

大气压化学电离-液相色谱串联质谱法测定油基食品中的18种邻苯二甲酸酯类化合物

祝伟霞, 杨冀州, 袁萍, 刘亚风, 张巨洲, 孙转莲

(河南出入境检验检疫局, 河南郑州 450003)

摘要: 根据2011年6月卫生部公示的食品中17种禁用邻苯二甲酸酯的名单, 本方法采用相色谱-串联四极杆质谱建立了快速测定含油食品中18种邻苯二甲酸酯(PAEs)含量的分析方法。食品采用乙腈提取, 加入水稀释后, 正己烷液液萃取, 样液浓缩至干后, 甲醇定容。采用C₁₈液相色谱柱分别在等度与梯度两种洗脱程序下分离, 大气压化学正离子电离, 多反应监测模式测定。在该优化方法条件下, 18种邻苯二甲酸酯检测限(LOQ)在0.05~0.5 mg/kg之间, 方法回收率为53.4%~107.9%, 相对标准偏差(RSD)为7.2%~24.6%。应用本方法分析了植物油、起酥油、辣椒酱、豆瓣酱、饼干等多种食品中18种邻苯二甲酸酯类物质含量, 经与标准方法相比, 表明本方法操作简单、测定结果准确, 可以作为食品中18种邻苯二甲酸酯类化合物的确证方法。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 邻苯二甲酸酯; 塑化剂; 起云剂; 含油食品

文章编号: 1673-9078(2012)1-115-118

Determination of 18 Phthalic Acid Esters Compounds in Oily Foodstuffs

by Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Liquid

Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHU Wei-xia, YANG Ji-zhou, YUAN Ping, LIU Ya-feng, ZHANG Ju-zhou, SUN Zhuan-lian

(Henan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: A quick confirmative method was developed for determining 18 phthalic acid esters (PAEs) in oily foodstuffs by liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS), basing on the ministry of health announcement about 17 illegal PAEs in foodstuffs. The oil sample was extracted with acetonitrile. After mixed with water, n-hexane was selected as the solvent of liquid-liquid extraction. The extracts were concentrated to dry and methanol was used to dissolve residues. The separation was carried out on C₁₈ column with the isocratic and gradient elution. The detection of 18 analytes was achieved in the positive atmosphere pressure chemical ionization (APCI) and multi-reaction monitoring (MRM) mode. With the optimized condition, the limits of quantification (LOQ) of the 18 PEAs analytes were 0.05-0.5 mg/kg. The overall recovery varies from 53.4% to 107.9%, and the relative standard deviations (RSD) were between 7.2% and 24.6%. Real sample including vegetable oil, shortening oil, chili sauce, bean sauce, and biscuit were determined 18 PAEs residues with this method and compared with the standard method. The results showed that the method was simple, accurate and suitable for the determination of 18 PAEs in oily foodstuffs.

Key words: Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); phthalic acid esters (PAEs); plasticizer; kiun agent; oily foodstuffs.

邻苯二甲酸酯(PAEs)是一类环境激素类物质, 主要用作增加塑料的可塑性和韧性, 还普遍用于建筑材料、化妆品、合成橡胶、洗涤剂、润滑油等产品生产过程中^[1]。一般食品中PAEs残留主要是由加工、包

收稿日期: 2011-10-25

基金项目: 国家质检总局科研计划项目(20071K162)

作者简介: 祝伟霞(1979-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事食品安全研究工作

装过程中接触塑料设备和容器而产生的, 最近爆发的食品饮料中“起云剂”风波, 源于不法厂商为了降低生产成本, 在起云剂配方中违法添加DBP、DEHP和DINP等塑化剂达到食品增稠的目的。邻苯二甲酸酯类具有雌激素活性成分, 能干扰人类和其他动物内分泌, 导致细胞突变、致畸和致癌等危害^[2]。在这起恶性食品安全事件发生后, 我国卫生部2011年6月公布了食品中可能添加的17种禁用塑化剂名单^[3]。因此, 为了监

