

多壁碳纳米管固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定 食品接触材料中双酚-二环氧甘油醚的迁移量

吴新华², 丁利¹, 李忠海², 张彦丽², 刘晓霞¹, 王利兵^{1*}

(1. 湖南省检验检疫科学技术研究院, 湖南出入境检验检疫局技术中心, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410004; 2. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004)

摘要 :建立了测定食品接触材料中6种双酚-二环氧甘油醚(双酚A二缩水甘油醚(BADGE)及其衍生物双酚A(2,3-二羟丙基)甘油醚(BADGE·H₂O)、双酚A(3-氯-2-羟丙基)甘油醚(BADGE·HCl)、双酚A(3-氯-2-羟丙基)(2,3-二羟丙基)醚(BADGE·H₂O·HCl)和双酚F二缩水甘油醚(BFDGE)及其衍生物双酚F双(3-氯-2-羟丙基)甘油醚(BFDGE·2HCl))迁移到食品中的迁移量的高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)。样品以叔丁基甲醚(MTBE)为提取溶剂,超声提取,提取液经多壁碳纳米管(MWCNTs)固相萃取(SPE)柱富集、净化。以COSMOSIL C₁₈为分析柱,流动相为0.1%甲酸的5 mmol/L醋酸铵溶液和甲醇。6种双酚-二环氧甘油醚在1.0~100 μg/L范围内线性关系良好($r^2 > 0.9991$)。在3个添加水平下,6种目标化合物的回收率范围为78.6%~89.9%,相对标准偏差小于10%。方法检出限范围为0.5~1.5 μg/L。该方法操作简单,灵敏度高,可应用于食品接触材料中双酚-二环氧甘油醚迁移量的快速检测。

关键词 :高效液相色谱-串联质谱;多壁碳纳米管;固相萃取;双酚-二环氧甘油醚;迁移量;食品接触材料
中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1094-05

Determination of the migration of bisphenol diglycidyl ethers from food contact materials by high performance chromatography- tandem mass spectrometry coupled with multi-walled carbon nanotubes solid phase extraction

WU Xinhua², DING Li¹, LI Zhonghai², ZHANG Yanli², LIU Xiaoxia¹, WANG Libing^{1*}

(1. Hunan Academy of Inspection and Quarantine, Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China; 2. Faculty of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract : A comprehensive analytical method based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed for measuring 6 exogenous endocrine disruptors — bisphenol diglycidyl ethers, including bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), bisphenol A glycidyl (2,3-dihydroxypropyl) ether (BADGE·H₂O), bisphenol A glycidyl (3-chloro-2-hydroxypropyl) ether (BADGE·HCl), bisphenol A (3-chloro-2-hydroxypropyl)(2,3-dihydroxypropyl) ether (BADGE·H₂O·HCl), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and bisphenol F bis (3-chloro-2-hydroxypropyl) ether (BFDGE·2HCl). The samples were extracted with methyl *tert*-butyl ether (MTBE) by ultrasonic wave assistant extraction. The extracts were cleaned up and concentrated on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). The target compounds were analyzed by HPLC-MS/MS under positive ion mode using a COSMOSIL C₁₈ column as analytical column. Under the optimal conditions, the calibration curves showed a good linearity in the concentration range of 1.0–100.0 μg/L for 6 target compounds. The correlation coefficients (r^2) were higher than 0.9991. Recoveries of 6

* 通讯联系人: 王利兵, 博士, 研究员, 研究方向为食品安全与检验检疫安全. E-mail: wanglb@hnciq.gov.cn.

基金项目: 国家公益性基金项目(No. 2009424011).

收稿日期: 2010-07-22

analytes at three spiked levels ranged from 78.6% to 89.9%, with relative standard deviations (RSDs) less than 10%. The detection limits of the method ranged from 0.5 to 1.5 $\mu\text{g/L}$. The method is sensitive and simple, and is suitable for the rapid determination of the migration of bisphenol diglycidyl ethers from food contact materials.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); multi-walled carbon nanotubes; solid-phase extraction (SPE); bisphenol diglycidyl ethers; migration; food contact materials

