

采用快速、灵敏和耐用的 GC/MS 或 LC/MS 方法检测食品中的邻苯二甲酸酯类化合物

应用报告

食品安全

作者

Jimmy Chan
台湾安捷伦科技有限公司
台北 104
台湾

冯爽
安捷伦科技有限公司（中国）
广州 510613
中国

摘要

近期发生的一系列国际食品安全危机事件，使人们更加关注适合广泛质谱平台、能够灵敏可靠地分析食品中污染物方法的快速开发。最近的例子就是在台湾出现的果汁饮料和其他食品中非法添加邻苯二甲酸酯类化合物事件。安捷伦公司已开发出在 GC/MS 和 LC/MS 上运行的高灵敏度定量分析方法，用于检测食品中的邻苯二甲酸酯类化合物。



Agilent Technologies

引言

邻苯二甲酸的酯类化合物称为邻苯二甲酸酯，常用做增塑剂以提高塑料及其制品的柔韧性、透明度、耐用性和使用寿命。邻苯二甲酸酯类化合物用途广泛，可以作为药丸的肠溶衣材料，也可以用于乳剂和混悬剂的制备。我们可以在许多产品中发现它的身影，比如粘合剂和胶水、电子器件、个人护理产品、医疗设备、管材、包装材料和儿童玩具等。由于这些化合物并非与塑料共价结合而只是混合，所以它们很容易释放到环境中去。研究表明，邻苯二甲酸酯类化合物可以引起许多健康问题，包括哮喘、内分泌紊乱、生殖功能异常、癌症、低出生体重、自闭症和注意力缺陷多动症 (ADHD) 等。因此，欧盟 (EU)、美国 (USA)，以及其他一些国家已经开始监管邻苯二甲酸酯类化合物的暴露问题。从 2007 年开始，欧盟 (2005/84/EC) 即对六种邻苯二甲酸酯类化合物在儿童玩具中的使用进行了严格控制，而美国从 2009 年起也开始执行类似法规 (表 1)。

2011 年 5 月，作为起云剂 (乳化剂) 的替代品，邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯 (DEHP) 被发现非法添加到运动饮料、果汁、茶饮料、果酱和食品粉等产品中。起云剂能改善果汁等产品的外观。该事件中邻苯二甲酸酯类化合物被用作棕榈油的替代品。这些非法产品马上被召回，并且由于它们可能出口，当局随即又发布了一个全球通告。在中国大陆和台湾地区，任何一种邻苯二甲酸酯类化合物在食品中的最大允许量是 1ppm。

为了保护消费者不受这种不道德加工产品的伤害，建立可以快速检测食品中邻苯二甲酸酯类化合物的灵敏、可靠的分析方法非常必要。本应用报告描述了可灵敏检测包括当前美国和欧盟管控的六种该类化合物在内的邻苯二甲酸酯类化合物的方法，可于 GC/MS 和 LC/MS 平台上运行，使用单四极杆和三重四极杆质谱。GC/MS 方法可以检测少至 50ppb 的邻苯二甲酸酯类化合物，而 LC/MS 方法采用三重四极杆质谱时，灵敏度更高，可检测 1ppb 水平的该类化合物。两者的检测水平已足够确保上市食品中不含有超过美国、欧盟、中国大陆和台湾地区规定限量的邻苯二甲酸酯类化合物。

表 1. 最常见的邻苯二甲酸酯类化合物

化合物名称	首字母缩写词
邻苯二甲酸二丁酯	DBP
邻苯二甲酸丁苄酯	BBP
邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯	DEHP
邻苯二甲酸二正辛酯	DNOP
邻苯二甲酸二异壬酯	DINP
邻苯二甲酸二异癸酯	DIDP
邻苯二甲酸二甲酯	DMP
邻苯二甲酸二乙酯	DEP
邻苯二甲酸二丙酯	DPRP
邻苯二甲酸二丁酯	DBP
邻苯二甲酸二异丁酯	DIBP
邻苯二甲酸二甲氧基乙酯	DMEP
邻苯二甲酸二丙酯	DPP
邻苯二甲酸戊基异戊基酯	PIPP
邻苯二甲酸二异戊酯	DIPP
邻苯二甲酸二 (2-乙氧基乙基) 酯	DEEP
对苯二甲酸二乙基己基酯	DEHT
邻苯二甲酸二烯丙酯	DASP
邻苯二甲酸丁苄酯	BBP
邻苯二甲酸二丙基庚基酯	DPHP
邻苯二甲酸二环己酯	DCHP
邻苯二甲酸二己酯	DHP
邻苯二甲酸二甲苯基酯	BMPP
邻苯二甲酸丁辛酯	BOP
邻苯二甲酸二苄酯	DBZP
邻苯二甲酸二庚酯	DHEPP
邻苯二甲酸二异庚酯	DIHEPP
邻苯二甲酸己基乙基己基酯	HEHP
邻苯二甲酸苄丁酯	BBEP
邻苯二甲酸二异辛酯	DIOP
邻苯二甲酸二乙基己基酯	DEHP
邻苯二甲酸二辛酯	DOTP
邻苯二甲酸二壬酯	DNP
邻苯二甲酸双十一烷基酯	DUP
己二甲酸二 (2-乙基己基) 酯	DEHA
邻苯二甲酸二正己酯	DNHP

