

固相萃取-LC-MS/MS 测定水中双酚 A 类物质

毛丽莎, 刘桂华, 姜杰, 刘红河, 康莉

深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518055

摘要: **目的** 建立固相萃取-液相色谱-串联质谱测定水中双酚类物质的高灵敏度方法。 **方法** 水样直接经反相 C₁₈ 小柱浓缩净化。以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 采用液相色谱-质谱/质谱电喷雾负离子电离 (ESI⁻) 模式和多反应监控 (MRM) 模式, 以双酚 A-d₁₆ 和四溴双酚 A-d₁₀ 为内标进行定量。 **结果** 测定水中双酚 F、双酚 A、四氯双酚 A 和四溴双酚 A 的线性范围均为 10~2 500 ng/L, 线性相关系数分别为 0.998、0.998、0.9998 和 0.9990, 检出限分别为 5、2、0.2、2 ng/L, 加标水平为 250、1 000 ng/L 时, 双酚 F、双酚 A、四氯双酚 A 和四溴双酚 A 的回收率范围为 65.3%~100.4%。 **结论** 固相萃取-液相色谱-串联质谱测定水中双酚类物质, 方法简便, 灵敏度高, 选择性好, 可作为检测水中四种双酚类物质的有效手段。

关键词: 液相色谱; 质谱; 固相萃取; 双酚 A

中图分类号: R123.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2016)10-1260-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.10.036

Determination of bisphenol A analogs in water sample by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction

MAO Li-sha, LIU Gui-hua, JIANG Jie, LIU Hong-he, KANG Li

Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: **Objective** A high sensitivity method for determination of bisphenols in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with solid phase extraction (SPE) was established. **Methods** The water samples were concentrated and purified by C18 cartridge directly, and then gradiently eluted with acetonitrile-water as the mobile phase for the baseline separation of the four compounds, bisphenol F (BPF), bisphenol A (BPA), tetrachlorobisphenol A (TCBPA) and tetrabromobisphenol A (TBBPA), in thirteen minutes. BPA-d₁₆ and TBBPA-d₁₀ were used as internal standards and the analytes were identified by LC-MS/MS with the negative electrospray ionization under multiple reaction monitoring mode. **Results** The linear ranges of BPF, BPA, TCBPA and TBBPA in water all fell in 10ng/L-2,500ng/L. The linear correlation coefficients of their standard curves were 0.998, 0.998, 0.9998 and 0.9990 respectively, and the detection limits were 5ng/L, 2ng/L, 0.2ng/L and 2ng/L. The average recoveries for BPF, BPA, TCBPA and TBBPA at spiked concentration levels of 250 ng/L and 1000 ng/L were in the range of 65.3%~100.4%. **Conclusions** The LC-MS/MS coupled with SPE is simple, highly sensitive and selective. It provides an effective approach for the detection of bisphenols in water.

Key words: Liquid Chromatography; Mass Spectrometry; Solid phase extraction; Bisphenol A

双酚类化合物一般是指一类具有两个羟苯基结构的物质。根据羟苯基和碳桥上取代基不同又可分为不同的类似物^[1]。其中最常见的是双酚 A (bisphenol A, BPA)、双酚 F (bisphenol F, BPF)、四氯双酚 A (tetrachlorobisphenol A, TCBPA) 和四溴双酚 A (tetrabromobisphenol A, TBBPA)。

一般人群的 BPAs 接触方式主要为经口途径, 塑料矿泉水瓶、饮料瓶及食品罐内外壁涂层等在使用及存放过程中, 都可能会有少量 BPAs 溶出进入食品和

作者简介: 毛丽莎 (1975-), 女, 四川泸州人, 硕士, 主任技师, 主要从事食品、环境检测工作。

水中, 进而通过消化道进入机体, 对内分泌有干扰作用。近年来, 世界各地包括我国的部分江河、湖泊中均有双酚 A 被检出的报道^[2-7]。

目前已有文献报道采用毛细管电泳-紫外检测法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法以及液相色谱-质谱联用法检测样品中的双酚 A (BPA) 等^[8-9]。目前利用液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 进行环境样品和人体样品中环境内分泌干扰物的研究是目前研究的趋势, 但是针对 BPA 类似物检测目前报道并不多, 而由于 BPA 类似物的逐渐使用, 越来越要求方法能囊括更多组分分析, 从而提高检测时效。因此, 建立起灵敏

