

LC-MS/MS 法测定虾肉中 21 种邻苯二甲酸酯类物质含量

LCMSMS-807

摘要：使用岛津三重四极杆液质联用系统建立了测定虾肉中 21 种邻苯二甲酸酯类物质含量的方法。虾肉样品中的邻苯二甲酸酯经乙腈提取，分散固相萃取净化，反相 C18 液相色谱柱分离。采用正离子模式进行电离，通过多反应监测模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用外标法定量，邻苯二甲酸酯类物质在 0.5 ng/mL ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.995 以上，且精密度和加标回收率实验结果良好。

关键词：三重四极杆质谱 虾肉 邻苯二甲酸酯

技术特点：

- ❖ 一针进样同时分析水产品中 21 种邻苯二甲酸酯，5 组同分异构体均得到较好地分离。
- ❖ 使用捕集柱能够有效去除系统中邻苯二甲酸酯干扰物。

邻苯二甲酸酯 (Phthalic acid esters, PAEs) 又称塑化剂，是塑料工业中常用的增塑剂之一，它能够增加产品的透明度、可塑性、膨胀性和柔韧性，并能够延长其使用寿命。因此，该类物质已被广泛的应用于玩具、化妆品、食品药品包装材料、纺织品等产品中。由于 PAEs 并未与塑料基质形成稳定的化学键，容易从塑料中迁移到外围环境，造成大气、水体、土壤和食品污染。PAEs 的分子结构具有芳香族基团，有一定的类雌激素活性。PAEs 在进入水环境后，因其较高的脂溶性，极易被水中生物吸收，且具有蓄积性，最终通过水产品进入人体，长期累积将对人体造成危害。

PAEs 的测定可以采用气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱 - 质谱联用 (GC-MS) 法和高效液相色谱 - 串联质谱联用 (LC-MS/MS) 法等。由于水产样品基质复杂，污染物较多，色谱法根据保留时间进行定性分析经常受到基质化合物的干扰，容易造成假阳性。高效液相色谱 - 串联质谱联用法因具有灵敏度高、特异性强和结果准确性好的特点，已成为食品基质中痕量有机物分析的主要方法。本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，建立了 21 种邻苯二甲酸酯含量的测定方法。该方法简单、快速、准确，可为水产品中邻苯二甲酸酯含量的测定提供方法支持。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.113		

1.2 分析条件

液相条件

- 色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.8 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03)
- 捕集柱：GL Sciences Inertsil® ODS-4 (50 mm×3.0 mm I.D., 2 μm)
- 流动相：A 相 - 0.1% 甲酸水溶液； B 相 - 甲醇
- 流速：0.20 mL/min
- 进样体积：5 μL
- 柱温：40°C
- 洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
9.00	泵	B.Conc	85
19.00	泵	B.Conc	90
20.00	泵	B.Conc	93
20.10	泵	B.Conc	100
22.00	泵	B.Conc	100
22.20	泵	B.Conc	40
26.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式：	ESI +	接口温度：	300°C
接口电压：	4.0 kV	D L 温度：	250°C
雾化气流速：	氮气 3.0 L/min	加热块温度：	400°C
加热气流速：	空气 10 L/min	驻留时间：	15 ms
干燥气流速：	氮气 10 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
碰撞气：	氙气 270 kPa	MRM 参数：	见表 2

1.3 样品前处理方法

称取试样 2 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 准确加入水 3 mL 和乙腈 10 mL, 旋涡混匀 1 min, 超声提取 5 min, 6000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至另一 50 mL 离心管中; 残渣用乙腈 10 mL 重复提取 1 次, 10000 r/min 离心 5 min 后, 合并上清液, 加入 NaCl 1 g 和 Na₂SO₄ 4 g, 旋涡 1 min, 6000 r/min 离心 5 min, 取上层溶液, 备用。

准确移取备用液 8 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 C18 100 mg 和乙二胺 -N- 丙基 (PSA) 50 mg, 旋涡 1 min, 6000 r/min 离心 5 min 后, 精密量取净化液 1 mL, 再用水定容至 2 mL, 旋涡混匀 1 min, 10000 r/min 离心 5 min, 将上清液转入色谱进样瓶, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.4 校准曲线的制备

