

同位素稀释-气相色谱-质谱法测定河蚌蚌肉中邻苯二甲酸酯类残留量

姑丽巴哈尔·艾合买提,阿依古丽·塔西

(新疆维吾尔自治区分析测试研究院,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011)

摘要: 河蚌蚌肉样品采用乙酸乙酯溶剂提取,滤液经弗罗里硅土固相萃取柱净化后氮吹浓缩,正己烷定容,经气质联用仪进行检测,同位素内标法定量。实验结果表明:PAEs在0.10~2.00 mg/L之间具有良好的线性关系,相关系数 r^2 均大于0.99,对样品进行高、中、低三个浓度的加标试验,各组分的平均回收率在73.1%~94.3%之间,相对标准偏差(RSD)值小于9.3%,检出限在1.2~3.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。该方法前处理简单,灵敏度和准确度高,可满足河蚌蚌肉中邻苯二甲酸酯类化合物的残留量检测要求。

关键词: 邻苯二甲酸酯(PAEs);河蚌;气质联用

中图分类号: X836 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2018)01-0060-06

邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)是一类环境雌激素物质,主要作为塑料的增塑剂使用,同时被广泛应用于建筑材料、化妆品、合成橡胶、洗涤剂、润滑油和医药产品等各行业产品的生产过程中^[1]。邻苯二甲酸酯类化合物属于高污染的一类环境激素污染物,具有不同程度的毒性,在人体内累积可导致生殖毒性、畸形、免疫毒性和神经毒性等严重危害^[2-3]。目前有关PAEs的研究多集中于环境样品和塑料制品等方面^[4-7],随着人们对食品质量安全的关注,学者将PAEs的残留研究方向扩展到食品领域,其检测方法主要为色谱法及色谱-质谱联用技术^[8-11]。

水产品作为人类食物的重要来源之一,其安全与人体健康紧密联系。本次实验选择的研究对象为河蚌。河蚌属双壳类软体动物,主要分布于长江中下游地区的淡水湖泊中,为中国特有资源^[12]。已有相关文献^[13-15]报道我国长江与黄河两大水域均存在较严重的PAEs污染,且该类化

合物极易溶出并释放进入环境体系,造成水质污染并通过富集进入水生生物体。由于河蚌的生长周期较长,主要生活在水体环境的底部,可通过吸收富集水体环境中的PAEs而存在健康风险,因此河蚌蚌肉中PAEs残留量的监测工作逐渐引起研究人员的重视。

对水产品可食部位污染物的残留检测工作,前处理是整个实验的关键部分,由于待测水产样品可食部位油脂含量高,基质较为复杂,需要在前处理过程中应用固相萃取柱对色素、油脂和水分等进行净化去除。本实验通过优化样品前处理条件,建立同位素稀释-气相色谱-质谱联用技术测定河蚌样品中7种PAEs的方法。采用同位素稀释^[16-18]的方法能够很好地降低基质效应带来的干扰,提高结果的准确度,在微量组分准确定量分析方面有很大优势,符合残留物的检测分析和监控要求。可为PAEs在水体环境和水产品中的来源、分布及迁移过程的研究提供基础数

收稿日期:2017-11-16

作者简介:姑丽巴哈尔·艾合买提(1979-),女,实验师,主要研究方向为食品安全检测。E-mail: guli1069@sina.com

据,也为食品安全与人体健康风险潜在危害的暴露水平研究提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

气相色谱-质谱仪(配电子轰击离子源,美国 Thermo 公司);分析天平(Mettler-Toledo 梅特勒-托利多);旋转蒸发仪(EYELA 埃朗);乙腈、丙酮、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司);佛罗里硅土(Florisil)固相萃取柱(500 mg/6 mL,天津博纳艾杰尔科技有限公司);均质机(T18 digital,德国 IKA 公司);离心机(CT18RT,上海天美公司);冷冻干燥机(ZL-12TD,上海左乐仪器有限公司);实验用水均为去离子水。

标准品:PAEs[邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、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)酯(DEHP)、邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP); D_4 -DEP、 D_4 -DIBP、 D_4 -DEHP 为内标物]化合物标准品(购自德国 De. Ehrenstorfer 公司)。

试验样品:人工养殖河蚌。

1.2 标准溶液配制

准确称量 7 种 PAEs 标准品置于 20.00 mL 的容量瓶中,用正己烷定容,配置成浓度为 20.00 mg/L 的标准储备液,放置 4℃ 冰箱中避光保存。将 7 种 PAEs 的单标混合并用正己烷稀释至浓度为 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/L 的标准溶液(分别加入 D_4 -DEP、 D_4 -DIBP、 D_4 -DEHP,三种内标浓度均为 0.50 mg/L)待用。