度高、基质干扰小的多组分分析方法是当前开展双酚类化合物研究的迫切需要,本文建立了 LC-MS/MS 检测水样中 4 种 BPAs 的分析方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与器材 ABI QTRAP 5500 LC/MS/MS 仪 (AB SCIEX 公司,美国);色谱柱:Waters Atlantis® T3 (2.1×150 mm 3 μm);涡旋振荡器(德国 IKA 公司);N₂ 吹浓缩仪(N-EVAP112,美国);Milipore 超纯水发生器(美国 Milipore 公司);1 000、100、20 μl 加样枪。

固相萃取装置(Supelco,美国);固相萃取小柱(瓦里安 Bond elute C₁₈, 3 ml, 500 mg, 美国)。

1.2 试剂

1.2.1 标准溶液 标准物质: BPF、BPA、TCBPA、TBBPA、BPA-d₁₆ 购自 SIGMA 公司,纯度大于 97%。TBBPA-d₁₀(100 ng/μl)购自 Dr. Ehrenstorfer 公司。分别准确称取 BPF、BPA、TCBPA、TBBPA 各 0.0100 g,用甲醇溶解定容至 10 ml,配成 1 mg/ml 标准储备液置于冰箱 4℃ 保存。取 BPF、BPA、TCBPA、TBBPA 储备液各 1 ml,用甲醇定容至 10 ml,得 100 μg/ml 标准混合溶液,使用时用甲醇逐级稀释至所需要的浓度。准确吸取 25 μg/ml 的 BPF、BPA、TCBPA、TBBPA 混合溶液 0.5 ml,用甲醇溶液定容至 5 ml,配成 2.5 μg/ml 标准混合溶液,置于冰箱 4℃ 保存。混合内标标准配制:取 10 μg/ml 的 BPA-d₁₆ 100 μl 和 10 μg/ml 的 TBBPA-d₁₀ 1 ml 置于容量瓶中,用甲醇溶液定容至 10 ml,配成 1 μg/ml 的混合内标标准溶液。

1.2.2 甲醇(色谱纯);乙腈(色谱纯);盐酸(分析纯);纯水(18.2 MΩ·cm)。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 柱温为室温,进样量为 10 μl,流动相为乙腈和水。具体条件见表 1。4 种化合物的质谱图见图 1。

表 1 液相色谱条件

时间(min)	速度(μl/min)	乙腈(%)	水(%)
0.00	200	50	50
5.00	200	100	0
7.00	200	100	0
8.00	200	50	50
13.00	200	50	50

1.3.2 质谱条件 离子化方式:ESI 离子源;扫描模式:负电离;检测方式:多离子反应监测(MRM);碰撞

气(CAD):7 psi;气帘气(CUR):15 psi;雾化气(GSI):40 psi;加热气(GS2):45 psi;喷雾电压(IS):-4 500 V;去溶剂温度(TEM):400℃;扫描时间:100 ms。MRM 模式下的质谱参数见表 2。

表 2 MRM 模式下的质谱参数

化合物 中文名称	英文缩写	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	Dwell time (msec)	CE (E/eV)
双酚 F	BPF	199	92.8 *	50	-28
			104.9	50	-28
双酚 A	BPA	227.1	212.1 *	50	-38
			133	50	-34
四氯双酚 A	TCBPA	365	286 *	50	-42
			250	50	-49
四溴双酚 A	TBBPA	542.7	447.8 *	50	-31
			419.9	50	-32

