计算方法为:单次提取的回收率÷总回收率×100%。

2.3 方法参数

两种目标化合物在0.05~5 ng/ml的浓度范围内线性良好,相关系数均大于0.991,响应因子的相对标准偏差小于10%($n=5$)。选用PFOS和PFOA含量水平较低的替代基质(鱼罐头,经过烹调的猪肉和鸡蛋)进行加标回收实验,样品中目标化合物的含量低于加标水平的20%。肉类、鱼肉和蛋类样品的加标水平分别为3.8、1.1、10.0 ng/g样品干重。表3中列出了加标回收实验的回收率均值($n=5$)。将加标样品逐级稀释,当信噪比 $S/N=3$ 时确定样品中目标化合物的浓度为检出限。由结果可见该方法准确可靠,灵敏度显著高于Tittlemier等^[7]所采用的甲醇提取法。

表3 三种膳食样品中PFCs的加标回收率及检测限

化合物	肉类		水产		蛋类	
	回收率 (%)	检测限 (pg/g) ^a	回收率 (%)	检测限 (pg/g)	回收率 (%)	检测限 (pg/g)
PFOS	82	105	115	129	108	76
PFOA	85	158	101	319	113	88

注:^a为肉类、水产和蛋类检测限的单位均为pg/g样品干重。

2.4 实际样品的分析

采用本方法分析了来自3个采样点的9份动物性膳食样品。样品采用双份饭的采集方式,猪肉、羊肉、牛肉、鸡肉、鸭肉、兔肉、猪肝和猪血均归

为肉类样品;鱼、虾和牡蛎归为水产类样品;鸡蛋、鸭蛋、咸鸭蛋及松花蛋归为蛋类样品。烹调后的膳食样品经称重、匀浆之后按照本方法进行处理分析。如表4所示,三类动物性膳食样品中均检出目标化合物,其中水产品的污染水平相对较高,图1为1号采样点水产类膳食样品中PFOS和PFOA的色谱图。

表4 实际样品的检测结果

Table 4 Determination results of actual dietary samples (pg/g dry sample)

采样点编号	肉类		水产		蛋类	
	PFOS	PFOA	PFOS	PFOA	PFOS	PFOA
1	265	< LOD	1255	652	< LOD	484
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	231
3	157	< LOD	2778	< LOD	815	124

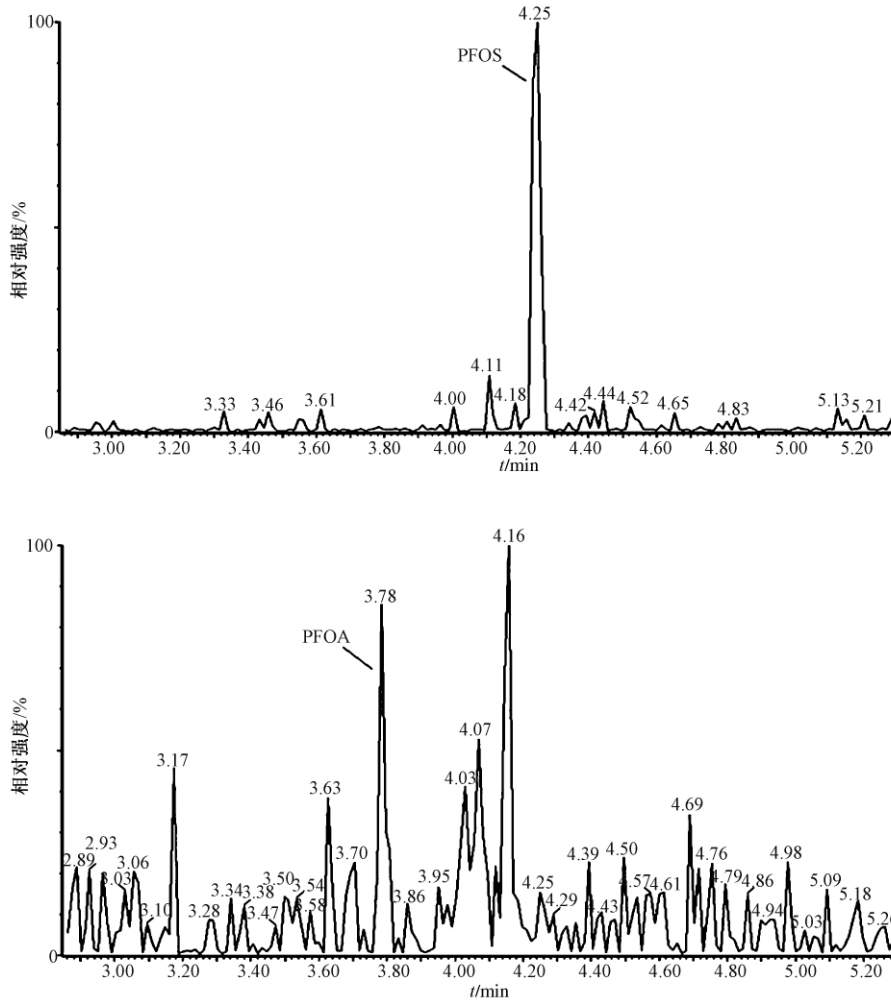


图1 1号采样点水产类膳食样品中PFOS和PFOA的色谱图

Figure 1 Chromatograms of PFOS and PFOA in aquatic product from sampling site No. 1

3 结论

本实验采用甲醇提取,固相萃取净化以及UPLC-MS/MS建立了三类动物性膳食样品中PFOS和PFOA的分析方法,目标化合物的回收率为82%~115%,检测限分别为76~129 pg/g干重和88~319 pg/g干重。运用该方法分析了9份膳食样品,三类样品中均检出目标化合物。结果表明,本方法准确可靠、灵敏度高,可以满足多种动物性膳食样品中痕量PFCs分析的定量要求。

参考文献

[1] HOUDE M, MARTIN J W, LETCHER R J, et al. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review [J]. Environ Sci Technol 2006 40: 3463-3473.