1.3 样品采集与前处理

通过底网捕捞对河蚌进行样品采集,采集后放置于带有冰袋的保温箱中运至实验室,去壳取出可食用部分,用组织捣碎机将样品匀浆处理后,迅速冷冻 24 h,放入冻干机内 -40℃ 进行冷冻干燥去除水分,备用。

1.4 实验方法

试验过程中为避免塑料制品中的邻苯二甲酸酯对测试的干扰,均替换使用玻璃器皿,且经过色谱级的甲醇和正己烷浸泡润洗,马弗炉内高温烘干。

准确称取 0.50 g 样品于 50.00 mL 玻璃管中,加入 15.00 mL 乙酸乙酯溶剂,涡旋振荡 3 min,低温条件超声萃取 15 min,高速离心 1 min,取上清液至浓缩瓶中,40℃ 减压旋转蒸发至约 2.00 mL,转移至 Florisil 柱净化,用 10.00 mL 正己烷:丙酮(92:8)混合溶剂洗脱目标物,收集洗脱液浓缩后用正己烷定容至 2.00 mL,装进样瓶待测。

1.5 气相色谱-质谱联用条件

离子源:电子轰击(EI)源,70 eV;离子源温度:230℃;传输线温度:270℃;色谱柱:HP-5MS(30.00 m × 0.25 mm × 0.50 μm);程序升温:80℃,以 20℃/min 升温至 280℃,保持 15 min;载气:氦气(99.999%);流速:1.0 mL/min;进样口温度:260℃;进样量:2.0 μL,不分流进样;溶剂延迟:4.0 min;扫描模式和范围:全离子扫描(Full scan),50 ~ 450 amu。

2 结果与讨论

2.1 同位素内标物的选择

同位素内标物必须要与待测化合物有相似的结构,在样品前处理过程及仪器响应上具有相同的性质,本试验选用 D_4 -DEP、 D_4 -DIBP、 D_4 -DEHP 三种同位素标记物作为内标物进行定量,通过色谱峰保留时间及选择离子丰度比为目标化合物定性,进行实验结果的测定分析。

2.2 质谱条件的选择

质谱的定性和定量是以离子碎片为选择依据的,根据 PAEs 化合物在 EI 模式下电离裂解的结果,选定检测灵敏度较高且丰度较强的碎片离子作为定性离子,选择基质干扰小的特征离子作为定性离子,质谱参数见表 1。根据欧盟 2002/657/EC 指令^[19]规定,对于质谱确证方法必须达到 4 个确证点的要求,PAEs 化合物标准品及内标物的色谱图及定量离子流图见图 1。

表 1 邻苯二甲酸酯类的质谱参数
Tab. 1 Ms parameters for phthalate esters

序号 No.	组分 Component	保留时间/min Retention time	特征离子/(<i>m/z</i>) Characteristic ions
1	DMP	6.24	77,133,163 *,194
2	DEP	7.09	105,149 *,177,222
3	DIBP	8.63	104,149 *,167,223
4	DBP	10.12	104,149 *,205,223
5	BBP	10.98	91,104,149 *,206
6	DEHP	11.82	113,149 *,167,279
7	DNOP	13.06	104,149, * 261,279
8	D ₄ – DEP	7.10	153 *
9	D ₄ – DIBP	8.67	153 *
10	D ₄ – DEHP	11.83	153 *,171

注：* 为定量离子。
Note:The asterisk represented the quantitation ion.