测当前我国食品中邻苯二甲酸酯类物质污染状况, 建立一种快速测定食品中多种邻苯二甲酸酯类物质是非常必要的。

目前国内外主要采用气相色谱质谱法(GC-MS)测定食品中PEAs^[4-5], GC-MS作为邻苯二甲酸酯最常用的分析方法, 具有重复性好、定性准确的优点^[2], 国标也规定采用该方法测定食品中16种PEAs^[6], 但国标未规定DINP和DIDP的分析方法, 而目前在台湾、香港等地已有DINP和DIDP检出阳性的新闻报道。根据该类化合物的紫外吸收和电离特征, 一些研究者、官方方法开始采用HPLC或LC-MS/MS技术分析食品中多种PEAs^[7-9], 但已报道的文献方法很少适用于含油基食品的分析, 在测定油基食品的方法中常需要采用凝胶净化^[6]、固相萃取^[10]等复杂的样品前处理步骤。为了解决油基食品中邻苯二甲酸酯检测的难题, 本实验拟以富含油脂的各种食品为研究对象, 首次采用LC-APCI-MS/MS技术, 建立了含油食品中18种邻苯二甲酸酯化化合物的检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API 4000液相色谱-串联质谱仪(美国应用生物公司), 配Agilent1200液相色谱仪和电喷雾离子源; BRANSON 5210超声波清洗仪(美国BRANSON公司); IKA T18涡旋混匀器(德国IKA公司); N-EVAP氮气浓缩仪(美国Organomation公司)。50 mL具塞离心管、20 mL试管、10 mL和1 mL移液管(均为玻璃材质, 使用前用甲醇清洗), 16种混合标准溶液(符合GB/T 21911-2008所列16种化合物, 1000 mg/L溶于正己烷中, 购自美国o2si smart solutions公司)和DINP、DIDP、DEHP、DBP、DIBP、DNP单个标准品(德国Dr. Ehrenstorfer公司); 甲醇和乙酸胺(色谱纯, 美国Fisher公司), 二氯甲烷(分析纯, 天津化学试剂二厂), 玻璃注射器, 实验过程中所用容器或器皿均为玻璃材质, 使用前应用甲醇洗涤, 并尽量避免接触塑料制品。

单个标准储备溶液: 分别称取10 mg标准品, 加入甲醇溶解并定容至50 mL, 该单标溶液浓度为200 mg/L。18种混合标准溶液: 取1 mL混标溶液, 吹干, 加入甲醇溶解, 并与5 mL DINP和DIDP单标溶液混合, 定容至100 mL, 该混合标准溶液浓度为10 mg/L。

1.2 实验步骤

取1.0 g均匀试样于10 mL具塞离心管中(固态油脂样品需先于50 °C熔化), 用移液管加入5 mL乙腈, 涡旋混合3 min后, 超声提取10 min, 于4000 r/min离心5 min, 转移上清液于20 mL玻璃试管中与5 mL水混合,

加入10 mL正己烷涡旋混合3 min, 于4000 r/min离心2 min, 转移正己烷层于另一试管中, 再加入5 mL正己烷重复提取步骤, 合并正己烷层于50 °C氮气流下浓缩至干, 加入1 mL甲醇溶解, 经滤膜过滤后进行LC-MS-MS测定。

1.3 LC-MS/MS 测定条件

色谱柱: Shiseido MG II C18, 150×2.1 (i.d.) mm, 5 μm; 流动相: 5 mmol/L乙酸胺甲醇(A)-水(B), 分离方法1: 等度洗脱, 95%A+5%B; 分离方法2: 梯度洗脱程序, 0~5 min: 45%~80%A; 5~13 min: 80%~95%A; 13~20 min: 95%~100%A, 20~20.1 min: 100%~45%A, 保持5 min。流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

离子化方式: 正离子电离(APCI+); 电晕放电电流: 5 μA; 雾化气: 344.5 kPa (50 psi); 气帘气: 172.4 kPa (25 psi); 喷雾电压: 4500 V; 去溶剂温度: 450 °C; 碰撞气: 69 kPa (10 psi); 每个离子对驻留时间: 50 ms; 每种化合物的检测离子对、去簇电压(DP)、碰撞室出口电压(CXP)、射入电压(EP)、碰撞能量(CE)等质谱参数见表1。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

