

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法同时测定 鱼肉样品中19种氯酚类化合物

张书芬¹ 徐晓蓉¹ 穆应花^{1,2} 张爱芝¹ 邢家漂^{*1} 沈坚¹
毛玲燕¹ 吴希^{1,2} 刘宇^{1,2}

¹(宁波市产品食品质量检验研究院(宁波市纤维检验所), 宁波 315048)

²(宁波大学食品与药学学院, 宁波 315211)

摘 要 建立了超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)方法用于检测鱼肉中 19 种氯酚类化合物(Chlorophenols, CPs)。采用 QuEChERS 方法进行前处理。样品经 10 mL 乙酸乙酯结合均质与超声辅助萃取后,取有机相并加入 500 mg C₁₈ 和 100 mg MgSO₄ 振荡 20 min, 超声 5 min 进行净化,取上清液氮吹至近干,用 1 mL 乙腈-水(1:1, V/V)溶液复溶后过膜,采用 UPLC-Q-TOF-MS 方法检测。采用 BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)进行分离,以乙腈-1 mmol/L 甲酸铵为流动相进行梯度洗脱,运行时间为 18 min。在大气压力化学电离源(Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)、负离子全扫描模式下采集 19 种 CPs 的质谱信息。根据标准品的色谱保留时间、母离子精确质量数及丰度比,在 UNIFI 软件中构建了 19 种 CPs 的筛查数据库。结果表明,19 种 CPs 在 10~1500 μg/L 浓度范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.991$),检出限为 5~10 μg/kg,定量限为 16~30 μg/kg。19 种 CPs 在鱼肉基质中的低、中、高 3 个加标水平下的回收率为 65.7%~98.2%,日内精密密度为 4.3%~9.5%($n = 6$),日间精密密度为 5.1%~9.3%($n = 9$)。本方法简化了样品前处理步骤,不需要衍生化即可实现 19 种 CPs 的完全分离,大大提高了检测效率,并且操作简单、分辨率高、重现性好,可用于水产品中多种 CPs 类污染物的同时筛查和定量分析,为水产品的安全监管提供了有效的技术手段。

关键词 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱; QuEChERS; 鱼肉; 氯酚类化合物; 高通量检测

氯酚类化合物(Chlorophenols, CPs)被广泛用作杀虫剂、有机溶剂和药物等^[1]。常见的 CPs 有 19 种,均由氯原子取代苯环上的部分氢原子形成,根据取代的氯原子数可将 CPs 划分为一氯酚、二氯酚、三氯酚、四氯酚和五氯酚^[2]。CPs 普遍存在于炼油、炼焦、煤气和纸浆等工业废水和生活污水中,是一类稳定性极强和难降解的化合物,可在环境中长久留存,并且通过食物链能够在生物体内富集和累积^[3]。人体长期接触或摄入 CPs 可引起头昏、皮肤瘙痒、贫血及多种神经系统疾病,过量摄入后可导致急性中毒^[4]。因此,许多国家出台了相关法律政策限制对含氯化合物的使用。美国国家环境保护局(Environmental Protection Agency, EPA)将 2-氯苯酚、2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚和五氯酚列入 129 种环境优先污染物清单中^[5]。国际生态纺织品标签已将 19 种 CPs 全部列入禁用物质清单,并且规定 I 类产品即婴幼儿用服装中三氯苯酚总含量不得超过 0.20 mg/kg,四氯酚和五氯酚总含量均不得超过 0.05 mg/kg,一氯苯酚和二氯苯酚总量均不得超过 0.50 mg/kg^[6]。我国农业部公告第 250 号规定所有食品动物禁用五氯酚酸钠,在动物源食品中不得检出^[7]。为了进一步规范食品安全监督抽检工作,《国家食品安全监督抽检实施细则(2022 年版)》明确规定了畜禽肉及其副产品需检测五氯酚酸钠项目^[8]。欧盟(European Union, EU)规定(2021/277),在含有五氯酚及其盐和酯类的物质、混合物或物品中的限值不得超过

2022-09-05 收稿; 2022-12-28 接受

宁波市泛 3315 创新团队项目(No. 2018B-18-C)、宁波市高新精英创新团队项目(No. 甬高科[2018]63号)、浙江省科学技术厅公益技术应用分析测试项目(No. LGC20C200003)、宁波市科学技术局自然科学基金项目(No. 202003N4196)、国家市场监督管理总局科技计划项目(No. 2020MK117)、浙江省市场监督管理局科技项目(Nos. 20210140, ZC2021B060)和宁波市科学技术局公益类科技计划项目(Nos. 2021S194, 2021S193)资助。

* E-mail: nbsjy2017@163.com

5 mg/kg^[9]。目前,检测 CPs 的方法多局限于纺织品、皮革和畜禽产品,并且规定的限量标准也多针对五氯酚及其盐类化合物,而对于水产品中 CPs 的限量尚无相关标准。

作为与畜禽肉类和蛋类并列的三大动物源性食物之一,动物类水产品约占人类动物类蛋白摄入量的 30%,与畜禽肉类相比,动物类水产品不仅具有特殊的营养健康功能,而且在生产上还具有更好的经济效益和生态效益^[10]。考虑到当前含 CPs 的工业废水在我国工业废水中占比较大,而水环境污染必然导致水产品污染,从而影响食用者的健康,因此,开展水产品中 CPs 含量的动态监测尤为重要。

