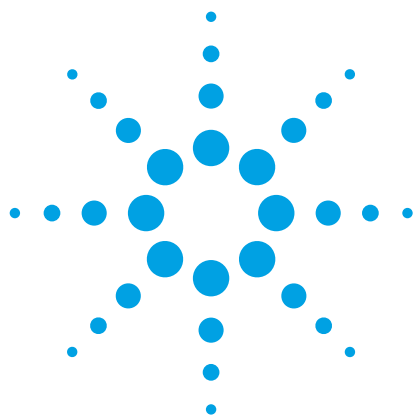




使用经优化的提取/净化方法以及安捷伦 7000 三重四极杆气质联用系统测定鱼体组织中的溴化阻燃剂 (BFR)

应用简报

食品安全

作者

Kamila Kalachova、Jana Pulkrabova、
Tomas Cajka 和 Jana Hajslova
布拉格
化学技术学院
食品分析与营养系
Technicka 3
166 28 Prague 6
Czech Republic

Chris Sandy
安捷伦科技（英国）有限公司
610 Wharfedale Road
Winnersh Triangle
Wokingham
Berkshire
RG41 5TP
UK



摘要

本应用简报对一种可用于同时定性、定量分析鱼体肌肉组织中的多溴联苯醚 (PBDE) 和不同类型的替代溴化阻燃剂 (ABFR) 的高通量、高灵敏、低成本分析方法进行开发与验证。定量步骤前的样品处理可大为简化，具体如下：在向匀化的样品中加入水后，疏水性分析物在外加的无机盐作用下转化为乙酸乙酯。然后，在硅胶微柱上清除包含分配所得的有机粗提物中的大量脂肪。最后，通过与串联质谱联用的气相色谱法 (GC/MS/MS) 以多反应监测 (MRM) 模式在 Agilent 7890 气相色谱与 Agilent 7000B 三重四极杆 GC/MS 系统上分析鱼体组织提取物。



Agilent Technologies

前言

已有证据表明，食用鱼肉尤其是富含脂肪酸的鱼肉（例如三文鱼，通常含有 ω -3 多不饱和脂肪酸，如二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA)) 对心血管系统有益，并适于作为明显性冠心病的二级预防。但相反的是，这使得膳食接触某些污染物例如溴化阻燃剂 (BFR) 的风险增加。因此，从 2004 年 8 月起欧盟 (EU) 市场禁止了销售含有高于 0.1% 五溴联苯醚 (pentaBDE) 和八溴联苯醚 (octaBDE) 技术混合物的食品，在 2008 年 7 月，该禁令又进一步延伸至含有十溴联苯醚 (decaBDE) 的电气与电子产品 [1, 2]。由于这些立法的出台，市场上推出了适合作为多溴联苯醚替代品用于商业用途的替代性 BFR。它们中的一些化合物例如 1,2-双(2,4,6-三溴苯氧基)乙烷 (BTBPE) 已经在环境中被检出 [3]。因此，需要一种简便、快速、低成本、高灵敏的分析方法，能够在短时

间内收集大量可靠的数据，以帮助控制食品污染并确保对食品和饲料快速预警系统 (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) 的灵活响应 [4]。

实验部分

标准品和溶液

在异辛烷中配制包含以下物质的校准溶液：BDE 28–203、HBB、PBT、PBEB 和 BTBPE，系列浓度为 0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 和 500 ng/mL；BDE 206、207、209 和 OBIND，系列浓度为 0.25、0.5、1、5、10、50、100、500 和 1,000 ng/mL。每个校准点以及样品提取物的异辛烷溶液均含有替代标准品 BDE 37 以及注射标准品 BDE77 和 ^{13}C -BDE 209，它们的浓度分别为 10、5 和 50 ng/mL。