近年来,食品罐头、婴儿奶瓶、微波炉饭盒及其他许多食品接触材料中都用到双酚 A 二缩水甘油醚(BADGE)、双酚 F 二缩水甘油醚(BFDGE)等环氧树脂作为内涂层^[1]。其中 BADGE 和 BFDGE 会在食品接触材料的加工和储藏过程中向内容物迁移,造成污染,并形成水合物、氯代物等衍生物^[2-4]。有研究报道,微量甚至痕量的双酚 A 及其环氧化物即可能对动物生理活动、生殖系统以及胎儿发育造成不良影响^[5]。鉴于其存在多种食品安全隐患,内涂层中双酚二缩水甘油醚及其衍生物迁移量的分析方法是各国食品安全检测的研究热点。

多壁碳纳米管(MWCNTs)是一种新兴的以碳为基础的纳米材料,具有一系列新异的物理化学特性。由于 MWCNTs 较大的比表面积及其特有的疏水性和结构,应用 MWCNTs 为基质进行固相萃取(SPE)受到越来越多的关注^[6,7]。

目前对双酚-二环氧甘油醚迁移量检测的方法主要为高效液相色谱法(HPLC)^[8,9]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[10]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[11]、液相色谱-串联质谱联用法(LC-MS/MS)^[12]等。本文采用 MWCNTs 为 SPE 柱填料,采用 HPLC-MS/MS 分析食品接触材料中的双酚-二环氧甘油醚向内容物的迁移量。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

API 4000 三重四极杆质谱仪(美国 ABI 公司);配有岛津公司的高效液相色谱仪;SPE 装置(美国 Supelco 公司);高速离心机(德国 Sigma 公司);多功能微量样品处理仪(湖南长沙中讯电子工程研究所)。

叔丁基甲醚(MTBE)、甲醇、乙腈、乙酸乙酯均为色谱纯(德国 Merck 公司);乙酸铵为色谱纯(北京化工厂);水为超纯水。

MWCNTs(直径 20~30 nm,长度 5~10 μm ,广东深圳纳米港公司);双酚-二环氧甘油醚标准品:BADGE、双酚 A(2,3-二羟丙基)甘油醚(BADGE·

H_2O)、双酚 A(3-氯-2-羟丙基)甘油醚(BADGE·HCl)、双酚 A(3-氯-2-羟丙基)(2,3-二羟丙基)醚(BADGE· H_2O ·HCl)、BFDGE、双酚 F 双(3-氯-2-羟丙基)甘油醚(BFDGE·2HCl)纯度均 $\geq 95\%$ (美国 Sigma 公司);罐头罐头、莲子罐头、鱼肉和牛肉罐头购自本地超市。

1.2 混合标准溶液的配制

分别准确称取标准品各 10.0 mg,用甲醇定容至 10 mL,配成 1.0 g/L 的标准储备溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。取上述标准储备液,用甲醇配成 100 mg/L 的中间标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光储存。取适量储备液,用甲醇定容配 1.0 mg/L 的标准工作液。现用现配。

1.3 MWCNTs SPE 柱的制备

除去商品化的 SPE 小柱中的填充物,彻底清洗小柱和聚乙烯垫圈。干燥小柱和垫圈后,用垫圈封住小柱的底部,称取 0.25 g MWCNTs 于 SPE 柱中,然后用垫圈封住小柱顶部,压紧 MWCNTs,使其高度大约为 1.8 cm。使用前先用 5 mL 甲醇、5 mL 水进行活化。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取

称取 2.0 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 15 mL MTBE,旋涡振荡 1 min,超声提取 20 min 后,以 7 500 r/min 离心 5 min,分离上清液。下层残渣再用 5 mL MTBE 采用上述步骤重复提取一次,合并两次提取液。将提取液置于多功能微量样品处理仪上 40 $^{\circ}\text{C}$ 吹至近干,用 5 mL 甲醇-水(50:50, v/v)溶解,脂肪含量较高的食品需再加 2 mL 正己烷,混匀后弃去正己烷层,待净化。

1.4.2 净化

将上述提取液加载到活化后的 MWCNTs SPE 小柱上,控制流速为 1 mL/min,弃去流出液,再用 5 mL 水淋洗,弃去淋洗液。最后用 5 mL 甲醇-乙酸乙酯(60:40, v/v)洗脱,收集合并全部洗脱液,于多功能微量样品处理仪上 40 $^{\circ}\text{C}$ 吹至近干,用甲醇-水(50:50, v/v)定容至 1 mL,过 0.45 μm 滤膜,供

