DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2018031602
杨丽萍, 王强, 祝凌燕.高效液相色谱串联质谱法测定鱼体内双酚 A 及其替代品[J].环境化学, 2018,37(8):1842-1850.
YANG Liping, WANG Qiang, ZHU Lingyan. Simultaneous determination of Bisphenol A and its alternatives in fish samples by ultra performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry[J].Environmental Chemistry,2018,37(8):1842-1850.

高效液相色谱串联质谱法测定鱼体内双酚 A 及其替代品*

杨丽萍# 王 强# 祝凌燕**

(环境污染过程与基准教育部重点实验室,天津市城市生态环境修复与防治重点实验室,
南开大学环境科学与工程学院, 天津, 300350)

摘 要 为实现生物体中双酚 A 及其替代物的准确、快速、高灵敏度的同时测定,采用固相萃取与超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用(SPE-UPLC-MS/MS)技术,建立了测定鱼体内双酚 A 及其 8 种替代物(双酚 B(BPB)、双酚 C(BPC)、双酚 E(BPE)、双酚 F(BPF)、双酚 S(BPS)、双酚 Z(BPZ)、双酚 AF(BPAF)和双酚 AP(BPAP))的前处理和分析方法.结果显示,以 V(甲醇):V(水)= 1:1 的混合液为萃取剂提取鱼体中的双酚类目标物,经过 HC-C18 SPE (500 mg)柱净化富集后,采用 Waters BEH Shield RP18(2.1×150 mm, 1.7 μm, Waters)色谱柱分离目标物,9 种目标双酚类化合物的线性范围 0.500—100 ng·g^{-1}(r > 0.995),检出限可达 0.100—380 pg·g^{-1}湿重,回收率范围为 68.0%—125%,相对标准偏差范围为 1.4%—5.7%.通过分析锦鲤全鱼样品,证明该方法样品回收率高、检出限低、灵敏度高、重现性好,具有较好的实用性.

关键词 液相质谱联用, 双酚 A, 鱼, 双酚类化合物.

Simultaneous determination of Bisphenol A and its alternatives in fish samples by ultra performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry

YANG Liping# *WANG Qiang*# *ZHU Lingyan***

(Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin,300350, China)

Abstract: In order to determine bisphenol A and its alternatives accurately, rapidly and sensitively, a method for the sample pretreatment and determination of bisphenol A and eight alternatives (bisphenol B (BPB), bisphenol C (BPC), bisphenol E (BPE), bisphenol F (BPF), bisphenol S (BPS), bisphenol Z (BPZ), bisphenol AF (BPAF) and bisphenol AP (BPAP)) in fish was established, which coupled ultra performance liquid chromatography with triple quadruples mass spectrometry. The optimum sample pretreatment conditions were established as follows V(methanol): V(water) = 1:1 mixed solution as extractant, HC-C18 SPE cartridge for purification and enrichment. The target compounds were separated on a Waters BEH Shield R18 column. The linear range of the nine target bisphenol compounds was 0.500—100 ng·g^{-1}(r > 0.995) and the detection limit was

2018 年 3 月 16 日收稿(Received: March 16,2018).
* 国家自然科学基金(21577067, 21737003)和教育部 111 创新引智基地计划 (T2017002)资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China (21577067, 21737003) and Ministry of Education 111 Innovative Intelligence Base Plan of China(T2017002).
#杨丽萍、王强对本文具有同等贡献.YANG Liping and WANG Qiang contributed equally to this work.
* * **通讯联系人**,Tel:022-23500791, E-mail:zhuly@ nankai.edu.cn
Corresponding author, Tel:022-23500791,E-mail:zhuly@ nankai.edu.cn

hjhx.rcees.ac.cn

0.100—380 pg·g^{-1} wet weight (ww). The recovery of the nine target bisphenol compounds was in the range of 68.0%—125%, and the relative standard deviation was 1.4%—5.7%. The developed method was validated using common carp exposed to the target compounds. The method was proved to be a reliable and cost-effective alternative technique for the analysis of lowers level of bisphenol compounds in biota.

Keywords: Liquid chromatography tandem mass spectrometry, Bisphenol A (BPA), Fish, Bisphenol compounds.

双酚类化合物(bisphenol compounds,BPs)是一类与双酚 A(二酚基丙烷,bisphenol A, BPA)结构相似、包含两个苯酚基团,中间由碳或者不同的化学结构桥接在一起的化学物质,广泛应用在合成聚碳酸酯、环氧树脂、聚醚和聚酯等领域,是合成高分子材料的重要单体.其中,双酚 A(BPA)是公认的典型环境内分泌干扰物[1-3],其生产和使用在美国和加拿大等国家受到了限制或禁止.目前我国与双酚 A 相关的标准有 GB13116—1991《食品容器及包装材料用聚碳酸酯卫生标准》和 GB14942—1994《食品容器、包装材料用聚碳酸酯成型品卫生标准》,规定双酚 A 的使用量<0.05 mg·L^{-1}.因此,双酚 A 的替代品包括双酚 B(BPB)、双酚 C(BPC)、双酚 E(BPE)、双酚 F(BPF)、双酚 S(BPS)、双酚 Z(BPZ)、双酚 AF(BPAF)和双酚 AP(BPAP)(9 种双酚类物质的化学名称及结构式见表 1)的生产和使用在急剧增加,关于 BPA 及其部分替代品(BPAF、BPS 和 BPF)在环境水体[4]、饮用水及一些功能型饮料[5]和生物体中检出率及浓度的报道越来越多[6-8].Yamazaki 等[9]在日本、韩国和中国的河水和海水中发现 BPF 比 BPA 的浓度高 1 到 2 个数量级,这表明 BPF 是一些东南亚国家地表水中的一种主要双酚类污染物.Yang 等[10]在中国杭州湾水中检测到 BPAF,浓度范围为 0.9—246 ng·L^{-1}与水和沉积物中 BPA 的浓度相近.