目前,检测 CPs 的方法有气相色谱-质谱法(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[11-13]和液相色谱-串联质谱法(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[14-15]。周敏等^[14]采用液液萃取-LC-MS/MS 法测定了黄喉中的五氯酚酸钠,检出限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 80.3%~91.7%。钟惠英等^[16]采用液液萃取结合 GC-MS 的方法测定了水产品中 19 种 CPs 的含量,方法的平均回收率为 55.2%~125%,检出限在 0.2~0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,但该方法前处理较繁琐耗时,并且 2,5-二氯酚和 3,5-二氯酚未分离。王成云等^[17]利用固相萃取结合 GC-MS 建立了纸和纸制品中 19 种 CPs 的检测方法,该方法的平均回收率为 81.35%~93.48%,定量限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但该方法中 2,4-二氯酚和 2,5-二氯酚峰形重叠未分开。王连珠等^[18]利用超高效液相色谱-串联质谱(Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定动物源性食品中五氯酚及其钠盐,加标回收率为 73.2%~108.4%,定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。上述方法的准确性和精密度均能符合污染物分析要求,但是利用 GC-MS 检测前需要衍生化,这无疑增加了实验过程的繁琐性和操作的复杂性。相较于 GC-MS, LC-MS/MS 具有灵敏度高、选择性强和前处理简单等特点,而超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)具备超高效液相色谱与高分辨质谱联用技术的优点,不仅能够提供化合物的精确分子质量,还可配合自建的一、二级谱库实现对非法添加物的无标定性分析,并且谱库可以动态扩充^[19],从而实现化合物的快速定性和定量分析,适用于复杂化合物的快速分析,在食品污染物检测领域具有良好的发展前景^[20-21]。QuEChERS(Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe)是近年来国际上最新发展起来的一种用于农产品检测的快速样品前处理技术,已越来越多地应用于水产品污染物残留分析^[22]。相较于传统的液液萃取和沉淀蛋白法,QuEChERS 方法的净化能力更高,而与固相萃取方法相比,该方法更加灵活和便捷^[23]。

本研究基于 QuEChERS 前处理技术与 UPLC-Q-TOF-MS 方法建立了一种可以同时快速检测鱼肉中 19 种 CPs 的方法,为制定水产品中 CPs 的限量标准以及更好地控制水产品的质量安全提供了参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SYNAPT-G2-Si 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司); ME204E 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); Heraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机(宁波市诺利电子科技有限公司); KS-300EI 超声波清洗机(宁波科生设备有限公司); Vortex 3 自动漩涡混合器(德国 IKA 公司); Reeko AH-20 全自动均质器(中国睿科集团)。

乙腈、甲醇和乙酸乙酯(色谱纯,德国 Merck 公司); 甲酸铵、甲酸钠和亮氨酸脑啡肽($\geq 99.99\%$, 上海麦克林生化科技有限公司)。19 种 CPs 单标标准品: 2-氯苯酚(2-Chlorophenol, 2-CP)、4-氯苯酚(4-Chlorophenol, 4-CP)、2,4-二氯苯酚(2,4-Dichlorophenol, 2,4-DCP)、2,6-二氯苯酚(2,6-Dichlorophenol, 2,6-DCP)、3,5-二氯苯酚(3,5-Dichlorophenol, 3,5-DCP)、2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-Trichlorophenol, 2,4,6-TCP)、2,4,5-三氯苯酚(2,4,5-Trichlorophenol, 2,4,5-TCP)、3,4,5-三氯苯酚(3,4,5-Trichlorophenol, 3,4,5-TCP)、2,3,5,6-四氯苯酚(2,3,5,6-Tetrachlorophenol, 2,3,5,6-TeCP)、2,3,4,6-四氯苯酚(2,3,4,6-Tetrachlorophenol, 2,3,4,6-TeCP)、2,3,4,5-四氯苯酚(2,3,4,5-Tetrachlorophenol, 2,3,4,5-TeCP)、五氯酚(Pentachlorophenol, PCP), 购于上海安谱瑾世标准技术服务有限公司; 3-氯苯酚(3-Chlorophenol, 3-CP)、2,3-二氯苯酚(2,3-Dichlorophenol, 2,3-DCP)、2,5-二氯苯酚(2,5-Dichlorophenol, 2,5-DCP)、3,4-二氯苯酚(3,4-Dichlorophenol, 3,4-DCP)、2,3,4-三氯苯酚(2,3,4-Trichlorophenol, 2,3,4-TCP)、2,3,5-三氯苯酚

(2,3,5-Trichlorophenol, 2,3,5-TCP)和2,3,6-三氯苯酚(2,3,6-Trichlorophenol, 2,3,6-TCP),购于北京振翔科技有限公司,纯度均大于99.7%。19种CPs混合标准品(1000 $\mu\text{g/mL}$)购于上海安谱实验科技股份有限公司。实验用鱼类(带鱼、鲤鱼、鲫鱼、黑鱼、草鱼和马鲛鱼(重量: $(1000 \pm 5)\text{g}$))购于宁波市本地市场。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

19种CPs单标标准储备液的配制 准确称取19种CPs单标标准品10.0 mg(精确至0.0001 g),用甲醇溶解并定容至10 mL,配制成1 mg/mL的单标标准储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

19种CPs混合标准储备液的配制 准确量取100 μL 混合标准溶液(1000 $\mu\text{g/mL}$)于10 mL容量瓶中,用甲醇定容,配制成10 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

19种CPs混合标准溶液系列的配制 吸取10 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准储备液100 μL 于1 mL进样瓶中,用甲醇定容,配制成1000 $\mu\text{g/L}$ 的中间液,依次取1000 $\mu\text{g/L}$ 中间液10、20、50、100和200 μL 于5个2 mL的进样瓶中,取10 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准储备液40、50、100和150 μL 于4个2 mL的进样瓶中,分别用甲醇定容至1 mL,密封、摇匀。得到的19种CPs混合标准系列浓度依次为10、20、50、100、200、400、500、1000和1500 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2.2 样品前处理

