

实验技术与方法

固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定母乳中的游离态双酚 A

王雨昕, 李敬光, 赵云峰, 吴永宁

(国家食品安全风险评估中心, 北京 100050)

摘要:目的 建立了超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)测定母乳中游离态双酚 A(BPA)的方法。方法 BPA 经甲醇-丙酮(1:1, V/V)超声提取后,过固相萃取柱(Waters Sep-Pak NH₂ 6 cc)进行净化,甲醇-丙酮(1:1, V/V)洗脱,经 Waters ACQUITY BEH C18 色谱柱(50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm)分离,在电喷雾负离子源和多反应监测模式下进行测定,内标法定量。结果 BPA 在 0.1 ~ 20 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数 $r^2 > 0.997$ 。BPA 的加标回收率为 91.85% ~ 106.75%,相对标准偏差为 4.80% ~ 15.36%,检出限为 0.010 μg/L,方法定量限为 0.035 μg/L。结论 本方法可满足母乳中游离态双酚 A 含量评估的需要。

关键词:超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS); 母乳; 固相萃取; 双酚 A

中图分类号:X132 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)01-0024-05

Investigation of free bisphenol a in human milk by SPE-ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry

Wang Yuxin, Li Jingguang, Zhao Yunfeng, Wu Yongning

(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective A method was developed for determination of free bisphenol A (BPA) in human milk by ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** BPA was ultrasonic extracted with methanol/acetone (1:1, V/V), purified by freezing-lipid coupled with solid phase extraction (Waters Sep-Pak[®] NH₂ 6 cc), and then eluted with methanol/acetone (1:1, V/V). Finally, BPA was separated on a Waters ACQUITY[™] BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm) and detected by negative electrospray ionization in multiple reactions monitoring mode. **Results** The linear range of BPA was 0.1 – 20 μg/L, and the correlation coefficient (r^2) of the standard curve was above 0.997. The mean recoveries for BPA with three spike levels were 91.85% – 106.75%, and the relative standard deviations were 4.80% – 15.36%. The limit of detection of the method was 0.010 μg/L, and the limit of quantification was 0.035 μg/L. **Conclusion** The method was proved to be suitable to evaluate the level of free BPA in human milk.

Key words: Ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); human milk; solid phase extraction; bisphenol A

双酚 A(BPA)是一种环境雌激素物质,也是世界上使用最广泛的工业化合物之一,主要用于生产聚碳酸酯和环氧树脂。聚碳酸酯材料是一种透明的硬塑料,加入 BPA 可以让聚碳酸酯等塑料产品变得无色透明、耐用、防摔,尤其能够防止酸性蔬菜和水果从内部侵蚀金属容器。因此广泛用于罐头食

品和饮料的包装、矿泉水瓶、婴幼儿奶瓶等产品中^[1]。BPA 可通过食品包装容器或塑料薄膜渗入食品或饮料中,这些物品的反复使用或暴露于高热环境会导致 BPA 的浸出,进而被人体摄入^[2],对人体的生殖系统、大脑、心血管系统、肝脏等产生危害^[3]。目前,BPA 已经在人体血液^[4]、尿液^[4-6]、环境^[7]和食品^[8-9]等不同基质中均被检出。

自 2011 年 3 月 1 日起,欧盟禁止生产含 BPA 的塑料奶瓶,6 月 1 日起禁止任何 BPA 塑料奶瓶进口到成员国。我国自 2011 年 6 月 1 日起,禁止生产聚碳酸酯和其他含 BPA 的婴幼儿奶瓶,自 2011 年 9 月 1 日起,禁止进口和销售聚碳酸酯和其他含 BPA 的婴幼儿奶瓶,由生产企业或进口商负责召回。母

收稿日期:2012-09-26

基金项目:卫生行业科研专项“食品安全应急与监测预警技术研究和应用”(200902009)

