

# 凝胶渗透色谱-高效液相色谱-串联质谱法测定 食品中邻苯二甲酸酯类化合物的含量

肖家勇<sup>1</sup>, 李莉<sup>2</sup>, 丁利<sup>1</sup>, 朱绍华<sup>1</sup>, 龚强<sup>1</sup>, 付善良<sup>1</sup>, 王利兵<sup>1\*</sup>

(1. 湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 长沙 410004; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

**摘要:** **目的** 建立同时测定食品中 6 种邻苯二甲酸酯类化合物含量的高效液相色谱-串联质谱方法 (HPLC-MS/MS)。**方法** 以 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱为分析柱, 以甲醇-0.1%甲酸水为流动相, 采用梯度洗脱模式, 流速为 0.35 mL/min; 质谱离子源的工作模式为正离子电离模式 (ESI+), 采用多反应监测离子模式 (MRM) 进行定量检测; 样品用有机溶剂提取, 凝胶渗透色谱净化。**结果** 食品中邻苯二甲酸丁苄酯等 6 种增塑剂在线性范围内线性关系良好 ( $r^2 > 0.999$ ), 定量限为 0.04~0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 检测限为 0.01~0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。方法的加标回收率为 81.9%~103.9%, 相对标准偏差均小于 7.2%。**结论** 本文所建立的方法简单, 灵敏度高, 适用于食品中的 6 种邻苯二甲酸酯类增塑剂的分析检测。

**关键词:** 邻苯二甲酸酯; 高效液相色谱-串联质谱; 凝胶渗透色谱

## Determination of phthalates in food by gel permeation chromatography-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Jia-Yong<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, DING Li<sup>1</sup>, ZHU Shao-Hua<sup>1</sup>, GONG Qiang<sup>1</sup>, FU Shan-Liang<sup>1</sup>, WANG Li-Bing<sup>1\*</sup>

(1. Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176 China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the simultaneous determination of 6 kinds of phthalates in food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were separated by an Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column with a mobile phase of methanol-0.1% formic acid/water in gradient elution mode at the flow rate of 0.35 mL/min. The mass spectrometry worked in the positive ion mode, and multiple reaction monitoring (MRM) was adopted for the quantification of the analytes. Samples were purified by gel permeation chromatography (GPC) after extraction with organic solvents. **Results** A good linearity for 6 kinds of phthalates was achieved, with all correlation coefficients more than 0.999. Average recoveries of 6 analytes at three spiked level were ranged from 81.9% to 103.9%, with RSDs less than 7.2%. The limits of quantification and detection of the method was 0.04~0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.01~0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. **Conclusion** The established method is sensitive and simple, and suitable for

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD29B05)

**Fund:** Supported by the National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD29B05)

\*通讯作者: 王利兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wanglb0419@126.com

\*Corresponding author: WANG Li-Bing, Researcher, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science Technology, Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: wanglb0419@126.com

the determination of 6 kinds of phthalates in food.

**KEY WORDS:** phthalates; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; gel permeation chromatography

## 1 引言

邻苯二甲酸酯类化合物 (phthalic acid esters, PAEs) 是一类环境雌激素物质, 具有生殖毒性、胚胎毒性、遗传毒性等, 对人体尤其是男性的健康危害巨大, 近年来越来越受到社会的关注<sup>[1-3]</sup>。作为增塑剂, 邻苯二甲酸酯类化合物在食品包装材料、化妆品、医疗用品等生产中被广泛应用。PVC 塑料制品具有方便、快捷、美观等优点, 是目前使用较多的一种食品包装材料, 食品包装塑料中邻苯二甲酸酯类化合物的含量很高, 最高可达聚合物本体的 60%。由于邻苯二甲酸酯类增塑剂与塑料基质之间没有形成共价键, 而是以氢键和范德华力连接, 彼此之间保持各自独立的化学性质, 因而很容易迁移到与之接触的食品中<sup>[4,5]</sup>。邻苯二甲酸酯类化合物已被美国等许多国家列入“优先监测污染物名单”<sup>[6]</sup>。因此, 建立快速、灵敏的分析方法对于食品中邻苯二甲酸酯类物质的监控是非常必要的。