国标提取油脂食品中邻苯二甲酸酯采用乙酸乙酯-环己烷与石油醚等有机溶剂^[6], 文献报道常用的提取溶剂还有正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮和甲醇等^[2,5,8], 本实验对比了几种有机溶剂提取食品中邻苯二甲酸酯类物质的效果, 结果甲醇提取纯油脂、起酥油样品时回收率35%~80%, 正己烷、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯等弱极性有机溶剂与样品中油脂成份互溶度高, 需采用凝胶净化除去样品中油脂干扰物, 而乙腈提取油脂食品中18种待测物时互溶干扰物最少, 回收率在81~97%之间。为了简化操作步骤, 本实验采用乙腈作为提取溶剂。

2.2 液液萃取条件的优化

乙腈提取液存在的油脂互溶物, 易干扰仪器测定。为了净化样品, 实验分别设计在乙腈提取液中加入正己烷、石油醚、二氯甲烷、叔丁基甲醚等萃取溶剂, 结果表明正己烷萃取效率最高(仅40~62%), 18种PAEs待测物在乙腈-正己烷、石油醚或二氯甲烷组成的两相溶液中, 由于极性相差小, PAEs不能定量转移至弱极性有机相。为了提高两相的分配效率, 试验优化了在乙腈提取液加入等比例水混合, 以增加样液极性, 几种有机溶剂的回收率大小为正己烷(79~95%)>石油醚(68~89%)>二氯甲烷(45~75%)。因此本方法采用

先在乙腈提取液中加入等比例水，再进行正己烷萃取，完成18种PAEs待测物的净化。

表1 18种邻苯二甲酸酯类化合物的CAS号、质谱参数和LOQ值

Table 1 The CAS number, mass parameter and LOQ of 18 PAEs compounds

No.	Compound	CAS #	Transition ^a	DP/V	CE/eV	CXP/V	EP/V	LOQ/(mg/kg)
1	Dimethyl phthalate (DMP)	131-11-3	195.0/163.0*; 195.0/133.0	35	15;33	10;8	11;10	0.1
2	Diethyl phthalate(DEP)	84-66-2	223.1/177.1; 223.1/149.1*	35	12;25	12;9	6	0.1
3	Bis(2-methoxyethyl phthalate (DMEP)	117-82-8	283.2/207.2*; 283.2/59.2	55	10;30	14;10	9	0.5
4	Bis(2-ethoxyethyl phthalate (DEEP)	605-54-9	311.3/221.2*; 311.3/73.2	60	10;20	15;13	10	0.1
5	Benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	313.1/91.1; 313.1/149.1*	75	30;19	4;9	4;5	0.2
6	Bis(2-n-butoxyethyl phthalate (DBEP)	117-83-9	367.2/101.3; 367.2/249.3*	65	18;12	5	12;13	0.05
7	Diphenyl phthalate (DPhP)	84-62-8	319.2/225.2*; 225.2/77.2	65;103	16;38	15;14	8;15	0.05
8	Dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	279.3/205.2*; 279.3/167.1	50	12;17	14;11	4	0.1
9	Diisobutyl phthalate (DIBP)	84-69-5	279.3/149.1*; 279.3/205.2	50	20;12	9;14	4	0.1
10	Dipentyl phthalate (DPP)	131-18-0	307.3/149.2*; 307.3/219.2	50	20;12	9;15	10	0.05
11	Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	84-61-7	331.2/167.1*; 331.2/149.2	53	20;33	11;9	8;10	0.2
12	Bis(4-methyl-2-pentyl)phthalate (BMPP)	146-50-9	335.2/167.2*; 335.2/251.3	50	18;12	11;6	10;7	0.1
13	Dihexyl phthalate (DHXP)	84-75-3	335.2/149.2*; 335.2/233.3	50	30;12	9;11	10;11	0.1
14	Dinonyl phthalate (DNP)	84-76-4	419.3/149.1; 419.3/275.3*	70	28;13	9;6	6;4	0.2
15	Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	117-81-7	391.3/149.2; 391.3/167.2*	70	24;19	9;11	4	0.2
16	di-n-octyl phthalate (DNOP)	117-84-0	391.3/149.2; 391.3/261.3	70	24;13	9;12	9;10	0.2
17	Diisononyl phthalate (DINP)	28553-12-0	419.3/127.3*; 419.3/149.1	70	18;28	7;9	4;6	0.5
18	Diisodecyl phthalate (DIDP)	247-977-1	447.4/141.4; 447.4/149.3*	70	17;31	8;6	9;9	0.5

Note a: Marked * is quantification transition.

