

同位素内标-UPLC-MS/MS 法检测易拉罐啤酒中 双酚 A 含量

江小剑^{1,2}

(1.厦门市产品质量监督检验院, 福建 厦门 361004;

2.厦门市食品包装材料安全评价及检测重点实验室, 福建 厦门 361004)

摘要: **目的** 为了提高金属易拉罐啤酒中双酚 A (BPA) 的检测能力, 建立一种基于同位素内标的超高效液相色谱-串联质谱分析方法。**方法** 样品经超声处理后除去 CO₂, 随后添加内标物 BPA-¹³C₁₂, 用超高效液相色谱-串联质谱法进行检测分析, 采用内标法定量。**结果** 经同位素内标标准曲线校正, 方法的定量限为 1.00 μg/L, 线性方程为 $y=1.73x+0.206$, 线性相关系数为 0.9992, 相对标准偏差为 4.68%~6.63%, 加标回收率为 91.0%~109%。使用该方法对厦门市市售 6 种易拉罐啤酒样品进行了 BPA 污染物迁移量检测, 结果显示 6 种啤酒中均检出 BPA, 平均质量浓度为 1.48 μg/L。**结论** 此方法具有前处理简便快捷、检测限高、灵敏度高、准确度高等特点, 能够满足金属易拉罐啤酒中低含量 BPA 的检测要求。

关键词: 双酚 A; 超高效液相色谱/串联质谱法; 同位素内标法; 易拉罐啤酒

中图分类号: TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2020)21-0018-04

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.21.003

Determination of Bisphenol A in Canned Beer by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry based on Isotope Internal Standard

JIANG Xiao-jian^{1,2}

(1.Xiamen Products Quality Supervision & Inspection Institute, Xiamen 361000, China;

2.Xiamen Key Laboratory of Food Packing Material Safety Evaluation and Testing, Xiamen 361004, China)

ABSTRACT: The work aims to establish a method based on isotope internal standard by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MS-MS) to enhance the determination ability of bisphenol A (BPA) in canned beer. The canned beer samples were mixed with BPA-¹³C₁₂ after ultrasonic treatment, and then analyzed by UPLC/MS-MS and quantified by isotope-labelled internal standard. Quantified by the calibration curve of isotope-labelled internal standard, the detection limitation of the method was 1.00 μg/L. The linear equation was $y=1.73x+0.206$, the correlation coefficient was 0.9992, and the spiked recoveries of BPA was 91.0% to 109% with RSDs ranging from 4.68% to 6.63%. Then, the method was applied to determine the pollutant migration of BPA in 6 canned beers from Xiamen local market. The results showed that BPA was found in all samples with the average concentration of 1.48 μg/L. The method has the advantages of simple and fast pretreatment, low detection limitation, high sensitivity and good accuracy, which can satisfy the requirement of detecting low BPA concentration in canned beer.

KEY WORDS: bisphenol A; UPLC/MS-MS; isotope internal standard; canned beer

收稿日期: 2020-08-28

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划 (2019MK081)

作者简介: 江小剑 (1987—), 男, 博士, 工程师, 主要研究方向为包装材料安全性。

在我国啤酒流通市场上, 易拉罐啤酒因具有便于携带、易于开启的优点而备受青睐。金属易拉罐在贮存过程中受到暴晒、剧烈震荡等外部因素的影响, 内层涂料存在双酚 A (BPA) 释放迁移进入啤酒的可能性^[1-4]。有调查指出, 我国 31 种罐装啤酒中 BPA 的检出质量浓度为 1.26 ~ 3.81 $\mu\text{g/L}$ ^[5], 而加拿大市场上此值为 0.081 ~ 0.54 $\mu\text{g/L}$ ^[6], 葡萄牙市场上此值为 0.65 ~ 4.7 $\mu\text{g/L}$ ^[7]。