目前国内外关于邻苯二甲酸酯类化合物的研究主要集中在环境中的分布, 测定方法多为采用固相萃取净化后进行气相色谱法、液相色谱法或气-质联用法测定<sup>[7-10]</sup>。由于食品样品基质复杂, 对于该类物质在食品中的污染情况则研究较少。近年来随着食品安全问题的凸显, 对食品中邻苯二甲酸酯类化合物的研究有所增加, 但方法主要还是集中于气-质联用法, 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的邻苯二甲酸酯报道不多<sup>[11]</sup>。本文选用邻苯二甲酸二己酯(DHXP)、邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)、邻苯二甲酸二庚酯(DHP)、邻苯二甲酸二丙酯(DPRP)、邻苯二甲酸二丁氧基乙基酯(DBEP)等6种物质为研究对象, 建立高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的这6种邻苯二甲酸酯类增塑剂的方法, 该方法简单、快速、准确、灵敏, 可用于监测食品中的邻苯二甲酸酯类物质的污染情况。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 试验材料

实验样品均购自当地超市, 包括火腿肠、培根、

猪瘦肉、果冻、酸奶和水果酥。

#### 2.1.2 仪器与试剂

API 4000 三重四级杆质谱仪(美国应用生物系统公司); 岛津 20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 高速离心机(德国 Sigma 公司); 氮吹仪(Turbo Vap II, 美国 Caliper 公司); GPC 凝胶色谱仪(GPC Vario, 德国 Lctech 公司); 超声波振荡器(KQ-250E, 美国舒美公司)。

甲醇和乙腈为 HPLC 试剂(德国 Merck 公司), 二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷、环己烷均为分析纯(国药集团化学试剂); 邻苯二甲酸二己酯(DHXP)、邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)、邻苯二甲酸二庚酯(DHP)、邻苯二甲酸二丙酯(DPRP)、邻苯二甲酸二丁氧基乙基酯(DBEP)标准品(纯度均 99%, 美国 Sigma 公司); 水为超纯水(美国 Millipore 超纯水仪制备)。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取邻苯二甲酸二己酯(DHXP)、邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)、邻苯二甲酸二庚酯(DHP)、邻苯二甲酸二丙酯(DPRP)、邻苯二甲酸二丁氧基乙基酯(DBEP) 10.0 mg, 用甲醇溶解定容至 10 mL, 配成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液, 4 °C 冷藏保存。分别移取各个标准储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配成浓度各为 100 µg/mL 的中间标准溶液, 4 °C 冷藏避光储存。将中间标准溶液用甲醇稀释定容, 配成浓度各为 1.0 µg/mL 的标准工作液。

#### 2.2.2 仪器条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 µm); 流动相: 溶剂 A 为甲醇, 溶剂 B 为 0.1%甲酸水, 梯度洗脱程序为: 0~10.0 min, 50%~2%B, 10.0~15.0 min, 2%B, 15.1 min, 50%B, 15.0~20.0 min, 50%B; 进样量: 10 µL; 流速: 0.35 mL/min; 柱温: 35 °C。

质谱离子源为电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 雾化气(Gas1): 413 kPa(60.00 psi); 辅助气(Gas2): 448 kPa(65.00 psi); 离子喷雾电压(IS): 4500.00

V; 气帘气(Cur): 172 kPa(25.00 psi); 离子化温度(TEM): 500 °C; 检测方式: 多反应监测模式(MRM)。

### 2.2.3 样品前处理

准确称取样品 5.0 g 于 20 mL 玻璃试管中, 每次加入 10 mL 正己烷涡旋提取 2 次, 合并提取液, 40 °C 氮吹浓缩至干后, 准确加入 7.0 mL 环己烷-乙酸乙酯(1:1, V:V)溶解, 进行 GPC 净化。GPC 系统的流动相为环己烷-乙酸乙酯(1:1, V:V), 流速为 5.0 mL/min; 前运行时间、主运行时间和尾运行时间分别为 840、960 和 300 s; 样品吸入体积为 6400  $\mu$ L。将 GPC 净化洗脱液于 40 °C 氮吹浓缩至干, 准确加入 1.0 mL 甲醇溶解混匀, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后转入进样瓶进行 HPLC-MS/MS 分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱条件的优化

