

高效液相色谱法测定白酒中的邻苯二甲酸酯

Detection on phthalates in white spirit by HPLC

蔡英翔 李忠海 付湘晋 张慧 黎继烈 王书源

CAI Ying-xiang LI Zhong-hai FU Xiang-jin ZHANG Hui LI Ji-lie WANG Shu-yuan

(中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004)

(Faculty of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and
Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:建立一种基于高效液相色谱法(HPLC)邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)、邻苯二甲酸二戊酯(DPP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二烯丙酯(DAP)进行检测分析。以C₁₈反相柱为分析柱,采用UV检测器对比了两种不同流动相的洗脱效果,最后选择乙腈—超纯水为流动相进行梯度洗脱,检测6种邻苯二甲酸酯类塑化剂在1~20 mg/L范围内有着良好的线性范围($R^2 > 0.9990$)。在3个添加水平下,6种塑化剂的回收率在85.57%~109.90%,相对标准偏差小于5%。此方法的检出限范围为0.179~0.425 mg/L,该方法灵敏、方便且稳定,可用于食品中邻苯二甲酸酯类塑化剂的快速检测。

关键词:高效液相色谱法;梯度洗脱;邻苯二甲酸酯;塑化剂

Abstract: A comprehensive analytical method based on high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for measurement in foods of 6 phthalates-Dibutyl phthalate, Dioctyl Phthalate, Di-N-pentyl phthalate, Diethyl phthalate, Butyl benzyl phthalate, Diallyl phthalate. The extracts were analyzed by HPLC using an Inertsil® C₁₈ column. The two kind of organic mobile phases which are acetonitril and the methanol were compared. The acetonitril-water gradient elution was found to be more advantageous. Under the optimal conditions, the calibration curves showed a good linearity ($R^2 > 0.9990$) in the concentration ranged from 1.0~20.0 mg/L for 4 target compounds. Recoveries of 6 analyses at three spiked levels ranged from 85.57% to 109.90%, with relative standard deviations (RSD) less than 10%. The detection limits of the method ranged from 0.179 to 0.425 mg/L. This method is sensitive and simple, and is suitable for the rapid determination of the phthalates added in the food.

基金项目: 国家科技支撑计划课题(编号:2012BAD29B05, 2012BAC01B07);质检公益性行业科研专项(编号:201310128,201210036,201110061)

作者简介: 蔡英翔(1988—),男,中南林业科技大学在读硕士研究生。
E-mail: 616753407@qq.com

通讯作者: 李忠海

收稿日期: 2014-12-01

Keywords: high performance liquid chromatography; gradient elution; phthalates; plasticizer

塑化剂,又称增塑剂,是一种在塑料加工中为增强其柔韧性,方便加工而加入的一种工业助剂。由于塑化剂在食品加工中可以起到乳化稳定剂的效果,且成本低,最近几年大量不法商贩使用塑化剂代替乳化稳定剂在食品加工中使用。其中邻苯二甲酸二丁基酯(DBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)、邻苯二甲酸二戊酯(DPP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二烯丙酯(DAP)(图1)使用较多。邻苯二甲酸酯类塑化剂分子结构类似于人体荷尔蒙,进入人体后形成假性荷尔蒙,传递假性化学信号,干扰内分泌,对人体造成损害^[1-4]。