双酚 A, 又称 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷, 长期接触 BPA 的人群易患肥胖症、糖尿病、性早熟以及内分泌失调等疾病^[8-9]。根据 GB 31604.10—2016, 使用液相色谱-串联质谱法测定食品接触材料及制品中 BPA 的迁移量, 并采用外标法定量。该方法对酒精类食品模拟物中 BPA 的定量限为 10 $\mu\text{g/L}$, 高于市场上易拉罐啤酒中 BPA 的检出浓度。其他检测方法, 如液相色谱法^[10-11]、气相色谱-质谱联用法^[7,12]、酶联免疫法^[13-14]也都存在同样的问题。鉴于仪器方法固有的局限性, 研究人员开始从样品前处理方面入手, 以提高检测方法的检出限。朱华蓉等^[15]采用固相萃取技术进行样品前处理, 运用液相色谱-质谱联用法进行北京市售桶装饮用水中 BPA 的检测, 检出限为 7.0 ng/L ; 郑赛等^[16]使用 PLEXA 固相萃取柱富集、净化饮用水, 运用液相色谱-质谱联用法测定 BPA 及其氯化消毒副产物, 检出限为 0.2 $\mu\text{g/L}$ 。固相萃取的操作步骤相对较复杂, 在一定程度上影响了回收率, 并且固相萃取柱可能存在痕量的 BPA 迁出, 易造成样品污染。

文中拟采用同位素内标法消除基质环境的干扰, 在啤酒样品中添加内标物 BPA-¹³C₁₂, 无需采用固相萃取操作, 即可直接测定样品中低含量的 BPA。此方法的开发有望为加强啤酒中 BPA 污染物的检验监管提供技术支撑, 适合推广为检测标准。

1 实验

1.1 试剂材料与仪器设备

主要试剂: BPA 标准品, 纯度 $\geq 99\%$, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 同位素内标 BPA-¹³C₁₂ 溶液, 10 mg/L , 日本 Tokyo Kasei Kogyo 公司; 甲醇, 色谱纯, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 乙醇, 分析纯, 阿拉丁试剂(上海)有限公司。金属易拉罐啤酒和玻璃瓶装啤酒样品购自厦门市某超市。

主要仪器设备: AB SCIEX Triple QuadTM 5500 LC/MS/MS, 美国 AB 公司; SK 8210HP 超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国密理博公司。

1.2 方法

1.2.1 标准工作溶液的配制

准确称取 BPA 标准品 50 mg 至 50 mL 容量瓶中,

用甲醇/水(体积比为 1:1)溶解并定容, 配制成 BPA 质量浓度为 1 g/L 的储备液。用甲醇/水(体积比为 1:1)逐级稀释储备液, 得到 BPA 质量浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的中间液。准确移取 0.5 mL 10 mg/L BPA-¹³C₁₂ 的同位素内标液于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇/水(体积比为 1:1)定容, 得到质量浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 BPA-¹³C₁₂ 内标液。取 20 μL 上述 BPA 中间液和 20 μL 内标液与 960 μL 超声处理过的啤酒混合, 得到 BPA 质量浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 、BPA-¹³C₁₂ 质量浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。同理, 固定内标液体积, 调整 50 $\mu\text{g/L}$ BPA 中间溶液和啤酒的混合体积, 配得到 BPA-¹³C₁₂ 质量浓度固定为 2 $\mu\text{g/L}$ 、BPA 质量浓度为 0, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液。

1.2.2 样品处理

取同一生产日期的某品牌易拉罐啤酒和玻璃瓶装啤酒(作空白样品), 开盖, 将约 10 mL 啤酒倒入 100 mL 的干净玻璃烧杯中, 置于超声波清洗器中超声 30 min , 除去 CO_2 。随后, 准确移取 980 μL 超声样液于进样小瓶中, 加入 20 μL 100 $\mu\text{g/L}$ 的同位素内标液, 振荡混匀, 用 0.22 μm 的针式过滤器过滤, 得到待测样液和空白样品溶液, 采用超高效液相色谱-串联质谱仪测定。每个样品平行测定 3 次。

