

实验技术与方法

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法同时测定饮料中
11种磷酸酯类增塑剂含量凌云¹, 雍炜¹, 何佩霞^{1,2}, 毕静波^{1,2}, 姚美伊¹, 姚桂红¹, 张峰¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2. 中国医科大学, 辽宁 沈阳 110122)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(UPLC-MS/MS)同时测定饮料中11种磷酸酯类增塑剂含量的检测方法。方法 饮料样品用乙腈液液萃取,采用N-丙基乙二胺(PSA)进行固相基质分散净化,C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm)分离,0.1%甲酸水溶液和甲醇为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾离子源,正离子模式进行多反应监测。结果 11种目标物的定量限在2.5~50 μg/L之间,加标浓度范围内,平均回收率在82.4%~113.0%之间,相对标准偏差(RSD)在3.8%~17.6%之间。结论 该方法简单快速,灵敏度高,准确度高,可用于饮料中磷酸酯类增塑剂的风险监测。

关键词:超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱;磷酸酯;增塑剂;饮料

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)06-0528-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.06.005

Simultaneous determination of organophosphate ester plasticizers used in beverage

by ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry

LING Yun¹, YONG Wei¹, HE Peixia^{1,2}, BI Jingbo^{1,2}, YAO Meiyi¹, YAO Guihong¹, ZHANG Feng¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

2. China Medical University, Liaoning Shenyang 110122, China)

Abstract: Objective A method was developed for the simultaneous determination of 11 organophosphate ester plasticizers in beverage by ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was liquid-liquid extracted with acetonitrile, and purified by matrix solid dispersion using primary secondary amine (PSA). The compounds were separated on a C₁₈ chromatographic column (2.1 mm×100 mm, 2.5 μm) with the gradient elution of 0.1% formic acid aqueous solution and methanol as mobile phase. The analytes were detected by electrospray ionization source in the positive ion mode and multiple reactions monitoring mode. **Results** The result showed that the limits of quantification were in the range of 2.5-50 μg/L, the average spiked recoveries were in the range of 82.4%-113.0%, and the relative standard deviations (RSD) were in the range of 3.8%-17.6%. **Conclusion** This method was simple, rapid, sensitive, accurate, and could be used for the monitoring and supervision of organophosphates in beverage.

Key words: Ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry; organophosphate; plasticizer; beverage

食品接触材料的种类繁多,尤其是树脂类,在食品包装行业应用非常广泛,其在生产过程中会加入增塑剂、抗氧剂、光稳定剂、着色剂等添加剂以增强使用性能,但食品包装材料与食品接触过程中,这些添加剂会迁移至食品内,从而对人体健康造成

威胁。为此欧盟 2002/72/EC^[1] 以及我国 GB 9685—2016《食品安全国家标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准》^[2] 中规定了食品接触材料中添加剂的最大使用量及特定迁移量等指标以规范添加剂的使用。饮料作为人们生活中的日常饮品,种类繁多、消费量大,其包装材料主要为聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)等材料,这些树脂产品中也会加入添加剂,对于树脂中添加剂的安全性评价是以材料中目标物在食品模拟物中的迁移量作为评价依据,但模拟物与真实样品存在差距,我国 GB 31604.1—2015《食品安全

收稿日期:2019-09-12

基金项目:国家重点研发计划课题(2017YFC1601305)

作者简介:凌云 女 研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:lingyun_505@163.com

通信作者:张峰 男 研究员 研究方向为分析化学

E-mail:fengzhang@126.com

国家标准《食品接触材料及制品迁移试验通则》^[3]中也规定对于已与食品接触的材料及制品,应直接检测与之接触的食品中某种或某类物质的特定迁移量,因此有必要对实际样品中目标物的迁移量进行测定。