作者简介:王雨昕 女 实习研究员 研究方向为食品安全

Email:wangyuxin_bojue@sina.com

通信作者:李敬光 男 研究员 研究方向为食品安全

Email:lichrom@yahoo.com.cn

乳是婴儿成长中最自然、最安全、最完整的天然食物,营养丰富,含有婴儿所需的所有营养和抗体,保证婴儿的正常、健康发育。但是母乳也是婴儿暴露于污染物的主要途径,母亲通过膳食摄入的 BPA 可以通过母乳造成婴儿的暴露。因此有必要了解母乳中 BPA 的浓度,对婴儿暴露于 BPA 的程度作出评估。目前,我国缺少有关于母乳中 BPA 含量水平的数据,针对这种现状和母乳中 BPA 暴露评估的需要,本研究在优化样品前处理的基础上,建立了超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)检测母乳中游离态双酚 A 的方法。本方法准确、灵敏度高。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪、Quattro Premier 三重四级杆质谱仪、固相萃取柱: Sep-Pak NH₂柱和 Sep-Pak Florisil 柱(1 g, 6cc)(均购于美国 Waters 公司); 甲醇(质谱级)、丙酮、二氯甲烷、正己烷(均为农残级)、实验用水为 Milli-Q 超纯水。标准品: 100 mg/L BPA (Bisphenol A) 和 100mg/L ¹³C-BPA (纯度 > 99%, 美国 CIL 公司)。

1.2 样品前处理

量取 10 ml 母乳置于培养皿中,冷冻干燥呈粉末状后,取出置于 50 ml 聚丙烯离心管中,加入 10 ng ¹³C-BPA 内标,加入甲醇-丙酮(1:1, V/V) 15 ml, 超声 30 min 后,以 7 012 × g 离心 15 min, 取上清液; 残渣中再加入甲醇-丙酮(1:1, V/V) 10 ml, 超声 30 min 后, 7 012 × g 离心 15 min, 取上清液; 合并两次提取液, 离心浓缩至尽干, 加入 30 ml 甲醇复溶后, 置于 -20 °C 过夜冷冻; 取出后 7 012 × g 离心 15 min, 取上清液并离心浓缩至干, 加入二氯甲烷-正己烷(1:9, V/V) 10 ml, 涡旋后以 9 384 × g 离心 10 min, 取上清液, 过 NH₂ 固相萃取柱[6 cc NH₂ 固相萃取柱预先用甲醇-丙酮(1:1, V/V) 与正己烷活化], 10 ml 正己烷淋洗后, 6 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V) 洗脱, 洗脱液用氮气吹至干, 用 200 μl 甲醇-水(1:1, V/V) 定容, 涡旋后, 以 21 460 × g 离心 15 min, 取上清液, 上机分析。

1.3 液相色谱-质谱条件

①UPLC 条件: BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm), 前接 1 根 Vanguard 预柱; 柱温 40 °C; 流速 0.25 ml/min; 进样量 20 μl; 全定量环模式。流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为水。梯度洗脱 0 ~ 2.0 min, 50% ~ 90% A; 2.0 ~ 3.0 min, 100% A; 3.0 ~ 5.5 min, 50% A。②MS 条件: 电喷雾负离子化模式

(ESI), 毛细管电压 3.8 kV, 锥孔电压 35 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 去溶剂气流量 800 L/h, 锥孔气 60 L/h, 碰撞能量 25 eV; 碰撞气 0.45 ml/min, 多反应监测模式(MRM)扫描, 监测离子 m/z 227 > 212.2 (BPA, 定量离子)、 m/z 227 > 132.8 (BPA)、 m/z 239 > 224.2 (¹³C-BPA)。

2 结果与讨论

2.1 背景污染

由于 BPA 的广泛应用, 在各种实验室用品中可能存在污染, 所以在选择实验用具时尽量选择玻璃制品或是聚丙烯用品。本研究选用聚丙烯离心管作为样品提取时实验用具。分析过程中所使用的微量注射器中也可能存在 BPA 污染, 因此在使用前对微量注射器进行检查, 并且在使用之前多次清洗, 尽量降低其本底水平。