1.2.3 超高效液相色谱条件

液相色谱仪: Agilent 1290 液相色谱仪; 色谱柱, Waters AcquityTM UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm (2.1 $\text{mm} \times 100 \text{mm}$); 柱温为 35 $^\circ\text{C}$; 流动相, A 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液, B 为甲醇; 流速为 1.0 mL/min ; 进样体积为 2 μL 。梯度洗脱程序: 0 min , 75% (体积分数) A; 4 min , 0% (体积分数) A; 5 min , 0% (体积分数) A; 5.1 min , 75% (体积分数) A; 7 min , 75% (体积分数) A。

1.2.4 质谱条件

离子源: ESI⁻; 离子源温度 (TEM), 550 $^\circ\text{C}$; 电喷雾电压 (IS), -4500 V ; 气帘气压力 (CUR), 207 kPa ; 雾化器压力 (GS1), 345 kPa ; 辅助器压力 (GS2), 414 kPa ; 碰撞室入口电压 (EP), -10 eV ; 碰撞室出口电压 (CXP), -16 eV ; 驻留时间为 100 ms ; 待测物的母离子、子离子、去簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 见表 1。

表 1 BPA 及同位素内标物的质谱参数

Tab.1 Mass spectrum parameters of BPA and isotope internal standards

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压/ eV	碰撞能 量/ eV
BPA	227.1	212.1*	80	-18
		133.1	80	-24
BPA- ¹³ C ₁₂	240.1	225.1*	80	-18

注: *为定量离子

2 结果与讨论

2.1 检测方法的建立

2.1.1 质谱条件

将 BPA 和 BPA-¹³C₁₂ 内标物配制成质量浓度为 0.1 mg/L 的单标溶液,用于质谱条件优化。根据化合物的化学电离特性,选用电喷雾负离子仪源 (ESI⁻) 模式进行离子化,对 BPA 和 BPA-¹³C₁₂ 的质谱参数进行优化,优化后的母离子、子离子、去簇电压、碰撞能量信息见表 1。

2.1.2 色谱条件

流动相的组成对目标物的分离和检测限有着重要的影响,为提高方法的分离效率和灵敏度,此次实验对流动相条件进行了优化。最初实验中的流动相采用水和甲醇做流动相,试验结果发现定性离子对的信号较弱。考虑到 BPA 为负离子模式电离,适当添加乙酸铵有利于化合物电离,因此改用 5 mmol/L 乙酸铵水溶液和甲醇溶液作为流动相。随后,进一步对梯度洗脱条件进行优化,得到峰形尖锐、对称的提取离子流色谱图。

2.1.3 标准曲线与定量限

实验采用内标法定量,在标准溶液和样品中添加相同浓度的同位素内标物,通过目标化合物与内标物峰面积比值同目标化合物与内标物浓度比值的线性关系,计算双酚 A 含量。按 1.2.1 节配制质量浓度为 0, 1, 2, 5, 10 μg/L 的 BPA 标准工作溶液 (内标物质量浓度均为 2 μg/L),采用超液相色谱-串联质谱仪进样分析,得到 BPA 的峰面积 A_s 和内标物 BPA-¹³C₁₂ 的峰面积 A_i ,以 BPA 的质量浓度 (x , μg/L) 为横坐标,色谱峰面积之比 y (A_s/A_i) 为纵坐标,绘制标准溶液回归曲线,得到线性方程 $y=1.73x + 0.206$ ($R^2=0.9992$)。

采用样品添加目标物的方式确定方法的定量限。在空白模拟液中,逐步增加标准溶液添加量,按照 1.2.2 节的处理方法和 1.2.3 节的仪器条件进行检测,以目标物的色谱峰信噪比 $S/N \geq 10$ 时来确定定量限,结果为 1.00 μg/L。

2.1.4 精密度与回收率

取玻璃瓶啤酒为基质,添加适量体积的标准溶液和内标溶液,使 BPA 的添加水平分别为 1, 3, 10 μg/L,内标物质量浓度均为 2 μg/L。每个浓度平行配制 6 个样品,按照 1.2.2 节的方法进行前处理,按照 1.2.3 节的仪器工作条件进行检测,测定 BPA 的含量,计算平均回收率和相对标准偏差,结果见表 2。3 种浓度水平的加标回收率为 91.0%~109%,相对标准偏差为 4.68%~6.63%,表明方法的回收率和精密度均符合 GB 31604.10—2016 的要求。