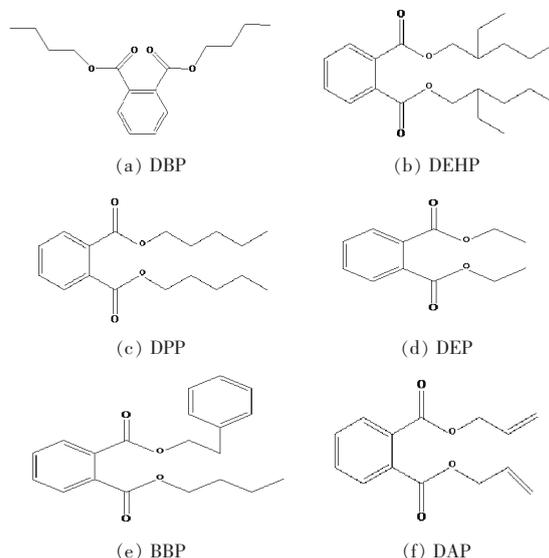


图1 6种邻苯二甲酸酯的分子结构

Figure 1 Molecular structure of 6 PAEs

目前针对邻苯二甲酸酯类塑化剂的检测有气相色谱法^[5,6]、气质联用法(GC-MS)^[7,8]、液相质谱联用法^[9,10]等。中国国标^[11]推荐的邻苯二甲酸酯类塑化剂的检测方法是气质联用(GC-MS)法,但气质联用仪器,耗材和仪器的维护费用都比一般的方法高,而液相色谱法可降低相关研究成本而且操作简单,但多种邻苯二甲酸酯类塑化剂在液相色谱下较难分离,检出限较高^[12],为进一步提高检测效率且适用于基层实验室的日常检测分析的方法,本研究以外标法,利用LC-20AT岛津高效液相色谱仪,通过优化流动相对白酒中6种邻苯二甲酸酯类塑化剂同时进行测定,建立一种适合该型仪器的高效液相色谱方法,并将此法成功应用于白酒中邻苯二甲酸酯类塑化剂的含量测定。

1 材料和方法

1.1 仪器、材料和试剂

1.1.1 仪器

高效液相色谱仪:LC-20AT型,日本岛津公司;
超声波清洗仪:KQ-50B型,昆山市超声仪器有限公司;
真空泵:PD 5001/5006型,德国 Heidolph 公司;
超纯水机:ZWL-LS1-10型,中沃水务公司。

1.1.2 材料和试剂

邻苯二甲酸二丁基酯、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、邻苯二甲酸二烯丙酯;纯度 $\geq 99.0\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

邻苯二甲酸二戊基酯;纯度 $\geq 99.2\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

邻苯二甲酸二乙基酯;纯度 $\geq 98.5\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

邻苯二甲酸丁苄酯;纯度 $\geq 98.5\%$,美国阿拉丁公司;
甲醇:色谱纯,韩国 SK. Chemicals 公司;

乙腈:色谱纯,中国国药集团化学试剂有限公司;
瓶装白酒:北京红星公司。

为减少试验误差,所使用的玻璃器皿用超纯水淋洗3次,放入丙酮中浸泡24 h,烘箱中80℃烘烤12 h,整个试验过程中应避免使用其他塑料制品以带来试验误差。

1.1.3 标准储备溶液的制备 分别取各种邻苯二甲酸酯类增塑剂2.000 mg标准样,加入2 mL甲醇溶解后,取1 mL移至10 mL容量瓶中用甲醇定容,配制成0.1 mg/mL的标准储备液后,放置于2℃的冰箱冷藏。使用时再根据实际需求配制成不同浓度的标准溶液。

1.1.4 标准混合液和标准工作液的制备 分别取6种塑化剂单标标准储备液100 μ L于100 mL容量瓶中,用甲醇定容得到 1×10^{-4} mg/mL的标准混合液,放置于2℃的冰箱冷藏。工作液的配制要临用前再配制,通过不同体积混合液溶液分别配制0.1,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,20.0 μ g/L的工作液待用。

1.2 色谱条件

色谱柱为C₁₈柱(Inertsil® ODS-SP 4.6 \times 250 mm, 5 μ m);柱温为40℃;UV检测器波长选取邻苯二甲酸酯类最大吸收峰224 nm^[13];进样量为10 μ L;流动相A为超纯水,B为乙腈,梯度洗脱程序为:0~2.5 min,80%~100% B;2.51~10 min,100% B;10.01~12.50 min,100%~80% B;12.51~20 min,80% B(图2);流速为1.0 mL/min。