吸取适量邻苯二甲酸酯混合标准工作液, 用空白基质液溶解稀释, 配制成浓度为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 的系列基质匹配标准工作液并上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。各化合物信息及质谱参数如表 2 所示。

表 2 MRM 参数

No.	化合物名称	英文缩写	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
1	邻苯二甲酸二甲酯	DMP	194.7	163.0*	-23	-11	-17
				77.1	-23	-31	-14
2	邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯	DEMP	283.1	207.0*	-21	-6	-22
				149.0	-21	-28	-29
3	邻苯二甲酸二乙酯	DEP	223.1	149.0*	-30	-20	-30
				177.1	-30	-10	-18
4	邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯	DEEP	311.1	73.1*	-23	-13	-30
				221.1	-23	-6	-24

5	邻苯二甲酸二 烯丙酯	DAP	247.1	189.1* 149.1	-28 -28	-11 -16	-20 -27
6	邻苯二甲酸二 异丙酯	DiPRP	251.1	149.0* 191.1	-30 -30	-20 -9	-30 -20
7	邻苯二甲酸二 丙酯	DPRP	251.1	149.0* 191.1	-30 -30	-20 -9	-30 -20
8	邻苯二甲酸二 苯酯	DPhP	319.1	225.0* 77.1	-23 -23	-9 -36	-24 -30
9	邻苯二甲酸丁 基苯基酯	BBP	313.1	91.1* 149.0	-30 -30	-20 -12	-17 -16
10	邻苯二甲酸二 异丁酯	DIBP	279.1	149.0* 205.1	-30 -30	-20 -8	-30 -22
11	邻苯二甲酸二 丁酯	DBP	279.1	149.0* 205.1	-30 -30	-20 -8	-30 -22
12	邻苯二甲酸二 (2-丁氧基)乙酯	DBEP	367.1	101.1* 249.1	-27 -27	-12 -7	-19 -27
13	邻苯二甲酸二 戊酯	DPP	307.1	149.1* 219.1	-30 -30	-20 -7	-30 -24
14	邻苯二甲酸二 异戊酯	DIPP	307.1	149.1* 219.1	-30 -30	-20 -7	-30 -24
15	邻苯二甲酸二 环己酯	DCHP	331.1	149.1* 167.1	-30 -30	-25 -13	-28 -18
16	邻苯二甲酸二 (4-甲基-2-戊基) 酯	BMPP	335.1	149.1* 167.0	-30 -30	-25 -11	-27 -18
17	邻苯二甲酸二 己酯	DHXP	335.2	149.1* 233.2	-30 -30	-20 -8	-30 -25
18	邻苯二甲酸二 庚酯	DHP	363.2	149.1* 247.2	-30 -30	-20 -8	-30 -27
19	邻苯二甲酸二 (2-乙基己)酯	DEHP	391.3	149.1* 167.1	-30 -30	-25 -13	-30 -17
20	邻苯二甲酸二 正辛酯	DNOP	391.4	149.0* 261.1	-30 -30	-20 -8	-30 -29
21	邻苯二甲酸二 壬酯	DNP	419	149.0* 275.0	-30 -30	-20 -8	-30 -29

