DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2013.17.021

液质联用法测定婴儿乳粉中双酚A和己烯雌酚

刘艳琴,王浩*,杨红梅,郭启雷,史海良,田艳玲
(国家食品质量安全监督检验中心,北京 100094)

摘　要:建立了婴儿乳粉中双酚 A 和己烯雌酚残留的高效液相色谱-串联四极杆质谱联用测定方法。样品经碱性乙腈超声提取,以 MGⅢ-C_{18} 色谱柱(2.1×150 mm,1.8 μm)分离,流动相为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液和甲醇(梯度洗脱),流速 0.25 mL/min。采用多反应监测负离子模式,可以同时对婴幼儿配方乳粉中的双酚 A 和己烯雌酚进行定性和定量测定。方法在 1.0 μg/L~25.0 μg/L 范围内呈良好线性,方法的检出限为 5 μg/kg。在 5、25、250 μg/kg 三个加标水平下,加标回收率为 80.6 %~102.9 %,相对标准偏差为 1.29 %~8.83 %。

关键词:液质联用仪;婴儿配方乳粉;双酚A;己烯雌酚

Determination of Bisphenol A and Diethylstilbestrol in Infant Milk Powder by LC-MS/MS

LIU Yan-Qin, WANG Hao*, YANG Hong-mei, GUO Qi-lei, SHI Hai-liang, TIAN Yan-ling
(China National Food & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: A quick confirmative method was developed for determining the residues of Bisphenol A and diethylstilbestrol in infant milk powder by LC-MS/MS. The sample was ultrasonic extracted with alkaline acetonitrile, the HPLC separation was carried out on a MGⅢ-C_{18} column (2.1×150 mm, 1.8 μm), the mobile phase were 10 mmol/L ammonium acetate solution and methanol with gradient elution, the flow was 0.25 mL/min. The detection of Bisphenol A and diethylstilbestrol was carried outin the negative multi-reaction monitoring (MRM) mode. Under the optimal conditions, good linear relationship was obtained in the range of 1.0 μg/L-25.0 μg/L for Bisphenol A and diethylstilbestrol. The limit of detection was 5 μg/kg. The recoveries at three spiked levels of 5, 25, 250 μg/kg were between 80.6 % and 102.9 %, and RSDs value were between 1.29 % and 8.83 %.

Key words: LC-MS-MS; infant milk powder; Biphenol A; diethylstilbestrol

双酚 A 简称双酚基丙烷(BPA),在工业上双酚 A 被用来合成聚碳酸酯(PC)和环氧树脂等材料。聚碳酸酯是一种透明的硬塑料,它常用来作为单体合成聚碳酸酯塑料,这种材料可以用来加工成塑料接触制品。双酚 A 可以通过包装材料进入食品或化妆品中,进而进入人体,造成人类和野生动物的内分泌系统、免疫系统、神经系统出现异常,还会严重干扰人类和动物的生殖遗传功能。研究已经证实,低剂量的 BPA (10^{-7} mol /L) 即能引起支持细胞和精子细胞死亡。己烯雌酚是一种人工合成的雌性激素类药物,常当做性激素调节动物的生理功能,还被用作动物饲料添加剂,以促进动物的生长。己烯雌酚是人工合成的非甾体雌激素,属于雌激素及孕激素类药物。它在促进动物蛋白质的合成代谢、提高动物日增重和减少脂肪等方面效果明显,另外具有增加瘦肉率、排出死胎以及提高饲料转化率等功能而广泛应用于畜牧业。将其添加到饲料里可以提高产崽率或催情作用,同时通过饲喂会使己烯雌酚残留在牛奶中。国内外研究表明,己烯雌酚可以破坏机体的遗传物质,导致基因突变,引发肿瘤。由于目前还没有婴幼儿配方乳粉中双酚 A 和己烯雌酚残留的国家标准检测方法,还不能完成科学监管,保护广大婴幼儿的健康和利益。因此,及时寻求简便、快速、准确、敏感性高的婴幼儿配方乳粉中双酚 A 和己烯雌酚残留的检测方法才能保障食用婴幼儿配