尽管这些替代品与 BPA 理化性质相似,但 BPB、BPC、BPZ、BPAF 和 BPAP 的辛醇水分配系数要高于 BPA[11-12],可能存在生物富集和生物放大作用.同时,BPB、BPAF 和 BPZ 比 BPA 具有类似或更高的雌激素活性[13],BPS 和 BPF 的雌激素活性弱却也对内分泌造成干扰[13-14],因此需要一种同时检测生物体中多种双酚类化合物的方法.目前,已有文献报道同时检测沉积物、水中双酚类化合物的液质联用方法[10,15],但检测生物体内双酚类化合物的方法报道较少[6],大部分报道仅以 BPA 为研究对象,虽然已有报道使用气质联用仪同时检测 BPA 及其 8 种替代物的方法[8],但其检出限(LOD)较高,除 BPF 的 LOD 为 0.000597 ng·g^{-1}外,其他 8 种目标物 LOD 均高于 0.02 ng·g^{-1},不能满足分析鱼体内痕量双酚类物质的需求,不利于调查研究双酚类物质,尤其是针对 BPA 替代物在鱼体内的富集情况.

本研究旨在通过优化前处理方法和分析参数建立一种同时分析全鱼样品中 BPA 及其 8 种替代品的液质联用检测方法,并检测分析在暴露实验中这些双酚类化合物在锦鲤(Cyprinus carpio)体内的富集水平.

1　实验部分(Experimental section)

1.1　仪器与试剂

实验采用 Waters 公司的超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(UPLC-MS/MS,Xevo TQS)进行分析定量.4 种国产 500 mg 固相萃取小柱:天津博纳杰尔股份有限公司的 HLB、PEP 和 PWAP 柱,和上海安谱实验科技股份有限公司的 HC-C18(HC-C18 柱是含碳量为 17%的 C18 柱).

其他实验仪器:Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司),ZQTY-70S 恒温震荡箱(上海知楚仪器有限公司)、Centrifuge 5430R 离心机(上海斯坦福生物科技发展有限公司)、KQ-500E 超声仪(昆山市超声仪器有限公司),超纯水机 Milli-Q (型号 Milli-Q Reference A+).

试剂甲醇、乙腈均为色谱纯(赛默飞世尔科技(中国)有限公司),丙酮、冰醋酸均为分析纯(天津市康科德技有限公司),β-葡萄糖苷酸酶、醋酸铵、氨水购于上海安谱实验科技股份有限公司,实验全程使用超纯水.

标样信息:BPA(99%),BPS(99.7%),BPAF(98%)购自日本 TCI 公司.BPF(99.9%)购自德国

hjkx.rcees.ac.cn

Dr. Ehrestorfer 公司,BPA 同位素内标 $^{13}C_{12}$-BPA 购自加拿大 TRC 公司,BPAP(99%),BPB(98.4%),BPC(98%),BPE(99%)和 BPZ(98%)的标准品均购自美国 AccuStandard 公司.

1.2 标准溶液的配制

分别将 9 种双酚类目标物用甲醇配制成浓度为 100 mg·L^{-1}的标准储备液,置于 40 mL 棕色样品瓶中,用甲醇稀释分别配制 1 mg·L^{-1}的目标物混合液和 1 mg·L^{-1}的内标物混合液,置于 20 mL 棕色样品瓶中.配制好的溶液均储存于 -20 ℃避光环境中.实验中所需的工作液均采用 $V_{甲醇}:V_{水}=1:1$ 的混合溶液稀释标准储备液获得,现配现用.

1.3 样品的采集与预处理

样品采集:本研究样品来自室内暴露实验,以锦鲤为实验对象,9 种双酚类化合物的暴露浓度均为 50 nmol·L^{-1}.实验用锦鲤取自天津塘沽花鸟鱼虫市场,体长范围 11.0-13.0 cm,体重范围 24.8—38.8 g.锦鲤进行体表消毒后放置于曝气 12 h 已经除氯的自来水中(pH=7.3±0.2;水的硬度为 95.0±3.1 mg·L^{-1} $CaCO_3$;溶解氧浓度为 7.9±0.1 mg·L^{-1};温度控制在 (24±1)℃;昼夜的时间分配为 12:12 h),每两天喂食 1 次,在实验室驯化至少 1 个月.暴露实验在圆柱形玻璃鱼缸内(直径约为 20 cm,高为 30 cm)进行.暴露溶液按照下述方法配制:将一定量的 BPA、BPB、BPC、BPE、BPF、BPS、BPZ、BPAF 和 BPAP 储备液加入到玻璃鱼缸中并用曝气自来水稀释至 6 L,机械搅拌 5 min,超声 20 min,最终得到每种双酚类化合物浓度均为 50 nmol·L^{-1}的混合暴露溶液.设置空白和暴露实验两组,每组两个平行,实验容器水深 20 cm(装 6 L 暴露溶液)放入 4 条锦鲤,暴露 8 d,暴露期间不喂食,分别在第 0、2、4、8 d 取样,每次取样在每个实验容器中随机各取 1 条锦鲤.