用黑体和斜体标明的六种邻苯二甲酸酯类化合物系美国和欧盟管控品种

实验部分

试剂与标准品

GC 标准品: 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP, CAS 84-74-2)、邻苯二甲酸丁苄酯 (BBP, CAS 85-68-7)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP, CAS 117-81-7)、邻苯二甲酸二正辛酯 (DNOP, CAS 117-84-0)、邻苯二甲酸二异癸酯 (DIDP, 26761-40-0)、邻苯二甲酸二异壬酯 (DINP, 28553-12-0) 购自 ChemService 公司 (West Chester, PA, 美国)。这些标准品溶于二氯甲烷中。

LC 标准品: 30 种邻苯二甲酸酯标准品均购自 Dr. Ehrentorfer GmbH 公司。单个邻苯二甲酸酯类化合物的贮备液配制为浓度为 100-1000 µg/mL 的甲醇溶液。制备校准曲线用的工作标准溶液系采用甲醇稀释贮备液配制, 每个邻苯二甲酸酯类化合物浓度为 10 µg/mL。

仪器

GC/MS 和 GC/MS/MS 实验于配备了 Agilent 5975C GC/MSD 或 7000B 三重四极杆 GC/MS 的 Agilent 7890A GC 系统上运行。LC/MS 和 LC/MS/MS 实验于配备了 Agilent 6140 单四极杆 LC/MS 或 Agilent 6400 系列三重四极杆 LC/MS 的 Agilent 1260 RRLC HPLC 系统上运行。仪器条件见表 2-4。

表 2. GC/MS 和 GC/MS/MS 条件

GC 运行条件

色谱柱	Agilent J&W DB-5MS Ultra Inert Capillary GC column, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (部件号 122-5532UI)
进样体积	1 µL
进样口温度	290 °C, 恒温
进样模式	不分流
柱温程序	120 °C 保持 1min, 以 20 °C/min 的速度上升到 300 °C, 保持 5min
后运行	300 °C 保持 5 min
载气	氮气, 1.2 mL/min
传输线温度	300 °C

Agilent 5975C 系列 GC/MSD (单四极杆) 条件

扫描模式	EI, SIM/Scan
采集参数	质量范围 50-500 amu

Agilent 7000B 三重四极杆 GC/MS 条件

模式	EI, MRM
源温度	230 °C
四极杆温度	Q1 和 Q2 = 150 °C
调谐文件	atunes.eiextune.xml
碰撞气流速	氮气 1.5mL/min, 氦气 2.25mL/min
检测器增益	15

表 3. 分离 30 种邻苯二甲酸酯类化合物的 LC/MS 条件

LC 运行条件						
色谱柱	分析: Agilent ZORBAX Eclipse Plus, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (部件号959741-912)					
柱温	25 °C					
进样体积	10 μL					
流动相	A = 重蒸水 B = 甲醇					
运行时间	6.0 min					
流速	0.5 mL/min					
梯度表	时间 (min)	0	2.0	5.0	5.5	5.51
	B%	60.0	80.0	100.0	100.0	60.0

Agilent 6410 MSD (单四极杆) LC/MS 系统条件

离子源	ESI, 正离子模式
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	4 L/min
雾化器压力	50 psig
毛细管电压 (正模式)	4000 V
扫描模式	SIM

表 4. 分离 13 种邻苯二甲酸酯类化合物的 LC/MS/MS 条件

LC 运行条件						
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902)					
柱温	50 °C					
进样体积	10 μL					
自动进样器温度	6 °C					
流动相	A = 重蒸水 B = 甲醇 +5.0mM 甲酸铵溶液					
运行时间	10 min					
流速	0.55 mL/min					
梯度表	1260 RRLC					
	时间 (min)	0	5.0	6.0	8	8.1
	流速 (mL/min)	0.2	0.55	0.55	0.55	0.55
	B%	90.0	90.0	95.0	95.0	100.0
	Agilent 1290 Infinity GC 系统					
	时间 (min)	0	5.0	8	8.1	
	流速 (mL/min)	0.2	0.55	0.55	0.55	
	B%	90.0	90.0	90.0	100.0	

Agilent 6400 系列三重四极杆 LC/MS/MS 条件

离子模式	ESI, 正离子模式
干燥气温度	350 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	40 psi
毛细管电压	4000 V
MRM 数据采集	分段 MRM (区段 1 为 0–3.5 min; 区段 2 为 3.5–8.0 min)
电子倍增管	50–100 V
电压增量 (Delta EMV)	