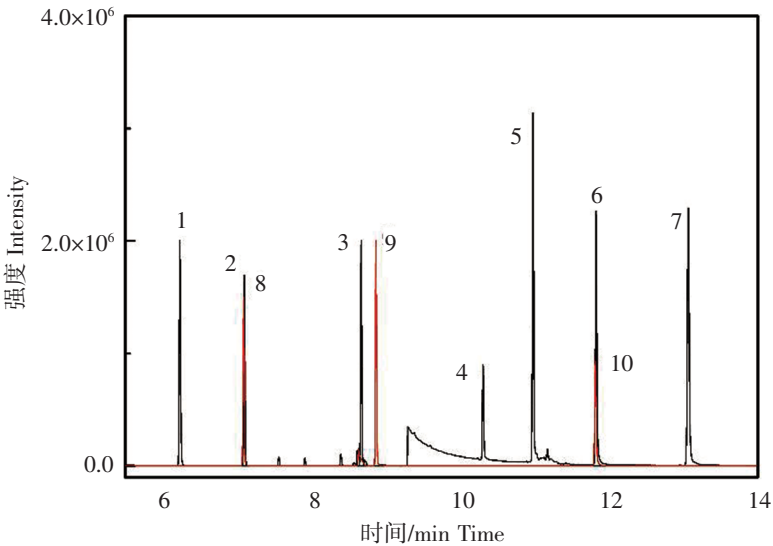


图 1 邻苯二甲酸酯标准物质及内标物的色谱图
Fig.1 Chromatogram of the phthalate esters

注:特征峰(Peak identifications) 1 :DMP;2:DEP;3:DIBP;4:DBP;5:BBP;6:DEHP;7:DNOP;8:D₄ – DEP;9:D₄ – DIBP; 10:D₄ – DEHP。

2. 3 提取溶剂的选择

样品中 PAEs 残留量检测前处理常用的萃取溶剂主要有：二氯甲烷、乙腈、正己烷、乙酸乙酯。本实验通过对比以上四种溶剂的萃取效率，参考组分的回收率和以色谱图中基质干扰峰为依据，结果表明 PAEs 各个组分的萃取效率较为接

近（图 2），其中正己烷和乙酸乙酯的效果略高，由于乙腈极性较强，在萃取目标物的同时也会溶解部分基质，对色谱峰具有一定的干扰，而二氯甲烷的毒性较强，目前已逐渐被相似溶剂替代，本实验综合考虑后选择乙酸乙酯作为样品的萃取溶剂。

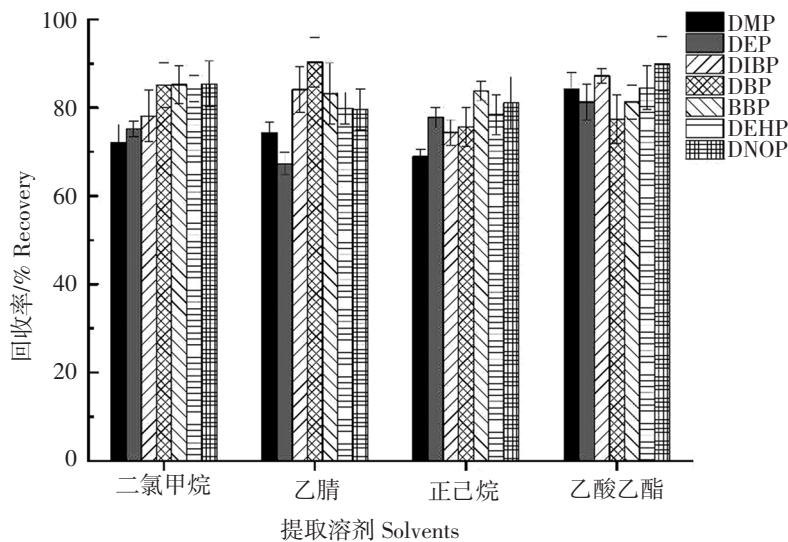


图 2 不同溶剂萃取效率
Fig.2 Effect of different solvents on extraction efficiency

2.4 固相萃取柱的选择

河蚌蚌肉的基质较为复杂，含有大量的脂肪、蛋白质和色素等物质，极易溶解在萃取溶剂中，从而干扰待测化合物的色谱分析，需要对杂质进行净化处理，目前以吸附为主要目的的固相萃取（SPE）柱有 N - 丙基乙二胺（PSA）、C₁₈、弗罗里硅土（Florisil）、中性氧化铝（Al₂O₃ - N）4 种。其中 PSA 可去除样品基质中的极性色

素、糖类和脂肪酸等化合物；C₁₈ 萃取柱作为反相吸附剂，能够吸附样品基质中的脂肪、脂质、甾醇等化合物；Florisil 萃取柱是一种键合镁吸附剂，能除去极性干扰物；Al₂O₃ - N 可吸附保留芳香族和脂肪胺类等含电负性基团的化合物。本实验对比以上 4 种 SPE 柱对河蚌蚌肉样品的净化效果（图 3），通过 Florisil 柱净化后的样品杂质峰较少，且回收率符合残留分析的要求。