HPLC-MS/MS 分析。

1.5 色谱条件

色谱柱为 COSMOSIL C₁₈ 柱(150 mm × 2 mm, 2.5 μm); 柱温为 30 °C。流动相 A 为甲醇, B 为含有 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 醋酸铵溶液。梯度洗脱程序 0 ~ 10 min, 40%B ~ 5%B; 10 ~ 15 min, 5%B; 15 ~ 16 min, 5%B ~ 40%B; 16 ~ 20 min, 40%B。流速为 0.25 mL/min。进样量为 10 μL。

表 1 多反应监测扫描模式下检测 6 种双酚-二环氧甘油醚的部分质谱参数

Table 1 MS parameters for multiple reaction monitoring detection of 6 exogenous endocrine disruptors

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy/eV	Declustering potential/V
BFDGE	330.4	133.2*, 163.2	22, 18	52
BADGE	358.4	191.2*, 135.2	21, 40	52
BADGE · H ₂ O	376.5	208.2*, 135.2	20, 40	56
BADGE · HCl	394.1	227.2*, 135.4	20, 40	55
BADGE · H ₂ O · HCl	412.2	209.3*, 199.2	25, 22	57
BFDGE · 2HCl	402.2	199.2*, 181.2	22, 30	56

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

利用流动注射泵连续进样,将每种质量浓度为 100 μg/L 的双酚-二环氧甘油醚标准溶液分别注入离子源中,在正离子模式下进行母离子全扫描以选择适当的分子离子峰。结果表明,ESI⁺ 电离模式下,目标化合物全扫描的准分子离子[*M* + NH₄]⁺ 最理想。对该准分子离子峰进行二级质谱扫描(子离子扫描),得到离子碎片信息,获得二级质谱图。然后对去簇电压、碰撞气能量等参数进行了优化,使分子离子和特征碎片离子对强度达到最佳。在优化的质谱条件下,目标物的总离子流 MRM 色谱图见图 1。由图 1 可见,6 种分析物离子选择性好,峰形尖锐对称。

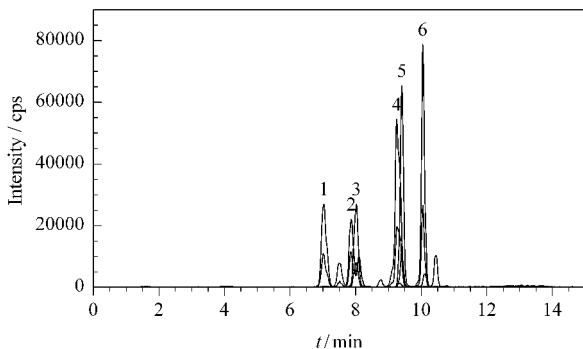


图 1 6 种双酚-二环氧甘油醚混合标准溶液 (5 μg/L) 的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of 6 bisphenol diglycidyl ethers (5 μg/L)

Peaks: 1. BADGE · H₂O; 2. BFDGE; 3. BADGE · H₂O · HCl; 4. BFDGE · 2HCl; 5. BADGE; 6. BADGE · HCl.

1.6 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;雾化气压力为 413 kPa;辅助气压力为 448 kPa;离子喷雾电压为 5 500.00 V;气帘气压力为 137 kPa;离子化温度为 500 °C;检测方式为多反应监测扫描(MRM)模式。6 种双酚-二环氧甘油醚定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压见表 1。

2.2 提取溶剂的选择

在实验过程中,提取溶剂的选择是关键。本实验分别比较了甲醇、乙腈、MTBE 和乙酸乙酯作为提取溶剂对双酚-二环氧甘油醚提取效率的影响,用上述溶剂超声提取罐头食品中的双酚-二环氧甘油醚的回收率见图 2 所示。由图 2 可以看出,用 MTBE 作为提取溶剂,6 种双酚-二环氧甘油醚的回收率最好,因此本实验采用 MTBE 作为提取溶剂。同时比较了超声作用时间的影响,当超声作用 15 min 时,双酚-二环氧甘油醚能充分提取。