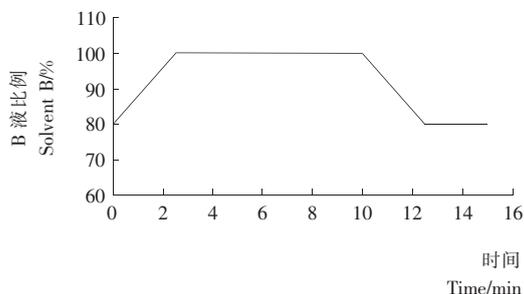


图2 6种塑化剂的梯度洗脱程序

Figure 2 Gradient elution program for high performance liquid chromatography analysis of six phthalic acid esters

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

由于待测的6种抗氧化剂极性范围较宽,极性弱的化合物(如BBP和DAP)需要高有机相含量才能将其在较短的时间内充分地洗脱下来,因此需要提高流动相中有机相的比例,但流动相中有机相含量过大又会降低极性相似化合物的分离度,加大了定性和定量分析的难度。所以,为了同时得到较快的洗脱速度和较好的分离效果,改善化合物的峰形,需要采用梯度洗脱的方法。本试验先对比了甲醇和乙腈两种常用洗脱液纯有机相洗脱效果,

由图3.4可知,在两种纯有机相洗脱条件下,6种塑化剂在纯乙腈流动相下,10 min内都能够出峰,但是分离度较差。其中在纯甲醇洗脱条件下,6种塑化剂在30 min之内还有BBP、DAP并未出峰检出,且分离度也不佳。所以选用乙腈做流动相,根据纯乙腈流动相下洗脱情况进行梯度洗脱,选择条件为:流动相A为超纯水,B为乙腈,梯度洗脱程序为:0~2.5 min,80%~100% B;2.51~10.00 min,100% B;10.01~12.50 min,100%~80% B;12.51~20.00 min,80% B。虽然用梯度洗脱的洗脱液时,其色谱图基线漂移,但在进行定量分析必须分离不同物质峰,基线漂移带来的影响可对谱图进行手动积分来消除(图5和表1)。

2.2 线性相关性、检出限、检出量和重复性

采用峰面积外标法定量,以浓度(0.1,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0 mg/L)为横坐标,峰面积为纵坐标建立标准曲线(表2),根据 $S/N=3$ 计算得DBP、DEHP、DPP、DEP、BBP、DAP的最低检出限(LOD),检出量(LOQ),结果见表3。

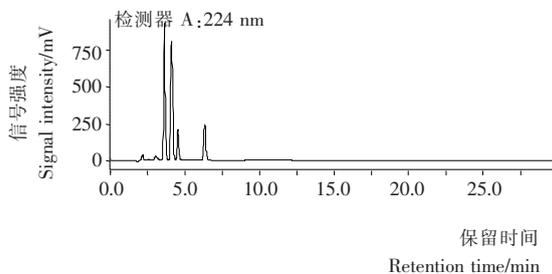


图 3 甲醇纯有机相洗脱色谱图

Figure 3 The HPLC chromatogram of six phthalic acid esters with methanol elution

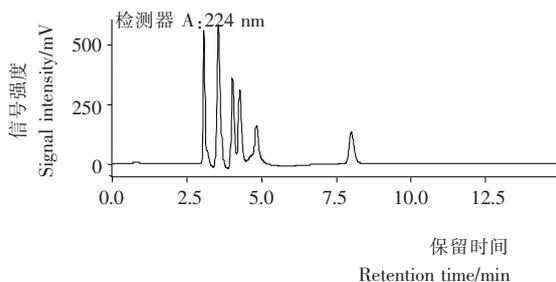


图 4 乙腈纯有机相洗脱色谱图

Figure 4 The HPLC chromatogram of six phthalic acid esters with acetonitrile elution