基金项目:国家质检总局质检公益性行业科研专项资助项目(200910267-02)资助项目

作者简介:刘艳琴(1968—),女(汉),教授级高级工程师,本科,从事食品安全与营养检验的研究工作。
* 通信作者:王浩(1969—),男,工程师,硕士研究生,从事食品安全与营养检验的研究工作。

方乳粉的卫生和安全。

目前，测定双酚 A 和己烯雌酚残留的文献比较多，方法主要是气相-质联用法[1-4]、高效液相色谱法[5-8]和液相-质联用法等[9-12]。气相色谱-质谱联用法存在前处理步骤繁琐、有机试剂消耗量大、测定周期长等缺点；液相色谱法虽然对仪器要求不高，但检出限不高，而且不能满足确证要求；液相色谱-质谱联用技术是近年来新兴的检测技术，由于其准确、高效和高灵敏度，符合目前食品安全检测所追求的快速高效的要求。目前还未见液相色谱- 串联质谱联用法用于同时检测双酚 A 和己烯雌酚的报道。本文采用碱性乙腈提取目标物，采用高效液相色谱串联质谱仪进行检测，前处理简单，灵敏度高，适合于婴幼儿配方乳粉中双酚 A 和己烯雌酚残留的同时快速检测。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器

甲醇和乙腈：色谱纯，德国 Fisher 公司；双酚 A，己烯雌酚：w≥99 %，美国 Sigma 公司；实验所选用样品为作者单位检验样品；其他试剂均为国产分析纯。Agilent 6410 型串联三重四极杆质谱仪，配 Agilent1200 型液相色谱仪：美国 Agilent 公司；RE-2000 型旋转蒸发器：上海市亚荣生化仪器厂；KQ-5200 型超声波清洗仪：昆山市超声仪器有限公司；TGL-16M 型高速台式冷冻离心机：湘仪离心机仪器有限公司；Milli-Q 去离子水发生器：美国 Milli-Q 公司。

1.2　标准溶液的配制

标准储备液：分别称取适量的双酚 A 和己烯雌酚标准品，分别用甲醇配成 0.1 mg/mL 的标准储备液，该溶液在-18 ℃保存。

标准工作溶液：用甲醇将标准储备液稀释成 1.0 μg /mL。

空白样品提取液：选择阴性样品，按 1.5 操作。

基质混合标准工作溶液：根据仪器的灵敏度和线性范围，吸取一定量的标准工作溶液，用空白样品提取液配成系列浓度的基质混合标准工作溶液。

1.3　色谱分析条件

色谱柱：资生堂MGⅢ-C_{18}柱，1.8 μm，2.1 mm×150 mm。

条件：流速 0.25 mL/min，柱温 25 ℃，进样量 20 μL，流动相：甲醇（A）+10 mmoL/L 乙酸铵缓冲溶液（B）；梯度洗脱：0~3 min，B 保持 80 %，3 min~15 min，B 由 80 % 线性递减至 5 %，15 min~21 min，B 保持 5 %，21.0 min~20.1 min，B 由 5 %线性递增至 80 %，21.1 min~25.0 min，B 保持 80 %。

1.4　质谱分析条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）；扫描方式：负离子扫描；检测方式：多反应检测；干燥气：N_2；雾化气压力：275.8 kPa；干燥气温度：325 ℃；干燥气流速：8 L/min；汽化温度：340 ℃。

1.5　样品处理

称取 4.0 g 样品，精确至 0.01 g，置于 100 mL 比色管中，加水 35 mL，充分溶解后超声提取 5 min，再用含 1 %氨水的乙腈溶液定容。超声波提取 20 min，上清液经滤纸过滤，吸取 25 mL 滤液至 100 mL 蒸发瓶内，并将其接至旋转器上，于 45 ℃水浴中减压蒸馏至 1 mL 左右，加含 2 %氨水的甲醇溶液充分溶解后定容至 5 mL，滤纸过滤后待测（如浑浊严重，以 8 000 r/min 高速离心 10 min，取上清液过滤膜）。