注: * 为定量离子。

1.3.3 水样前处理 依次用 10 ml 甲醇和 10 ml 纯水对 C₁₈ 固相萃取柱进行活化,备用。准确量取 200 ml 水样于样品瓶中,用浓盐酸调节 pH<2,控制样品以 0.5 ml/min 一定流速通过萃取柱,待水样完全流出后,抽真空 10 min,用 6.00 ml 甲醇洗脱,收集洗脱液,40℃ 条件下 N₂ 吹至 1.00 ml,振荡混匀,进行 LC-MS-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 工作曲线的绘制 分别取 0、2、20、50、100、200 μl 2.5 μg/ml 的混合标准溶液,用乙腈/水(1:1)定容至 1.00 ml,配成 0、0.005、0.05、0.125、0.25、0.5 μg/ml 标准系列,上述标准系列各取 100 μl 分别加入至 20 ml 空白水样中,配成浓度为 0、25、250、625、1 250、2 500 ng/L 的工作曲线,分别加入 50 μl 1 μg/ml 的混合内标溶液,使内标浓度为 25 ng/ml。然后经上述样品前处理方法处理后检测,根据测定结果绘制工作曲线,见表 3。

表 3 水样中四种化合物的工作曲线

	化合物	线性范围 (ng/L)	a	b	r
1	BPF	10~2500	9.91×10 ⁵	1.51×10 ⁵	0.998
2	BPA	10~2500	1.51×10 ⁶	1.55×10 ⁵	0.998
3	TCBPA	10~2500	1.8×10 ⁵	5.73×10 ⁴	0.9998
4	TBBPA	10~2500	1.13×10 ⁴	2.01×10 ³	0.9990