样品制备

GC/MS

三个饮用水样品由台湾食品工业发展研究所提供。用于检验样品制备方法可行性的红茶、运动饮料、橙汁和拿铁咖啡等四种饮料购自零售店。采用固相萃取 (SPE) 法代替传统的己烷液液萃取法处理样品，可以减少背景干扰，并加快提取过程。于玻璃套管中加入 5 g Agilent Chem Elut 材料 (部件号 198003)，然后加载 5 mL 水性样品，并使之完全浸入 Chem Elut 吸附剂中。吸附剂用二氯甲烷淋洗三次，每次 5 mL，洗脱出分析物并留下污染物。分析前用氮气将样品吹至 2.5 mL。

LC/MS

取饮料、食品粉、健康护理产品或烤制食品各 1 g，用 45 mL 甲醇提取，超声 20 min。样品提取液放冷至室温 (约 25-30 °C) 后，用甲醇定容到 50mL 量瓶中。分析前，将 1 mL 提取液离心 (3500 rpm) 10 min。

分析参数

采用的 MS 和 MS/MS 参数见表 5-8。

表 5. Agilent 5975 GC/MS 单四极杆 SIM 分析参数

编号	化合物	CAS 号	目标离子	Q1	Q2	Q3
1	DBP	84-74-2	149	150	223	205
2	BBP	85-68-7	149	91	206	238
3	DEHP	117-81-7	149	167	279	104
4	DNOP	117-84-0	279	149	167	261
5	DINP	28553-12-0	293	149	127	167
6	DIDP	26761-40-0	307	149	141	167

表 6. Agilent 7000B 三重四极杆 GC/MS 分析参数

编号	化合物	定量离子对	定性离子对
1	DBP	149→65@ 30 eV	149→93@ 20 eV 223→149@ 10 eV
2	BBP	149→65@ 30 eV	149→93@ 20 eV 206→149@ 10 eV
3	DEHP	149→65@ 30 eV	149→93@ 20 eV 279→149@ 15 eV
4	DNOP	279→71@ 10 eV	279→149@ 15 eV
5	DINP	293→71@ 10 eV	293→149@ 10 eV
6	DIDP	307→71@ 10 eV	307→149@ 10 eV

表 7. 采用 Agilent 6140 单四极杆 LC/MS 系统分离 30 种邻苯二甲酸酯类化合物的分析参数

化合物	m/z	Frag V
DMP	195.00	90
DEP	223.00	90
DPRP	251.00	90
DBP/DIBP	279.00	130
DMEP	283.00	130
DPP/PIPP/DIPP	307.00	130
DEEP	311.00	130
BBP	313.00	130
DPHP	319.00	130
DCHP	331.00	130
DHP/BMPP/BOP	335.00	130
DBZP	347.00	130
DHEPP/DIHEPP/HEHP	363.00	130
BBEP	367.00	130
DNOP/DIOP/DEHP/DEHT/DOTP	391.00	130
DNP/DINP	419.00	130
DIDP	447.00	130
DUP	475.00	130

Frag V = Fragmentation voltage (碎裂电压)

表 8. 采用 Agilent 6400 三重四极杆 LC/MS 系统分离 13 种邻苯二甲酸酯类化合物的分析参数

化合物	保留时间 (min)	MRM	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
DMP	0.98	195.1→163	30	57	5
		195.1→91.9			40
		195.1→77			40
DEP	1.05	223.1→177	30	72	1
		223.1→148.9			13
		223.1→65			45
DAP	1.07	247.1→189	50	72	1
		247.1→149			15
DPP	1.18	251.1→191	30	72	1
		251.1→149			9
DBP	1.39	251.1→65	30	72	53
		279.2→205.1			1
		279.2→149			9
BBP	1.35	279.2→120.9	30	72	37
		313.2→205			1
		313.2→148.9			5
DCP	1.84	313.2→91	30	72	25
		331.2→167			9
		331.2→148.9			21
DNHP	2.28	331.2→120.9	30	72	49
		335.2→233.1			1
		335.2→149			9
DEHP	3.96	335.2→120.9	100	140	45
		391→279			5
		391→167			15
DEHA	4.07	391→149	100	104	15
		371.3→129			9
		371.3→111			25
DNOP	4.45	371.3→55	50	104	53
		391.3→261.1			1
		391.3→149			9
DINP	5.41	391.3→120.9	50	104	53
		419.3→149			13
		419.3→71			21
DIDP	6.93	419.3→57	50	104	25
		447.3→149			25
		447.3→85			25
		447.3→71			25

结果与讨论

样品制备

该 GC 和 LC 方法运用成功的关键之一就是要求样品制备技术快速并且能够减少背景噪音。实验室中，其它来源的邻苯二甲酸酯类化合物污染有许多，比如来自塑料管和容器。谨慎仔细的样品制备对于获得没有污染和化学干扰产生的背景噪音的结果非常关键。GC 分析食品中邻苯二甲酸酯类化合物的一个传统样品处理方法，按照中国大陆标准 GB21911-2008 规定，系采用己烷进行液液萃