2.3 PVC实验材料的影响

色谱检测实验室中几乎每种试剂与仪器设备的生产、分析过程均离不开含有PVC材质的物质，因此在邻苯二甲酸酯检测过程易检出阳性，特别是聚乙烯生产常用的一些塑化剂如DBP、DEHP和DINP，均有检出阳性的现象，实验发现过滤采用的一次性医用注射器最易产生DEHP和DBP阳性，因此在实验过程中应尽量避免使用含塑料材质的实验器材，减少基质干扰。在本实验测定条件下空白样液几乎不存在18种PEAs受PVC实验材料干扰的影响。

2.4 色谱条件的选择

邻苯二甲酸酯属弱极性化合物，在C₁₈色谱柱中保留性强，实验发现邻苯二甲酸酯色谱分离存在的问题为：1、DBP、DEHP和DINP易产生阳性干扰，在色谱柱中易残留强，难洗脱；2、几种邻苯二甲酸酯的正、异同分异构体难以分离；3、DINP和DIDP峰形差。试验了流动相为乙腈或甲醇+0.1%甲酸时效果，DIDP、DEHP和DNOP几种化合物很难洗脱，同时该方法也不能将正、异同分异构体分离；流动相水相改为乙酸胺后，17种化合物能定量洗脱，随着乙酸胺浓度增加，分离度提高，但质谱基质效应也增加。在运行梯度洗脱程序时，DEHP易产生阳性图谱（包括进样量为0的

情况下），在高有机相（95%~97%）等度洗脱条件下，空白基线中没有DEHP干扰，但在高淋洗强度下待测物的分离度差。因此本方法联合采用等度与梯度洗脱两种分离方法，高洗脱等度方法分离时间短，可作为样品快速筛选方法。难分离同分异构体产生的阳性结果时，采用梯度洗脱方法测定，共同完成18种邻苯二甲酸酯类化合物分离（见图1）。

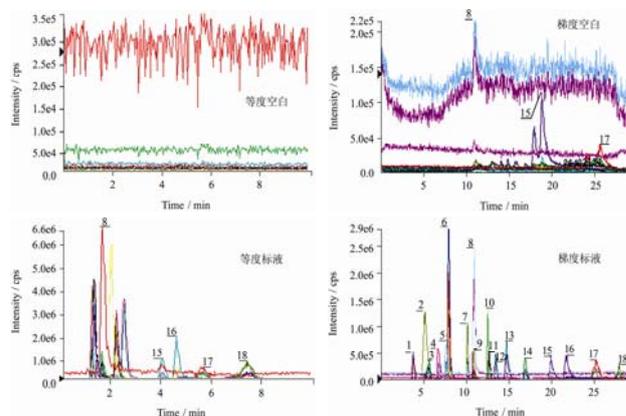


图1 两种洗脱条件下18种PAEs总离子流图

Fig.1 The total ion current chromatograms of 18 PAEs with 2 different elution program

2.5 质谱条件的优化

大气压化学电离(APCI)与ESI是液质常用的两种电

离方式,邻苯二甲酸酯属弱极性化合物,比较邻苯二甲酸酯在两种电离方式下的离子化效率和检测灵敏度,发现ESI离子化效率与灵敏度均高于APCI,但ESI基质抑制现象明显,与标准溶液响应强度相比,信号响应减少了约5倍,APCI基质抑制效应小,本方法选用APCI作电离源。采用浓度为0.5 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液以流动注射的方式在正离子模式下进行母离子全扫描,对于几种同分异构体,需分别配制单个标准溶液进行扫描,确定化合物的分子离子 $[M+H]^+$,再分别以待测物的分子离子峰为母离子,进行子离子全扫描,选取丰度较强、干扰较小的两对子离子作为定性与定量离子。实验发现邻苯二甲酸二苯酯(DPhP)以 $[M+H]^+$ 为母离子时,仅获得一个信号强度较高的225.2特征碎片离子,其它子离子丰度均小于10%,根据EEC/657/2002关于子离子碎片丰度不得小于10%的要求,质谱优化又以225.2为母离子,获得其三级质谱碎片77.2,完成DPhP化合物的定性,18种PAEs的优化质谱参数见表1。