实验所用的各种溶剂, 包括甲醇、水、丙酮、二氯甲烷等, 均在使用前检测本底状况, 选择无本底污染或本底最低的溶剂。实验用水为 Milli-Q 超纯水, 从两台不同的超纯水机中量取相同体积的超纯水进行本底实验, 均发现有 BPA。获得无 BPA 的实验用水难度较大, 因此本方法不使用反相固相萃取柱, 以减少前处理中的用水量。此外, 固相萃取柱在使用前用洗脱溶剂进行淋洗, 以去除可能存在的本底污染。在控制 BPA 本底污染后, 系统空白水平在检出限以下, 可以满足母乳中 BPA 检测的要求。每批样品进行前处理时都要跟随系统空白样品, 用以监测前处理过程的本底水平。

2.2 UPLC-MS/MS 条件的优化

2.2.1 色谱条件优化

部分研究^[10-11]选用 C₁₈ 柱对 BPA 进行分离, 本研究选用 BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm) 进行分离, 分离效果较好。考察两种流动相对 BPA 峰响应的影响: ① A: 甲醇, B: 水; ② A: 甲醇, B: 0.1% 氨水溶液, 结果表明, 流动相 ① 条件下的 BPA 峰响应比流动相 ② 条件下的 BPA 峰响应高。比较柱温对 BPA 峰响应的影响, 柱温 40 °C 时 BPA 的峰响应约为柱温为 30 °C 时的 2 倍。综合考虑上述因素, 最终选用 1.3 节所述液相色谱条件。

2.2.2 质谱条件优化

BPA 的两个子离子分别为 m/z 227 > 212.2 和 227 > 132.8, 这两个子离子均可作为 BPA 的定性离子, 而 m/z 227 > 132.8 的峰响应只有 m/z 227 > 212.2 峰响应的 1/3, 故选择 m/z 227 > 212.2 为 BPA 的定量离子。分别考察锥孔电压、毛细管电压和碰撞能量对 BPA 峰响应的影响。锥孔电压和毛