新鲜的鱼类样品经过去头、鳞、骨和内脏处理,搅碎待用。

提取 准确称取5.00 g鱼肉样本于50 mL离心管中,加入10 mL乙酸乙酯,均质,超声15 min,再以4500 r/min离心5 min,收集全部有机相。

净化 将所收集的有机相转移至装有500 mg C_{18} 和100 mg MgSO_4 的离心管中,涡旋振荡20 min,超声5 min,再以9500 r/min离心10 min,收集全部上清液,氮吹至近干后,以11 mL乙腈-水(1:1, V/V)溶液复溶,过0.22 μm 有机滤膜后,用UPLC-Q-TOF-MS进行检测。

空白鱼肉样品的制备 利用本方法对实际鱼肉样品进行检测,同时对每种鱼类制备质控样,即一份加入标准品,另一份不加入标准品,每份检测样进行3个平行测定,然后在保证加标回收率达标的情况下确定空白鱼肉样种类,最后将该份鱼肉样品按照上述制样方式制备空白鱼肉样品,待用。

1.2.3 仪器分析条件

色谱条件 色谱柱: ACQUITY-UPLC-BEH- C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.4 mL/min; 流动相A为1 mmol/L甲酸铵溶液, B为乙腈。梯度洗脱: 0~10 min, 20%~50% B; 10~11 min, 50%~95% B; 11~15 min, 95% B; 15~16 min, 95%~20% B; 16~18 min, 20% B。进样量: 3 μL 。

质谱条件 扫描模式: 大气压化学电离源负离子模式(APCI⁻); 毛细管电压5 kV; 锥孔电压20 V; 离子源温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$; 离子源电压80 V; 脱溶剂气温度 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流量900 L/h; 锥孔气流量50 L/h; 连续扫描,记录范围50~600。校正液为200 $\mu\text{g/mL}$ 亮氨酸脑啡肽(Leucine Enkephalin, LE) ($[M-H]^{-} = 554.2615$), 0.5 mmol/L甲酸钠。

1.2.4 19种CPs筛查谱库的建立

根据Krauss等^[24]的研究使用标准物质建立质谱数据库。配制19种CPs标准溶液(300 ng/mL), 进行UPLC-Q-TOF-MS测定。在APCI⁻模式下,采用MS Scan采集模式扫描分析,通过一级全扫确定待测物母离子的精确质量数和保留时间。采用MS^E及MSMS采集模式,通过改变能量对酚类物质特征碎片进行信息采集,发现CPs的特征碎片较少,考虑到CPs均含有氯,因而最终采用一级扫描进行定量定性,将其同位素作为主要定性依据^[25]。通过汇总各化合物的保留时间和一级母离子的精确质量数,结合各化合物的名称、分子式和结构式的mol文件等基本信息,将各化合物的质谱数据导入UNIFI软件^[26]构建19种CPs的筛查谱库。19种CPs的基本信息、母离子信息及质量偏差见电子版文后支持信息表S1。同时,在UNIFI软件中设置匹配参数,建立定性和定量分析方法。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

考察了不同流动相体系对 19 种 CPs 的峰形及灵敏度的影响。分别考察了甲醇-水、乙腈-水及添加不同浓度的氨水(0.001%、0.05%、0.1%)和甲酸铵(0.5、1、2、5 mmol/L)的流动相体系对目标物的洗脱效果。结果表明,采用乙腈-水流动相体系,同时向水相中加入甲酸铵时,19 种 CPs 的峰形和分离效果均优于其它流动相体系,即峰形更对称、保留时间更稳定。进一步对甲酸铵的添加量进行考察,结果表明,随着甲酸铵浓度降低,19 种 CPs 所呈现的峰形出现了不同程度的基线漂移,但灵敏度会随着甲酸铵添加量减少而提高,在甲酸铵浓度为 1 mmol/L 时,19 种 CPs 的峰形对称、分离度较好、灵敏度较高。因此,本研究最终选用 1 mmol/L 甲酸铵-乙腈体系作为流动相进行梯度洗脱。

2.1.2 色谱柱的优化

色谱分离优化需要考虑的因素主要有共流出物分离效果和保留时间。为获得最佳分离效果和最短的分离时间,同时根据 19 种 CPs 的结构特点,采用混合标准溶液,比较了同一规格(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)的常见色谱柱(ACQUITY-UPLC-BEH-C₁₈、ACQUITY-UPLC-BEH-C₈ 和 ACQUITY-UPLC-BEH-Phenyl)对 19 种 CPs 的分离效果。结果表明,19 种 CPs 在 C₁₈ 色谱柱中分离效果更好,峰形也更对称;在 Phenyl 和 C₈ 色谱柱中,6 种二氯酚和三氯酚均未得到完全分离,并且各个酚类的保留时间也总体后移,增加了检测时间。综合考虑色谱柱保留特征和分离效果等因素,本研究选用 100 mm 的 C₁₈ 色谱柱。

2.2 质谱条件的优化

由 CPs 的结构式及文献可知,CPs 适合采用负离子采集模式^[6]。考察了 19 种 CPs 在 SYNAPT G2-Si UPLC-Q-TOF-MS 下采用电喷雾(Electrospray ionization mass spectrometry, ESI)和大气压化学电离源(APCI)负离子模式下的离子特征,结果表明,在 ESI 电离模式下,4-CP、3-CP、3,4-DCP、3,5-DCP、2,4,5-TCP、2,3,5,6-TeCP、2,3,4,6-TeCP、2,3,4,5-TeCP 和 PCP 的灵敏度较高,响应较好,但其余 10 种 CPs 的响应极低。在 APCI 电离模式下,2,3,5,6-TeCP、2,3,4,6-TeCP、2,3,4,5-TeCP 和 PCP 等的灵敏度略有降低,但 19 种 CPs 的响应强度基本在同一水平,因而最终选择以 APCI 电离模式进行采集。优化后的 19 种 CPs 的总离子流色谱图见图 1。