实验发现, 甲醇和乙腈两种溶剂作为有机相对 6 种邻苯二甲酸酯类物质的分离效果相当, 但由于本实验采用的离子化方式是 ESI+模式, 相比而言, 能够给予质子的甲醇更有利于目标分析物的离子化。水相考察了添加不同的流动相改性剂, 比较了甲酸、乙酸的效果。实验结果显示, 加入甲酸和乙酸对 6 种邻苯二甲酸酯类物质的分离无明显影响, 但能显著提高其响应强度, 尤其是甲酸(见图 1)。因此, 我们最终选择甲醇-0.1%甲酸水体系作为流动相。

由于邻苯二甲酸酯类物质在  $C_{18}$  柱上都是强保留物质, 且结构上极其相似, 保留行为相当, 所以我们采用梯度洗脱模式, 且有机相比例高至 98%, 排除了实验中交叉污染的可能性。

### 3.2 质谱条件的优化

选择正离子模式(ESI+), 采用流动注射分析(FIA)的方式, 对 6 种目标化合物的质谱参数进行了优化。由于检测模式选用的为多反应监测扫描模式(MRM), 试验中对 6 种化合物的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压等参数进行了优化, 优化后的质谱条件见表 1。6 种邻苯二甲酸酯类物质在优化的条件下的 MRM 色谱图见图 2。

表 1 多反应检测扫描模式检测 6 种邻苯二甲酸酯类物质的质谱参数

Table 1 MS parameters for the analysis of 6 kinds of PAEs

目标物	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	DP/V	CE/V	EP/V	CXP/V
DPRP	251.4	149*	53	19	10	10
		191.3		12	10	10
		205.1*		11	10	8
BBP	313.3	149.1	70	18	10	7
		239.1		10	10	10
		149.1*		30	10	10
DCHP	331.2	230.8	50	13	10	15
		249.2		14	10	15
		149.3*		19	10	10
DHXP	335.3	233.1	70	12	10	10
		149*		19	10	10
		247.4		12	10	10
DHP	363.6	249.3*	75	11	10	10
		101.1		17	10	10
		149*		19	10	10