取。而采用 Agilent Chem Elut 固相萃取小柱代替上述传统方法制备样品更简便快速，整个操作不超过 10 min，并且消耗更少，邻苯二甲酸酯类化合物污染机会也更小。图1对比了采用 Chem Elut 固相萃取及传统液液萃取制备样品的分析状况，显然前者背景噪音低，无污染。

在 LC/MS 分析中，台湾 FDA 建立了一种甲醇提取并超声 20min 的全新方法，用于饮料、食品粉、健康护理产品和烤制食品的样品提取。样品制备前加入了一个内标，保证方法定量分析的准确性。

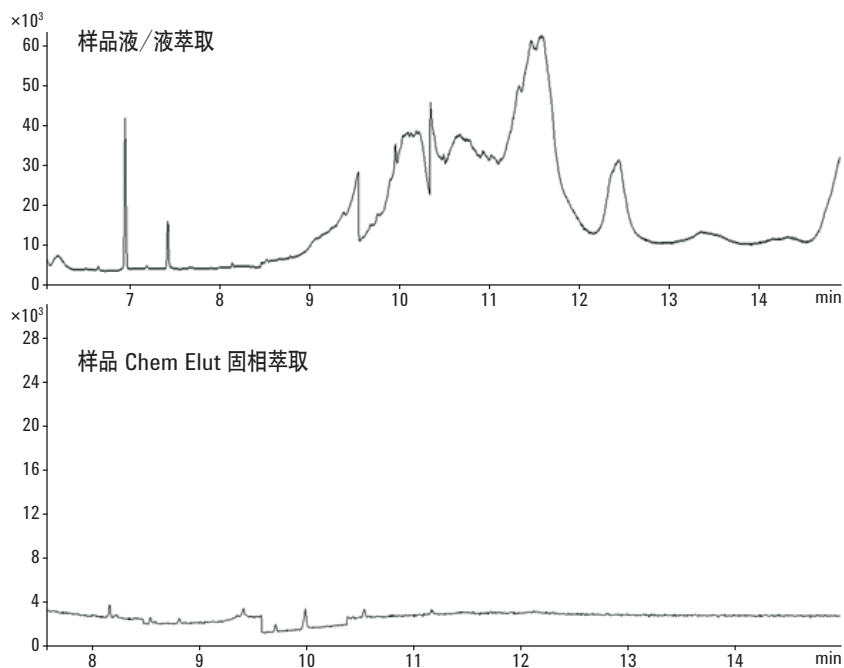
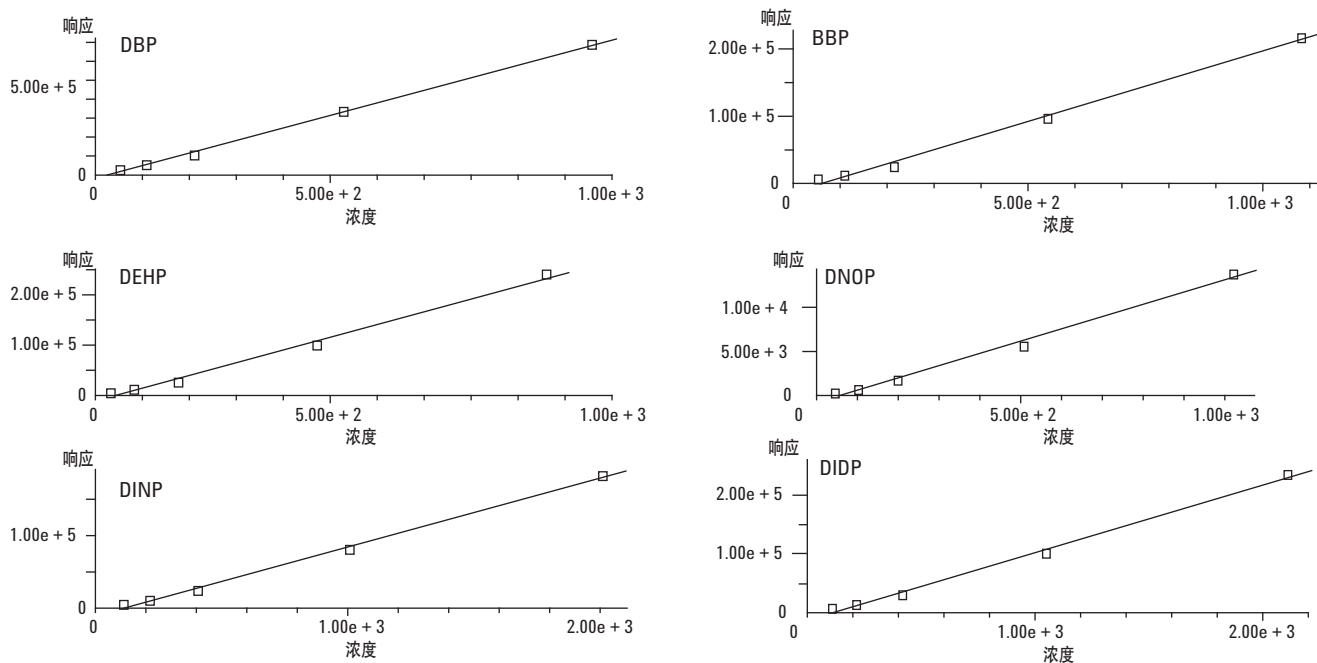