注：* 表示定量离子对

■ 结果与讨论

2.1 空白与标准样品的 MRM 色谱图

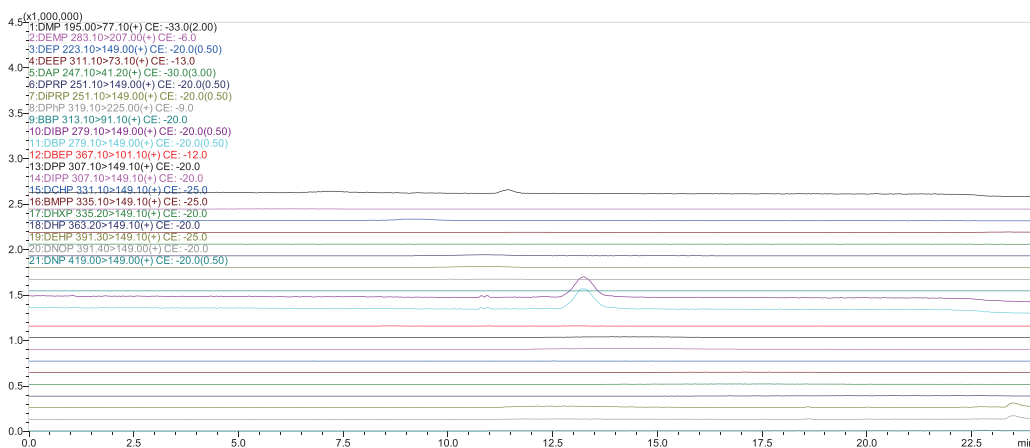


图 1 空白样品的MRM图谱

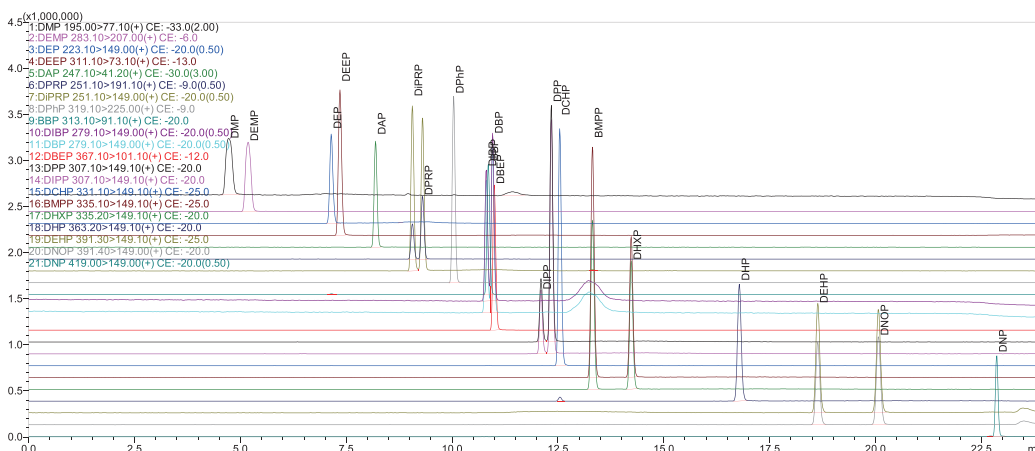


图 2 21种邻苯二甲酸酯(100 ng/mL)的MRM图谱

通过优化液相色谱条件，本文中DiPRP和DPRP、DIBP和DBP、DIPP和DPP、BMPP和DHXP、DEHP和DNOP，5组邻苯二甲酸酯类同分异构体均得到了较好地分离，具体结果见图3。