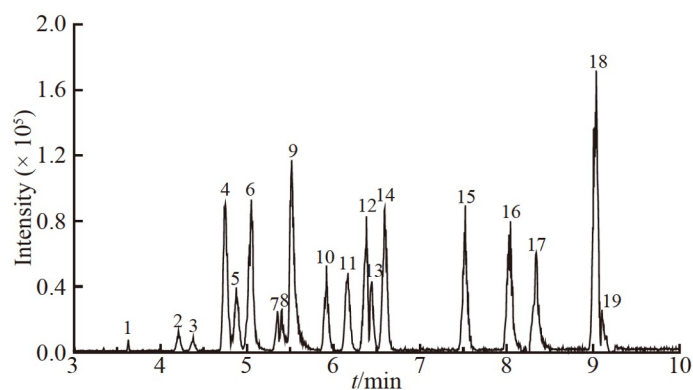


图1 19 种氯酚(CPs)的总离子流色谱图

CP, 一氯苯酚(Chlorophenol); DCP, 二氯苯酚(Dichlorophenol); TCP, 三氯苯酚(Trichlorophenol); TeCP, 四氯苯酚(Tetrachlorophenol); PCP, 五氯酚(Pentachlorophenol)

Fig.1 Total ion chromatogram of 19 kinds of chlorophenols (CPs)

1, 2-CP; 2, 4-CP; 3, 3-CP; 4, 2, 3, 5, 6-TeCP; 5, 2, 6-DCP; 6, 2, 3, 6-TCP; 7, 3, 4, 5-TCP; 8, 2, 3, 4, 6-TeCP; 9, PCP; 10, 2, 3-DCP; 11, 2, 5-DCP; 12, 2, 4, 6-TCP; 13, 2, 4-DCP; 14, 3, 4-DCP; 15, 3, 5-DCP; 16, 2, 3, 4-TCP; 17, 2, 3, 5-TCP; 18, 2, 4, 5-TCP; 19, 2, 3, 4, 5-TeCP

2.3 样品前处理的优化

考虑到利用 GC-MS 和 UPLC-Q-TOF-MS 检测 19 种 CPs 时,其前处理方法的主要区别在于是否衍生化,而其它处理步骤相同,因此,本研究在前期工作^[13]的基础上,仅针对加水量、提取方式及净化时间进

行了优化。考虑到乙酸乙酯作为复溶剂时适合 GC-MS 分析而不适合 UPLC-Q-TOF-MS 分析,因此样品在氮吹近干后用乙腈-水(1:1, V/V)溶剂进行复溶后测试。

2.3.1 加水量的优化

考虑到在前处理过程中若加入一定量水后,还需要添加相应的除水剂,同时为了将水相与有机提取剂更好地分层,还需加入盐析剂,这将增加前处理实验的繁琐程度,针对此情况,本研究考察了不同加水量对鱼肉中 19 种 CPs 回收率的影响(电子版文后支持信息图 S1)。在不加水的情况下,分别添加 0、2 和 5 g 无水 Na_2SO_4 作为除水剂^[27];在加水情况下,分别选取 1、3 和 5 mL 的加水量考察对目标物提取效果的影响,其中盐析剂的种类和用量分别为 3 g NaCl 和 5 g MgSO_4 。结果表明,在既不加水也不加除水剂的情况下,19 种 CPs 的回收率为 60.5%~79.3%;分别加入 2 和 5 g 除水剂时,19 种 CPs 的回收率分别为 57.9%~76.8%和 56.9%~75.3%;分别加入 1、3、5 mL 水时,19 种 CPs 的回收率分别为 51.3%~69.9%、43.6%~75.7%和 45.7%~70.8%。综上可知,在既不加水也不加除水剂时,19 种 CPs 的回收率均在 60%以上,而其它情况下有部分氯酚的回收率仅为 40%~50%,如 2,5-DCP 的回收率为 43.6%~52.2%。此外,虽然 2,3,5,6-TeCP、2,3,4,6-TeCP 和 PCP 在添加 3 mL 水、3 g NaCl 和 5 g MgSO_4 时回收率达到最高,分别为 72.7%、69.5%和 69.6%,但其它酚类的回收率相较于既不加水也不加除水剂时的回收率处于偏低或略接近的状态。综合考虑 19 种 CPs 的回收率,本研究选择在提取过程中既不加水也不加除水剂。

2.3.2 提取方式的优化

CPs 常用的提取方式主要有超声辅助萃取、索氏提取、固液振荡萃取及加速溶剂萃取等方法^[28]。其中,索氏提取的效率较高,但过程繁琐、提取时间长且实际消耗大,一般不推荐使用。加速溶剂萃取法设备昂贵,普及率低^[6]。基于方法的普及性和可操作性,同时为了保证提取试剂与样品间的充分混合,本研究考察了均质(8000 r/min, 30 s)、涡旋分散(3000 r/min, 60 s)与超声提取(40 °C, 15 min)相结合的提取方式对 19 种 CPs 提取效果的影响。如图 2 所示,采用涡旋振荡与超声水浴相结合的方式提取鱼肉中 19 种 CPs 时,2-CP 和 2,3,6-TCP 的回收率较低,分别为 38.1%和 42.2%,其余 CPs 的回收率集中在 50%~60%;采用均质结合超声提取时,19 种 CPs 的回收率均能达到 60%以上。因此,本研究最终选择均质与超声辅助萃取相结合的方式提取鱼肉中的 19 种 CPs。