样品前处理:取样后,首先将锦鲤剪碎并在匀浆机中匀浆,铝箔纸包好后在 -20 ℃冰箱冷冻保存,为避免双酚类化合物的背景污染,提取过程所用离心管均为聚丙烯材质.样品前处理借鉴 Liao 等[16]的方法,进行适当调整,取 1 g 室温下解冻的全鱼样品,加入 20 ng 的 $^{13}C_{12}$-BPA 内标,振摇混匀,加入 1 mL 的 1 mol·L^{-1}醋酸铵缓冲溶液(pH 5.0;7.71 g 醋酸铵溶于 93.4 mL 的超纯水、6 mL 冰醋酸以及 600 μL 的 β-葡萄糖苷酸酶),混合溶液在 37 ℃水浴锅中保持 12 h.水解后,样品中分别加入 6 mL $V_{甲醇}:V_{水}=1:1$ 的混合液,涡旋 1 min 之后超声提取 30 min,将样品放入恒温振荡箱中以 250 r·min^{-1}速度振荡 30 min,之后将混合液以 6000 r·min^{-1}的转速离心 10 min,将上清液转移至 15 mL 新聚丙烯离心管中,重复上述提取过程,将两次上清液合并用 超纯 水稀释至 500 mL 待过固相萃取柱.样品过柱之前,先将 4 种固相萃取柱依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 超纯水活化,然后以每秒 1-2 滴的流速将样品过柱,待样品全部过柱,用 10 mL 含 5% (*V*/*V*) 的甲醇水溶液淋洗以去除杂质,而后用真空泵将柱中的残余水份抽干,再用 10 mL 0.1% (*V*/*V*)的氨水甲醇溶液洗脱柱内的目标化合物,洗脱液用高纯度氮气缓慢吹干.最后,用 $V_{甲醇}:V_{水}=1:1$ 的混合液复溶至 500 μL,过膜后转移到 2 mL 进样小瓶中.

1.4 色谱条件与质谱条件

采用 UPLC-MS/MS 进行样品分析,色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH Shield RP18(2.1×150 mm,1.7 μm,Waters),柱温维持在 55 ℃,进样量为 10 μL.流动相的流速 0.3 mL·min^{-1},其中 A 为 0.1% (*V*/*V*)氨水,流动相 B 为甲醇,流动相梯度淋洗程序:0—0.01 min,20% B;0.01—2 min,20%—40% B;2—7 min,40%—80% B;7.1—8.1 min,100% B;8.1—10 min,20% B.质谱条件采用电喷雾离子源的负离子模式(ESI-),多反应监测扫描模式(MRM),离子源温度和去溶剂温度分别为 120 ℃ 和 350 ℃,毛细管电压为 2.5 kV,去溶剂气(氮气)流速 700 L·h^{-1},锥孔气(氮气)流速 150 L·h^{-1}.

2 结论与讨论(Results and discussion)

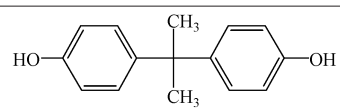
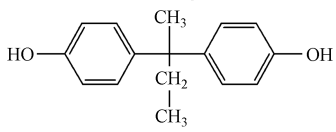
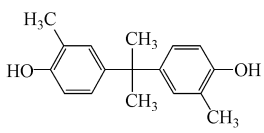
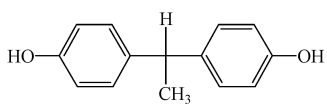
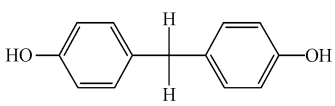
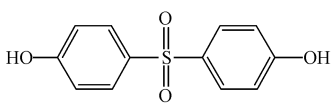
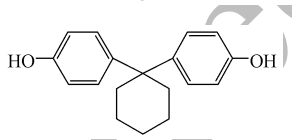
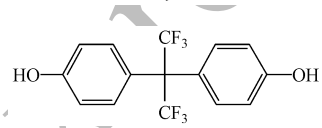
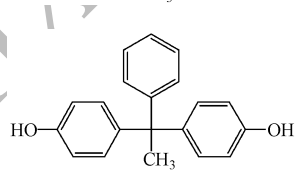
2.1 质谱方法优化