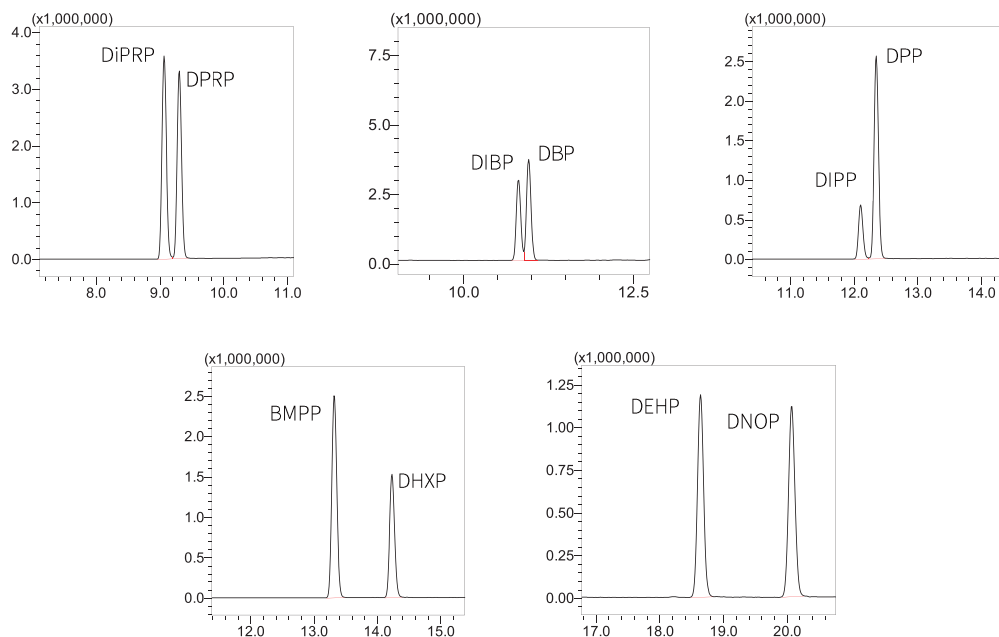


图 3 5组邻苯二甲酸酯同分异构体分离图谱

在仪器分析过程中，使用 Inertsil® ODS-4 (50 mm×3.0 mm I.D., 2 μm) 作为捕集柱，样品中的邻苯二甲酸酯直接进入分析色谱柱，而液相系统中存在的邻苯二甲酸酯类物质则先有捕集柱捕获后再进入分析色谱柱。因此，可以实现来自系统的邻苯二甲酸酯类物质与样品中的目标物分离，从而有效地去除系统中的背景干扰，典型图谱见图 4。

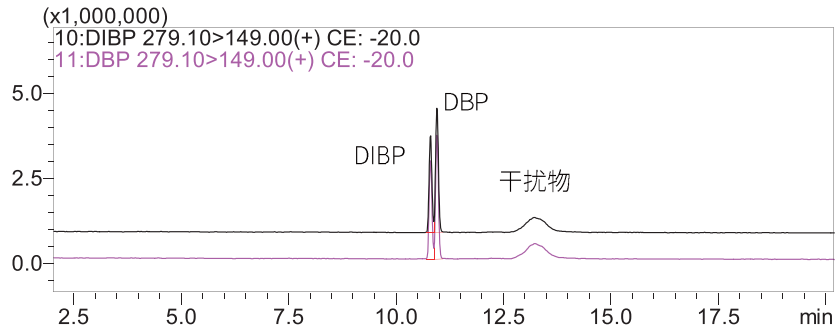


图 4 DIBP 和 DBP 与系统中干扰物分离的典型图谱

2.2 线性范围与检出限

将 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 不同浓度的 21 种邻苯二甲酸酯基质匹配标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量。以标准溶液浓度为横坐标，特征离子质量色谱图峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 5 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