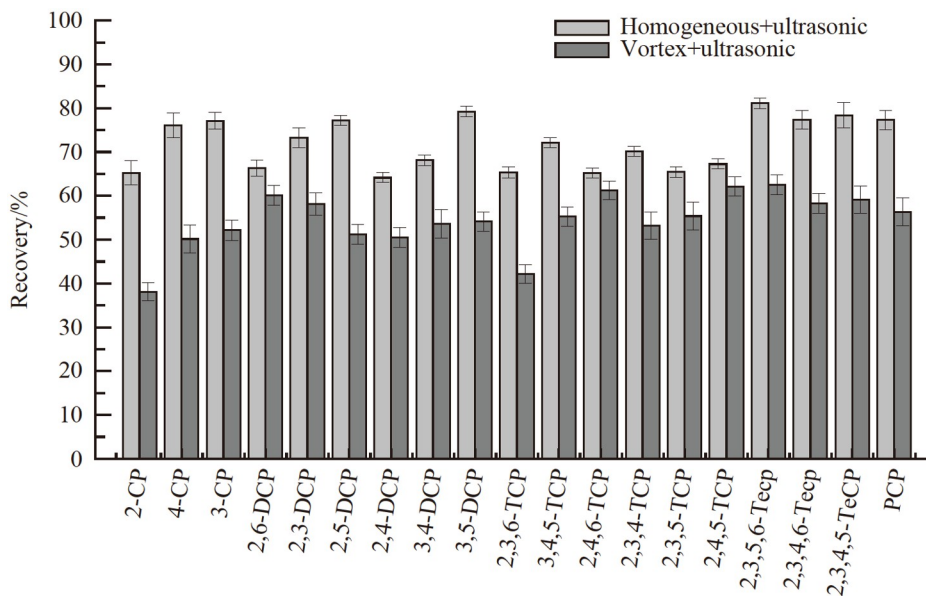


图2 不同提取方式对 19 种 CPs 回收率的影响

Fig. 2 Effects of different extraction methods on recoveries of 19 kinds of CPs

2.3.3 净化时间的优化

在本研究组的前期工作^[13]中,净化过程的振荡和超声时间分别设置为 30 和 15 min,考虑到在大批

样品检测中如果净化时间过长,将影响检测效率,因此本研究对不同振荡时间(10、20 和 30 min)进行了优化(图 3)。结果表明,样品经过 10 min 振荡后的回收率普遍偏低,为 30.4%~46.9%。随着振荡时间延长,样品中 19 种 CPs 的回收率有逐步提高的趋势,但是总体而言,振荡 20 和 30 min 样品回收率结果差异不大。因此,从节约能耗和提高检测效率的角度考虑,本方法选择振荡时间为 20 min。此外,本研究还考察了不同超声时间(0、5、10 和 15 min)下 CPs 的回收率,结果表明,不同超声时间下回收率的差别不大,但是超声与否对 19 种 CPs 的回收率影响较大(电子版文后支持信息图 S2)。因此,在不影响检测效果并考虑节约检测成本的前提下,本研究采用 5 min 的超声时间。

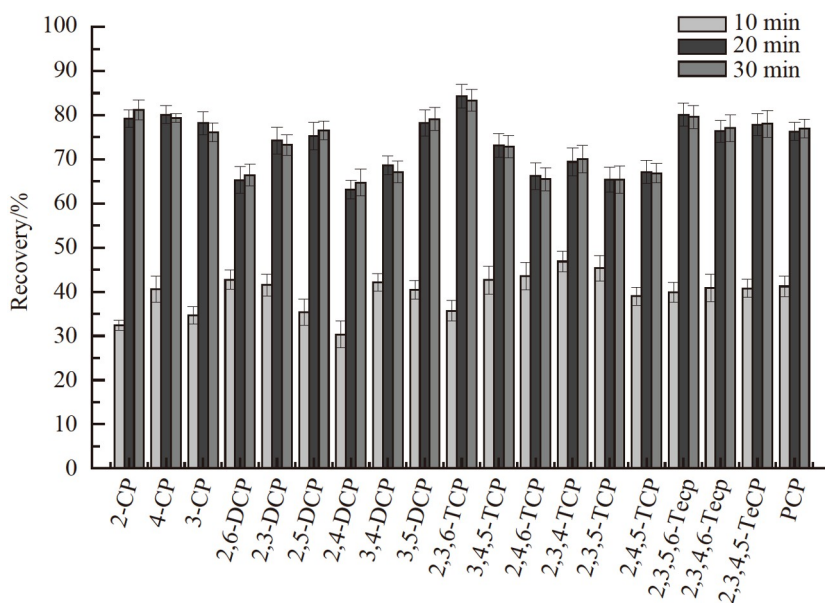


图3 不同振荡时间对 19 种 CPs 回收率的影响

Fig. 3 Effect of different oscillation time on the recoveries of 19 kinds of CPs

2.4 基质效应考察

基质效应(Matrix effect, ME)是由目标化合物与基质中的共提干扰物竞争电离所产生^[29]。对于高脂肪和高蛋白复杂基质样品,其基质效应会影响酚类污染物的电离,引起信号的增强或抑制,从而影响结果的准确性^[30]。一般而言,ME=1.0 表示不存在基质效应;0.8 < ME < 1.2 为弱基质效应,一般可以忽略^[31];0.5 < ME < 0.8 或 1.2 < ME < 1.5 为中等基质效应;ME < 0.5 或 ME > 1.5 为强基质效应。采用空白基质提取液和纯溶剂配制相同浓度的基质匹配校准液和标准溶液,用阴性样品平均峰面积的响应值(B)与纯溶剂平均峰面积的响应值(A)之比表征基质效应(公式 1):

$$ME = \frac{B}{A} \quad (1)$$

本研究采用空白鱼肉样品进行基质效应评价,结果表明,19 种 CPs 的 MEs 为 0.64~2.42,除了 3 种一氯酚和 2,4,6-TCP、2,3,4-TCP 存在基质增强效应之外,其余酚类均存在中等基质抑制效应,本研究采用空白基质提取液配制基质匹配标准曲线来消除基质效应。此外,对不同种类鱼所对应的基质效应进行了考察,发现同一种酚类化合物在不同鱼类之间的基质效应相差不大,结果见电子版文后支持信息表 S2。因此,在实际检测过程中,面对品种较多的鱼类样品,可以随机选取一种鱼类样品来配制基质匹配标准曲线,以提高检测效率^[32]。