表 1. 目标分析物、替代标准品 (SUR) 和注射标准品 (SS) 列表

缩写	分析物	CAS 号
BDE 28	2,4,4'-三溴联苯醚	41318-75-6
BDE 37 (SUR)	3,4,4'-三溴联苯醚	147217-81-0
BDE 47	2,2',4,4'-四溴联苯醚	5436-43-1
BDE 49	2,2',4,5'-四溴联苯醚	243982-82-3
BDE 66	2,3',4,4'-四溴联苯醚	189084-61-5
BDE 77 (SS)	3,3',4,4'-四溴联苯醚	93703-48-1
BDE 85	2,2',3,4,4'-五溴联苯醚	182346-21-0
BDE 99	2,2',4,4',5-五溴联苯醚	60348-60-9
BDE 100	2,2',4,4',6-五溴联苯醚	189084-64-8
BDE 153	2,2',4,4',5,5-六溴联苯醚	68631-49-2
BDE 154	2,2',4,4',5,6'-六溴联苯醚	207122-15-4
BDE 183	2,2',3,4,4',5',6-七溴联苯醚	207122-16-5
BDE 196	2,2',3,3',4,4',6,6'-八溴联苯醚	N/A
BDE 197	2,2',3,3',4,4',6,6'-八溴联苯醚	N/A
BDE 203	2,2',3,4,4',5,5',6-八溴联苯醚	N/A
BDE 206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-九溴联苯醚	N/A
BDE 207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-九溴联苯醚	N/A
BDE 209	十溴联苯醚	1163-19-5
^{13}C -BDE 209 (SS)	^{13}C -十溴联苯醚	N/A
BTBPE	1,2-双(2,4,6-三溴苯氧基)乙烷	37853-59-1
HBB	六溴苯	87-82-1
PBEB	五溴乙苯	85-22-3
PBT	五溴甲苯	87-83-2
OBIND	八溴三甲基苯基茚满	N/A

化学品和材料

- 己烷（德国默克 SupraSolv 级，或同等质量）
- 异辛烷（德国默克 SupraSolv 级，或同等质量）
- 乙酸乙酯（德国西格玛奥德里奇气相残留分析级，或同等质量）
- 二氯甲烷（德国默克 SupraSolv 级，或同等质量）
- 无水硫酸钠（捷克 Penta Chrudim，或同等质量）

将无水硫酸钠在 600 °C 下加热 7 h，储存在干燥器中备用。以此方式制备和储存的硫酸钠有效期为一个月。

- 硅胶 (0.063–0.200 mm)（德国默克，或同等质量）

将硅胶在 180 °C 下加热活化 5 h，然后通过添加 2% 的去离子水并振摇 3 h 而失活，再储存于干燥器中 16 h 备用。以此方式制备和储存的硅胶有效期为 14 天。

- 硫酸镁（德国西格玛奥德里奇，或同等质量）
- 氯化钠（捷克 Lach-ner，或同等质量）
- 玻璃棉（德国默克，或同等质量）
- 50 mL 聚丙烯管（法国 Merci，或同等质量）
- 230 mm 长玻璃巴氏移液管 D812（德国 Poulten and Graf GmbH，或同等质量）

仪器

- 组织研磨机，购自莱驰公司（德国 Haan）
- 带水浴的真空旋转蒸发仪 Buchi Rotavapor R-114 和 R-200（瑞士步琪旋转蒸发仪）
- 离心机 Rotina 35R（德国海蒂诗离心机）

样品前处理

将 10 g 鱼体组织匀浆（含替代标准品 BDE 37 – 10 ng 溶质）置于聚丙烯离心管中，加 5 mL 蒸馏水混匀，然后加 10 mL 乙酸乙酯剧烈振摇 1 min。随后，将 4 g 硫酸镁和 2 g 氯化钠加入混合物中。