细管电压对 BPA 峰响应的影响呈抛物线状,而碰撞能量不能加得过大,否则会损失母离子信息。综合

考虑上述条件,选择了 1.3 节所述的质谱条件,总离子流图和 MRM 色谱图见图 1。

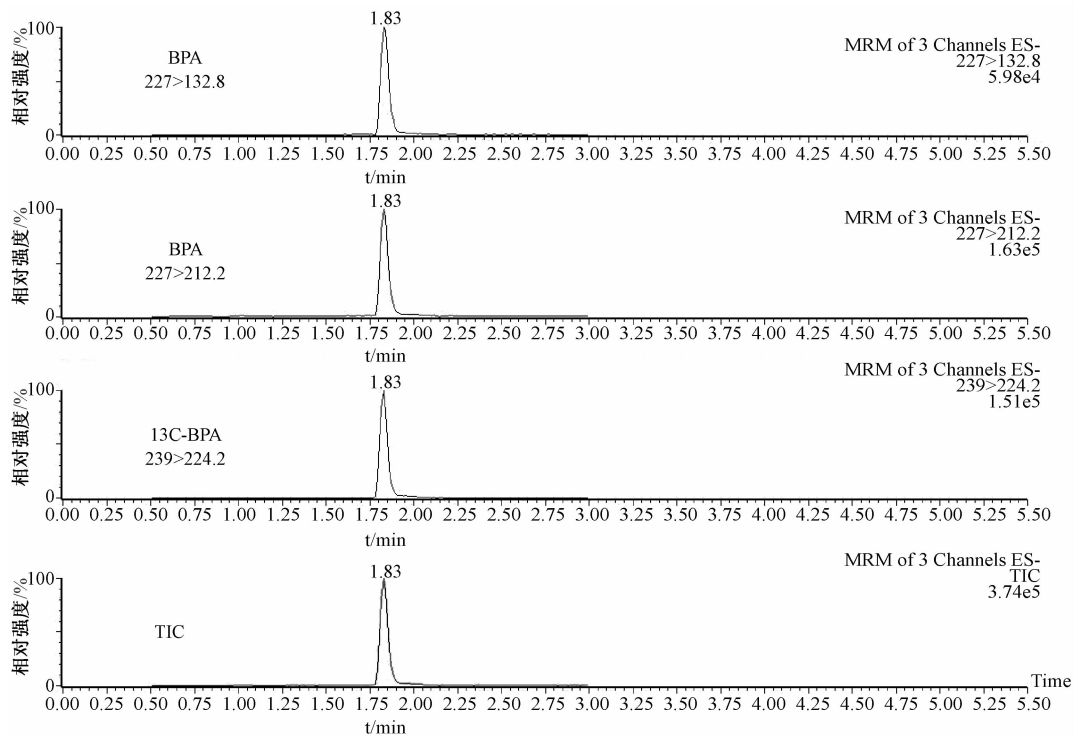


图 1 总离子流图及 BPA 与其同位素内标的色谱图
Figure 1 Chromatograms for BPA and its internal standard

2.3 样品前处理条件的确定

2.3.1 浓缩条件的影响

将 10 ng BPA 标准加入到 10 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)溶液中,用氮吹和离心浓缩两种方式分别将标准溶液浓缩至干,用 200 μ l 甲醇-水(1:1, V/V)定容后进样测定,另将 10 ng BPA 用 200 μ l 甲醇-水(1:1, V/V)定容后不经过浓缩步骤,直接进样测定,分析浓缩步骤是否有损失。结果显示,氮吹和离心浓缩两种方式的损失均低于 10%,但是氮吹浓缩的时间过长可能会损失更多的 BPA。本研究确定 NH_2 固相萃取洗脱液使用氮吹方式浓缩,提取液使用离心浓缩方式浓缩。

2.3.2 提取溶剂的确定

取 10 ml 全脂牛奶置于玻璃皿中,冷冻干燥成粉末状后取出置于 50 ml 离心管中,加入 10 ng BPA 标准和 10 ng ^{13}C -BPA 内标(加标水平为 1 $\mu\text{g/L}$),分别使用甲醇和甲醇-丙酮(1:1, V/V)两种溶剂进行提取,按 1.2 节所述步骤进行前处理后上机分析,甲醇提取的平均回收率为 106.59% ($n=3$, $RSD=3.11\%$),甲醇-丙酮(1:1, V/V)提取的平均回收率为 109.28% ($n=3$, $RSD=6.50\%$),两种溶剂的提取回收率均较好,但是甲醇提取时 BPA 的基质抑制较为严重,是甲醇/丙酮(1:1, V/V)提取时的 3~4 倍左右,故选用甲醇-丙酮(1:1, V/V)作为提取溶

剂。使用 15、10 和 10 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V) 依次进行提取,并分别进样,第一次提取 BPA 的量约为总量的 75% 左右,第二次提取的 BPA 约为 20% 左右,第三次提取 BPA 仅约为 5%,考虑到提取体积越大,浓缩时间越长,有可能会损失更多的 BPA,故最终确定使用甲醇-丙酮(1:1, V/V)提取两次。

2.3.3 固相萃取条件的确定

将 10 ng BPA 标准溶于 10 ml 二氯甲烷-正己烷(1:9, V/V)溶液中, NH_2 固相萃取柱预先用 10 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)和 10 ml 正己烷活化,将 10 ml 标准溶液全部上样至 NH_2 固相萃取柱,正己烷淋洗后,10 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)分 10 次洗脱 BPA,1 ml/次,并分别接收洗脱液,离心浓缩至干后,分别进行分析。结果表明,6 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)可以将 BPA 全部洗脱下来,故最终确定用 6 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)洗脱 BPA。

由于母乳中脂肪含量较高,本研究的关键是要去除脂肪对 BPA 测定的干扰,有些研究采用 NH_2 固相萃取柱^[10]或是正己烷液液萃取的方法^[11]去除脂肪;也有文献指出,脂肪在低温冷冻状态下可以呈絮状物析出,经过滤后可以达到去除脂肪的效果^[8]。虽然正己烷液液萃取的方法可以很好地去除脂肪,但对目标物损失较大,故本研究比较了冷冻除脂和 NH_2 固相萃取柱这两种方法去除脂肪的效果。