分别将质量浓度为 50 μg·L^{-1}的 9 种目标物和内标的单标溶液进行质谱 MS 扫描,在 1.5—2.5 kV 范围内调节电喷雾电压, 2—100 V 范围内调节锥孔电压,选出最适合的质谱离子化模式,得到母离子峰 $[M-H]^-$;在 2—80 V 范围调节碰撞电压,确定各个目标物的定性和定量子离子.因 BPZ 和 BPAF 分子结构稳定,仅找到一个明显的子离子.各质谱参数详见表 1.

http://www.rcees.ac.cn

表 1　9 种目标分析物质谱检测参数

Table 1　Mass spectrometric parameters for 9 target analytes

目标物 Analyte	化学名称 Compounds	结构式 Structure	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	锥孔电压 Cone Potential/V	碰撞电压 Collision Potential/V
BPA	2,2-bis (4-hydroxydiphenyl) propane		227	212 133 *	31	17 25
BPB	2,2-bis (4-hydroxyphenyl) butane		241	212 * 147	32	20 30
BPC	2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl) propane		255	240 147 *	78	16 32
BPE	Bis(4-hydroxydiphenyl) ethane		213	198 * 169	78	16 42
BPF	Bis(4-hydroxydiphenyl) methane		199	105 * 93	28	21 21
BPS	Bis(4-hydroxyphenyl) sulfone		249	156 108 *	32	22 28
BPZ	4,4′-cyclohexylidenebisphenol		267	173	32	25
BPAF	2,2-bis (4-hydroxyphenyl) hexafluoropropane		335	265 * 197	35	15 25
BPAP	4,4′-(1-phenylethylidene) bisphenol		289	274	35	15

*：定量离子. *：Quantitative ion.

2.2　样品前处理方法的优化

针对本次研究的 9 种双酚类化合物,在 Liao 等[16]分析尿液中双酚类化合物方法的基础上,选取了 4 种不同填料的 SPE 柱和 4 种不同的萃取剂.在 SPE 柱填料类型选择时,保留了常用于去除生物样品中蛋白质、脂肪等基质干扰的 HC-C18、HLB、PEP 和 PWAX.在萃取剂选择时,保留了广泛使用、对多种双酚类化合物都具有较好富集效果的纯有机萃取剂(甲醇、乙腈),同时选择了有机溶剂和水的混合萃取剂.

2.2.1　固相萃取柱的选择

取 500 mL 的超纯水,加入 100 ng 双酚类目标物混合液,按照 1.3 节的操作步骤,对水样进行固相萃取后,浓缩定容至 1 mL,经 UPLC-MS/MS 检测,比较分析 4 种 SPE 柱对 9 种双酚类化合物的回收率,实验结果如图 1 所示.4 种固相萃取柱对于 BPA 的萃取效率均较好,提取效率范围为 81.1%—104%.对于其他 8 种双酚类化合物,HC-C18 固相萃取柱呈现出最佳的萃取效率(91.3%—99.3%).这可能是由于 HC-C18 固相萃取柱的官能团的强疏水作用以及萃取柱含碳量较高,吸附能力较强的原因.其次是 HLB

hjhxxb.rcees.ac.cn

固相萃取柱,提取效率的范围为 86.9%—94.6%.其他两种固相萃取柱的萃取效率要比前两者的萃取效率低很多,其中 PEP 萃取柱的萃取效率的范围为 55.6%—77.1%,PWAX 柱的萃取效率的范围为 55.4%—75.1%.存在于 HLB 和 PEP 固相萃取柱中的亲水性基团,以及 PWAX 固相萃取柱中的弱阴离子交换基团,可能是影响其萃取效率的原因.因此最终选择 HC-C18 固相萃取柱作为本实验提取和纯化双酚类化合物的固相萃取柱.

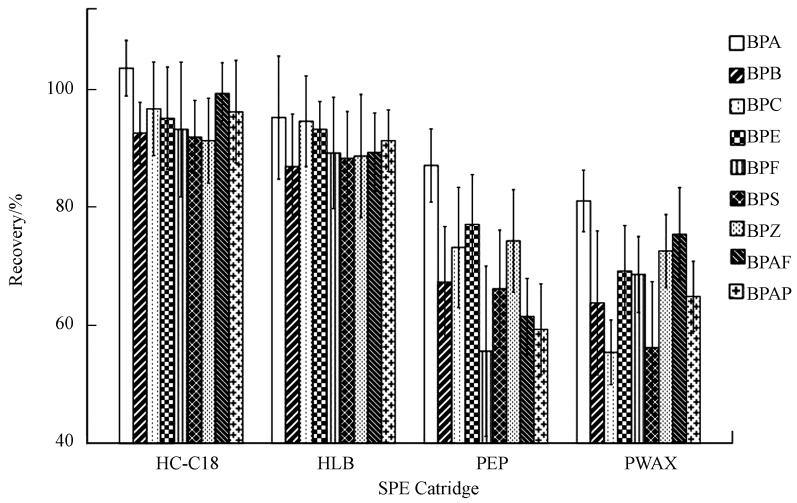


图 1 不同固相萃取柱对 9 种 BPs 的回收率对比

Fig.1 Recovery performance comparisons of various SPE catridges for nine BPs

2.2.2 萃取剂的选择

本研究选取 4 种萃取剂,其中 2 种纯有机试剂分别为甲醇和乙腈,和 2 种混合试剂,分别为体积比 1:1 的甲醇-水溶液和乙腈-水溶液.取 1 g 室温下解冻的锦鲤全鱼样品,加入 100 ng 目标物混合液,按照 1.3 节的操作步骤,对样品的提取液进行富集纯化,最终浓缩定容至 1 mL,经 UPLC-MS/MS 检测,比较分析 4 种条件对 9 种双酚类目标化合物的回收率,实验结果如图 2 所示.