继续振摇 1 min，离心（5 min，11000 rpm），然后从有机层取出 5 mL 等分试样。在缓和的干燥氮气流下小心蒸干溶剂。

将蒸发后的提取物用 1 mL 正己烷重新溶解，再用手工制备的硅胶微柱纯化。根据鱼体肌肉脂肪含量进行脂肪测定和硅胶微柱尺寸选择在别处有所描述 [5]。将收集的洗脱液用真空旋转蒸发仪小心蒸发，再将残余的溶剂在缓和的干燥氮气流下挥去。将残渣重新溶于 0.5 mL 异辛烷，异辛烷中含有用作注射标准品的 BDE 77 (5 ng/mL) 和 ¹³C BDE 209 (50 ng/mL)。

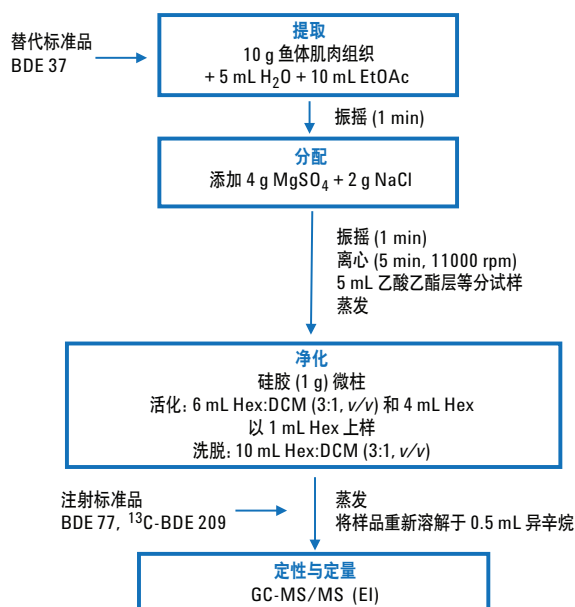


图 1. 新鲜鱼体肌肉组织提取与净化的总体方案（Hex – 正己烷，DCM – 二氯甲烷，EtOAc – 乙酸乙酯）

仪器分析

所有气质联用实验均在 Agilent 7890A 气相色谱仪（美国加利福尼亚州圣克拉拉市安捷伦科技公司）和电子电离 (EI) 模式的 Agilent 7000B 三重四极杆质谱仪（安捷伦科技公司）上运行。气相色谱系统配有 Agilent 7693A 自动进样器（安捷伦科技公司）和二氧化碳冷却的多模式进样口 (MMI)。为了进行分离，采用了 DB-XXLB 毛细管柱（15 m × 0.18 mm，0.07 μm 膜厚；安捷伦科技公司）。经优化的气相色谱分析条件列于表 2。

表 2. 优化的气相色谱分析条件 Agilent 7890 气相色谱条件

Agilent 7890 气相色谱条件

色谱柱	15 m × 0.18 mm, 0.07 µm DB-XLB (定制色谱柱, 无部件号)
自动进样器	Agilent 7693A 自动液体进样器
进样	2 µL 冷不分流进样, 采用二氧化碳冷却多模式进样口 (MMI)
进样口衬管	2 mm 内径凹口去活衬管 (部件号 5190-2296)
进样器温度程序	80 °C (0.20 min), 以 600 °C/min 升至 285 °C
进样模式	冷脉冲不分流
进样脉冲压力	50 psi
不分流时段	1.5 min
到分流口的吹扫流速	1.0 min 时 50 mL/min
载气	氦气
载气流速	1.5 mL/min (11 min), 以 15 mL/min 升至 3 mL/min
柱温箱程序	110 °C (1.5 min), 以 30 °C/min 升至 320 °C (3.5 min)
运行时间	12 min

7000B 三重四极杆气质联用仪以 MS/MS 电子电离 (EI) 模式运行, 使用每个分析物检测两对 transitions 的多反应监测模式 (MRM) 检测/确认分析物, 具体见表 3。传输线、离子源、第一四极杆和第二四极杆的温度分别为 300 °C、280 °C、150 °C 和 150 °C。碰撞池气体为氮气 (1.5 mL/min) 和氦气 (2.25 mL/min)。电子倍增器 (EM) 增益值示于表 3。一、二级质谱的分辨率均为 1.2 amu 半峰全宽。根据每个时间窗口的特征离子对数将驻留时间调整为 20-80 ms, 以实现每秒 5 个扫描循环 (Hz)。