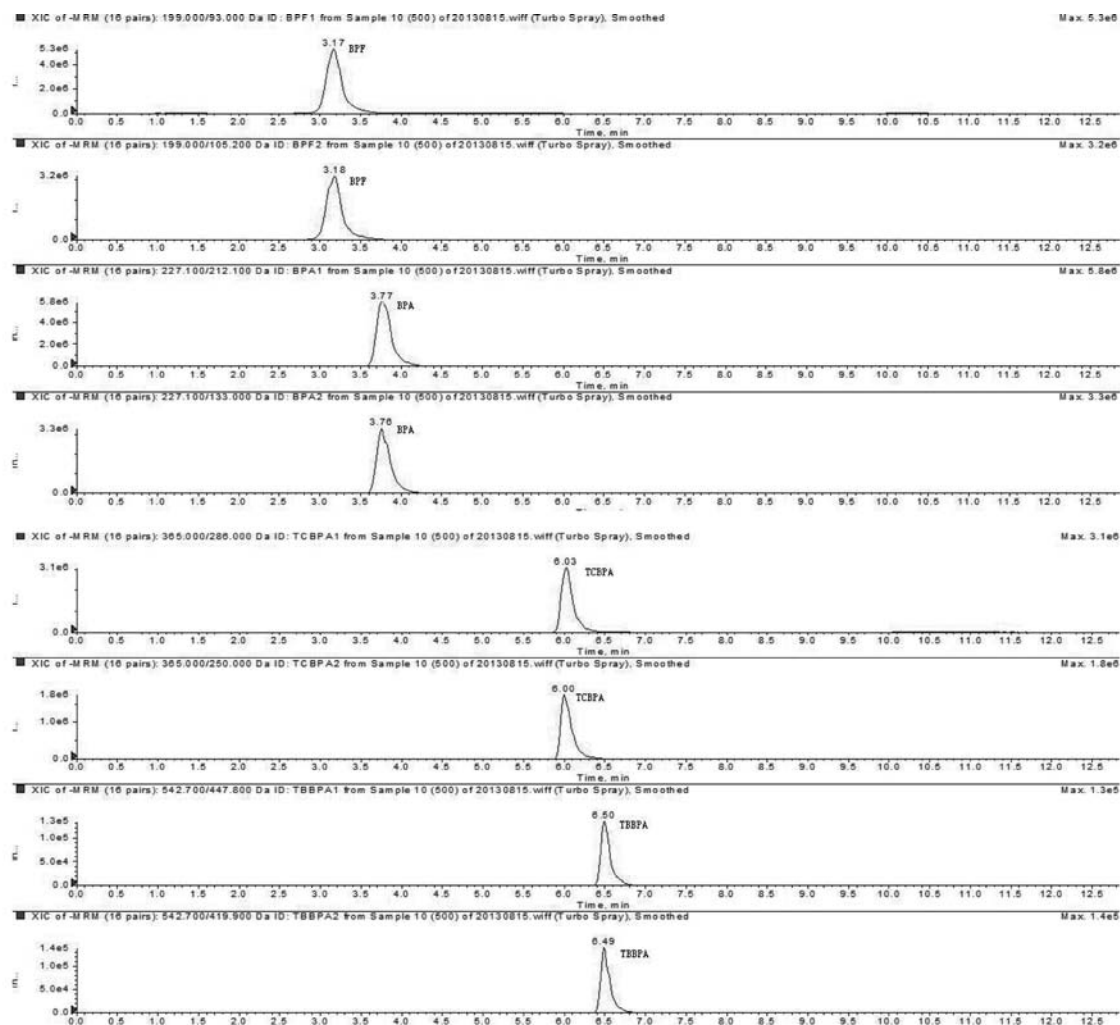


图 1 多反应监测(MRM)色谱图

2.2 检出限 以一低浓度标准样品进样进行检出限测定,以三倍信噪比计算检出限,结果见表 4。

表 4 4 种双酚 A 类化合物的检出限和保留时间

样品号	化合物	RT(min)	检出限(ng/L)
1	BPF	3.17	5
2	BPA	3.77	2
3	TCBPA	6.03	0.2
4	TBBPA	6.50	2

2.3 回收率及精密度 向空白水样中加入 4 种物质

的混合标准,配成加标样品重复测定,4 种双酚 A 类物质的相对标准差和回收率数据见表 5。

2.4 色谱条件优化 本法选用 Waters 公司的 Atlantis® T3(2.1×150 mm 3 μm)色谱柱,与一般反相 C₁₈柱相比,采用高纯度硅胶和三官能团 C₁₈烷基键合相,对极性化合物保留能力更强,具有色谱峰形优异、分辨率高等优点。梯度洗脱可以提高分离度、缩短分离时间、改善峰形、降低最小检测量和提高分离精度,因此本文以纯乙腈和纯水组成流动相进行梯度洗脱以分离待测组分及改善峰型,具体条件见表 1。

表 5 回收率和精密度

化合物	回收率(% , $\bar{x}\pm s, n=5$)		日内精密性(% , $n=6$)		日间精密性(% , $n=3$)	
	低浓度 0.25ng/ml	高浓度 1.00ng/ml	低浓度 0.25ng/ml	高浓度 1.00ng/ml	低浓度 0.25ng/ml	高浓度 1.00ng/ml
BPF	81.5±10.1	93.6±5.0	9.0	5.3	7.9	5.4
BPA	89.2±11.1	95.9±4.5	12.5	4.7	7.8	4.5
TCBPA	83.1±9.8	91.8±3.7	7.2	2.4	8.8	2.5
TBBPA	75.6±10.3	85.0±6.1	9.2	5.0	11.5	5.4

2.5 固相萃取柱的选择 本实验共采用 Waters Oasis 系列的 HLB 固相萃取柱、Agilent ODS-C₁₈ 柱以及瓦里安的瓦里安 Bond elute C₁₈ 柱共三种固相萃取小柱对样品进行浓缩净化,通过测得的峰面积比较三种柱子的效能。