2　结果与讨论

2.1　样品前处理条件选择

为了充分提取样品中双酚 A 和己烯雌酚残留，本实验首先分别选择乙腈、甲醇、乙酸乙酯等做为样品提取溶液，试验结果均不理想，随后经过反复试验，发现含 1 %氨水的乙腈能有效地提取样品中目标化合物，同时能有效除去样品中的蛋白质，因此，选择此溶液作为样品提取液。此外，实验还发现，只有当定容溶液为碱性时，才能充分溶解目标化合物，所以本方法选择含 2 %氨水的甲醇溶液作为样品的定容溶液。

2.2　基质效应的影响

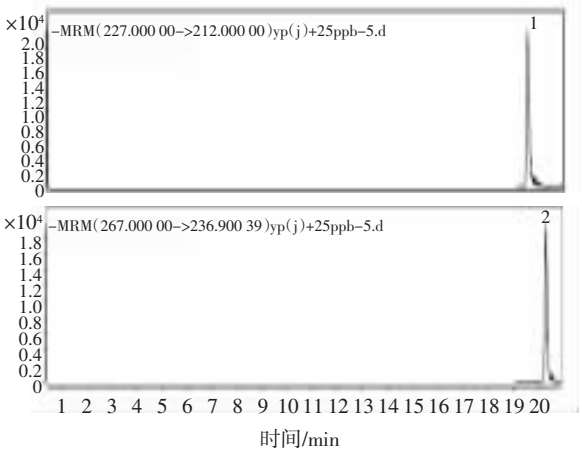
化学分析中，基质指的是样品中被分析物以外的组分。基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰，并影响分析结果的准确性。为了消除测定液中存在的基质效应，考虑到双酚 A 和己烯雌酚为 ESI 负电离模式，采用含 2 %氨水的甲醇溶液作为样品溶解液，很大程度上减小了测定液中的基质效应，同时提高了检测灵敏度。分别用空白样品测定液及含 2 %氨水的甲醇溶液配制成浓度为 0.01 μg/mL 双酚 A 和己烯雌酚标准溶液，通过二者响应值的比较来确定基质效应。实验发现，双酚 A 和己烯雌酚的基质效应分别为 74.5 % 和 70.8 %，这说明实际样品中的基质效应不会对双酚 A 和己烯雌酚的定性定量测定造成较大的干扰。

2.3　色谱条件的优化

色谱柱的选择：为了有利于色谱峰的分离及锋形的改善，本方法分别采用资生堂 MGⅢ-C_{18} 色谱柱（150 mm × 2.1 mm，1.8 μm）、ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱和 ZORBAX SB-Aq 色谱柱（150 mm × 2.1 mm，3.5 μm）进行分离试验，发现资生堂 MGⅢ-C_{18} 色谱柱

(150 mm × 2.1 mm，1.8 μm)效果较好。

流动相的选择：实验发现用水作水相流动相时，双酚 A 色谱峰易展宽，因此本方法采用 10 mmoL/L 乙酸铵溶液-甲醇为流动相，利用梯度洗脱的方法提高分离及检测效果效果，测试开始时，流动相中 10 mmoL/L 乙酸铵溶液-甲醇的比例为 80∶20，然后在 0~3 min 保持此将比例，这一部分主要是洗脱测定液中极性较强的杂质，3 min~15 min 内将改变二者的比例为 5∶95，这一部分主要是洗脱测定液中的中等极性杂质，15 min~21 min 保持此比例，这一部分主要是洗脱测定液中双酚 A 和己烯雌酚。通过上述两步梯度，在 21 min 内，可以较好的分离测定液中双酚 A 和己烯雌酚，结果见图1。



1. 双酚 A；2. 己烯雌酚

图 1 双酚 A 和己烯雌酚的加标 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of a blank sample spiled with Bisphenol A and diethylstilbestrol