2.5 方法的线性范围、检出限和定量限

利用空白鱼肉基质配制 9 个梯度水平(10、20、50、100、200、400、500、1000 和 1500 $\mu\text{g/L}$)的基质匹配混合标准工作液,以浓度(x , $\mu\text{g/L}$)为横坐标,以每个目标分析物的峰面积(y)为纵坐标绘制工作曲线,各目标化合物在 10~1500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.991$),线性回归方程的相关系数为 0.991~0.999。以 3 倍信噪比(S/N)计算得到检出限(Limit of detection, LOD)为 5~10 $\mu\text{g/kg}$,以 10 倍信噪

比计算得到定量限(Limit of quantitation, LOQ)为 16~30 $\mu\text{g/kg}$ (电子版文后支持信息表 S3)。

2.6 加标回收率以及精密度

通过向空白样品基质液中添加 3 个不同浓度水平的 CPs 标准溶液,浓度以每种 CPs 的定量限的 1、2 和 10 倍确定(低: 16/30 $\mu\text{g/kg}$; 中: 32/60 $\mu\text{g/kg}$; 高: 160/300 $\mu\text{g/kg}$),按照 1.2 节进行处理后再进行测试,每个加标水平均进行日内实验(重复 6 次)和日间实验(连续 3 d, 每天重复 3 次)。结果见电子版文后支持信息表 S4,各化合物的回收率为 65.7%~98.2%,日内精密度(Laboratory relative standard deviation for repeatability, RSD_r)为 4.3%~9.5%,日间精密度(Laboratory relative standard deviation for reproducibility, RSD_{wR})为 5.1%~9.3%,结果均符合方法学要求。

2.7 与其它方法的比较

本研究组前期通过 QuEChERS-GC-MS 方法实现了对水产品中 19 种 CPs 的检测分析,但是 2,6-DCP 和 3,5-DCP 的峰未能很好地分离^[13],基于此,在优化前处理方法的基础上开发了本方法。与现有的 19 种 CPs 的检测技术相比(电子版文后支持信息表 S5),本方法比 GC-MS 检测技术的前处理步骤简单且无需衍生化,19 种 CPs 在 10 min 之内即可检测完毕,大大缩短了检测时间,而且 19 种 CPs 的峰形能够全部分开且峰形对称。同时,本方法与高永刚等^[6]建立的利用 LC-MS 同时测定纺织品中 19 种 CPs 的检测技术相比,具有更低的检出限。

2.8 实际样品测定

为了验证本方法在实际样品中的应用效果,采用本方法对采购的 6 种不同鱼类(带鱼、鲤鱼、黑鱼和草鱼等)进行检测,结果表明,在一份草鱼和一份鲤鱼样品中检出了 2,4-DCP,其含量分别为 19 和 17 $\mu\text{g/kg}$ 。其余鱼类样本中均未检出 CPs。

3 结论

本研究建立了基于 QuEChERS 前处理方法结合 UPLC-Q-TOF-MS 同时测定鱼类样品中 19 种 CPs 的方法。与目前已有的方法相比,本方法不需衍生化处理,操作简便且检测时间短,提高了样品分析效率,可实现 19 种 CPs 的有效分离,其准确度和精密度均满足方法学要求,为水产品中酚类化合物的检测提供了方法参考。后续将继续开发其它酚类污染物在水产品中的高通量检测技术,以期将来建立筛查和鉴定水产品中酚类污染物的谱库丰富相关数据,同时也为食品安全提供强有力的技术支撑。

References

- [1] LIU J, WANG J, GUO Y, YANG X, WU Q, WANG Z. *J. Chromatogr. A*, 2022, 1673: 463077.
- [2] CELAYA L S, MOLINA A C, GONZALEZ M A, VILLA W C, SILVA L R, VITURRO C I. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.*, 2022, 21(3): 343-351.
- [3] GARBA Z N, ZHOU W, LAWAN I, XIAO W, ZHANG M, WANG L, CHEN L, YUAN Z. *J. Environ. Manage.*, 2019, 241: 59-75.
- [4] XING J, LI Y, ZHENG R, SHEN H, XU X, MAO L, LUO X, SHEN J, YAO W. *Food Addit. Contam. : Part A*, 2022, 39(6): 1136-1148.
- [5] EPA 600/r-07/080. Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I, II and III Guidance Document. United States Environmental Protection Agency.
- [6] GAO Yong-Gang, NIU Zeng-Yuan, ZHANG Yan-Yan, YE Xi-Wen, LUO Xin, ZHANG Jia-Yun. *J. Instrum. Anal.*, 2019, 38(1): 75-79.
高永刚, 牛增元, 张艳艳, 叶曦雯, 罗忻, 张嘉蕴. 分析测试学报, 2019, 38(1): 75-79.
- [7] Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Announcement No. 250 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. (2020-04-14) [2022-08-09]. http://www.moa.gov.cn/nybgb/2020/202002/202004/t20200414_6341556.htm.
农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第250号. (2020-04-14) [2022-08-09]. http://www.moa.gov.cn/nybgb/2020/202002/202004/t20200414_6341556.htm.
- [8] State Administration for Market Regulation. Detailed Rules for the Implementation of National Food Safety Supervision and Sampling Inspection (2022 Edition) (2022-02-22) [2022-08-09]. <https://www.doc88.com/p-00029752715187.html>.
国家市场监督管理总局. 国家食品安全监督抽检实施细则(2022年版). (2022-02-22) [2022-08-09]. <https://www.doc88.com/p-00029752715187.html>.