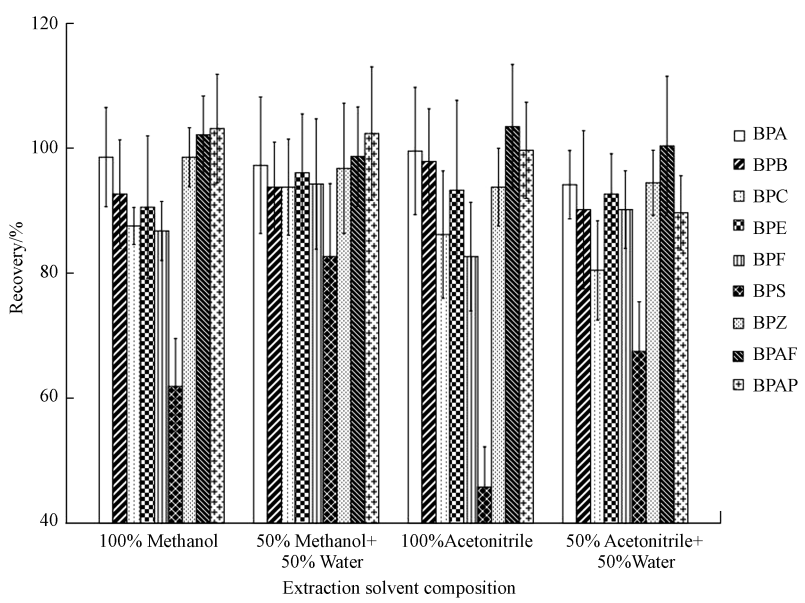


图 2 不同萃取剂对锦鲤中 9 种 BPs 的回收率对比

Fig.2 Recovery performance comparisons of various extraction solvents for nine BPs in Cyprinus carpio

除了 BPS 外,4 种提取溶剂对其他 8 种双酚类化合物的回收率均超过了 85%.使用纯有机试剂作为萃取剂提取目标物时,BPS 回收率均不超过 65%.这可能是由于 BPS 的分子结构中有一个吸电子能力

很强的砜基,使其酸性比其他 BPA 替代品更强,同时其 lgK_{ow}值为 1.65,具有较强的亲水性,仅以有机溶剂作为萃取剂不利于 BPS 从生物组织中溶出.这一点也在分离色谱柱的流出顺序中得到了验证,BPS 在 20% 有机相、80% 水相(1 min 左右)即从色谱柱流出.因此,考虑到 BPS 的特殊理化性质,本实验在有机溶剂中加入一定比例的水作为混合提取溶剂.与纯有机溶液作为萃取剂相比,加入混合溶液($V_{有机}/V_{水}$ = 1:1)作为萃取剂后,BPS 的回收率提高了 34%—47%.其中,以体积比 1:1 的甲醇水溶液作为萃取剂时,BPS 的回收率最高,约为 83%,其它 8 种双酚类化合物的回收率也均高于 95%.因此,本研究选用体积比 1:1 的甲醇水溶液作为萃取剂研究双酚类化合物在锦鲤体内的富集情况.

2.3　方法验证

2.3.1　标准曲线、线性范围、检出限和定量限

实验采用 $V_{甲醇}/V_{水}$ = 1:1 的混合液作为溶剂配制不同浓度梯度(0、0.005、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、5、10、20、50、100 ng·L^{-1})的混合标准系列溶液,并取 1 mL 各个浓度的混合标准溶液转移至对应的 2 mL 自动进样瓶,并添加 20 ng 内标 $^{13}C_{12}$-BPA,经 UPLC-MS/MS 分析.以标准样品系列浓度(C_i)为横轴,以标样中的双酚类物质峰面积(A_i)与同位素内标峰面积(A_s)之比为纵轴,绘制标准曲线,结果如表 2,线性相关系数(r)为 0.991—0.998, 相关性良好,本方法线性范围 0.500—100 ng·g^{-1},详见表 3.在定量全鱼样品双酚类物质浓度时,采用内标校正定量法(内标 $^{13}C_{12}$-BPA 的添加量为 20 ng),计算样品中 A_i/A_s,代入标准曲线得出 C_i.

在全鱼样品中添加目标化合物,按照 1.3 节的前处理方法经 UPLC-MS/MS 测定,以 3 倍信噪比(S/N)对应的添加水平作为检出限(LOD),10 倍信噪比(S/N)对应的添加作为定量限(LOQ),结果表明,本方法对 9 种目标物的检出限在 0.100 pg·g^{-1}(BPB)—380 pg·g^{-1}(BPZ)之间,定量限在0.300 pg·g^{-1}(BPB)—1.27 ng·g^{-1}(BPZ)之间(详见表 2).与之前的文献报道相比[15-16],除了 BPZ 的定量限与 Liao 等[16]的定量限相当之外,其余 8 种 BPs 的定量限均低了 3 个数量级,这表明本研究对全鱼样品的前处理及分析方法能够有效降低生物样品的基质效应.