有机磷酸酯类添加剂具有很好的增塑性,同时具备阻燃、润滑等功能,在家具、建材、纺织品以及食品包装材料等领域广泛使用,但由于其具有生物累积性,对人体有一定危害^[4-6]。目前我国批准使用的食品接触用磷酸酯类增塑剂有 2 种,包括烷烃取代磷酸酯类和芳香烃取代磷酸酯类,分别为磷酸三乙酯和 2-乙基己基二苯基磷酸酯,其中 2-乙基己基二苯基磷酸酯最小特定迁移量为 2.4 mg/kg,并被限制用于接触水性食品^[4]。其他种类如烷烃取代有机磷酸酯类[磷酸三甲酯、磷酸三正丁酯、磷酸三异丁酯、磷酸三丁氧乙酯、磷酸三(2-乙基己基)酯]、卤代烷烃有机磷酸酯类[磷酸三(1-氯-2-丙基)酯、磷酸三(2-氯乙基)酯]、芳香烃取代有机磷酸酯类(磷酸三甲苯酯、磷酸甲苯二苯酯)等也具有增塑功能,目前还没有列入食品接触材料及制品中添加剂的使用标准,可能被违规添加,应对其进行有效监测。

目前关于有机磷酸酯类的检测方法主要为气相色谱法^[7-8]、气相色谱-质谱法^[9-12]、高效液相色谱-串联质谱法^[13-16]等。气相色谱-质谱主要对目标物的碎片离子进行检测,对于食品等基质复杂的样品,抗干扰弱,而液相色谱-三重四级杆质谱是扫描母离子和子离子的二级质谱,特异性强,具有极高的准确度及灵敏度,在食品中有害物检测领域应用非常广泛。现有方法主要针对纺织品、玩具等材料,但是土壤等环境样品以及尿液等生物标本尚没有食品中磷酸酯类化合物迁移量的测定方法。因此类药物被限制用于接触水性食品,所以本试验应用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱,建立了同时测定饮料中 11 种磷酸酯类增塑剂(6 种烷烃取代有机磷酸酯、2 种卤代烷烃有机磷酸酯、3 种芳香烃取代有机磷酸酯)含量的分析方法,为食品中此类化合物的风险监测提供技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

超高效液相色谱仪(配有自动进样器和柱温箱,美国 Waters),QTRAP 5500 质谱仪[配备电喷雾离子源(ESI),美国 Applied Biosystems],高速离心机,50、10 ml 玻璃离心管,不锈钢针孔过滤器(美国 Millipore)。

磷酸三甲酯(TMP,CAS:512-56-1)、磷酸三乙酯(TEP,CAS:78-40-0)、磷酸三正丁酯(TnBP,CAS:126-73-8)、磷酸三异丁酯(TiBP,CAS:126-71-6)、磷酸三丁氧乙酯(TBEP,CAS:78-51-3)、磷酸三(1-氯-2-丙基)酯(TCPP,CAS:13674-84-5)、磷酸三甲苯酯(TCP,CAS:563-04-2)、磷酸甲苯二苯酯(CDPP,CAS:26444-49-5)、三苯基氧化膦(TPPO,CAS:791-28-6)、磷酸三(2-乙基己基)酯(TEHP,CAS:78-42-2)、磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP,CAS:115-96-8),纯度均 $\geq 95\%$,均购自德国 Ehrenstorfer。甲醇、水均为质谱级,乙腈为色谱纯,甲酸(纯度 98%),*N*-丙基乙二胺(PSA,40 μm ,美国 Agilent)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取上述 11 种磷酸酯类标准品各 0.100 0 g,用甲醇溶解并定容至 10 ml,配制成 10 mg/ml 的各标准物储备液,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。根据各化合物的响应,准确移取各标准储备液于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容,配制成混合标准工作液,再用乙腈-水溶液(1:1, *V/V*)逐级稀释,制备系列混合标准溶液。

1.2.2 样品前处理

取样品 2 ml 于 50 ml 玻璃离心管内(碳酸类饮料需超声脱气,有固体悬浮物类饮料需离心),加入 10 ml 乙腈,1 g NaCl 涡旋混合 2 min,4 000 r/min 离心 5 min(离心半径 6.8 cm),取 5 ml 上清液加入 0.5 g PSA 涡旋混合 2 min,4 000 r/min 离心 5 min(离心半径 6.8 cm),取上清液过不锈钢滤膜,滤液用纯水 1:1 稀释后进样。

1.2.3 仪器条件

色谱:Waters Xbridge T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,2.5 μm),流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱见表 1。流速:0.4 ml/min,进样量:5 μl 。

表 1 梯度洗脱

Table 1 Gradient elution

时间/min	A/%	B/%
0.00	95.0	5.0
2.00	95.0	5.0
6.00	40.0	60.0
15.00	0.0	100.0
30.00	0.0	100.0
31.00	95.0	5.0
35.00	5.0	5.0