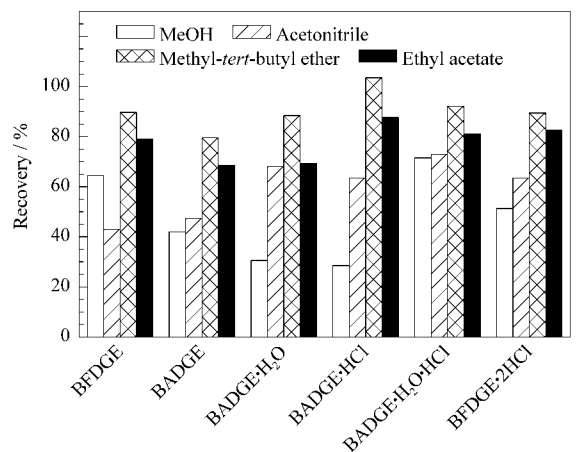


图 2 不同溶剂提取罐头食品样品中双酚-二环氧甘油醚的回收率

Fig. 2 Recoveries of bisphenol diglycidyl ethers in canned foodstuffs by different extraction solvents

2.3 MWCNTs 用量的选择

实验发现 MWCNTs 的用量对实验有一定影响,用量过少则不能完全吸附目标物,用量过多则会

影响上样时的流速。实验中制备不同填充质量的 MWCNTs SPE 小柱, MWCNTs 用量从 150 mg 到 400 mg。称取几份空白样品各 2.0 g 并添加 20 ng/g 的标准溶液按 1.4.1 节所述步骤进行前处理, 分别上样到上述 SPE 小柱, 流速控制在 1.0 mL/min, 以 6 mL 甲醇-乙酸乙酯(50:50, v/v) 洗脱, 回收率情况见图 3。由图 3 可知 250 mg MWCNTs 已能完全吸附 6 种目标物, 用量过多不但回收率没有增加, 反而会影响上样速率及洗脱效率。综合考虑, 选定最佳的 MWCNTs 用量为 250 mg。

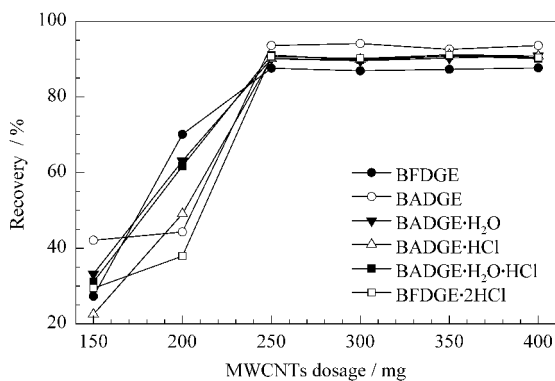


图 3 MWCNTs 用量对回收率的影响

Fig. 3 Effect of MWCNTs dosage on recoveries

2.4 洗脱溶剂及其体积的优化

当添加 20 ng/g 待净化提取液到活化的 MWCNTs SPE 小柱后, 分别比较了甲醇、乙腈和乙酸乙酯洗脱效率, 洗脱溶剂体积为 6 mL, 流速控制在 1.0 mL/min。实验结果表明: 用甲醇洗脱时, BFDGE 和 BFDGE·2HCl 的回收率不是很好, 其余 4 种目标物都能达到 80% 以上; 乙腈洗脱时的回收率不如甲醇好; 乙酸乙酯洗脱时 BFDGE 和 BFDGE·2HCl 的回收率能达到 80% 以上, 但是其余 4 种均比较低, 因此采用单一的溶剂无法从 MWCNTs 柱上把目标物全部洗脱下来。综合比较 3 种溶剂的洗脱效率, 甲醇和乙酸乙酯的洗脱能力刚好互补, 因此采用甲醇和乙酸乙酯混合溶液作为洗脱溶剂。考察了采用不同体积比的甲醇和乙酸乙酯洗脱时对回收率的影响, 结果(见图 4)表明甲醇和乙酸乙酯的体积比为 60:40 时, 各化合物的回收率最好。

考察不同体积下洗脱液对回收率的影响, 洗脱溶剂为甲醇-乙酸乙酯(60:40, v/v), 流速控制在 1.0 mL/min, 不同洗脱溶剂体积对回收率的影响见图 5。可以看出, 随着洗脱体积的增大, 双酚-二环氧甘油醚的回收率虽然也不断增大, 但当洗脱液体积大于 5 mL 时, 回收率的生长缓慢。综合考虑溶剂体积和回收率, 最终选定洗脱液体积为 5 mL。