表中\*表示定量离子

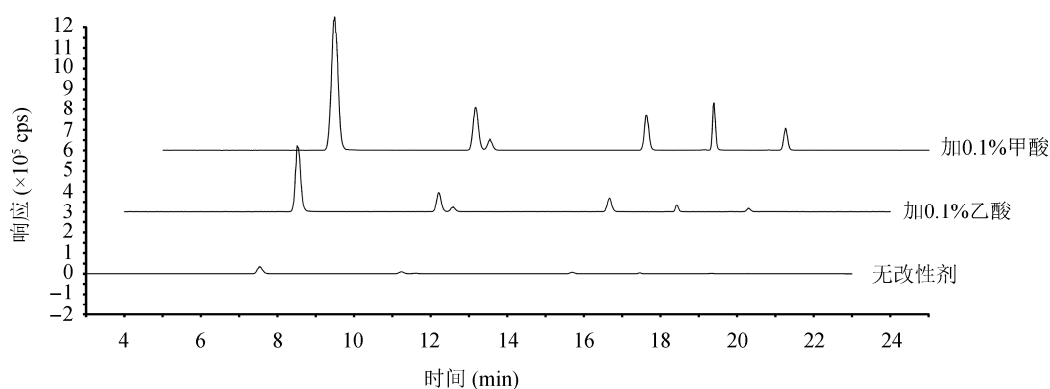


图 1 流动相改性剂的影响

Fig. 1 Effect of mobile phase modifier

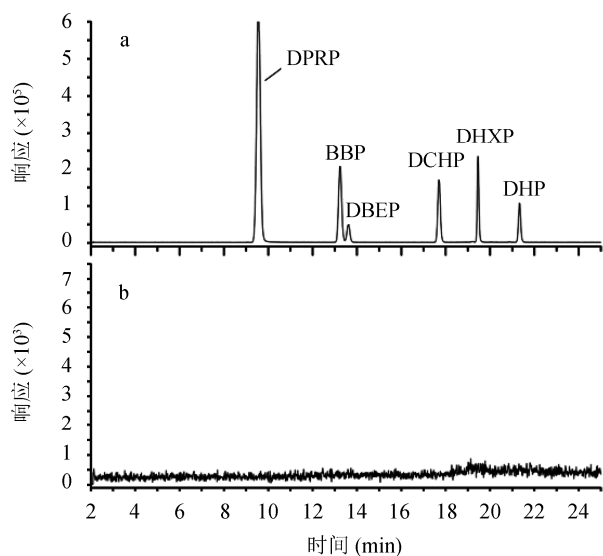


图2 6种邻苯二甲酸酯的多反应监测离子色谱图(a为5 ng/mL标准溶液, b为空白溶剂)

Fig. 2 MRM chromatograms of 6 kinds of PAEs (a: 5 ng/mL standard solution, b: blank solution)

### 3.3 GPC 条件的优化

将6种目标化合物的混合标准溶液(浓度均为0.1  $\mu\text{g/mL}$ ),按2.2.3中的方法进行GPC处理,采用分段收集的方法确定收集时间。前12 min收集为一个馏分,12 min后每2 min收集一个馏分,按2.2.2色谱条件进HPLC-MS/MS分析。根据分析结果,得到6种目标化合物的流出曲线(见图3)。由图3可知,6种邻苯二甲酸酯类化合物的收集时间为14~30 min。

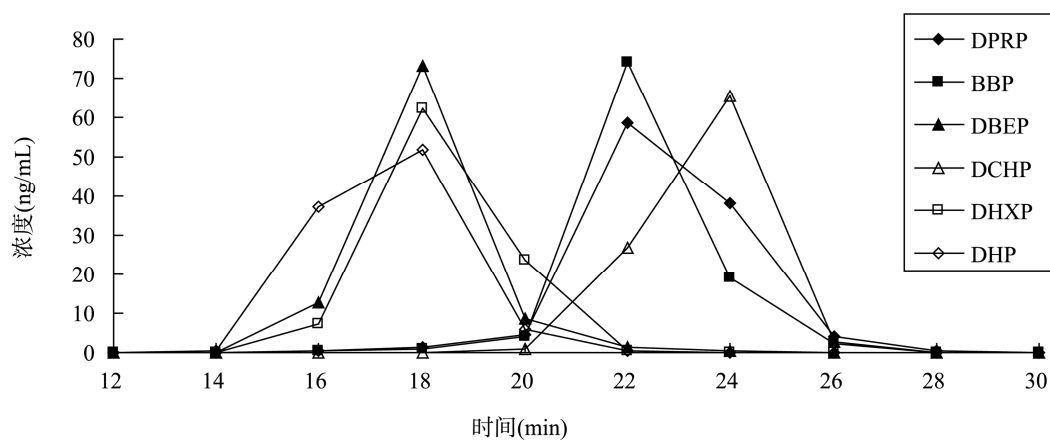


图3 6种邻苯二甲酸酯的淋洗曲线

Fig. 3 Elution curve of 6 kinds of PAEs

### 3.4 干扰的排除

由于塑料制品的广泛使用,邻苯二甲酸酯类增塑剂的污染无所不在。因此,实验中应尽量避免使用塑料制品;实验中使用的有机试剂均经过重蒸,确认无该类物质残留后才能使用;玻璃器皿在使用前用经过重蒸的丙酮浸泡24 h后烘干方可使用。从图2中空白试剂的谱图中可见,本实验中使用的仪器、器具、试剂等对目标物的测定没有干扰。