质谱:电喷雾离子源正离子;毛细管电压:5.5 kV;离子源温度:600 $^{\circ}\text{C}$;气帘气:137.9 kPa,雾化气:275.8 kPa;辅助气:275.8 kPa。各化合物采用多反应监测(MRM)方式,见表 2。

表2 11种化合物的MRM监测条件

Table 2 MRM parameters of 11 compounds

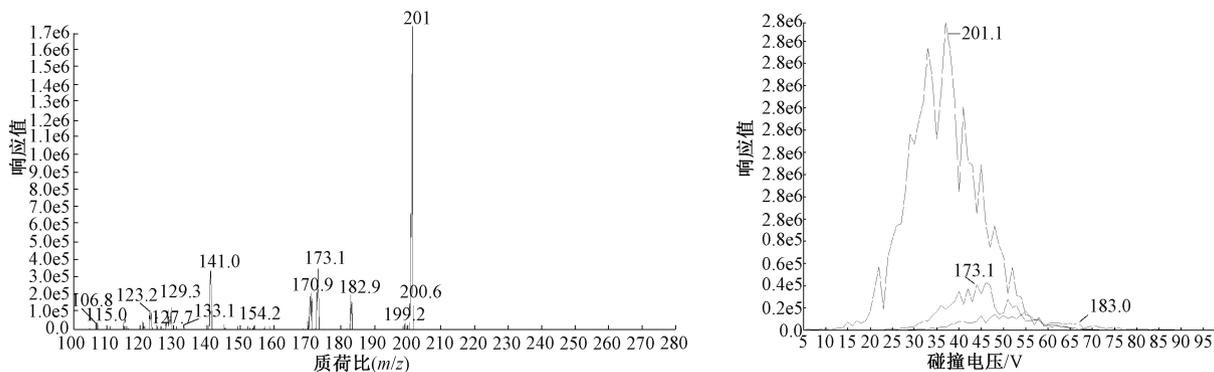
化合物	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	碰撞电压 /V	保留时间 /min
TMP	141.1	109.1 [*] /126.9	22/20	4.6
TEP	183.2	127.0 [*] /155.1	15/11	8.0
TnBP	267.2	211.1 [*] /155.1	11/13	15.6
TiBP	267.3	211.2 [*] /155.2	11/13	15.3
TBEP	399.3	299.1 [*] /199.2	17/21	16.7
TCPP	329.0	253.0 [*] /175.0	15/15	11.5
TCP	369.2	243.0 [*] /279.2	39/36	18.3
CDPP	341.1	265.1 [*] /229.2	35/35	15.7
TPPO	279.0	201.1 [*] /183.0	35/51	10.6
TEHP	435.0	323.3 [*] /211.2	11/14	25.2
TCEP	286.9	225.0 [*] /98.8	18/32	8.8

注：^{*}为定量离子

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

将待测目标物的标准工作液 50 ng/ml 通过蠕



注：左图为子离子扫描结果，右图为碰撞电压优化结果

图1 TPPO的质谱优化

Figure 1 Optimization of TPPO

2.2 液相色谱条件的优化

以11种目标物的混合标准溶液进行优化试验。因11种目标物的质谱检测选择的是正离子扫描模式，甲醇和乙腈作为流动相中的有机相，对目标物的电离起到重要作用，所以首先对甲醇-水体系及乙腈-水体系进行优化试验。结果表明，使

用甲醇-水体系时目标物的响应较好，而使用乙腈-水体系时，3种氯代化合物TCPP、TCEP、TCP的响应降低10倍以上，这与在正离子模式下甲醇是质子给予试剂有关，甲醇作为流动相更有利于正离子模式下氯代磷酸酯类化合物的离子化。11种目标物在最优条件下的谱图见图2。