图 1. 比较样品 GC/MS 分析后空白进样的分析状况。样品液-液萃取 (顶图)，样品 Chem Elut 固相萃取 (底图)。请注意液液萃取法的空白进样显示有大量的携出物，甚至出现在第二次空白进样中。而采用 Chem Elut 固相萃取法空白进样一次即显示几乎没有背景干扰

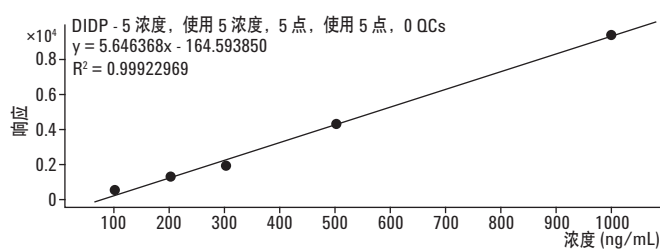
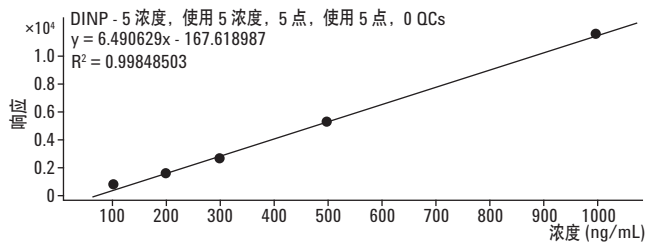
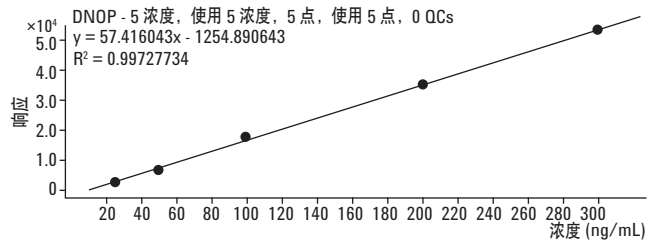
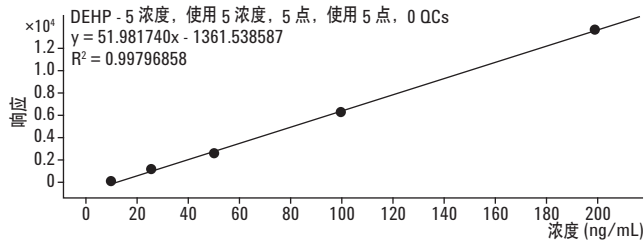
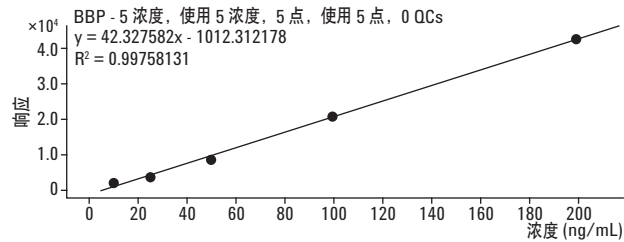
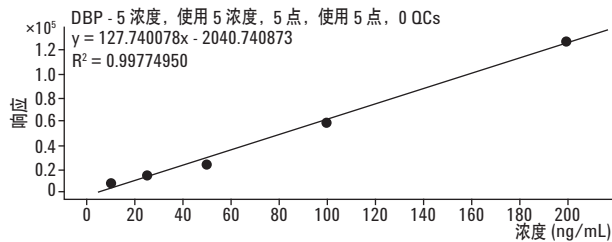
定量分析的灵敏度和线性

GC/MS 和 GC/MS/MS 方法检测标准溶液的灵敏度已经轻松超过了中国大陆 (GB21911-2008) 和台湾地区对邻苯二甲酸酯类化合物的限量规定, 即食品中任何该类化合物的含量不得超过 1 ppm。不管使用单四极杆 (MSD) 还是三重四极杆质谱平台, 检测灵敏度均在 50-100ppb 范围内, 定量的线性相关系数 (R²) 大于等于 0.992 (见图 2 和 3)。



化合物	线性范围 (mg/L)	相关系数 (R ²)
1 DBP	0.05 - 1	0.998
2 BBP	0.05 - 1	0.996
3 DEHP	0.05 - 1	0.992
4 DNOP	0.05 - 1	0.992
5 DINP	0.1 - 2	0.997
6 DIDP	0.1 - 2	0.996