取 10 ml 全脂牛奶置于玻璃皿中,冷冻干燥成粉末状后取出置于 50 ml 离心管中,分别加入 15、10 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)提取两次,合并上清液并离心浓缩至干后,称取脂肪重量;加入 30 ml 甲醇复溶后,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻过夜,脂肪会成絮状物析出;以 $7\ 012\ \times\ \text{g}$ 离心 15 min,取上清液并离心浓缩至干后,再次称取脂肪重量,与未进行冷冻除脂前的脂肪重量进行比较。结果表明,冷冻除脂去除了约 30% 的脂肪,去除脂肪效果并不理想。

另取同样的 10 ml 全脂牛奶置于玻璃皿中,冷冻干燥成粉末状后取出置于 50 ml 离心管中,分别加入 15、10 ml 甲醇-丙酮(1:1, V/V)提取两次,合并上清液并离心浓缩至干后,称取脂肪重量;加入 10 ml 二氯甲烷-正己烷(1:9, V/V)复溶后,全部上样至 NH_2 固相萃取柱,将洗脱液离心浓缩至干后,称取脂肪重量;比较过 NH_2 固相萃取柱前后的脂肪重量, NH_2 固相萃取柱去除了约 70% 的脂肪,还有少部分脂肪残留;直接加入 200 μl 甲醇-水(1:1, V/V),涡旋后脂肪发生乳化,溶液变为乳白色,将其置于 1.5 ml 离心管中,以 $21\ 460\ \times\ \text{g}$ 离心 15 min,脂肪会呈淡黄色浮于溶液表面,呈凝固状,将下层清液取出,直接进行测定,BPA 峰响应及回收率均较好。

为了去除残留的脂肪,将 NH_2 固相萃取柱的洗脱液离心浓缩至干后,用 10 ml 正己烷-乙酸乙酯(96:4, V/V)复溶,过 Florisil 柱(乙酸乙酯和正己烷分别活化柱子),正己烷淋洗后,用 6 ml 乙酸乙酯洗

脱,洗脱液离心浓缩至干后,无脂肪残留,加入 200 μl 甲醇-水(1:1, V/V)复溶,以 $21\ 460\ \times\ \text{g}$ 离心 15 min,取上清液分析,BPA 峰响应较未过 Florisil 柱时有一定程度降低,但回收率较好;过 Florisil 柱后,虽然去除了脂肪的干扰,但是 BPA 也有一定的损失,故只需 NH_2 固相萃取柱净化即可。考虑到过 NH_2 固相萃取柱后脂肪仍有残留,为使残留量达到最小,在过 NH_2 固相萃取柱前先进行过夜冷冻除脂步骤。

2.4 线性关系、检出限和定量限

以甲醇-水(1:1, V/V)为溶剂,配制系列浓度 BPA 标准溶液(0.1、0.5、1、10 和 20 $\mu\text{g/L}$),内标为 10 $\mu\text{g/L}$ ^{13}C -BPA。按 1.3 节所述的 UPLC-MS/MS 条件进行测定,内标法定量,线性方程为 $y = 1.09x + 0.57$,相关系数 $r^2 > 0.997$,表明在 0.1 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 范围内,BPA 呈现良好线性相关。向未检出 BPA 的全脂牛奶样品中分别加入不同浓度的 BPA,按 1.2 节所述的方法进行处理,以逐级降低添加水平的方法确定方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ),以 3 倍信噪比(S/N)对应的添加水平作为检出限,10 倍信噪比(S/N)对应的添加作为定量限,结果表明,LOD 为 0.010 $\mu\text{g/L}$ 、LOQ 为 0.035 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 准确度和精密度

取空白全脂牛奶,在 3 个水平下添加 BPA,按 1.2 节所述的方法进行样品制备,1.3 节所述的方法进行测定。以平均回收率表示准确度,相对标准偏差(RSD)表示精密度,结果见表 1。3 个添加水平的