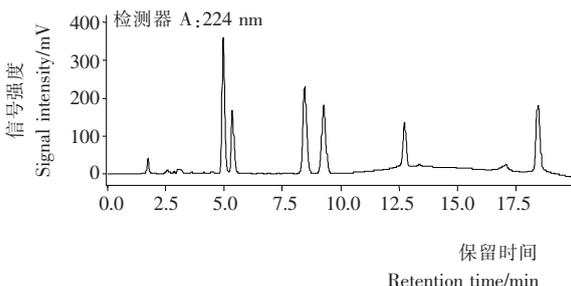


图 5 乙腈梯度洗脱下 6 种塑化剂色谱图

Figure 5 The chromatogram of six phthalic acid esters in gradient elution

表 1 6 种塑化剂的出峰顺序

Table 1 The elution order of 6 PAEs

序号	出峰时间/min	塑化剂
1	4.950	DEP
2	5.350	DPP
3	8.449	DEHP
4	9.261	DBP
5	12.736	BBP
6	18.460	DAP

表 2 标准曲线和线性范围

Table 2 Regression equations and Linear range

塑化剂	线性回归方程	线性范围/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
DEP	$Y=0.000\ 005\ 077X+0.076\ 34$	1~20
DPP	$Y=0.000\ 005\ 894X+0.091\ 63$	1~20
DEHP	$Y=0.000\ 002\ 781X+0.047\ 81$	1~20
DBP	$Y=0.000\ 006\ 453X+0.062\ 38$	1~20
BBP	$Y=0.000\ 006\ 164X+0.010\ 65$	1~20
DAP	$Y=0.000\ 008\ 593X+0.009\ 12$	1~20

表 3 方法线性相关性、检出限和检出量

Table 3 The linear relationship, limit of detection (LOD) and limit of quantity (LOQ) ($S/N=3$)

塑化剂	R^2	LOD/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	LOQ/mg
DEP	0.999 9	0.179 2	0.543 3
DPP	0.999 9	0.215 2	0.652 4
DEHP	0.999 9	0.202 2	0.612 9
DBP	0.999 9	0.178 3	0.540 4
BBP	0.999 9	0.230 8	0.699 4
DAP	0.999 6	0.424 5	1.286 4

由表 2、3 可知,在梯度洗脱条件下,在 1~20 mg/L 范围内,6 种塑化剂标准曲线的线性相关性均大于 0.999 0,DEP、DPP、DEHP、DBP、BBP 检测限在 0.2 mg/L 左右,DAP 的检测限在 0.4 mg/L 左右。所以该方法检测限低,回收率好,重复性稳定,可用于检测食品中的这 6 种塑化剂。

2.3 实际样品检测分析

用以上建立的测定方法测定自来水和市售塑料瓶装白酒中塑化剂的含量,分别取自来水和市售瓶装白酒 100 mL,过 0.22 μm 滤膜后待测。自来水和市售瓶装白酒中均未检出 PAEs。将标准工作液添加至 100 mL 自来水和市售瓶装白酒中,添加水平分别为 2.0, 1.0, 0.5 mg ,加入正己烷 2.0 mL,加玻璃塞后涡旋振荡 1 min,静置分层,取上层清液按上述方法每个加标水平下平行测定 5 次^[14]。6 种塑化剂的平均回收率在 85.57%~109.90%,相对标准偏差在 1.1%~4.8%,测定结果见表 4。

3 结论

通过对色谱流动相梯度洗脱优化,建立一个同时测定 6 种邻苯二甲酸酯类增塑剂的高效液相色谱方法。按以上建立的测定方法测定自来水和市售瓶装白酒中的塑化剂的含量,则具有分离度好、基线平稳、重现性好等特点,最低检出限可完全满足 6 种邻苯二甲酸酯类增塑剂在中国国标要求检测的需要。

表4 塑化剂的添加回收率和精密度

Table 4 Average recoveries and relative standard deviations (RSD) of sixphthalic acid esters

塑化剂	加标量/ (mg · L ⁻¹)	自来水		瓶装酒	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
DEP	2.0	97.89	3.5	96.76	1.6
	1.0	95.66	4.6	92.33	4.7
	0.5	109.90	3.1	94.21	3.8
DPP	2.0	97.10	2.2	96.53	3.9
	1.0	95.41	3.8	92.42	3.4
	0.5	110.24	2.1	94.29	2.0
DEHP	2.0	99.13	1.3	102.25	2.9
	1.0	94.98	2.3	96.67	3.2
	0.5	108.72	3.9	101.20	4.0
DBP	2.0	98.94	2.8	98.22	2.1
	1.0	93.63	4.7	92.67	4.0
	0.5	106.74	2.5	102.29	3.5
BBP	2.0	92.18	2.3	93.12	4.4
	1.0	85.57	2.7	87.99	4.1
	0.5	89.86	3.5	90.01	4.8
DAP	2.0	97.66	3.8	97.87	1.1
	1.0	89.28	1.7	100.91	1.2
	0.5	99.92	2.5	99.24	2.6