2.4 质谱条件的优化

采用直接进样方式将浓度为 100 ng/mL 的双酚 A 和己烯雌酚注入离子源中，在负离子检测方式下进行母离子全扫描，得到双酚 A 和己烯雌酚的分子离子峰。根据欧盟 2002/657/EC 指令规定对于质谱确证方法必须达到 4 个确证点的要求，低分辨液相色谱-质谱联用仪检测应在确定母离子的基础上选择两个以上的子离子。以该离子峰为母离子，进行二级质谱扫描，最后采集全扫描的二级质谱图，得到碎片离子信息，然后再对得到的二级质谱参数如破碎电压、碰撞能量等进行优化，使定性离子与定量离子产生的离子对强度比例达到最大时为最佳。得到双酚 A 和己烯雌酚的最佳质谱参数，结果见表 1。

2.5 线性关系及检出限

用空白样品提取溶逐级稀释的标准工作液，分别进样 20 μL，测定结果经线性回归[y 为峰面积，Counts；x 为浓度，(μg/L)]，同时用空白样品进行加标实验，在信噪比均大于 3 的条件下能检出，将此添加量定为检出限，结果见表 2。

表 1 双酚 A 和己烯雌酚的质谱参数

Table 1 Parameters of mass spectra of Bisphenol A and diethylstilbestrol

被测物质名称	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碎裂电压/V	碰撞能量/V
双酚 A	227.0	212.1*；132.9	100	17；30
己烯雌酚	267.0	236.9*；251.0	120	25；20

注：* 为定量离子。

表 2 双酚 A 和己烯雌酚的线性方程、线性关系、相关系数及检出限

Table 2 The linear equation，correlation coefficient and limits of detection for Bisphenol A and diethylstilbestrol

被测物质名称	线性方程	线性关系/(μg/L)	相关系数	检出限(S/N≥3)(μg/kg)
双酚 A	y =3 527.9 x-3 775.5	1~25	0.999 3	5
己烯雌酚	y = 74 458.1 x-2 692.1	1~25	0.999 2	5

从表 2 可以看出，双酚 A 和己烯雌酚在 1 μg/L~25 μg/L 浓度范围内高度线性相关(相关系数>0.999)，检出限低(5 μg/kg)，可以满足实际检测要求。

2.6 方法的回收率和精密度

每组准确称取空白样品 6 份，每份 4.0 g，共 3 组，分别定量加入双酚 A 和己烯雌酚标准物质，添加水平分别为 5、25、250 μg/kg。按供试品溶液制备方法制备后进行测定，结果见表 3。

表 3 加标样品回收率与相对标准偏差(n=6)

Table 3 Recovery and relative standard deviation(RSD) of in spiled sample(n=6)

被测物质名称	添加浓度(5 μg/kg)		添加浓度(25 μg/kg)		添加浓度(250 μg/kg)	
	回收率/%	相对标准偏差RSD/%	回收率/%	相对标准偏差RSD/%	回收率/%	相对标准偏差RSD/%
双酚 A	80.6	4.20	97.6	3.97	102.9	3.54
己烯雌酚	91.6	1.29	97.4	8.83	89.9	3.90

从表 3 中可看出，不同浓度平均加标回收率 80.6 %~102.9 %，平均相对标准偏差为 1.29 %~8.83 %(n=6)。图 1 为加标样品中 MRM 色谱图。

3 结论

建立了婴幼儿配方乳粉中双酚 A 和己烯雌酚的液相色谱-串联质谱测定方法。该法样品加标回收率 80.6 %~102.9 %，平均相对标准偏差为 1.29 %~8.83 %

DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2013.17.022

茶叶中茶多酚提取及含量测定的研究

浦周芳,韩丽琴,曹宏梅
(吉林医药学院,吉林 吉林 132013)