### 3.5 线性范围与检测限

将6种邻苯二甲酸酯类物质的混合标准溶液用甲醇稀释成一系列标准工作液,按2.2.2项中的测定条件进行分析,以目标物的浓度为横坐标,目标物的质谱响应强度为纵坐标,得到6种邻苯二甲酸酯类物质的标准曲线,其线性相关系数均大于0.999。方法的检测限(LOD)与定量限(LOQ)分别以样品基质的3倍和10倍信噪比(S/N)计算,结果见表2。从表2中可以看出,本方法灵敏度高,检测限远低于GB/T 21911-2008,能达到0.01~0.04  $\mu\text{g/kg}$ 。

表2 6种邻苯二甲酸酯的线性范围、检测限及定量限结果  
Table 2 Linear ranges, limit of detection and limit of quantification of 6 kinds of PAEs

目标物	线性范围(ng/mL)	LOD( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ( $\mu\text{g/kg}$ )
DPRP	0.2~100	0.01	0.04
BBP	0.2~100	0.01	0.04
DCHP	0.2~100	0.01	0.04
DHXP	0.2~100	0.01	0.04
DHP	0.2~100	0.01	0.04
DBEP	1.0~100	0.04	0.2

### 3.6 准确度与精密度

在制成匀浆的空白样品中加入 6 种邻苯二甲酸酯类物质的混合标准溶液, 混匀, 4 °C 冷藏避光放置 24 h, 制成低、中、高 3 个浓度水平的加标样品, 进行添加回收试验, 每个浓度水平进行 6 次重复实验, 平均回收率和精密度(RSD%)结果见表 3。

### 3.7 实际样品的检测

采用本文建立的方法对市售塑料包装类食品(包括 6 个火腿肠样品、3 个培根样品、2 个猪瘦肉样品、5 个果冻样品、2 个酸奶样品和 1 个水果酥样品)中邻苯二甲酸丁苄酯等 6 种邻苯二甲酸酯类化合物进行了检测, 选择的 6 种目标化合物中 DPRP、DHXP、DBEP 在所检测的 19 个食品样品中均未发现, BBP、DCHP 的检出率较高(分别为 42.1%和 31.6%), 含量在 0.04~0.77  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间, DHP 的检出率较低(仅 2 个样品检出), 含量在 0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下。图 4 为某品牌火腿肠样品的色谱图。

## 4 结 论

本文建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定食品中 6 种邻苯二甲酸酯类化合物的含量。实验结果表明, 该方法简便、快捷, 灵敏度高、专属性好, 可为食品中的邻苯二甲酸酯类物质的检测提供参考。

表 3 3 个添加水平的回收率和精密度( $n=6$ )

Table 3 Recoveries and precisions for blank sample spiked at 3 different levels ( $n=6$ )

目标物	添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率 (%)	RSD(%)	
			日内	日间
DPRP	2.0	81.9	3.0	5.4
	20.0	85.3	2.4	7.8
	50.0	90.2	5.9	8.3
BBP	2.0	93.6	4.4	6.7
	20.0	91.7	3.4	5.5
	50.0	102.5	4.9	4.9
DCHP	1.0	103.9	5.7	7.3
	20.0	99.3	3.6	5.7
	50.0	98.2	6.9	7.1
DHXP	1.0	89.6	5.5	6.1
	20.0	93.7	7.2	7.9
	50.0	91.5	4.4	6.7
DHP	1.0	87.0	5.6	6.5
	20.0	92.3	6.4	7.7
	50.0	95.9	6.9	9.6
DBEP	1.0	91.7	1.9	6.7
	20.0	89.3	3.2	5.5
	50.0	93.5	3.0	4.6