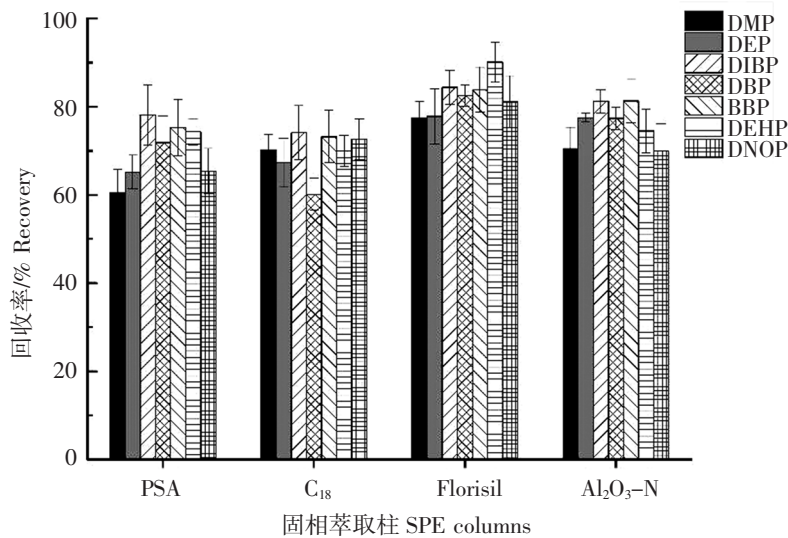


图 3 不同 SPE 净化效果对比
Fig.3 Comparison of different SPE columns for purification

2.5 方法线性

在上述仪器条件下，对梯度浓度（0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/L）的混合标准溶

液进行测定，每种浓度进样 3 次。在该范围内以质量浓度与峰面积比（待测组分与同位素内标物峰面积比）作标准曲线并得到线性方程，相

关系数 r^2 均大于 0.99，表明该方法具有良好的线性关系。

2.6 回收率、检出限及精密度

对河蚌蚌肉样品进行添加回收率试验，分别进行 3 个水平（0.50、1.00、2.00 mg/kg）的添加回收试验，每个添加浓度进行 3 个平行试验。

表 2 河蚌样品中邻苯二甲酸酯平均回收率和相对标准偏差（n=3）
Tab.2 Recovery and RSD of spiked samples（n=3）

组分 Component	添加量/(mg/kg) Spiked concentration						检出限/ (μg/kg) LODs	定量限/ (μg/kg) LOQs
	0.50		1.00		2.00			
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%		
	Recovery	RSD/%	Recovery	RSD/%	Recovery	RSD/%		
DMP	78.4	1.4	73.1	5.9	80.8	2.8	1.2	4.0
DEP	75.2	4.7	74.3	3.2	79.5	8.9	2.2	7.3
DIBP	81.3	9.3	84.5	4.6	90.2	6.2	2.4	8.0
DBP	84.1	5.2	73.6	2.9	90.3	5.3	3.0	10.0
BBP	83.2	0.7	88.6	5.4	88.5	6.8	2.8	9.3
DEHP	87.6	1.3	79.5	1.3	76.9	4.3	3.9	13.0
DNOP	73.8	5.6	89.8	5.7	94.3	1.7	3.5	11.7

2.7 样品测定

通过本试验优化的前处理及仪器条件对河蚌进行 PAEs 含量测定，同时测定乙酸乙酯和正己烷试剂中 PAEs 的残留量，检测后发现正己烷试剂中有少量的 PAEs 检出，考虑原因是封装溶剂的塑料瓶盖少量溶解到溶剂中，在扣除溶剂本底后，测定的河蚌样品中仅有 DEP 和 DBP 两种目标物残留，残留量在 10~30 μg/kg 范围内，通过对养殖区域环境水样中 PAEs 的调查研究，结果发现水体中存在 DEP 残留，由此可见河蚌蚌肉中 PAEs 残留的主要途径是通过水体迁移和富集。

3 结论

本试验通过优化前处理条件对河蚌蚌肉中 PAEs 进行检测分析，结果表明 7 种 PAEs 在 0.10~2.00 mg/L 的浓度范围内具有良好的线性关系，添加回收率试验结果均高于 70% 以上，符合残留量检测的要求，可较准确地反映所测样品的含量，可适用于大批量样品的监测工作。由于河蚌的生长环境在湖底，因此后期将进一步对湖区的底泥中 PAEs 污染状况进行监测，从而对

通过测定计算得出不同浓度的平均回收率在 73.1%~94.3% 之间，相对标准偏差（RSD）小于 9.3%，该方法精密度良好。以 3 倍和 10 倍信噪比（S/N）作检出限（LODs）和定量限（LOQs），结果表明本方法具有较高的灵敏度（表 2）。

污染物在整个环境中的迁移规律进行研究。

参考文献：

[1] 张娜, 刘欣. 邻苯二甲酸酯类化合物的研究进展[J]. 环境科学导刊, 2009, 28 (3): 25-28.