图 2. 六种最受关注的邻苯二甲酸酯类化合物的校准曲线、线性范围和相关系数, 采用 Agilent 5975 系列 GC/MS, 同步进行 SIM 和 Scan 模式分析



化合物	线性范围 (mg/L)	相关系数 (R ²)
1 DBP	0.05 - 1	0.998
2 BBP	0.05 - 1	0.998
3 DEHP	0.05 - 1	0.998
4 DNOP	0.05 - 1	0.997
5 DINP	0.1 - 2	0.999
6 DIDP	0.1 - 2	0.998

图 3. 六种最受关注的邻苯二甲酸酯类化合物的校准曲线、线性范围和相关系数, 采用 Agilent 7000B 三重四极杆 GC/MS 系统, MRM 模式分析

如图 4 所示，采用 GC/MSD 平台分析，其重现性也非常理想。Agilent 5975 GC/MS 的一个最大特点就是可以同步获取 SIM 和 Scan 分析数据，如图 5 所示分析 15 种邻苯二甲酸酯类化合物的情况。这种特点降低了出现假阳性的可能性。

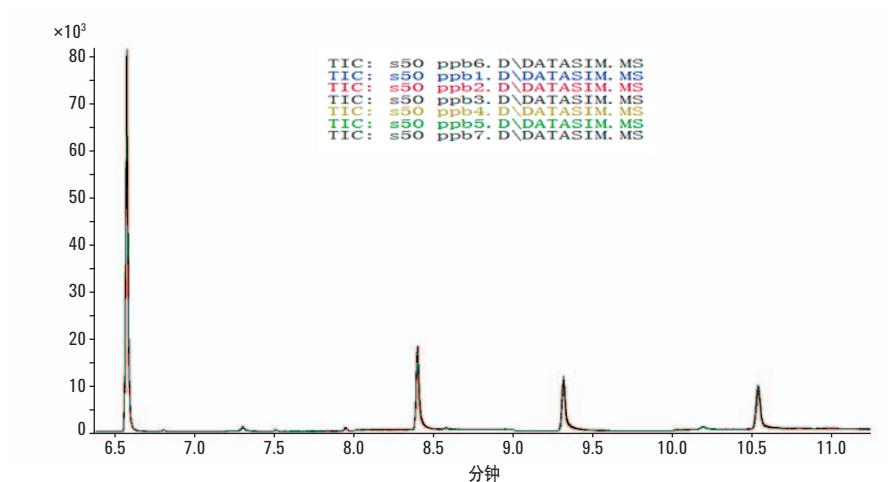


图 4. 六种管控的邻苯二甲酸酯类化合物以 0.05 mg/L (50 ppb) 六次进样分析得到的总离子流 (TIC) 色谱图的重现性。所有六次运行结果几乎是重合的

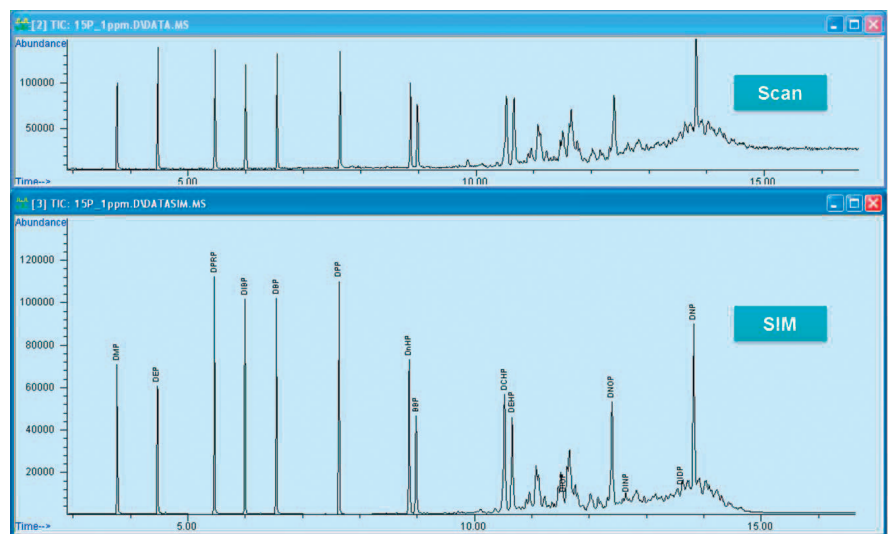


图 5. 15 种邻苯二甲酸酯类化合物混合物的同步 GC/MS Scan 和 SIM 分析

采用 LC/MS 法同时分析 30 种邻苯二甲酸酯类化合物的甲醇溶液，得到的仪器检测限范围是 50-500 ppb。LC/MS/MS 法提供的仪器检测限 (IDL) 远低于台湾 FDA 20 ppb 的限量要求，分析 13 种邻苯二甲酸酯类化合物的数据见表 9 ($\mu\text{g}/\text{mL}=\text{ppb}$)，定量的线性相关系数 R^2 远大于或等于 0.9947 (萃取离子流色谱图见图 6)。同时采用 C18 色谱柱，建立了分离 14 种邻苯二甲酸酯类化合物的同分异构体，尤其是 DIBP 和 DBP 的 LC/MS/MS 方法 (数据未列出)。