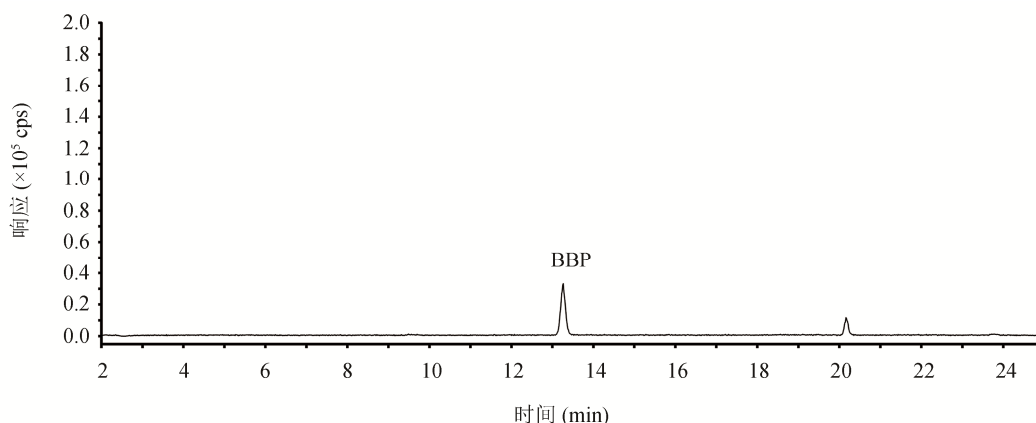


图 4 样品 MRM 色谱图

Fig. 4 MRM chromatogram of sample

## 参考文献

- [1] Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, *et al.* Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(15): 5564–5570.
- [2] 董夫银, 闫杰. 欧盟及美国禁用邻苯二甲酸酯的法规及其出台始末[J]. *检验检疫科学*, 2006, 16(3): 78–80.  
Dong FY, Yan J. Regulations of EU and American on disabled PAEs, and the beginning and end of their introduction [J]. *Inspect Quarant Sci*, 2006, 16(3): 78–80.
- [3] 王小逸, 林兴桃, 容慧明, 等. 北京地区家庭中邻苯二甲酸酯类环境污染物的调查[J]. *环境与健康*, 2007, 24(10): 820–821.  
Wang XY, Lin XT, Ke HM, *et al.* Investigation of environmental pollutants of PAEs in Beijing families [J]. *J Environ Heal*, 2007, 24(10): 820–821.
- [4] 李波平, 林勤保. PVC 包装材料中化学物向食品迁移的研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(8): 197–199.  
Li BP, Lin QB. Review on the migration of chemicals from PVC plastic packaging materials to foodstuffs [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007, 28(8): 197–199.
- [5] 黄永辉. SPE-GC-MS 法同时测定奶粉中 18 种邻苯二甲酸酯迁移量[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(11): 167–171.  
Huang YH. Simultaneous determination of 18 phthalate acid esters migration in milk powder by solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Res Dev*, 2010, 31(11): 167–171.
- [6] 王小逸, 林兴桃, 容慧明, 等. 邻苯二甲酸酯类环境污染物健康危害研究新进展[J]. *环境与健康杂志*, 2007, 24(9): 736–738.  
Wang XY, Lin XT, Ke HM, *et al.* Researches of effects of phthalate esters on rodents and human [J]. *J Environ Heal*, 2007, 24(9): 736–738.
- [7] Guo BY, Wen B, Shan XQ, *et al.* Separation and determination of phthalates by micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1095: 189–192.
- [8] Carrillo JD, Martinez MP, Tena MT. Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry use of deuterated phthalates as internal standards [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1181: 125–130.
- [9] Caroline S, Mireille MV, David B, *et al.* Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1072: 233–242.
- [10] 徐向华, 方晓明, 丁卓平, 等. 高效液相色谱测定牛奶中邻苯二甲酸酯的方法研究[J]. *化学通报*, 2008, 6: 420–424.  
Xu XH, Fang XM, Ding ZP, *et al.* Determination of phthalic acid esters in milk by high performance liquid chromatography[J]. *Chem Bull*, 2008, 6: 420–424.
- [11] 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. *色谱*, 2007, 25(5): 766–767.  
Liu C, Li LS, Wang SW, *et al.* Determination of phthalates in drinks by HPLC-ESI/MS [J]. *Chin J Chromatogr*, 2007, 25(5): 766–767.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



肖家勇, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: xiaojy@hn.ciq



王利兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。  
E-mail: Wanglb@hn.ciq