MassHunter 定量分析软件 (版本 B.04.04) (安捷伦科技公司) 用于数据处理。

表 3. MS/MS 方法的优化条件

化合物名称	前体离子	一级质谱分辨率	产物离子	二级质谱分辨率	碰撞电压	保留时间窗口 (min)	电子倍增器增益值
BDE 28	405.8	宽	246	宽	20	0.3	10
	407.8	宽	248.1	宽	22	0.3	10
PBT	406.7	宽	325.8	宽	16	0.3	10
	406.7	宽	246.8	宽	24	0.3	10
PBEB	499.7	宽	484.6	宽	19	0.3	10
	499.7	宽	420.5	宽	11	0.3	10
BDE 37	405.8	宽	246.0	宽	20	0.3	10
	407.8	宽	248.1	宽	22	0.3	10
BDE 49	485.7	宽	326.1	宽	28	0.3	10
	483.7	宽	324.1	宽	32	0.3	10
HBB	551.7	宽	472.5	宽	26	0.3	10
	551.7	宽	391.5	宽	34	0.3	10
BDE 47	485.7	宽	326.0	宽	28	0.3	10
	483.7	宽	324.1	宽	32	0.3	10
BDE 66	485.7	宽	326.0	宽	28	0.3	10
	483.7	宽	324.1	宽	32	0.3	10
BDE 77	485.7	宽	326.0	宽	28	0.3	10
	403.8	宽	269.9	宽	35	0.3	10

表 3. MS/MS 方法的优化条件 (续)

化合物名称	前体离子	一级质谱分辨率	产物离子	二级质谱分辨率	碰撞电压	保留时间窗口 (min)	电子倍增器增益值
BDE 100	565.7	宽	405.8	宽	28	0.3	10
	403.8	宽	269.9	宽	35	0.3	10
BDE 99	565.7	宽	405.8	宽	28	0.3	10
	403.8	宽	269.9	宽	35	0.3	10
BDE 85	565.7	宽	405.8	宽	28	0.3	10
	403.8	宽	269.9	宽	35	0.3	10
BDE 154	643.6	宽	483.8	宽	20	0.3	10
	483.7	宽	374.9	宽	40	0.3	10
BDE 153	643.6	宽	483.8	宽	20	0.3	10
	483.7	宽	374.9	宽	40	0.3	10
BDE 183	561.7	宽	454.9	宽	45	0.3	100
	721.6	宽	561.8	宽	17	0.3	100
BTBPE	356.8	宽	277.8	宽	13	0.3	100
	356.8	宽	328.6	宽	11	0.3	100
BDE 197	801.7	宽	641.5	宽	14	0.3	100
	641.7	宽	534.5	宽	47	0.3	100
BDE 203	801.7	宽	641.5	宽	14	0.3	100
	641.7	宽	534.5	宽	47	0.3	100
BDE 196	801.7	宽	641.5	宽	14	0.3	100
	641.7	宽	534.5	宽	47	0.3	100
BDE 207	719.6	宽	559.6	宽	49	0.3	100
	879.8	宽	719.6	宽	9	0.3	100
BDE 206	719.6	宽	559.6	宽	49	0.3	100
	879.8	宽	719.6	宽	9	0.3	100
OBIND	406.7	宽	327.7	宽	25	0.3	100
	852.7	宽	771.7	宽	14	0.3	100
13C- BDE 209	651.5	宽	543.6	宽	34	0.3	100
	811.8	宽	651.4	宽	44	0.3	100
BDE 209	799.4	宽	639.5	宽	44	0.3	100
	639.6	宽	530.7	宽	36	0.3	100