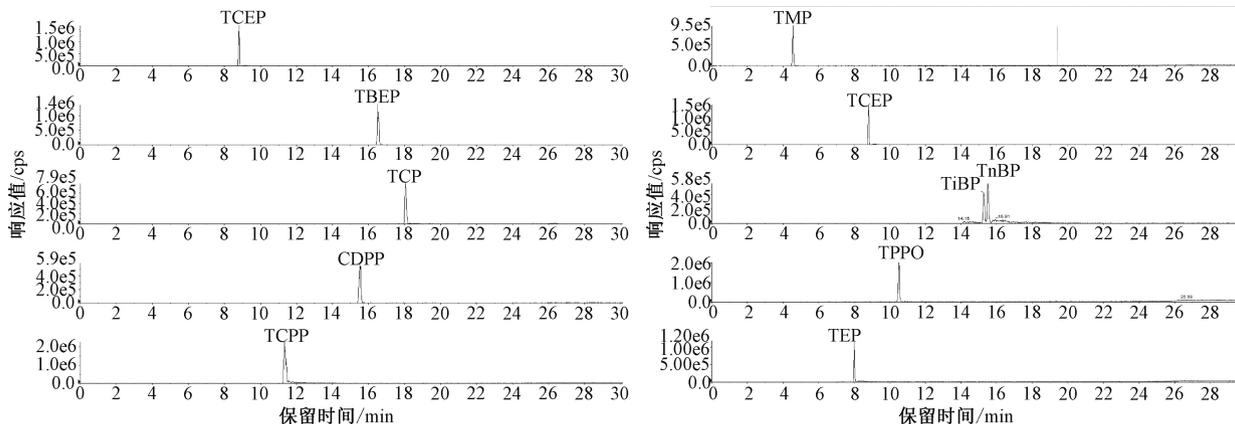


图2 11种化合物谱图

Figure 2 Chromatography of 11 compounds

动泵, 5 μl/min 流速直接注入质谱进行全扫描分析, 在正离子/负离子模式下, 找到目标物的准分子离子峰 [M+H]⁺、[M+NH₄]⁺、[M+Na]⁺、[M-H]⁻ 等, 11种化合物均为正离子模式下进行监测, 且丰度最高的准分子离子峰 [M+H]⁺ 作为母离子, 通过子离子扫描模式, 找出目标物的碎片离子, 以丰度相对高的离子作为碎片离子, 并对碰撞电压进行优化。以 TPPO 为例, 在正离子模式下, 对准分子离子峰 m/z 279.0 进行二级子离子扫描, 见图 1, 得到主要的离子碎片 [M-C₆H₆+H]⁺ m/z 201.1、[M-C₆H₈O+H]⁺ m/z 183.0、[M-C₇H₆O+H]⁺ m/z 173.1, 再对碎片在 MRM 监测模式下进行碰撞电压的优化, 得到 3 个碎片 m/z 201.1、m/z 183.0、m/z 173.1 的最优碰撞电压在分别 30~40、45~55、37~45 V 之间。所有目标物的母离子、子离子及碰撞电压优化结果见表 2。

2.3 样品前处理条件的优化

饮料样品中含有水溶性糖类、色素等极性干扰物,采用液液萃取的方式对 11 种目标物进行萃取,以去除水溶性杂质,进一步采用 PSA 进行净化去除极性干扰成分。在液液分配步骤中,通过加入 NaCl 使乙腈相与水相分层,从乙腈相中提取出目标物。

2.4 线性关系、检测限和定量限

配制 11 种目标物的系列混合标准溶液,以目标

组分的峰面积为纵坐标、相应的质量浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标绘制标准曲线。结果表明,相关系数(R^2)均大于 0.99,各目标物在范围内具有较好的线性关系,取空白基质加标样品,根据 1.2.2 进行样品前处理,目标物信噪比(S/N)约为 10 时的信号浓度作为方法的定量限,见表 3。结果表明 11 种化合物的定量限在 2.5~50 $\mu\text{g/L}$ 之间,方法具有较高的灵敏度,满足特定迁移量测定要求。

表 3 11 种化合物的线性方程、线性范围、相关系数及方法定量限

Table 3 Linear equation, linear, correlation coefficients and limits of quantification of 11 compounds