表 9. 采用 LC/MS/MS 方法分析 13 种邻苯二甲酸酯类化合物的仪器检测限

化合物	R^2	IDL ng/mL (S/N > 10)
DMP	0.9955	2
DEP	0.9968	3
DAP	0.9947	0.3
DPP	0.9983	0.5
DBP	0.9949	5
BBP	0.9962	0.5
DCP	0.9981	0.3
DNHP	0.9981	0.5
DEHP	0.9949	5
DEHA	0.9972	0.5
DNOP	0.9979	0.5
DINP	0.9993	5
DIDP	0.9998	5

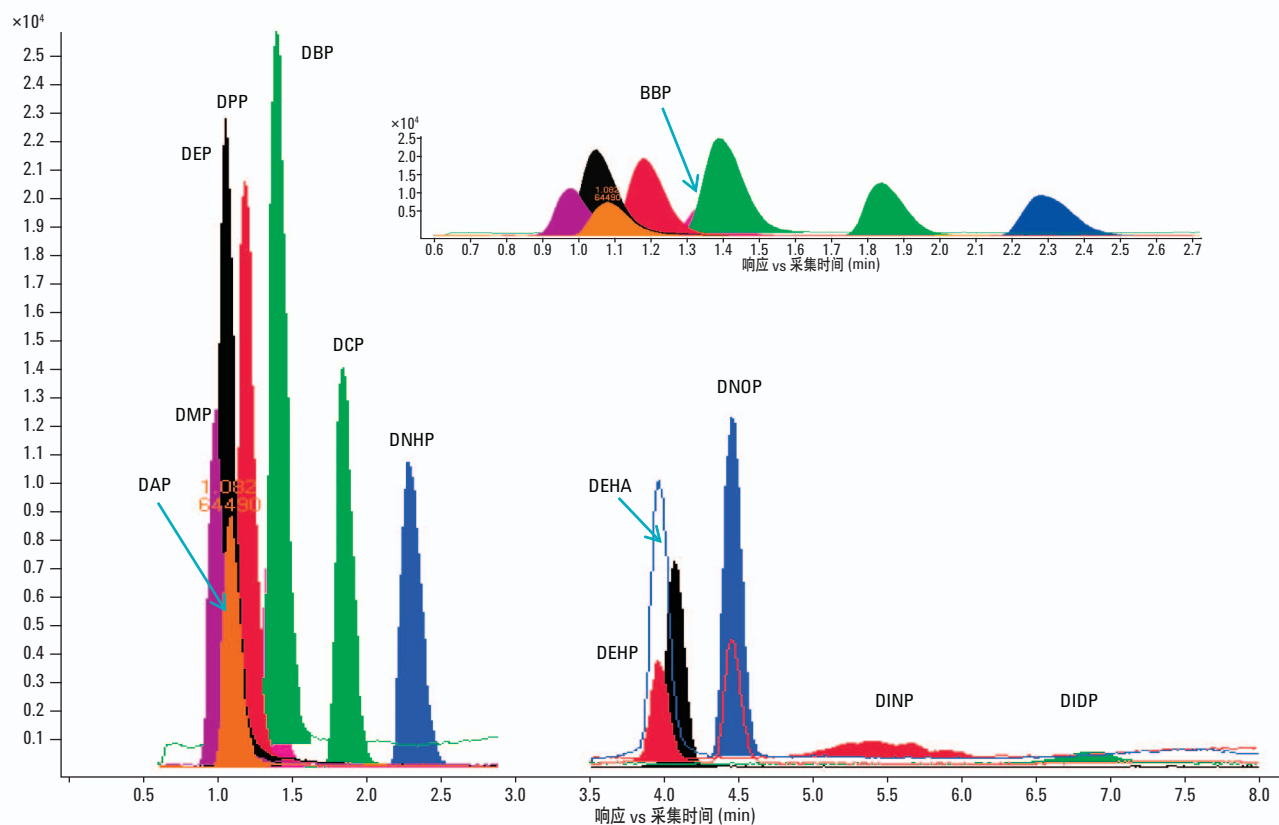


图 6. 采用 LC/MS/MS 方法分离 13 种邻苯二甲酸酯类化合物的萃取离子流 (EIC) 色谱图

样品检验结果

采用本文建立的 GC 方法分析了购自零售店的三种饮料样品。GC/MS 分析结果见表 10。样品 SN1874 中的 DINP 和样品 SA2549 中的 DEHP、DINP 和 DNOP 含量超过了中国大陆和台湾地区规定的限量标准 (1ppm)。实际上, 样品 2549 中 DINP 的含量甚至超过了规定限量 100 倍。