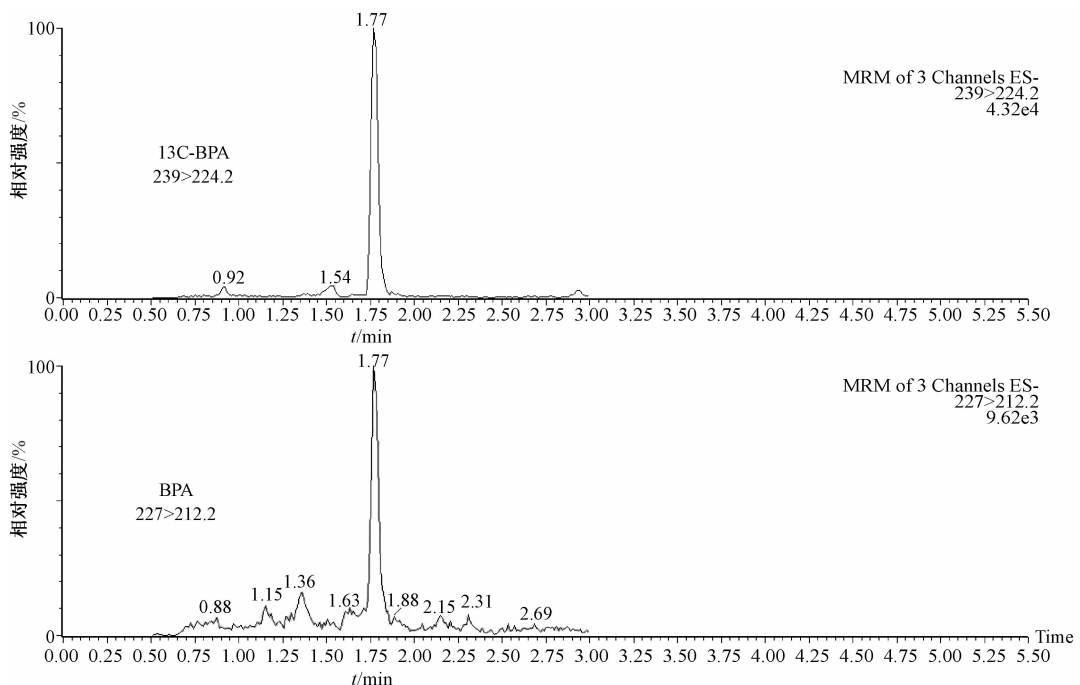


图 2 全脂牛奶中 BPA 的加标回收色谱图(加标水平为 0.05 $\mu\text{g/L}$)

Figure 2 chromatograms of BPA in whole milk with the spiked level of 0.05 $\mu\text{g/L}$

表1 准确度和精密度试验结果($n=6$)Table 1 experimental result of accuracy and precision($n=6$)

加标水平 (ng/ml)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.05	91.85 (75.56 ~ 100.00)	15.36
1	103.94 (95.86 ~ 109.03)	5.46
5	106.75 (100.38 ~ 112.39)	4.80

平均回收率在 91.85% ~ 106.75% 之间, RSD 在

4.80% ~ 15.36% 之间, 低水平加标回收色谱图详见图 2。

2.6 实际样品的测定

应用所建立的方法测定 10 份母乳样品(样品来源于 2007 年全国母乳调查样品), 10 份母乳样品均检出 BPA, 其含量水平为 0.102 ~ 0.698 $\mu\text{g/L}$, 图 3 为 BPA 含量水平为 0.698 $\mu\text{g/L}$ 样品的色谱图。