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性方程	相关系数 R^2	定量限/ $(\mu\text{g/L})$
TMP	0.25 ~ 500	$y = 8.63 \times 10^5 x + 6.92 \times 10^3$	0.999	2.5
TEP	1 ~ 100	$y = 5.46 \times 10^5 x + 7.89 \times 10^4$	0.998	10
TnBP	0.25 ~ 125	$y = 5.98 \times 10^5 x + 7.96 \times 10^4$	0.999	2.5
TiBP	0.5 ~ 50	$y = 5.74 \times 10^5 x + 8.09 \times 10^4$	0.999	5.0
TBEP	0.5 ~ 50	$y = 6.07 \times 10^5 x + 1.08 \times 10^5$	0.999	5.0
TCPP	5 ~ 1 000	$y = 6.96 \times 10^4 x + 1.39 \times 10^5$	0.998	50
TCP	0.5 ~ 100	$y = 4.25 \times 10^5 x + 7.92 \times 10^4$	0.999	5.0
CDPP	2.5 ~ 500	$y = 1.93 \times 10^5 x + 8.20 \times 10^4$	0.998	25
TPPO	50 ~ 500	$y = 3.24 \times 10^4 x + 1.93 \times 10^5$	0.992	50
TEHP	5 ~ 250	$y = 1.98 \times 10^4 x + 6.50 \times 10^4$	0.992	50
TCEP	2.5 ~ 500	$y = 1.69 \times 10^4 x + 1.02 \times 10^4$	0.998	25

2.5 基质效应

液相色谱-电喷雾质谱法中,离子源为大气压电离方式,目标物的电离受溶剂环境及离子源结构的影响较大,尽管样品前处理过程已经去除了很多杂质成分,但在研究中仍发现残存的食物基质对目标物的响应有较大的影响,因此在食品中有害物的检查方法中开展基质效应研究是必要的。本试验采用外标法定量,基质效应(ME)采用空白样品提取液配制标准溶液的标准曲线斜率($Slope_A$)与纯溶剂配制标准溶液的标准曲线斜率($Slope_B$)之比进行评价,即 $ME = (Slope_A/Slope_B) \times 100\%$ 。 $ME > 1$,表现为基质增强作用; $ME < 1$,表现为基质抑制作用。本试验采用 3 种饮料(可乐、苹果汁、乳饮料)样品考察基质效应,结果表

明,11 种目标物的基质效应在 1.2~1.8 之间,基质效应不明显,故采用溶剂标准曲线对各目标物进行定量。

2.6 本底的消除

磷酸酯类用途广泛,属于环境污染物之一,在大气、灰尘、水体中均有残留,给高灵敏度的检测方法带来了背景干扰。本试验中发现,有两种目标物 TBEP、TCP 存在背景干扰,使用质谱级水和甲醇作为流动相及采用 peek 管作为流动相的管路等,仍无法去除这两种组分。最终,在进样器和溶剂混合器间增加隔离柱,使背景干扰峰与目标物峰的保留时间不同,从而有效区分目标物及干扰峰,干扰峰的出峰时间晚于目标物,相差 0.3 min,因此提高了目标物的检测灵敏度及准确度,见图 3。

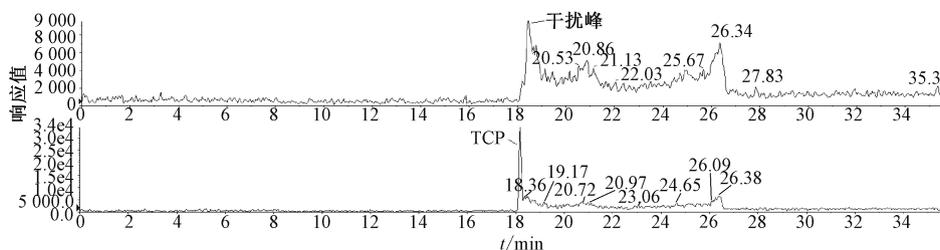


图 3 背景干扰的消除

Figure 3 Elimination of background

2.7 方法的回收率和精密度

选择空白饮料样品按照低、中、高 3 个水平分别添加 11 种目标物的混合标准工作液,按照本试验分析方法进行测定,每个水平平行测试 6 份样品,计算

每种化合物的平均回收率及相对标准偏差(RSD)。结果表明,11 种目标物的平均回收率在 82.4%~113.0%之间, RSD 在 3.8%~17.6%之间(见表 4),本方法具有良好的准确性。

表4 空白加标试验的平均回收率和精密度($n=6$)