[2] HEKSTER F M, LAANE R W, DE V P. Rev. Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substances [J]. Environ Contam T 2003 179: 99-121.

[3] STEENLAND K, FLETCHER T, SAVITZ D A. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) [J]. Environ Health Perspect 2010 118: 1100-1108.

[4] FROMME H, TITTELMIER S A, VOLKEL W, et al. Perfluorinated compounds-exposure assessment for the general population in Western countries [J]. Int J Hyg Environ Health,

- 2009 212: 239-270.
- [5] VESTERGRÉN R , COUSINS I T . Tracking the pathways of human exposure to perfluorocarboxylates [J] . Environ Sci Technol 2009 , 43 : 5565-5575 .
- [6] ZHANG T , SUN H W , WU Q , et al . Perfluorochemicals in meat , eggs and indoor dust in China : assessment of sources and pathways of human exposure to perfluorochemicals [J] . Environ Sci Technol 2010 , 44 : 3572-3579 .
- [7] TITTELMIER S A , PEPPER K , SEYMOUR C , et al . Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat , fish , fast foods and food items prepared in their packaging [J] . J Agric Food Chem 2007 , 55 : 3203-3210 .
- [8] WANG Y , YEUNG L W , TANIYASU S , et al . Perfluorooctane sulfonate and other fluorochemicals in waterbird eggs from south China [J] . Environ Sci Technol 2008 , 42 : 8146-8151 .
- [9] TANIYASU S , KANNAN K , SO M K , et al . Analysis of fluorotelomer alcohols , fluorotelomer acids , and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota [J] . J Chromatogr A 2005 , 1093 : 89-97 .
- [10] LIU J Y , LI J G , ZHOU P P , et al . A modified method for determination of perfluoroalkylcarboxylic acids and perfluoroalkyl sulfonic acids in human milk by ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry [C] // Organohalogen Compd. Dioxin 2008 , Beijing : 2008 : 70 .

实验技术与方法

液相色谱同位素稀释串联质谱法测定牛奶和奶粉中3种硝基咪唑类禁用兽药及其代谢物的残留量

陈瑞春,艾连峰,郭春海,王凤池

(河北出入境检验检疫局,河北 石家庄 050051)

摘要:目的 建立了液相色谱同位素稀释串联质谱法同时测定牛奶和奶粉中3种硝基咪唑类禁用兽药(甲硝咪唑、二甲硝咪唑和罗硝咪唑)及其代谢物(羟甲基硝咪唑和1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑)残留量的方法。方法 采用乙腈沉淀样品蛋白,乙酸乙酯提取目标物,强阳离子交换固相萃取柱净化提取液,液相色谱-串联质谱测定,同位素内标法定量。结果 牛奶样品中5种分析物的检测限(LOQ)为0.5~1 μg/kg,奶粉样品中5种分析物的LOQ为2.5~5 μg/kg。5种分析物在0~50 μg/L的浓度范围内呈良好线性,线性相关系数>0.995。方法在3个水平的添加回收率在88.3%~104.4%之间,相对标准偏差在3.67%~8.52%之间。结论 方法采用同位素稀释法定量,回收率高、重现性好,适用于牛奶、奶粉等样品中硝基咪唑类药物残留的定量及确证检测。

关键词:液相色谱-串联质谱;同位素稀释;硝基咪唑类药物;代谢物;牛奶;奶粉;兽药残留;食品安全

中图分类号:O657.63;O657.72 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2011)06-0543-07

Determination of 3 kinds of banned nitroimidazole veterinary drug and their metabolites in milk and milk powder by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry

Chen Ruichun , Ai Lianfeng , Guo Chunhai , Wang Fengchi

(Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Hebei Shijiazhuang 050051 , China)

Abstract: Objective A sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the simultaneous determination of 3 kinds of banned nitroimidazole veterinary drug and their metabolites including metronidazole , ronidazole , dimetridazole , metronidazole-OH (the metabolite of metronidazole) , and 2-hydroxymethyl-4-methyl-5-nitroimidazole (the metabolite of ronidazole and dimetridazole) in milk and milk powder .

Methods The protein in samples were precipitated with acetonitrile and the targets were extracted with ethyl acetate . Extracts were purified on a strong cation-exchange SPE column , and then LC-MS/MS analysis was performed on multiple reaction monitoring mode under positive ion electrospray ionization for each compound . Isotope dilution internal standard

收稿日期:2011-04-29

作者简介:陈瑞春 男 高级工程师 研究方向为食品安全

通信作者:艾连峰 男 工程师 E-mail: ai_lianfeng@126.com