2.6 方法测定低限与线性范围

在食品样品中添加0.5倍LOQ-20倍LOQ浓度混合标准工作溶液,按上述所述方法处理后,DBP、DEHP与DINP采用等度分离方法1测定,其它16种化合物采用梯度分离方法2测定,以定量离子对的峰面积(纵坐标)对浓度(横坐标)进行线性回归计算,所得相关系数 r 均大于0.9896。以扣除背景后信噪比 $(S/N) \geq 10$ 为LOQ,其LOQ值见表1。

2.7 方法回收率与精密度

取检测为阴性的纯油脂、动物脂肪、辣椒酱、豆瓣酱、起酥油样品,分别添加3个水平标准溶液(1 \times LOQ、2 \times LOQ、4 \times LOQ)进行回收率试验,平行测定10次,见表2。结果表明平均回收率在53.4%~107.9%,相对标准偏差(RSD)为7.2%~24.6%。

3 结论

采用简单的溶剂提取技术,建立了一种快速测定含油食品中18种PAEs的确证方法。该方法已为河南市场流通的植物油、火锅底料、辣椒酱等多种含油食品以及进出口45批油基食品检测服务,同时该方法结果与国际测定结果一致。与国标GC-MS法相比,首先本方法采用APCI-MRM法测定食品中18种邻苯二甲酸酯,减少了样品中其它色谱峰的干扰,实现了待测物的准确性;其次,GC-MS分析DINP和DIDP两种增塑剂时,得到一组色谱峰群,灵敏度低,但LC-MS/MS测定DINP和DIDP时,均能获得峰形对称的单峰,本方

法除测定卫生部禁用17种PAEs外,同时增加了DIDP;最后,本文所采用前处理方法不需要复杂的前处理仪器和步骤,18种PAEs均获得较高的回收率。因此作为一种新的分析方法,本方法的建立可以为食品中邻苯二甲酸酯的监管与检测提供可靠的技术依据。

表2 方法回收率与精密度 (n=10)

Table 2 The recovery and precision of the method (n=10)

Compound	Added/(mg/kg)	Average recovery/%	RSD/%
DMP	0.1, 0.2, 0.4	86.9	8.9
DEP	0.1, 0.2, 0.4	94.6	7.6
DMEP	0.5, 1.0, 2.0	95.6	10.2
DEEP	0.1, 0.2, 0.4	99.8	9.4
BBP	0.2, 0.4, 0.8	86.7	7.2
DBEP	0.05, 0.1, 0.2	90.1	8.8
DPhP	0.05, 0.1, 0.2	100.5	11.6
DBP	0.1, 0.2, 0.4	101.4	24.6
DIBP	0.1, 0.2, 0.4	85.7	14.3
DPP	0.05, 0.1, 0.2	82.3	15.7
DCHP	0.2, 0.4, 0.8	97.5	10.2
BMPP	0.1, 0.2, 0.4	93.0	8.6
DHXP	0.1, 0.2, 0.4	86.9	9.9
DNP	0.2, 0.4, 0.8	85.4	18.4
DEHP	0.2, 0.4, 0.8	107.9	20.5
DNOP	0.2, 0.4, 0.8	80.3	15.7
DINP	0.5, 1.0, 2.0	76.8	19.8
DIDP	0.5, 1.0, 2.0	53.4	21.2

参考文献

- [1] 姚卫蓉.食品包装污染物研究进展.现代食品科技[J].2005, 21(1):150-153
- [2] 王鑫.食品中邻苯二甲酸酯类污染物分析及迁移规律的研究[D].江南大学,2008
- [3] <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsj/dj/s7891/201106/51902.htm>
- [4] 卢春山,李玮,屠海云,等.气相色谱-质谱联用测定食品中的邻苯二甲酸酯[J].分析测试学报,2010,29(10): 1036-1040
- [5] 孙若男.食品和塑料橡胶中酞酸酯的GC-EI/MS及GC-MS/MS分析方法研究[D].厦门大学,2008
- [6] GB-T 21911-2008 食品中邻苯二甲酸酯的测定[S]
- [7] 王美丽,陈海婷,张会娜,等.高效液相色谱测定肉制品中五种邻苯二甲酸酯[J].分析实验室,2009,28(6):49-52
- [8] 刘超,李来生,王上文,等.液相色谱-电喷雾质谱联用法测定饮料中的邻苯二甲酸酯[J].色谱,2007,25(5):766-767