摘　要:探讨茶多酚的提取条件。采用均匀设计法,以茶多酚提取率为指标,考察乙醇浓度、液固比、提取时间对茶多酚提取率的影响。结果表明,茶叶中茶多酚最佳提取条件为:采用索氏提取法,以 60 %的乙醇为溶剂,液固比为 8∶1(mL∶g),提取时间为 180 min。验证试验结果表明提取物收率为 46.19 %。

关键词:茶多酚;提取条件;均匀设计

Study on Extraction Process and Determination of Tea Polyphenols from Green Tea

PU Zhou-fang, HAN Li-qin, CAO Hong-mei
(Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin, China)

Abstract: Study on extraction process a of tea polyphenols. Used the uniform design method, investigated the effects of the ratio of extraction to study the ethanol concentration, liquid to solid ratio, extraction time. The optimum condition was obtained: with 60 % of the ethanol as solvent, the liquid-solid ratio for 8∶1 (mL∶g), extracting time for 180 min by Soxhlet extraction.

Key words: the tea polyphenols; extraction process; the uniform design

茶多酚(Tea Polyphneols,简写 TP),又名茶单宁、茶鞣质,是茶叶中多羟基酚类化合物的混合物,占茶叶干重的 15 %~30 %。茶多酚由儿茶素类、黄酮甙类、花青甙类、酚酸类、缩酚酸类等 30 多种化学物质组成,其中儿茶素类化合物是茶多酚的主要成分,约占茶多酚含量的 65 %~80 %左右[1]。茶多酚不仅是一种天然的无毒的抗氧化剂,而且也是一种理想的天然药物,具有清除自由基和抗氧化等生物活性,在抑菌、抗病毒、防癌抗癌、

作者简介:浦周芳(1987—),男(汉),助理实验师,本科,研究方向:从事化学实验教学和科研工作。

(n=6),方法的灵敏度和准确度均满足实际样品检测的需要。

参考文献:

[1] 吕刚,王利兵,刘军,等. 包装材料中的份类环境雌激素的测定-固相萃取/ 气相色谱质谱法[J].分析实验室, 2008,27(9):73-75
[2] 卫碧文,缪俊文,于文佳. 气相色谱- 质谱法分析食品包装材料中双酚 A [J] .分析实验室, 2009,28(1):107-109
[3] 雅韵,徐晓云,谢孟峡,等. 动物组织中己烯雌酚残留的基体固相扩散-气相色谱-质谱分析方法研究[J].分析化学, 2003,31(11):1356-1359
[4] 卫碧文,缪俊文,于文佳. 气相色谱- 质谱法分析食品包装材料中双酚 A [J].分析实验室, 2009,28(1):107-109
[5] 周建科,张前莉,韩康 ,等. 中老年奶粉中双酚 A 和乙烯雌酚的反相高效液相色谱测定[J].食品工业科技, 2007,28(2):233-234
[6] 刘宏程,邹艳红,黎其万,等. 高效液相色谱分离牛奶中己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚[J]. 分析化学, 2008,36(2):245-248
[7] 彭青枝,潘思轶,刘松. 高效液相色谱法测定罐装食品中双酚 A [J]. 中国卫生检验杂志, 2010,20(10):2415-2416
[8] 王瑶,周建华,张鸿雁,等.食品中己烯雌酚的检测方法[J]. 食品工业科技, 2012,33(2):373-375
[9] 丁红春,李建林,徐逸云,等. 婴幼儿奶瓶中迁移双酚 A 的高效液相色谱-电喷雾串联质谱检测方法研究[J]. 化学分析计量, 2010,19(5):42-45
[10] 岳强,于志强,王德超,等. 人体尿液中双酚 A 与壬基酚的同位素稀释的 LC-MS/M 分析[J].分析测试学报, 2009,28(7):859-862
[11] 杜志峰,黄金凤,郭新东,等. 动物肌肉组织中己烯雌酚残留量的液相色谱- 串联质谱法测定[J].分析测试学报, 2007,26(6):823-826
[12] 闫小峰,孙志文. 超高效液相色谱- 串联质谱法测定饲料中的己烯雌酚[J].饲料广角, 2010(11):38-40

收稿日期:2012-12-23