[2] MATSUMOTOA M, HIRATA-KOIZUMIA M, EMA M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction[J]. Regulatory Toxicology Pharmacology, 2008, 50 (1): 37-49.

[3] ADIBI J J, PERERA F P, JEDRYCHOWSKI W, et al. Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland [J]. Environmental Health Perspectives, 2003, 111 (14): 1719-1722.

[4] 黄晓东, 陶然, 徐强. 紫外分光光度法测定饮用纯净水中邻苯二甲酸二己酯含量 [J]. 食品科学, 2012, 33 (16): 237-240.

[5] 肖佳, 黄颖, 王敏毅, 等. 在线富集-微乳液毛细管电动色谱法分析食品塑料袋中邻苯二甲酸酯类化合物 [J]. 色谱, 2012, 30 (9): 951-956.

[6] 马燕玲, 陈令新, 丁养军, 等. 超声辅助分散液液微萃取-高效液相色谱测定水样中的 4 种邻苯

- 二甲酸酯类增塑剂 [J]. 色谱, 2013, 31 (2): 155-161.
- [7] 杨荣静, 卫碧文, 高欢, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测食品接触材料中的 17 种邻苯二甲酸酯类增塑剂 [J]. 环境化学, 2012, 31 (6): 925-929.
- [8] 李拥军, 熊文明, 陈坚文, 等. 固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定罗非鱼中 9 种邻苯二甲酸酯 [J]. 分析测试学报, 2012, 31 (3): 278-283.
- [9] Environmental Protection Agency. EPA Method 8061A Phthalate esters by gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD) [S]. Washington D C: Environmental Protection Agency, 1996.
- [10] 芦丽, 宫旭, 冯友龙. 气相色谱-三重四级杆质谱法测定保健酒中 16 种邻苯二甲酸酯类物质 [J]. 色谱, 2014, 32 (11): 1286-1292.
- [11] JEN J, LIU T. Determination of the phthalate esters from food contacted materials by on-line microdialysis and liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1130 (1): 28-30.
- [12] 张缓, 姜启兴, 许艳顺, 等. 采珠后河蚌副产物的营养成分分析及评价 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (19): 346-349.
- [13] WANG F, XIA X H, SHA Y J. Distribution of phthalic acid esters in Wuhan section of the Yangtze River [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 154 (1): 317-324.
- [14] SHA Y J, XIA X H, YANG Z F, et al. Distribution of PAEs in the middle and lower reaches of the Yellow River [J]. Environmental Monitoring Assessment, 2007, 124 (1-3): 277-287.
- [15] ZENG F, WEN J, CUI K, et al. Seasonal distribution of phthalate esters in surface water of the urban lakes in the subtropical city [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 169 (1): 719-725.
- [16] 李凤华, 陈金东. 同位素稀释-气相色谱-质谱法测定白酒中 23 种邻苯二甲酸酯类化合物 [J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51 (2): 215-218.
- [17] 孙慧宇, 陈君义, 王玥, 等. 液相色谱-同位素稀释串联质谱法测定动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留 [J]. 分析试验室, 2011, 30 (7): 115-118.
- [18] 贺小敏, 陈浩. 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中 8 种全氟化合物 [J]. 食品科学, 2014, 35 (8): 193-197.
- [19] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of result [Z]. Official Journal of the European Communities, 2002.

Determination of phthalate acid ester residues in the meat of freshwater mussel by gas chromatography - mass spectrometry

Gulibahaer - Aihemaiti, Ayiguli - Taxi

(Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Instrument Analysis, Urumqi 830011, China)

Abstract: The freshwater mussel samples were extracted with ethyl acetate solvent. Then the samples were purified by solid-phase extraction with Florisil column. After filtration, the filtrate was concentrated with nitrogen and concentrated with n-hexane. The content was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with isotope internal standard method. The results showed that: PAEs had a good linear relationship between 0.10 ~ 2.00 mg/L, while the correlation coefficient r^2 were all above 0.99. The average recoveries ranged from 73.1% to 94.3% with RSD that less than 9.3% by three level of spiked concentrations. The limit of detection were ranged from 1.2 to 3.9 $\mu\text{g/kg}$. The method had the advantages of simple pretreatment, high sensitivity and high accuracy, and could be satisfied in requirement of detecting phthalate residues in freshwater mussel meat.

Key words: PAEs; freshwater mussel meat; GC-MS