结果与讨论

利用新开发的高通量样品前处理方法并将 7890 气相色谱仪和 7000B 三重四极杆气质联用系统作为仪器分析方法，可以分析 21 种代表性的 BFR。除了由欧洲食品安全局食物链污染物科学专家组 (EFSA CONTAM panel) [6,7] 包括在 BFR 核心监测组中的 8 种主要关注的 PBDE 同类物 (BDE 28、47、99、100、153、154、183 和 209) 外，我们还测定了另外 8 种 PBDE 同类物 (BDE 49、66、85、96、197、203、206 和 207) 以及 5 种替代性 BFR (PBEB、PBT、HBB、BTBPE 和 OBIND)。

色谱分离

当分析 PBDE 时，不仅需要考虑到目标分析物的分离，还必须考虑与其他非目标化合物的潜在共流出，因为许多同分异构体可能出现在实际样品中。由于这些原因，通常使用 30 m 长的毛细管柱。然而，当必须分析高度溴化的热降解性化合物例如 BDE 209 时，通常需要采用较短 (10-15 m) 的色谱柱。因此，在这种情况下共

流出的问题可能会出现。此外，采用负化学电离源 (NCI) 检测溴同位素模式 (m/z 79 和 81) 时，其他溴化物可能易于产生干扰。相反，EI 则会产生特异性更高的 $[M]^+$ 和 $[M-Br_2]^+$ 离子，同时 ^{13}C 标记的标准物质可有利于准确定量，但相比 NCI 定量限通常会高一些。

如图 2 和图 3 所示，采用以下条件所有 21 种目标 BFR 均在 12 分钟内得到分离，而相比之下，使用单四极杆 NCI 模式的气相色谱运行则需要 17.5 min：7890 气相色谱和 7000B 三重四极杆系统，Agilent DB-XLB 毛细管柱 (15 m $\times$ 0.18 mm, 0.07 μm)，EI 模式。仪器分析所需的时间得以缩短源于 DB-XLB 柱和 EI-MRM 运行模式下的三重四极杆质谱仪的高分离效率，在这情况下，可以使用高选择性前体离子和产物离子将 PBDE 与其他溴化物分离。如图 2 所见，PBEB 和 BDE 37 的共流出物可以通过使用不同的 MS/MS (EI) 离子对而轻易地分离。然而，当使用 GC/MS (NCI) 系统时则无法分离 BDE 28 和 PBT 的共流出物 (图 4)。