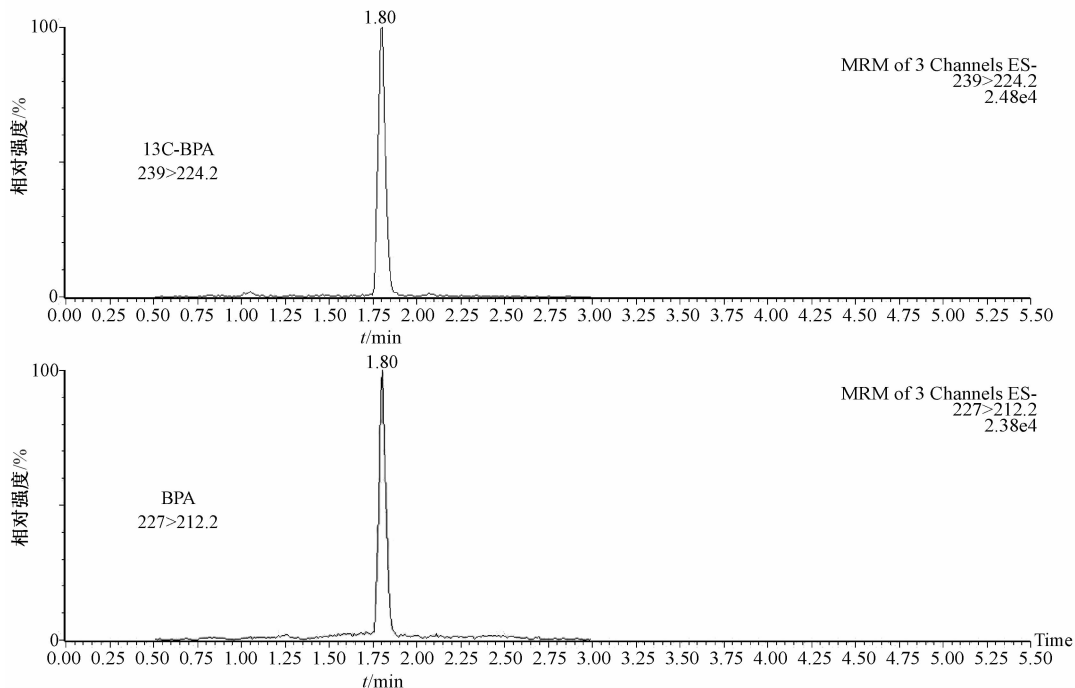


图3 母乳样品中 BPA 的 MRM 色谱图

Figure 3 MRM chromatograms of BPA in human sample

3 结论

本研究通过对仪器检测参数和样品前处理条件的优化, 建立了母乳中游离态双酚 A 的 UPLC-MS/MS 测定方法。本方法准确度和灵敏度高, 可满足母乳中 BPA 暴露评估研究的需要。

参考文献

- [1] 胡文兰, 刘建毅, 张倩. 双酚 A 测定方法的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 530-533.
- [2] 秦定霞, 崔毓桂, 刘嘉茵. 双酚 A 对生殖系统的影响及其作用机制[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29(1): 26-29.
- [3] 王丹妮, 贾丽红. 双酚 A 与健康的关系[J]. 实用预防医学, 2011, 18(9): 1808-1811.
- [4] He Y H, Miao M H, Herrinton L J, et al. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels [J]. Environ Res, 2009, 109: 629-633.
- [5] Xiao J, Shao B, Wu X Y, et al. A study on bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol in human urine samples detected by SPE-UPLC-MS [J]. Biomed Environ Sci, 2011, 24(1): 40-46.
- [6] Li X, Ying G G, Zhao J L, et al. 4-Nonylphenol, bisphenol-A

and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels [EB/OL]. (2012-08-26). <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.026>.

- [7] Vandenberg L N, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. Reproductive Toxicology, 2007, 24: 139-177.
- [8] Ahn Y G, Shin J H, Kim H Y, et al. Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish [J]. Anal Chim Acta, 2007, 603: 67-75.
- [9] Cao X L, Perez-Locas C, Dufresne G, et al. Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates [J]. Food Addit Contam, 2011, 28(6): 791-798.
- [10] 邵兵, 韩灏, 李冬梅, 等. 加速溶剂萃取-液相色谱-质谱/质谱法分析动物组织中的壬基酚、辛基酚和双酚 A [J]. 色谱, 2005, 23(4): 362-365.
- [11] Wei X, Huang Y Q, Wong M H, et al. Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China [J]. Chemosphere, 2011, 85: 122-128.