表 2 采用文中的检测方法检测啤酒中 BPA 含量的回收率和精密度

Tab.2 Recovery and precision of the method used in this study for detecting BPA in beer

化合物	加标值/ (μg·L ⁻¹)	检出值/ (μg·L ⁻¹)	回收率/ %	平均相对 偏差/%
BPA	1	1.09	109	6.63
	3	2.73	91.0	4.96
	10	9.83	98.3	4.68

2.1.5 内标法与外标法比较

啤酒中含有糖类、蛋白质、维生素等物质,其复杂的成分容易引起电喷雾质谱的基质效应^[17],会对目标物的分析造成干扰,从而影响方法的检出限。进一步比较了内标法和外标法在检测啤酒 BPA 含量中的差异,结果见表 3。通过比较发现,内标法在 BPA 质量浓度低于 10 μg/L 时有良好的线性,其定量限为 1.00 μg/L,适用于复杂基质中低浓度 BPA 的检测。同位素内标物与待测物化学性质相近,复杂基质中二者在仪器上的响应会等同增强或抑制^[17],而响应强度的相对比值与浓度比成正相关,因此通过内标校正可以消除基质效应的干扰,提高检测方法的准确性。

表 3 比较内标法和外标法
Tab.3 Comparison of internal and external
standard methods

方法	线性范围/ (μg·L ⁻¹)	定量限/ (μg·L ⁻¹)	线性相关系数 (R^2)
外标法	10~200	10.0	0.9996
内标法	0~10	1.00	0.9992

2.2 样品分析

在市场上随机购买某品牌易拉罐啤酒和玻璃瓶啤酒 (空白样品) 各 6 瓶,按上述前处理方法及仪器检测条件进行分析,每个样品平行测定 3 次,采用内标法定量。结果显示 6 个空白样品中 BPA 的平均检出质量浓度为 0.617 μg/L,平均相对标准偏差为 4.93%;在 6 个待测样品中均检出 BPA,平均质量浓度为 2.10 μg/L,相对标准偏差为 5.21%。将待测样品的 BPA 检出值扣掉空白样品的检出值,得到样品中 BPA 的质量浓度为 1.48 μg/L。金属易拉罐内表面采用环氧树脂涂层,而 BPA 是此类涂料的主要成分,未完全反应的 BPA 可能在啤酒运输、存储过程中发生迁移,这是金属易拉罐啤酒中检出 BPA 的主要原因。

3 结语

采用基于同位素内标的超液相色谱-串联质谱法

检测金属易拉罐装啤酒中 BPA 的含量。相较于外标法, 此方法的抗基质效应更强, 定量限更高, 适用于检测啤酒样品中低浓度的 BPA。采用该方法检测 6 种金属易拉罐啤酒中 BPA 的含量, 发现均被检出。此方法操作简单、灵敏度高, 能满足日常高通量检测, 同时也能确保检测结果准确可靠, 有望为金属罐装啤酒中 BPA 的监督检测、风险评估提供有力的技术支持。

参考文献:

- [1] VERISSIMO M, GOMES M. Aluminium Migration into Beverages: Are Dented Cans Safe[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 405(1): 385—388.
- [2] MUNGUIA-LOPEZ E M, SOTO-VALDEZ H. Effect of Heat Processing and Storage Time on Migration of Bisphenol A (BPA) and Bisphenol A-Diglycidyl Ether (BADGE) to Aqueous Food Simulant from Mexican Can Coatings[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(8): 3666—3671.
- [3] COOPER J E, KENDIG E L, BELCHER S M. Assessment of Bisphenol A Released from Reusable Plastic, Aluminium and Stainless Steel Water Bottles[J]. *Chemosphere*, 2011, 85(6): 943—947.
- [4] KANG J H, KITO K, KONDO F. Factors Influencing the Migration of Bisphenol A from Cans[J]. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(8): 1444—1447.
- [5] XIE Yun-fei, BAO Yang, WANG He-ya, et al. Release of Bisphenols from Can Coatings Into Canned Beer in China Market[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(4): 764—770.
- [6] GOODSON A, ROBIN H, SUMMERFIELD W, et al. Migration of Bisphenol A from Can Coatings-effects of Damage, Storage Conditions and Heating[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2014, 21(10): 1015—1026.
- [7] CUNHA S C, ALMEIDA C, MENDES E et al. Simultaneous Determination of Bisphenol A and Bisphenol B in Beverages and Powdered Infant Formula by Dispersive Liquid-liquid Micro-extraction and Heart-cutting Multidimensional Gas Chromatography-mass Spectrometry[J]. *Food Additives and Contaminants Part A*, 2011, 28(4): 513—526.
- [8] MOORS S, DIEP P, DEGEN G H. Toxicokinetics of Bisphenol A in Pregnant DA/Han Rats after Single iv Application[J]. *Archives of Toxicology*, 2006, 80(10): 647—655.
- [9] GUO Hong-chuan, LIU Tian-yi, UEMURA Y, et al. Bisphenol A in Combination with TNF-alpha Selectively Induces Th2 Cell-promoting Dendritic Cells *in vitro* with an Estrogen-like Activity[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2010, 7(3): 227—234.
- [10] 孙希岚, 朱争礼, 单莹莹, 等. 高效液相色谱-荧光检测法检测金属食品罐用涂料中的双酚 A 含量[J]. *包装工程*, 2013, 34(3): 27—30.
- [11] SUN Xi-lan, ZHU Zheng-li, SHAN Ying-ying, et al. Determination of Bisphenol A in Coatings of Metal Food Cans by HPLC Fluorescence Detection Method[J]. *Packaging Engineering*, 2013, 34(3): 27—30.
- [11] 王涛, 马明, 邵敏, 等. 高效液相色谱法同时测定塑料食品接触材料中双酚 S、双酚 A 和 4,4'-二氯二苯砜的迁移量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2017, 53(12): 1398—1402.
- [12] WANG Tao, MA Ming, SHAO Min, et al. Simultaneous Determination of Migration of Bisphenol S, Bisphenol A and 4,4'-Dichlorodiphenyl Sulfo[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2017, 53(12): 1398—1402.
- [12] BECERRA V, ODERMATT J. Detection and Quantification of Traces of Bisphenol A and Bisphenol S in Paper Samples Using Analytical Pyrolysis-GC/MS[J]. *Analyst*, 2012, 137: 2250—2259.
- [13] KIM A, LI C R, JIN C F, et al. A Sensitive and Reliable Quantification Method for Bisphenol A Based on Modified Competitive ELISA Method[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(7): 1204—1209.
- [14] OHKUMA H, ABE K, ITO M, et al. Development of a Highly Sensitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Bisphenol A in Serum[J]. *Analyst*, 2002, 127(1): 93—97.
- [15] 朱华蓉, 郝鹏鹏, 魏思雨. 北京市售桶装饮用水中双酚 A 的污染水平[J]. *包装工程*, 2017, 38(1): 103—107.
- [15] ZHU Hua-rong, HAO Peng-peng, WEI Si-yu. Pollution Level of Bisphenol A in Barrelled Drinking Water Products Sold in Beijing Market[J]. *Packaging Engineering*, 2017, 38(1): 103—107.
- [16] 郑赛, 杨蕴嘉, 张昕, 等. 超高效液相色谱-四级杆串联质谱法检测饮用水中双酚 A 和双酚 F 及其氯化消毒副产物[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(2): 155—159.
- [16] ZHENG Sai, YANG Yun-jia, ZHANG Xin, et al. Simultaneous Determination of Bisphenol A, Bisphenol F and Their Chlorinated Byproducts in Drinking Water by Ultr-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(2): 155—159.
- [17] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(13): 3019—3030.