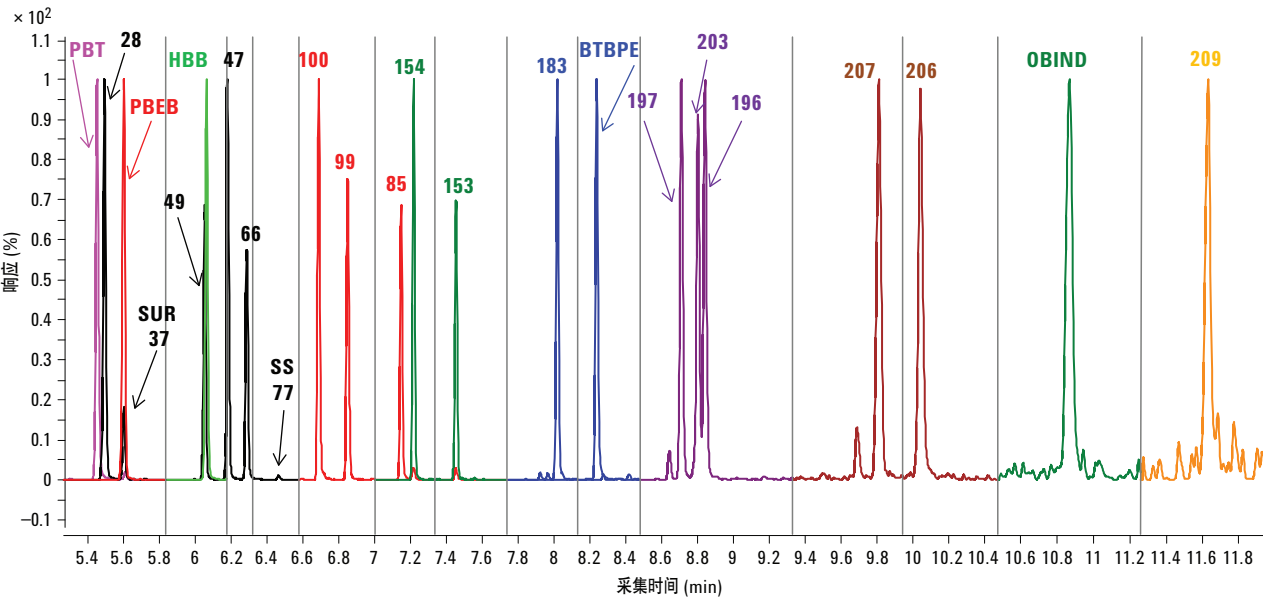


图 2. 5 $\mu g/kg$ 加标的鱼体肌肉组织的色谱图 (GC-EI-MS/MS) 示例

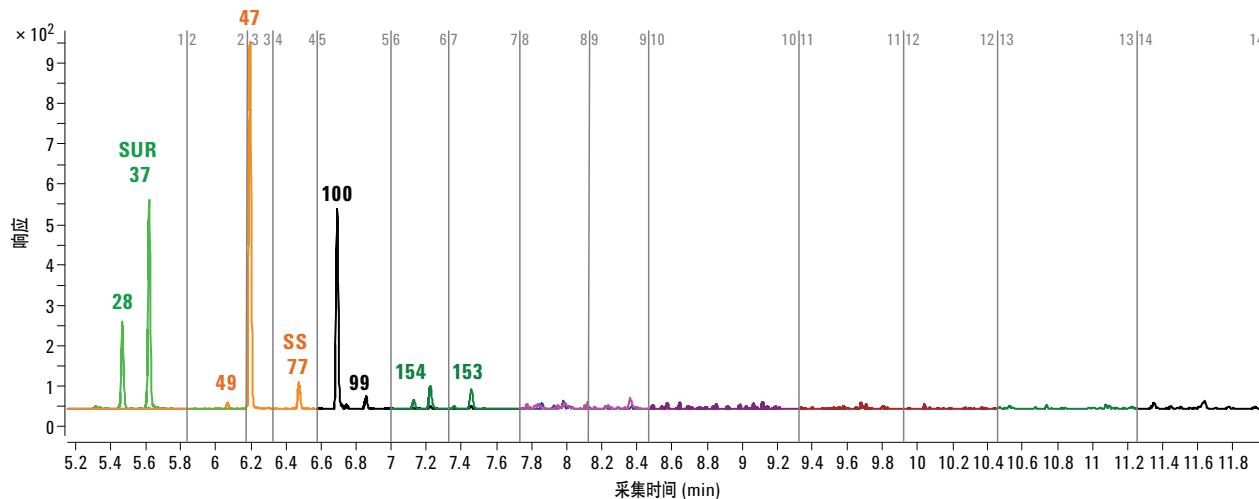


图 3. 自然情况下污染鱼体肌肉组织的色谱图 (GC-EI-MS/MS) 示例

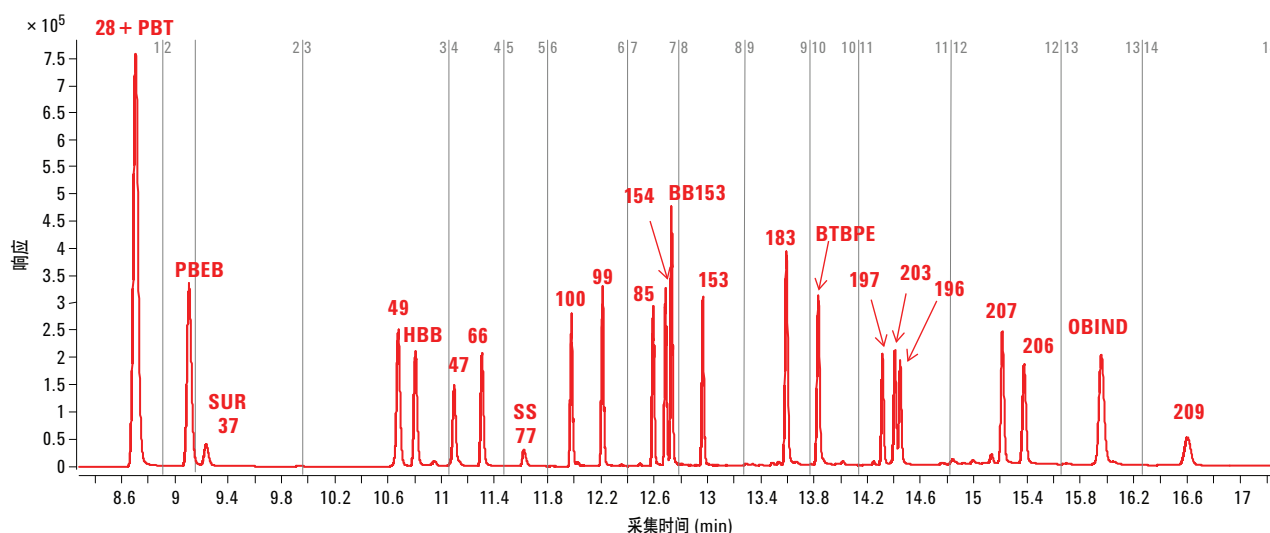


图 4. 5 µg/kg 加标的鱼体肌肉组织的色谱图 (GC-NCI-MS) 示例

方法性能特性

利用最终的 GC/MS/MS 设置，将溶于异辛烷的所有目标化合物的混标用来测试仪器分析的重现性，混标浓度为 100 ng/mL（相当于 10 µg/kg 鱼体肌肉组织）。GC/MS/MS 对所有目标化合物的响应的重现性用相对标准偏差 (RSD, %) 表示，范围为 1%–7%。

我们在验证研究中评价了详细列于本应用简报“实验部分”章节中的样品前处理方法和优化的 GC/MS/MS 分析条件，验证数据