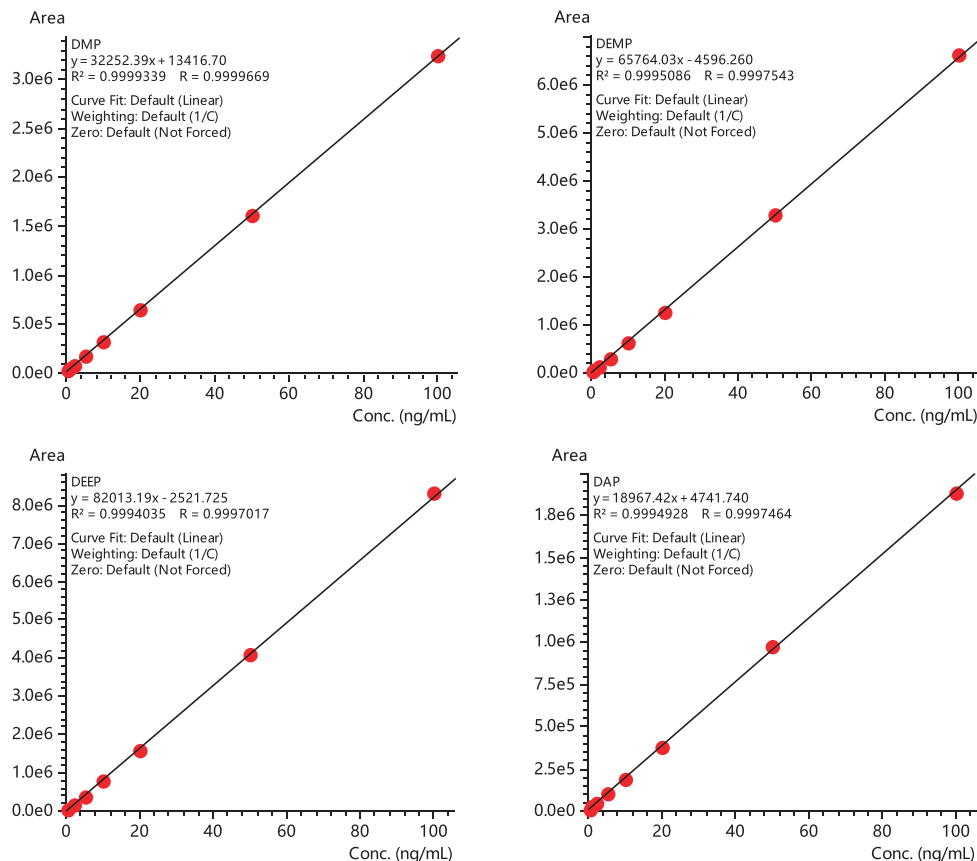


图 5 部分邻苯二甲酸酯的校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

No.	化合物名称	校准曲线	相关系数 R	准确率 (%)	检出限 (μg/kg)
1	邻苯二甲酸二甲酯	$Y = (32252.4)X + (13416.7)$	0.999	93.8~104.4	10
2	邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯	$Y = (65764.0)X + (-4596.26)$	0.999	95.1~108.4	10
3	邻苯二甲酸二乙酯	$Y = (101669)X + (191153)$	0.999	97.1~104.3	10
4	邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯	$Y = (82013.2)X + (-2521.72)$	0.999	93.0~113.2	10
5	邻苯二甲酸二烯丙酯	$Y = (18967.4)X + (4741.74)$	0.999	87.7~107.7	10
6	邻苯二甲酸二异丙酯	$Y = (37064.2)X + (10644.5)$	0.999	89.5~109.1	10
7	邻苯二甲酸二丙酯	$Y = (157458)X + (32482.4)$	0.999	96.5~106.2	10
8	邻苯二甲酸二苯酯	$Y = (89277.4)X + (2491.97)$	0.995	85.0~113.2	10
9	邻苯二甲酸丁基苄基酯	$Y = (65949.6)X + (12303.8)$	0.999	94.2~107.2	10
10	邻苯二甲酸二异丁酯	$Y = (127748)X + (349828)$	0.999	92.3~109.1	10
11	邻苯二甲酸二丁酯	$Y = (161196)X + (608096)$	0.999	88.6~108.8	10
12	邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯	$Y = (74660.0)X + (-5378.07)$	0.999	92.0~110.7	10
13	邻苯二甲酸二戊酯	$Y = (32276.4)X + (10583.4)$	0.999	94.7~108.7	10
14	邻苯二甲酸二异戊酯	$Y = (121624)X + (12616.3)$	0.999	94.6~110.5	10
15	邻苯二甲酸二环己酯	$Y = (124514)X + (15820.9)$	0.999	94.0~112.8	10
16	邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯	$Y = (135965)X + (7618.44)$	0.999	94.3~105.6	10
17	邻苯二甲酸二己酯	$Y = (74423.5)X + (-13661.6)$	0.999	94.3~111.9	10
18	邻苯二甲酸二庚酯	$Y = (77961.8)X + (10208.5)$	0.999	86.0~115.0	10
19	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯	$Y = (76618.3)X + (40978.4)$	0.999	91.0~110.7	10
20	邻苯二甲酸二正辛酯	$Y = (64571.3)X + (-10359.1)$	0.998	89.1~113.2	10
21	邻苯二甲酸二壬酯	$Y = (75872.3)X + (9746.44)$	0.999	93.2~111.6	10