- [9] EU. Statement on Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) (2021-3-15) [2022-08-09]. <http://www.jiebiaotest.com/a/news/894.html>.
- [10] ZHAO Ming-Jun, SUN Hui-Wu, WANG Yu-Guang, LIU Long-Teng, ZHU Xue-Mei, LIU Zi-Fei, WANG Xiao-Hu. *Chin. Fish. Econ.*, 2019, 37(6): 1-14.
赵明军, 孙慧武, 王宇光, 刘龙腾, 朱雪梅, 刘子飞, 王小虎. *中国渔业经济*, 2019, 37(6): 1-14.
- [11] LI Gen-Rong, YU Wen-Qin, XIAO Zhao-Jing, TONG Lan-Yan. *Food Indust.*, 2021, 42(6): 425-428.
李根容, 余文琴, 肖昭竞, 童兰艳. *食品工业*, 2021, 42(6): 425-428.
- [12] CAMPILLO N, VINAS P, CACHO J I, PENALVER R, HERNANDEZ-CORDOBA M. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217(47): 7323-7330.
- [13] MU Ying-Hua, XING Jia-Li, SHEN Jian, YING Lu, MAO Ling-Yan, XU Xiao-Rong, LOU Yong-Jiang, WU Xi. *Chin. J. Chromatogr.*, 2022, 40(5): 477-487.
穆应花, 邢家漂, 沈坚, 应璐, 毛玲燕, 徐晓蓉, 姜永江, 吴希. *色谱*, 2022, 40(5): 477-487.
- [14] ZHOU Min, ZHU Meng-Meng, ZHOU Ting-Ting, WANG Zhen, YU Peng-Fei. *Food Indust.*, 2019, 40(3): 280-284.
周敏, 朱萌萌, 周婷婷, 王珍, 余鹏飞. *食品工业*, 2019, 40(3): 280-284.
- [15] HUANG Jian-Xin, CHEN Jing-Hao, LU Sheng-Yong, YAN Jian-Hua, NI Ming-Jiang. *Chin. J. Environ. Eng.*, 2017, 11(2): 1293-1299.
黄建新, 陈经浩, 陆胜勇, 严建华, 倪明江. *环境工程学报*, 2017, 11(2): 1293-1299.
- [16] ZHONG Hui-Ying, LIU Hai, CHAI Li-Yue, ZHENG Dan, YANG Jia-Feng, QIU Ji-Shi, QIU Jie-Qiong. *J. Anal. Sci.*, 2016, 32(3): 371-376.
钟惠英, 柳海, 柴丽月, 郑丹, 杨家锋, 邱纪时, 邱洁琼. *分析科学学报*, 2016, 32(3): 371-376.
- [17] WANG Cheng-Yun, CHU Nai-Qing, LIN Jun-Feng, TANG Li-Chun, ZHONG Sheng-Yang, LI Yan-Hua, XIE Tang-Tang. *China Pulp Pap. Ind.*, 2016, 37(10): 33-37.
王成云, 褚乃清, 林君峰, 唐莉纯, 钟声扬, 李燕华, 谢堂堂. *中华纸业*, 2016, 37(10): 33-37.
- [18] WANG Lian-Zhu, FANG En-Hua, WANG Cai-Juan, CHEN Yong, LIN Zi-Xu, XU Dun-Ming. *Chin. J. Chromatogr.*, 2018, 36(6): 518-522.
王连珠, 方恩华, 王彩娟, 陈泳, 林子旭, 徐敦明. *色谱*, 2018, 36(6): 518-522.
- [19] FENG Bin, ZHANG Gao-Qin, ZHAO Li-Hong, WANG Wei, WU Kai-Xuan, XIN Guo-Bin, LIU Hua, XIAO Kun. *Chin. J. Forensic Med.*, 2022, 37(2): 172-177.
冯斌, 张高勤, 赵丽红, 王伟, 吴凯旋, 辛国斌, 刘华, 肖昆. *中国法医学杂志*, 2022, 37(2): 172-177.
- [20] HUANG Fang, WANG Yu-Qin, HUANG Xiao-Lan, LUO Hui-Tai, LIN Xiao-Shan, ZHU Zhi-Xin, DENG Xin, CHEN Chao, WU Hui-Qin. *Flavour Fragrance Cosmet.*, 2019, (3): 33-39.
黄芳, 王玉芹, 黄晓兰, 罗辉泰, 林晓珊, 朱志鑫, 邓欣, 陈超, 吴惠勤. *香料香精化妆品*, 2019, (3): 33-39.
- [21] CAO Gui-Yun, TIAN Shuo, ZHUANG Xue-Song, GENG Shao-Xuan, WANG Ting, NING Bo, LUO Yi, MENG Zhao-Qing. *Chin. J. Pharm. Anal.*, 2021, 41(3): 402-409.
曹桂云, 田硕, 庄雪松, 耿绍轩, 王亭, 宁波, 罗毅, 孟兆青. *药物分析杂志*, 2021, 41(3): 402-409.
- [22] LI W, ZHANG Z, ZHANG R, JIAO H, SUN A, SHI X, CHEN J. *J. Hazard. Mater.*, 2020, 384: 121241.
- [23] MANDAL S, POI R, BHATTACHARYYA S, ANSARY I, ROY S D, HAZRA D K, KARMAKAR R. *J. AOAC Int.*, 2020, 103(1): 62-67.
- [24] KRAUSS M, SINGER H, HOLLENDER J. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397(3): 943-951.
- [25] QIU Hui-Zhen, HUANG Feng-Mei, HE Xiao-Jin. *Modern Food*, 2021, (22): 190-194.
邱慧珍, 黄凤妹, 何孝金. *现代食品*, 2021, (22): 190-194.
- [26] WU Fu-Lin, WANG Cui-Zhu, DONG Qing-Hai, WANG Han, TAN Jing, LIN Hong-Qiang, LIU Jin-Ping, LI Ping-Ya. *China Pharmacy*, 2019, 30(17): 2336-2342.
吴福林, 王翠竹, 董庆海, 王涵, 谭静, 林红强, 刘金平, 李平亚. *中国药房*, 2019, 30(17): 2336-2342.
- [27] ZHANG Xian-Chen, LI Rong, ZHANG Peng-Jie, WU Xia, HUA Hong-Bo, YANG Lu-Qi, LU Jun-Wen, RONG Yu-Tang. *Chin. J. Chromatogr.*, 2018, 36(2): 114-124.
张宪臣, 李蓉, 张朋杰, 吴霞, 华洪波, 杨璐齐, 卢俊文, 容裕棠. *色谱*, 2018, 36(2): 114-124.
- [28] DE MORAIS P, STOICHEV T, BASTO M C P, VASCONCELOS M T S D. *Talanta*, 2012, 89: 1-11.
- [29] PIZZUTTI I R, VELA G M E, DE KOK A, SCHOLTEN J M, DIAS J V, CARDOSO C D, CONCENÇO G, VIVIAN R. *Food Chem.*, 2016, 209: 248-255.
- [30] ABAFE O A, GATYENI P, MATIKA L. *Food Addit. Contam. : Part A*, 2020, 37(3): 438-450.
- [31] ZHANG Chong-Wei, WU Zhi-Ming, LI Hua-Cen, ZHAO Feng-Bing, CHEN Qiang, SONG Zhi-Chao. *J. Instrum. Anal.*, 2020, 39(2): 174-181.
张崇威, 吴志明, 李华岑, 赵逢冰, 陈蔷, 宋志超. *分析测试学报*, 2020, 39(2): 174-181.
- [32] ZHANG Hong-Yan, QIU Guo-Yu, WU Fu-Xiang, XU Xiao-Hui, LI Chen-Xi, PAN Xiu-Li, WANG Xiao-Qiao. *Sci. Technol. Food Ind.*, 2020, 41(10): 259-264.
张虹艳, 邱国玉, 吴福祥, 许晓辉, 李晨曦, 潘秀丽, 王小乔. *食品工业科技*, 2020, 41(10): 259-264.