参考文献

1 Supornsilchai V, Soder O, Svehnikov K. Stimulation of the pituitary-adrenal axis and of adrenocortical steroidogenesis ex vivo by administration of di-2-ethylhexyl phthalate to prepubertal male rats[J]. J. Endocrinol, 2007, 192(1): 33~39.

2 Lovekamp-Swan T, Davis B J. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system [J]. Environ Health Perspectives, 2003, 111(2): 139~145.

3 Svehnikova I, Svehnikov K, Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats[J]. J. Endocrinol, 2007, 194(3): 603~609.

4 陈洪涛, 王力清, 黄翠莉, 等. 邻苯二甲酸酯毒理学研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 251~254.

5 张修景. 气相色谱法测定白酒中邻苯二甲酸二丁酯含量[J]. 理化检验, 2013, 49(10): 1 182~1 184.

6 李艳松, 陈铁英, 黄宝临, 等. 食品中 16 种邻苯二甲酸酯类化合物的气相色谱测定方法[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 105~107.

7 邵秋荣, 刘斌, 丁晓, 等. 气相色谱-质谱法测定酒中 23 种邻苯二甲酸酯残留量[J]. 理化检验, 2014, 50(10): 1 263~1 267.

8 Wang Ming-lin, Kou Li-juan, Zhang Yu-qian, et al. Matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry for the determination of phthalic acid esters in vegetables[J]. Sepu, 2007, 25(4): 577~580.

9 夏春岚, 任举, 朱小梅, 等. 15 种邻苯二甲酸酯在液相色谱/串联质谱上的分离和系统干扰研究[J]. 香精香料化妆品, 2013, 10(5): 36~42.

10 刘杰, 郁宏燕, 鲍立杰, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饮料中 16 种邻苯二甲酸酯[J]. 食品科学, 2012, 33(18): 211~215.

11 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21911-2008 食品中邻苯二甲酸酯的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

12 梁漱玉, 任佳丽, 李忠海, 等. 食品包装材料中 PAEs 前处理及色谱法测定研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 232~236.

13 杨博锋, 汤志旭, 高昕, 等. 高效液相色谱法测定纸制食品接触材料中邻苯二甲酸酯的迁移量[J]. 食品科学, 2012, 31(10): 1 272~1 276.

14 顾强, 张晨琛, 张慧, 等. 白酒中邻苯二甲酸酯类检测的样品前处理方法优化研究[J]. 食品科技, 2014, 39(9): 279~283.

信息窗

日本开发农残自动分析仪 50 min 完成检测

据日本媒体消息, 宫崎县综合农业试验场、岛津制作所、大阪大学、神户大学组成的研发小组, 开发了短时间内全自动分析农作物中残留农药成分的装置。

使用该装置、以前花近 1 周的分析现只需 50 min 就可完成。宫崎县从 3 月末开始将使用该装置进行分析。

据宫崎县报导, 在日本国内使用的农药成分约有 400 种, 世界上约有 800 种。以前各种成分的检测方法各异, 而且使用有机溶剂进行提取也很费时间。

该研发小组利用“超临界流体”在高温、高压下同时拥有液体和气体特性, 具有高提取能力的性质, 使用二氧化碳等超临界流体, 省去了提取相关的前处理过程。建立了提取、分析为一体, 可同时检测 500 种成分的全自动检测体系。

该装置中有机溶剂的使用量可降低到过去的 1/10。并可以切断样品和空气的接触, 可用于氧化分解而难于检测的成分的检测上。

(来源: www.foodmate.net)