9 种双酚类化合物的检出限差异比较大,其中 BPA 和 BPZ 的检出限最高,分别为 147 pg·g^{-1}和 380 pg·g^{-1},高于 BPE、BPAP 和 BPF 的检出限(1.50 pg·g^{-1}-6.30 pg·g^{-1})约 2 个数量级.这主要因为背景噪声造成的,质谱检测 BPA 和 BPZ 时,背景噪声形成的基线绝对强度约 10^3,而 BPE、BPAP 和 BPF 的基线绝对强度几乎为 0.而同样有 10^3背景噪声的 BPAF 和 BPC,其检出限比 BPA 和 BPZ 低 1 个数量级,这可能是由于不同取代基影响目标物分子离子化造成的.氟原子取代了 BPA 分子中两个苯环之间碳原子上的氢原子形成 BPAF,氟原子比氢原子的电负性强,使 BPAF 比 BPA 分子更容易形成带负电的母离子.而酚羟基的临位氢原子被甲基取代形成 BPC 分子,使 BPC 分子不在具有 BPA 分子的空间对称性,在质谱离子化过程中的更容易带电形成母离子.关于目标物离子化能力差异的推测,在质谱方法建立过程得到了印证,在相同目标物浓度,各目标物最佳锥孔电压条件下,BPAF 和 BPC 所产生的母离子峰强度高于 BPA 和 BPZ 约 1 个数量级.9 种目标物中,BPB 和 BPS 的检出限最低,分别为 0.100 pg·g^{-1}和 0.200 pg·g^{-1},低于 BPA 和 BPZ 的检出限 4 个数量级,这是 BPB 和 BPS 质谱检测背景噪声低和目标物分子易于离子化两方面原因共同导致的结果.

2.3.2　准确度和精密度

实验称取 1 g 匀浆后的锦鲤样品,除 BPZ 外,其他 8 种目标物的添加水平分别为 1.0、5.0、20.0 ng·g^{-1}.考虑到 BPZ 的定量限(1.27 ng·g^{-1})高于最低添加水平 1.0 ng·g^{-1},因此提高 BPZ 的最低添加量至 2.0 ng·g^{-1}.加入 20 ng $^{13}C_{12}$-BPA 内标,混匀,静置过夜.同时做空白对照实验,每个浓度平行测定 6 次,按照 1.3 节的操作步骤,对样品的提取液进行富集纯化,最终浓缩定容至 1 mL,经 UPLC-MS/MS 检测,扣除本底值后计算添加回收率和相对标准偏差(RSD),实验结果见表 3.

在低浓度段(1.0 ng·g^{-1}), 9 种目标物回收率范围为 68.0%—125%,回收率波动较大,说明低浓度段目标物受仪器影响较大,相对标准偏差范围为 1.4%—5.7%;在中浓度段 (5.0 ng·g^{-1}) 和高浓度段 (20.0 ng·g^{-1}) 各目标物回收率范围为 83.6%—108% 和 78.0%—113%,大部分均位于 90%—110% 之间,对应相对标准偏差范围为 1.0%—4.5% 和 1.4%—5.7%,说明方法平行性好、准确度高.综上所述,本研究优化后的全鱼样品预处理方法在 3 个设定的添加浓度下(尤其是中高浓度),能够完全满足实验要求.

http://ecsc.cn

表 2 目标分析物的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear range, regression equation, correlation coefficient, LOD and LOQ of analytes

目标物 Analyte	内标物 Internal standard	线性范围 Linear range/ ($ng \cdot g^{-1}$)	回归方程 Regression Equation	相关系数 Correlation Coefficient (r)	检出限 LOD/ ($pg \cdot g^{-1}$)	定量限 LOQ/ ($pg \cdot g^{-1}$)	检出限[a] LOD / ($pg \cdot g^{-1}$)	定量限[b] LOQ / ($pg \cdot g^{-1}$)
BPA	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.0137x+0.0636$	0.996	1.47×10^{2}	4.90×10^{2}	2.7×10^{2}	2.5×10^{2}
BPB	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.0271x+0.1876$	0.995	0.100	0.300	2.5×10^{2}	5.0×10^{2}
BPC	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.0161x+0.267$	0.991	86.0	2.87×10^{2}	—	—
BPE	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.0413x+0.0625$	0.998	6.30	21.0	—	—
BPF	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.0026x+0.0047$	0.996	1.50	5.00	8.6×10^{2}	1.0×10^{3}
BPS	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.0131x+0.1183$	0.996	0.200	0.600	70	2.5×10^{2}
BPZ	$^{13}C_{12}$-BPA	1.00—100	$y=0.0100x+0.0026$	0.993	3.80×10^{2}	1.27×10^{3}	—	1.0×10^{3}
BPAF	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.2153x+0.0034$	0.998	18.6	56.0	30	2.5×10^{2}
BPAP	$^{13}C_{12}$-BPA	0.500—100	$y=0.006x+0.0061$	0.996	4.30	13.0	—	2.5×10^{2}

注：[a] 数据来源于参考文献 15 活性污泥样品检测限.[a] The data were derived from LOD of activated sludge samples in reference 15.