2.3 精密度实验

对 10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 不同浓度的 21 种邻苯二甲酸酯混合标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：21 种邻苯二甲酸酯类物质保留时间和峰面积的相对标准偏差不高于 0.70% 和 8.17%，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	化合物名称	10 ng/mL		20 ng/mL		50 ng/mL		
		R. T.	RSD/%	Aera RSD/%	R. T.	RSD/%	Aera RSD/%	R. T.
1	邻苯二甲酸二甲酯		0.7	3.37	0.59	1.8	0.2	1.04
2	邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯		0.29	3.96	0.26	3.43	0.08	1.44
3	邻苯二甲酸二乙酯		0.06	7.6	0.08	2.47	0.06	1.13
4	邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯		0.03	7.24	0.07	0.7	0.05	5.34
5	邻苯二甲酸二烯丙酯		0.04	5.93	0.07	1.92	0.08	1.91
6	邻苯二甲酸二异丙酯		0.02	1.33	0.05	1.54	0.08	1.36
7	邻苯二甲酸二丙酯		0.01	1.73	0.06	3.03	0.08	2.23
8	邻苯二甲酸二苯酯		0.02	1.43	0.04	2.46	0.1	8.05
9	邻苯二甲酸丁基苄基酯		0.02	2.31	0.04	0.65	0.08	0.9
10	邻苯二甲酸二异丁酯		0.02	1.62	0.04	1.85	0.08	1.76

11	邻苯二甲酸二丁酯	0.02	0.91	0.04	1.73	0.07	0.74
12	邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯	0.02	1.17	0.04	1.27	0.07	1.15
13	邻苯二甲酸二戊酯	0.02	3.43	0.03	1.4	0.06	1.58
14	邻苯二甲酸二异戊酯	0.01	1.32	0.04	1	0.07	1.13
15	邻苯二甲酸二环己酯	0.02	4.33	0.04	1.18	0.07	1.81
16	邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯	0.02	1.51	0.06	0.61	0.08	2.29
17	邻苯二甲酸二己酯	0.01	3.42	0.06	1.31	0.09	1.2
18	邻苯二甲酸二庚酯	0.02	2.09	0.07	2.74	0.09	2.2
19	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯	0.02	3.05	0.09	2.41	0.08	1.16
20	邻苯二甲酸二正辛酯	0.04	2.94	0.08	3.93	0.08	0.98
21	邻苯二甲酸二壬酯	0.01	8.17	0.03	1.85	0.03	1.51

2.4 加标回收率实验

取空白虾肉样品，加入少量 21 种邻苯二甲酸酯混合标准品储备溶液，使虾肉样中添加浓度为分别为 100 µg/kg 和 200 µg/kg，平行做 3 份。按照 1.3 样品前处理方法提取净化后，测定 21 种邻苯二甲酸酯的添加回收率，各化合物的平均加标回收率结果在 70.78% ~ 110.67% 之间（见表 5）。

表 5 21 种邻苯二甲酸酯的加标回收率结果 (n=3)

No.	化合物名称	添加浓度水平	
		100 µg/kg	200 µg/kg
1	邻苯二甲酸二甲酯	95.86%	88.43%
2	邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯	100.34%	98.64%
3	邻苯二甲酸二乙酯	75.92%	92.59%
4	邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯	101.46%	105.37%
5	邻苯二甲酸二烯丙酯	94.58%	97.74%
6	邻苯二甲酸二异丙酯	98.38%	102.77%
7	邻苯二甲酸二丙酯	104.96%	109.70%
8	邻苯二甲酸二苯酯	99.40%	103.33%
9	邻苯二甲酸丁基苄基酯	91.30%	95.42%
10	邻苯二甲酸二异丁酯	86.30%	92.56%
11	邻苯二甲酸二丁酯	91.76%	110.67%
12	邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯	90.82%	95.10%
13	邻苯二甲酸二戊酯	93.16%	93.07%
14	邻苯二甲酸二异戊酯	93.12%	92.59%
15	邻苯二甲酸二环己酯	97.28%	94.62%
16	邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯	89.50%	92.48%
17	邻苯二甲酸二己酯	82.56%	85.80%
18	邻苯二甲酸二庚酯	95.76%	97.63%
19	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯	90.62%	92.21%
20	邻苯二甲酸二正辛酯	94.78%	91.99%
21	邻苯二甲酸二壬酯	71.76%	70.78%

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统建立了测定虾肉中 21 种邻苯二甲酸酯残留量的检测方法，其中 5 组同分异构体均得到较好地分离。该方法使用捕集柱能够有效去除系统中邻苯二甲酸酯类干扰物，方法灵敏度高、精密度好、结果准确，可为水产品中邻苯二甲酸酯类物质污染风险的监控提供参考方法。