Simultaneous Determination of 19 Kinds of Chlorophenols in Fish Samples by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry

ZHANG Shu-Fen¹, XU Xiao-Rong¹, MU Ying-Hua^{1,2}, ZHANG Ai-Zhi¹, XING Jia-Li^{*1},
SHEN Jian¹, MAO Ling-Yan¹, WU Xi^{1,2}, LIU Yu^{1,2}

¹(Ningbo Academy of Product and Food Quality Inspection (Ningbo Fibre Inspection Institute),

Ningbo 315048, China)

²(College of Food and Pharmaceutical, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract A method for simultaneous determination of 19 kinds of chlorophenols (CPs) in fish samples by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was developed. The samples were pretreated using QuEChERS method. Exactly, the sample was ultrasonic extracted by ethyl acetate, and the supernatant was concentrated to near dry by blowing nitrogen after purification by C₁₈ and MgSO₄. Finally, the UPLC-Q-TOF-MS in the negative ion scanning mode using atmospheric pressure chemical ionization source was used for on-machine detection. ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used as the chromatographic column, and the mixture of acetonitrile-1 mmol/L ammonium formate at the flow rate of 0.4 mL/min was used as the mobile phase. The column and sample temperature were 30 and 20 °C, respectively. The acquisition mode was MS scan, and the detection spectrum library of 19 kinds of CPs was also established. The results showed that the linearity of this method was good in the range of 10–1500 μg/L ($R^2 \geq 0.991$). The limits of detection of 19 kinds of CPs were 5–10 μg/kg, the limits of quantitation were 16–30 μg/kg, and the recoveries were 65.7%–98.2% with the relative standard deviations of less than 10%. The matrix effects of 19 kinds of CPs ranged from 0.64 to 2.24. The method developed here was of great theoretical and practical significance for control and management of residual level of phenolic compounds in aquatic products.

Keywords Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry; QuEChERS; Fish; Chlorophenols; High throughput detection

(Received 2022-09-05; accepted 2022-12-28)

Supported by the Fan-3315 Innovation Team of Ningbo (No. 2018B-18-C), the Ningbo High-Tech Elite Innovation Team (No. Yonggaoke[2018] No.63), the Zhejiang Provincial Department of Science and Technology Public Welfare Technology Application Analysis and Testing Project (No. LGC20C200003), the Natural Science Foundation of Ningbo (No. 202003N4196), the Science and Technology Plan Program of State Administration for Market Regulation (No. 2020MK117), the Science and Technology Project of Zhejiang Market Supervision Administration (Nos. 20210140, ZC2021B060) and the Public Welfare Science and Technology Project of Ningbo Science and Technology Bureau (Nos. 2021S194, 2021S193).