Table 4 Average recoveries and relative standard deviations

of spiked test			
化合物	加标水平/($\mu\text{g/L}$)	平均回收率/%	RSD/%
TMP	2.50	90.4	13.7
	50.0	103.2	9.2
	250.0	103.0	8.4
TEP	10.0	86.3	15.4
	50.0	97.8	11.5
	250.0	102.3	8.4
TnBP	2.50	105.0	9.1
	50.0	106.8	3.8
	250.0	103.4	3.9
TiBP	5.00	103.9	10.6
	50.0	99.2	12.5
	250.0	102.4	5.6
TBEP	5.00	90.2	12.0
	50.0	96.5	5.8
	250.0	98.6	5.4
TCPP	50.0	93.6	12.5
	250.0	107.0	10.3
	500.0	108.0	6.4
TCP	5.00	107.0	12.6
	50.0	103.0	5.7
	250.0	94.0	4.5
CDPP	25.0	96.8	13.8
	50.0	96.5	3.8
	250.0	99.7	3.9
TPPO	25.0	83.4	15.4
	50.0	90.4	13.7
	250.0	110.0	8.0
TEHP	50.0	82.4	17.6
	250.0	105.0	12.4
	500.0	103.0	10.6
TCEP	25.0	103.2	17.2
	50.0	113.0	9.2
	250.0	99.9	6.9

2.8 实际样品的测定

采用本方法检测了市售的20份饮料样品,未有样品检出含有这11种磷酸酯类增塑剂。

3 小结

本试验建立了高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定饮料中11种磷酸酯类增塑剂的含量。该方法准确快速,灵敏度高,应用于实际样品检测时重复性良好,可为食品中此类化合物的风险监测提供技术支撑。

参考文献

- [1] 欧盟委员会. 2002/72/EC 关于与食品接触的材料和制品的指令[S]. 欧盟委员会, 2002.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家

标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准: GB 9685—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品接触材料及制品迁移试验通则: GB 31604.1—2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [4] WEI G L, LI D Q, ZHOU M N, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: sources, occurrence, toxicity and human exposure [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196(9): 29-46.
- [5] FARHAT A, CRUMP D, CHIU S, et al. In ovo effects of two organophosphate flame retardants-TCPP and TDCPP-on pipping success, development, mRNA expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos [J]. *Toxicological Sciences*, 2013, 134(1): 92-102.
- [6] MEEKER J D, STAPLETON H M. House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(3): 318-323.
- [7] 吴刚, 汤富彬, 赵珊红. 加速溶剂萃取-气相色谱测定纺织品中磷酸酯类增塑剂[J]. *丝绸*, 2014, 51(3): 29-33.
- [8] GARCIA M, RODRIGUEZ I, CELA R. Microwave-assisted extraction of organophosphate flame retardants and plasticizers from indoor dust samples [J]. *Talanta*, 2009, 79(3): 824-829.
- [9] 望秀丽, 于文佳, 卫壁文, 等. 加速溶剂萃取-气相色谱-质谱法测定塑料中7种有机磷酸酯类阻燃剂和增塑剂[J]. *分析试验室*, 2017, 36(1): 109-113.
- [10] ARAGON M, MARCE R M, BORRULL F. Determination of phthalates and organophosphate esters in particulated material from harbour air samples by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012, 101(1): 473-478.
- [11] MA Y, HITES R A. Electron impact, electron capture negative ionization and positive chemical ionization mass spectra of organophosphorus flame retardants and plasticizers [J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, 48(8): 931-936.
- [12] 赵海娟, 张文洁, 郑美玲, 等. GC-MS 法测定烟用包装材料中非邻苯类增塑剂[J]. *包装工程*, 2019, 40(9): 59-65.
- [13] 李佩, 曾祥英, 崔君涛, 等. 液相色谱-串联质谱法测定尿液中7种有机磷酸酯代谢物[J]. *分析化学*, 2017, 45(11): 1648-1654.
- [14] CHEN D, LETCHER R J, CHU S G. Determination of non-halogenated, chlorinated and brominated organophosphate flame retardants in herring gull eggs based on liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1220(11): 169-174.
- [15] 张楠, 张斌, 禹伟腾, 等. 超高效液相适配-质谱法测定纺织品中禁用的9种有机磷阻燃剂[J]. *分析试验室*, 2015, 34(12): 1411-1414.
- [16] 高欣, 郑如兰, 戴传云, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定儿童玩具中氯系有机磷酸酯类阻燃剂[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(12): 1507-1510.