的概览（系统回收率、重现性、定量限 (LOQ) 和线性）见表 4。为了验证整个分析方法，将鱼体肌肉组织的样品添加两种浓度水平（1 和 5 µg/kg）的所有目标分析物标准物质，然后进行处理和分析。对于每批样品，均配制了程序空白样（即，以相同方式处理但不使用试验基质的样品）。回收率 (%) 计算为绝对回收率（不根据替代标准品的回收率进行修正），而重现性 (%) 则表示为相对标准偏差 (RSD)。回收率 (%) 和 RSD (%) 的范围分别为 78%–115% 和 2%–14%。

基于低浓度污染物的基质样品的 GC/MS/MS 初步测定结果，鱼体肌肉组织的定量限为 0.005 µg/kg，相当于 0.05 ng/mL（高度溴化的 BFR 会得到更高的值）。

鉴于新鲜鱼体组织中目标分析物存在的宽浓度范围，有必要使用更宽的工作标准溶液校准浓度 0.05–500 ng/mL（就 BDE 206、

207、209 和 OBIND 而言为 0.25–1000 ng/mL）。使用加权线性回归 (1/x)，计算校准曲线的回归系数 (R^2)，校准曲线的浓度范围为定量限直至最高校准点（500 ng/mL 或 1000 ng/mL）。在这些实验中，所有目标分析物均满足上述校准范围内的线性，回归系数 (R^2) 高于 0.99。