瓦里安 Bond elute C₁₈ 是一新型的 SPE 吸附剂,具有高键合密度、低流失、高回收率等特点,适用于环境水样中的有机物的富集。HLB 固相萃取柱是一种亲水亲脂平衡的水可浸润性反相吸附剂,对极性化合物具有优异的保留能力。在水样中添加同样浓度的样品进行固相萃取小柱处理后对洗脱液进行检测,结果见表 6,在三种固相萃取柱处理的样品所测得峰面积中,Waters 的 HLB 小柱处理的样品中,TCBPA 获得最大的峰面积,但其余三种化合物均较小;瓦里安的 Bond elute C₁₈ 小柱四种组分均获得较好回收,因此试验最终选择采用 Bond elute C₁₈ 小柱作为固相萃取小柱。

表 6 不同固相萃取柱处理水样后四种物质的峰面积

固相萃取柱	峰面积			
	BPF	BPA	TCBPA	TBBPA
HLB	3.45×10 ⁵	5.69×10 ⁵	3.15×10 ⁷	2.04×10 ⁵
ODS-C ₁₈	2.88×10 ⁶	2.74×10 ⁶	1.12×10 ⁷	7.95×10 ⁵
Bond elute C ₁₈	2.74×10 ⁶	7.10×10 ⁶	2.56×10 ⁷	1.77×10 ⁶

2.6 内标物质的选择 色谱-质谱联用分析中一般需要采用内标物质进行定量分析。LC-MS 联用分析存在基质效应,是指样品中除了待测物以外的其他基质成分对待测物测定值的影响,它源自色谱分离过程中与被测物共流出的物质对被测物离子化过程的影响,共流出干扰物可分为内源性杂质和外源性杂质。基质效应的存在会严重影响对待测物的定量准确度和精密度,且影响因素多变,很难被完全消除^[10]。使用内标物定量以及采用基质匹配标准曲线定量是目前常用的消除基质效应的手段,本法采用可获取的 BPA-d₁₆ 和 TBBPA-d₁₀ 作为同位素内标配合工作曲线进行定量分析,可有效消除基质效应的影响,同时可以跟踪补偿前处理过程中的损失。

3 结 论

本文建立了一种高效、准确的同时测定水样中四种双酚 A 类化合物的液相色谱-质谱/质谱分析方法。

水样中的双酚 A 内物质大多以游离化合物的形式存在,且含量较微量,因此水样可直接经 SPE 浓缩净化。本方法采用瓦里安 Bond elute C₁₈ 固相萃取柱对样品进行浓缩净化,再经 LC/MS/MS 分析测定,不仅做到了准确定性,也大大增加了分析的灵敏度。

参考文献

[1] Pasquet C, Vulliet E. Utilisation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of alkylphenols in various environmental matrices. Comparison with LC-MS/MS method [J]. Talanta, 2011, (85): 2492-2497.

[2] 国先芬,王贻鑫,耿存珍,等. 环境激素双酚 A 的毒理学研究进展 [J]. 环境科学与技术, 2013, 36(2): 86-92.

[3] Kawaguchi M, Sakui N, Okanouchi N, et al. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2005, 820(1): 49-57.

[4] 韩灏,邵兵,马亚鲁,等. 高效液相色谱法测定饮料类食品中的类雌激素 [J]. 色谱, 2005, 23(2): 176-179.

[5] 范奇元,申立军,丁训诚,等. 用子宫增重试验检测壬基酚的雌激素样作用 [J]. 劳动医学, 2000, 17(4): 196-197.

[6] Khim Js, Lee KT, Kannan K, et al. Trace organic contaminants in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2001, 40: 141-150.

[7] Heemken OP, Reincke H, Stachel B, et al. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea [J]. Chemosphere, 2001, 45: 245-259.

[8] Inoue K, Kawaguchi M, Funakoshi Y, et al. Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2003, 798(1): 17-23.

[9] YE X, Kuklennyik Z, Needham LL, et al. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2006, 831(1-2): 110-115.

[10] 段醒妹,张晔. 基质效应及其消除 [J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2000, 2(1): 17-18.

收稿日期: 2016-01-15