同时也对运动饮料中可能存在的几种邻苯二甲酸酯类化合物进行了 LC/MS/MS 分析。通过往一个运动饮料样品中添加适量 DEHP 后, 再同法进行样品制备, 建立了一条基质校准曲线 (图 7)。这条校准曲线用于定量分析另一个运动饮料样品中的 DEHP。两种定性离子的丰度比分别是 1.7 和 2.0, 与鉴别 DEHP 标准品的数据吻合。该运动饮料中检测到的 DEHP 浓度是 1.05 ppm, 恰高于台湾 FDA 规定的 1ppm 限量。

表 10. 三种饮料样品的 GC/MS 分析结果

	DEHP (mg/L)	DINP (mg/L)	DNOP (mg/L)
SN610	ND	ND	ND
SN1874	ND	2.13	ND
SA2549	72.5	137	19.0

ND = 未检测到

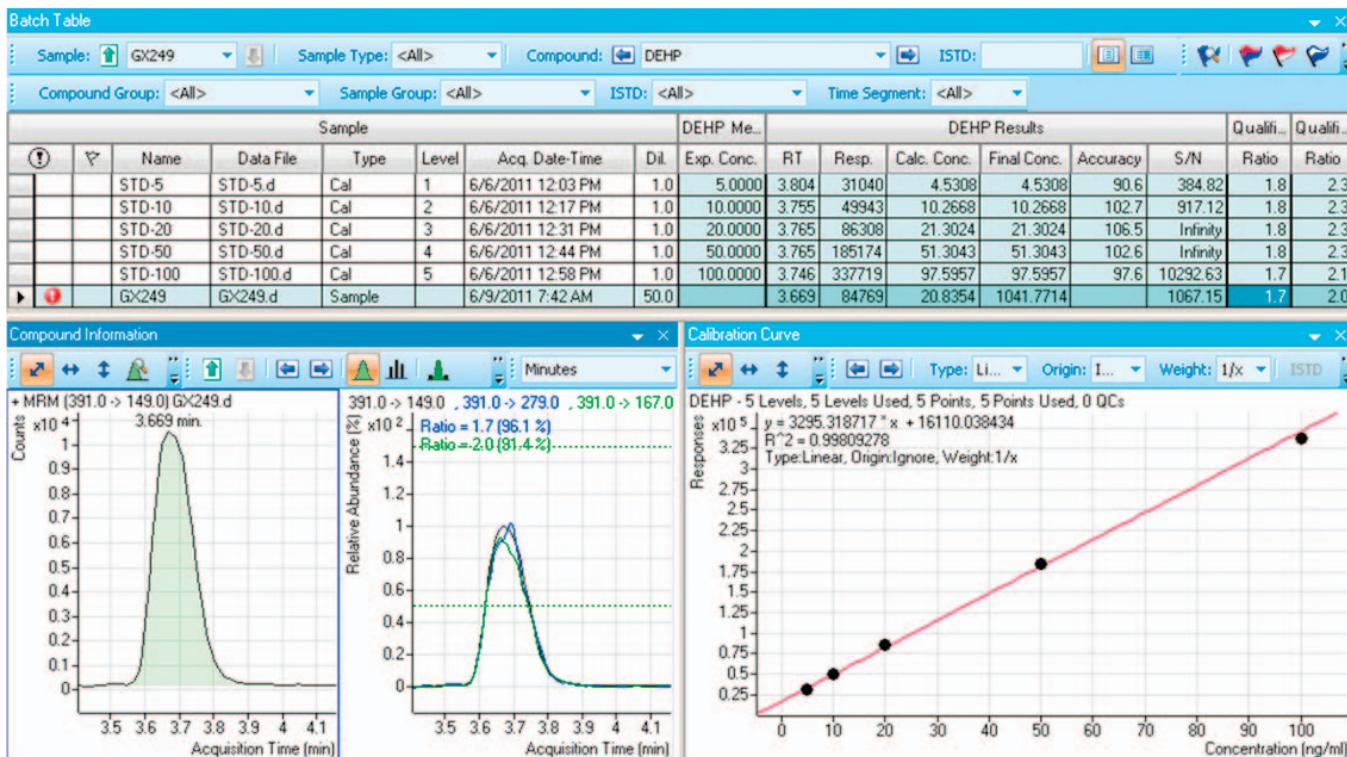


图 7. 加标 DEHP 到某一运动饮料样品后进行 LC/MS/MS 分析得到的校准曲线

结论

安捷伦公司已经建立了快速检测和定量分析食品中邻苯二甲酸酯类化合物的方法，无论您的实验室拥有怎样的质谱平台，对这 30 种邻苯二甲酸酯类化合物有怎样的定性要求，以及对欧盟和美国重点管控的六种低含量水平的该类化合物的准确定量要求如何，该方法均可满足众多实验室的需要。Agilent GC/MS 和 LC/MS 系统具有的灵活性和优异性能，可以确保对突发食品安全危机事件做出快速响应。

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，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。

本文中的信息、说明及技术规格等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 12 月 8 日，中国印刷
5990-9510CHCN



Agilent Technologies