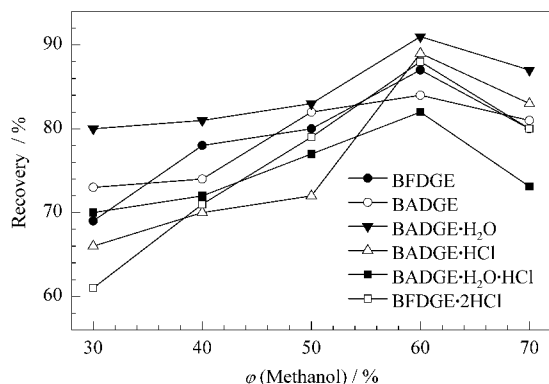


图 4 甲醇比例对回收率的影响

Fig. 4 Effect of methanol volume proportion on recoveries

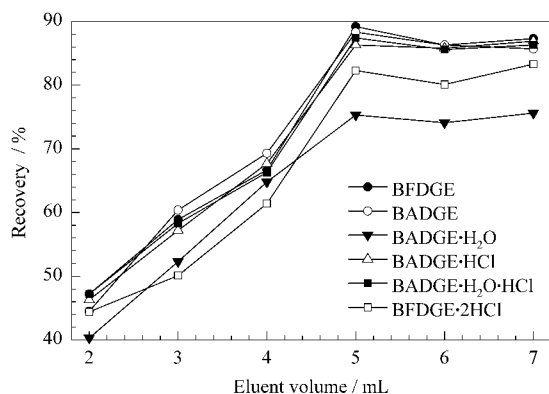


图 5 洗脱体积对回收率的影响

Fig. 5 Effect of eluent volume on recoveries

2.5 方法的线性范围与检出限

对 6 份空白薯头样品按 1.4 节所述步骤进行提取净化并吹干, 向其残余物中依次加入用甲醇配制成的 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 和 100.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液各 1 mL, 充分溶解后得到系列基质匹配标准溶液, 过滤膜后进行 HPLC-MS/MS 分析, 以目标物在 MRM 模式下的峰面积 (Y) 对相应的目标物质量浓度 (X , $\mu\text{g/L}$) 做标准曲线。6 种化合物的回归方程、相关系数、检出限 (LOD, $S/N=3$) 见表 2。

表 2 双酚-二环氧甘油醚的回归方程、相关系数和检出限 ($S/N=3$)Table 2 Regression equations, correlation coefficients (r^2) and LODs ($S/N=3$) for 6 target compounds

Compound	Regression equation ^a	r^2	LOD/ ($\mu\text{g/L}$)
BFDGE	$Y = 1700X + 225$	0.9993	1.0
BADGE	$Y = 4200X + 107$	0.9997	0.5
BADGE·H ₂ O	$Y = 2100X - 112$	0.9991	1.5
BADGE·HCl	$Y = 2400X + 103$	0.9995	1
BADGE·H ₂ O·HCl	$Y = 1124X + 246$	0.9997	1
BFDGE·2HCl	$Y = 1420X + 253$	0.9994	1.5

^a Y : peak area; X : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

2.6 方法的回收率与精密度

在 2 g 空白的蒜头基质中添加适量混合标准溶液,使得蒜头样品中双酚-二环氧甘油醚的含量分别为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按上述方法每个加标水平下平行测定 6 份样品,连续 6 d 重复操作,最终结果见表 3。6 种双酚-二环氧甘油醚在空白蒜头中的平均添加回收率范围为 78.6% ~ 89.9%,日内、日间相对标准偏差(RSD)均小于 10%,通过方法学考察发现该方法同样适用于其他罐头样品的分析。

表 3 蒜头样品中 6 种双酚-二环氧甘油醚的添加回收率及精密度($n=6$)

Table 3 Average recoveries and relative standard deviations (RSDs) of 6 bisphenol diglycidyl ethers in a garlic sample ($n=6$)

Compound	Spiked/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/ %	RSD/%	
			Inter-day	Intra-day
BFDGE	5	84.6	4.3	2.6
	10	86.3	5.5	3.2
	20	89.9	7.3	5.6
BADGE	5	83.5	3.9	2.9
	10	79.5	6.8	5.4
	20	87.6	4.6	2.7
BADGE · H ₂ O	5	89.9	6.1	4.5
	10	82.4	7.5	6.3
	20	87.3	4.7	2.5
BADGE · HCl	5	86.1	5.8	5.6
	10	82.6	5.9	4.3
	20	85.5	4.6	2.4
BADGE · H ₂ O · HCl	5	85.5	5.2	3.6
	10	87.8	6.3	4.2
	20	79.6	7.1	5.2
BFDGE · 2HCl	5	83.7	8.3	6.1
	10	89.7	5.9	3.3
	20	78.6	6.5	4.7