[b] 数据来源于参考文献 16 沉积物样品定量限. [b] The data were derived from LOQ of sediment samples in reference 16.

表 3 分析方法的回收率和相对标准偏差

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of the developed analytical method

目标物 Analyte	添加水平 Spiked level/ ($ng \cdot g^{-1}$)	检测值 Detected result/ ($ng \cdot g^{-1}$)	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 RSD/% (n=6)
BPA	1.0	1.1	108	1.4
	5.0	5.2	104	1.4
	20.0	20.9	105	3.2
BPB	1.0	1.0	98.0	2.1
	5.0	4.9	97.4	1.1
	20.0	18.3	91.5	2.5
BPC	1.0	1.1	111	4.2
	5.0	5.2	104	3.4
	20.0	21.5	108	5.3
BPE	1.0	1.1	108	3.5
	5.0	5.3	106	4.5
	20.0	19.7	98.5	3.4
BPF	1.0	0.8	78.0	1.4
	5.0	4.6	91.8	2.2
	20.0	18.6	93.0	1.4
BPS	1.0	0.7	68.0	3.5
	5.0	4.2	83.6	1.7
	20.0	15.6	78.0	2.8
BPZ	2.0 *	1.7	87.0	5.0
	5.0	5.1	101	2.8
	20.0	21.8	109	5.7
BPAF	1.0	1.3	125	5.0
	5.0	5.4	108	3.4
	20.0	22.5	113	2.5
BPAP	1.0	1.1	111	5.7
	5.0	4.8	96.6	1.0
	20.0	21.6	108	2.1

注：* 由于 BPZ 定量限相对较高，因此提高加标浓度.Because the BPZ limit was relatively high, the added standard concentration was increased.

2.4 鱼样中双酚类物质测定

按照 1.3 节的样品采集和前处理方法对 9 种双酚类目标物进行测定(图 3 和图 4).图 3 为标准样

hjhx.rcees.ac.cn

品和室内暴露实验鱼体样品中 9 种双酚类目标物的色谱图,从图中右侧鱼体样品的色谱图可以看出,本研究建立的固相萃取与超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用方法能有效去除基质效应对于目标物分析的干扰.从图 4 中可以看出 9 种双酚类化合物都在短时间内在锦鲤体内产生富集,随着暴露时间延长,BPAF、BPAP、BPC 和 BPZ 在锦鲤体内的浓度明显上升,并且明显高于 BPA 在锦鲤体内的浓度,这说明 BPAF、BPAP、BPC 和 BPZ 在锦鲤体内的生物富集比 BPA 更强.前期研究[12]也表明 BPAF、BPC 和 BPZ 能够被水生生物富集,并进入淡水食物网出现生物放大现象.因此,有必要围绕 BPA 及其替代物在水生动物体中的生物富集作用及毒物代谢动力学展开深入研究.

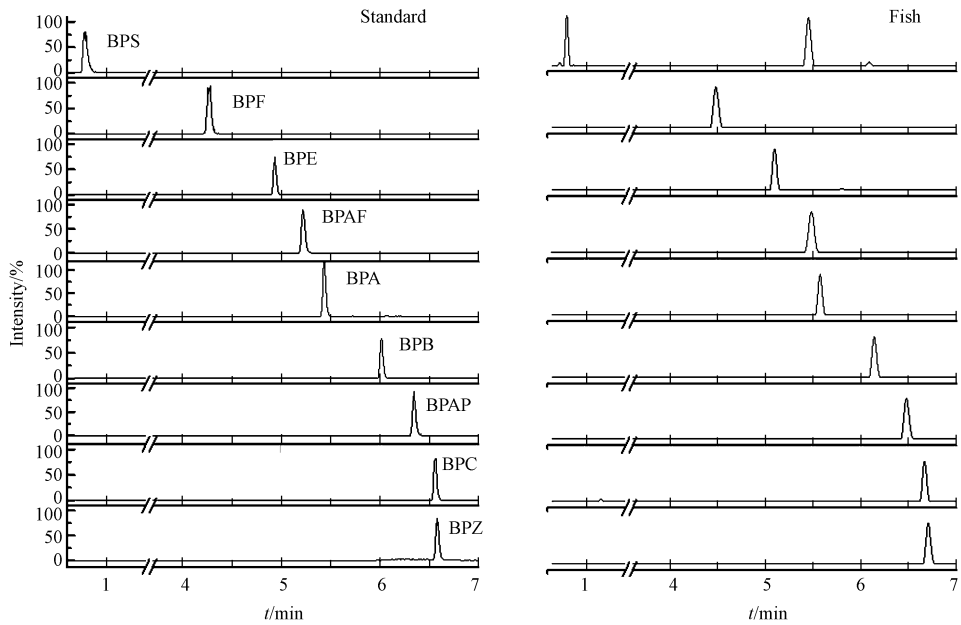


图 3　9 种 BPs 在 10 ng·g^{-1}标准品和暴露期间鱼样中的色谱图

Fig.3　Chromatograms of nine BPs from a 10 ng·g^{-1} technical standard and from fish sample during exposure