表 4. 对样品前处理方法和经优化的 GC/MS/MS 分析进行验证研究获得的验证数据概览

分析物	1 µg/kg		5 µg/kg		定量限 (µg/kg)	线性 (R^2)*
	回收率 (%)	RSD (%)	REC (%)	RSD (%)		
BDE 28	89	2	92	6	0.005	0.9990
BDE 47	78	7	83	5	0.005	0.9983
BDE 49	100	6	97	4	0.005	0.9993
BDE 66	100	6	96	5	0.005	0.9989
BDE 85	107	7	106	6	0.005	0.9984
BDE 99	106	8	100	5	0.005	0.9982
BDE 100	102	8	98	5	0.005	0.9981
BDE 153	107	10	101	7	0.05	0.9985
BDE 154	99	10	93	6	0.005	0.9984
BDE 183	100	8	104	10	0.05	0.9936
BDE 196	83	14	81	8	0.1	0.9964
BDE 197	86	12	93	12	0.1	0.9990
BDE 203	79	12	81	12	0.1	0.9929
BDE 206	79	10	86	13	1	0.9987
BDE 207	85	12	89	14	0.5	0.9963
BDE 209	81	8	79	11	1	0.9985
PBT	115	10	114	5	0.05	0.9994
PBEB	105	7	105	4	0.01	0.9959
HBB	102	12	103	3	0.05	0.9969
BTBPE	113	13	113	12	0.01	0.9973
OBIND	104	11	107	10	1	0.9929

* 计算了从定量限直至最高校准点（500 ng/mL = 50 µg/kg，以及就 BDE 206、207、209 和 OBIND 而言 1000 ng/mL = 100 µg/kg）范围内的校准曲线的回归系数 (R^2)

结论

基于乙酸乙酯-水性样品悬浮液分配然后进行 SPE 硅胶微柱净化而新开发的方法可显著提高实验室效率；相对于索氏提取，因为之后还需要接着采用其他常规净化技术进行几个小时，而该方法可在不到 1 个小时内处理多达 6 个样品。另外，当使用这种新的样品处理方法时，提取溶剂的用量也得以明显减少，因此该方法不仅可以降低成本还能提供更环保的分析方式。

在本应用简报“实验部分”章节中详述的样品前处理方法性能特性以及优化的 GC/MS/MS 分析条件与 SANCO 文件号 12495/2011 [8] 中所述一致，其最初设计是针对农残分析，但通常也适用于其他有机食品污染物的分析（回收率范围 70%–120%，重现性小于 20%）。所有目标分析物的回收率范围为 78%–115%，重现性（以相对标准偏差表示，RSD）不超过 14%，甚至在较低有加标水平下也是如此。在优化的 GC/MS/MS (EI) 条件下，定量限为 0.005 µg/kg（高度溴化的 BFR 会得到更高的值）。

三重四极杆质谱 EI 模式是常规单四极杆质谱不错的替代之选，因为可以选择高 m/z 区域的前体离子和产物离子，从而使干扰更少、灵敏度更高。使用该方法，甚至对于痕量水平的 BFR 分析（在探索研究中进行可靠的数据评估所必需）也是可行的。有关该应用进一步的详细信息也可参考最近发表的期刊论文 [9]。

参考文献

1. EC: Directive 2003/11/EC of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether).
2. BSEF. Bromine Science and Environmental Forum; 2012. <http://www.bsef.com> (accessed June 26, 2012).
3. A. Covaci, S. Harrad, M. A.-E. Abdallah, N. Ali, R. J. Law, D. Herzke, C. A. de Wit, Environ. Int. 37 (2011), 532–556.
4. Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm (accessed June 26, 2012).
5. K. Kalachova, J. Pulkrabova, L. Drabova, T. Cajka, V. Kocourek, J. Hajslova, Anal. Chim. Acta. 707 (2011), 84–91.
6. EFSA, Advice of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to relevant chemical compounds in the group of brominated flame retardants for monitoring in feed and food Request for data on Brominated Flame Retardants Levels in Foodstuffs, EFSA Journal. 328 (2006), 1–4.
7. EFSA, Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. EFSA Journal. (2011), 9(5), 2156.
8. Document no. SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
9. K. Kalachova, T. Cajka, C. Sandy, J. Hajslova, J. Pulkrabova, Talanta 105 (2013), 109–116.

更多信息

有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：
www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印制
2013 年 1 月 7 日
5991-0887CHCN



Agilent Technologies