2.7 实际样品的测定

应用本方法测定市售不同品牌的罐头食品的颜色谱图见图 6。其中 1 份鱼罐头样品中 BADGE · H₂O 检出量为 3.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1 份莲子罐头样品中 BADGE · H₂O · HCl 检出量为 2.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结论

通过对样品前处理条件的优化和改进,建立了测定食品接触材料中 6 种双酚-二环氧甘油醚迁移量的 MWCNTs-SPE-HPLC-MS/MS 方法。方法简单、快速、灵敏度高,测定结果可靠,以 MWCNTs 作 SPE 柱回收率更高,重现性更好,能满足食品接触材料中双酚-二环氧甘油醚迁移量的分析要求,同时也为其他内分泌干扰物的检测提供了有利工具。

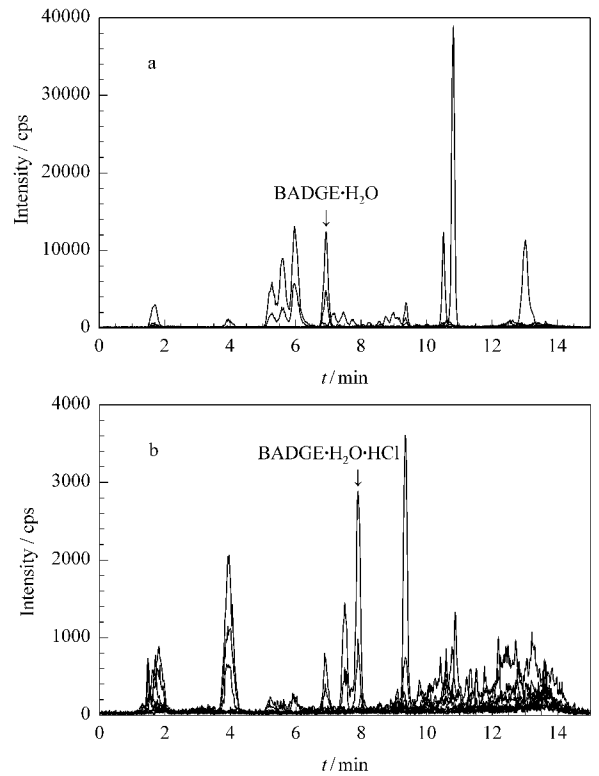


图 6 实际样品的 MRM 色谱图

Fig. 6 MRM chromatograms of real samples
a. fish canned foodstuff; b. garlic canned foodstuff.

参考文献:

- [1] Pardo O, Yusà V, León N, et al. J Chromatogr A, 2006, 1107(2): 70
- [2] Cabado A G, Aldea S, Porro C, et al. J Agric Food Chem, 2008, 46: 1674
- [3] Luo S L, Wu S L, Zhang C H, et al. Food Science (罗生亮, 吴少林, 张朝晖, 等. 食品科学), 2009, 30(7): 52
- [4] Leepipatpiboon N, Sae-Khow O, Jayanta S. J Chromatogr A, 2005, 1073(1/2): 331
- [5] Hu X W, Zhang W D, Liu Y Q. Food Science (胡向蔚, 张文德, 刘炎桥. 食品科学), 2006, 27(4): 264
- [6] Min G, Wang S, Zhu H, et al. Sci Total Environ, 2008, 396(1): 79
- [7] Zhou Q X, Xiao J P, Wang W D. J Chromatogr A, 2006, 1125(2): 152
- [8] Nerín C, Philo M R, Salafranca J, et al. J Chromatogr A, 2002, 963(1/2): 375
- [9] Sun C L, Leong L P, Barlow P J, et al. J Chromatogr A, 2006, 1129(1): 145
- [10] García R S, Losada P P. J Chromatogr A, 2004, 1032(1/2): 37
- [11] Vilchez J L, Zafra A, González-Casado A, et al. Anal Chim Acta, 2001, 431(1): 31
- [12] Zhang C H, Luo S L, Wu S L, et al. Journal of Instrumental Analysis (张朝晖, 罗生亮, 吴少林, 等. 分析测试学报), 2009, 28(6): 714