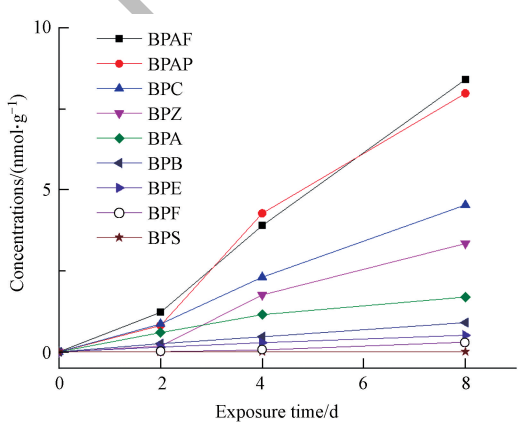


图 4　暴露期间锦鲤体内 9 种 BPs 的浓度 (nmol·g^{-1} ww)

Fig.4　Whole body concentrations of nine BPs in the Cyprinus carpio during exposure (nmol·g^{-1} ww)

3　结论(Conclusions)

本文建立了同时测定全鱼中 BPA 等 9 种双酚类化合物的分析方法,通过对固相萃取条件和 UPLC-MS/MS 的优化,并使用该方法检测了室内暴露实验中的锦鲤体内双酚类化合物的富集情况.该方法的检出限为 0.100 pg·g^{-1}(BPB)－380 pg·g^{-1}(BPZ)之间,3 种加标浓度(低、中、高)的回收率分别为 68.0%—125%、83.6%—108% 和 78.0%—113%,方法高效、稳定、准确度好、检出限低,且有效克服了基

质干扰的问题,适用于同时分析鱼体内多种双酚类化合物.室内空白和暴露实验结果表明双酚类化合物在短时间内即可以在锦鲤体内检出,说明这些双酚类化合物存在生物富集作用,应当对这类物质产生的环境生态问题以及人体暴露风险给以足够的重视.

参考文献(References)

[1] ANDERSON O S, KIM J H, PETERSON K E, et al. Novel epigenetic biomarkers mediating bisphenol a exposure and metabolic phenotypes in female mice[J]. Endocrinology, 2017, 158(1): 31-40.

[2] BRAUN J M. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2016, 13: 161-173.

[3] LI X, GUO J-Y, LI X, et al. Behavioural effect of low-dose BPA on male zebrafish: Tuning of male mating competition and female mating preference during courtship process[J]. Chemosphere, 2016, 169: 40-52.

[4] GANG X, SIHAN M, LIANG T, et al. Occurrence, fate, and risk assessment of selected endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants and receiving river of Shanghai, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(24): 25442-25450.

[5] WU X, LI Y, ZHU X, et al. Dummy molecularly imprinted magnetic nanoparticles for dispersive solid-phase extraction and determination of bisphenol A in water samples and orange juice[J]. Talanta, 2017, 162: 57-64.

[6] ANDRIANOU X D, GANGLER S, PICIU A, et al. Human exposures to bisphenol a, bisphenol f and chlorinated bisphenol a derivatives and thyroid function[J]. Plos One, 2016, 11(10): e0155237.

[7] GALLO P, PISCIOTTANO I D M, ESPOSITO F, et al. Determination of BPA, BPB, BPF, BADGE and BFDGE in canned energy drinks by molecularly imprinted polymer cleaning up and UPLC with fluorescence detection[J]. Food Chemistry, 2017, 220: 406-412.

[8] CESEN M, LAMBROPOULOU D, LAIMOU-GERANIOU M, et al. Determination of bisphenols and related compounds in honey and their migration from selected food contact materials[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(46): 8866-8875.

[9] ERIKO Y, NOBUYOSHI Y, SACHI T, et al. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India[J]. Ecotoxicology And Environmental Safety, 2015, 122: 565-572.

[10] YANG J, WANG X, ZHANG D, et al. Simultaneous determination of endocrine disrupting compounds bisphenol F and bisphenol AF using carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes modified electrode[J]. Talanta, 2014, 130: 207-212.

[11] JIN H and ZHU L. Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China[J]. Water Research, 2016, 103: 343-351.

[12] WANG Q, CHEN M, SHAN G, et al. Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China[J]. The Science of the total environment, 2017, 598: 814-820.

[13] KITAMURA S, SUZUKI T, SANOH S, et al. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds[J]. Toxicological Sciences, 2005, 84(2): 249-259.

[14] JI K, HONG S, KHO Y, et al. Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(15): 8793-8800.

[15] YANG Y, LU L, ZHANG J, et al. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal Of Chromatography A, 2014, 1328: 26-34.

[16] LIAO C, LIU F, MOON H-B, et al. Bisphenol Analogues in Sediments from Industrialized Areas in the United States, Japan, and Korea: Spatial and Temporal Distributions[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(21): 11558-11565.

hjhx.rcees.ac.cn