

微乳毛细管电动色谱法检测黄酒中 邻苯二甲酸酯类增塑剂

黄琦^{1,2}, 季晓娟¹, 徐立锋¹

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品
化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023)

摘要: 建立了微乳毛细管电动色谱法分离检测 12 种邻苯二甲酸酯类(PAEs)增塑剂的方法。考察了缓冲液类型及质量浓度、pH、表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)质量浓度、助表面活性剂质量浓度、乙腈体积分数等对 12 种 PAEs 分离的影响。结果表明,最佳的微乳液组成为:质量浓度为 33.1 mg/mL 的 SDS、66.1 mg/mL 的正丁醇、8.1 mg/mL 的正辛烷,体积分数为 12% 的乙腈、77.3% 的 6 mmol/L 磷酸盐-硼砂缓冲液(pH 值为 9.0)。当分离温度为 20 ℃,分离电压为 20 kV,检测波长 230 nm 时,12 种 PAEs 在 20 min 内达到基线分离。12 种 PAEs 的平均回收率和精密度分别为 85.3%~96.9% 和 3.4%~6.8%,方法检出限(S/N=3)低至 0.5 μg/mL。该方法操作简便,灵敏度较高,试验结果准确可靠,可用于黄酒样品中 12 种 PAEs 的检测,结果满意。

关键词: 微乳毛细管电动色谱法;邻苯二甲酸酯;黄酒

中图分类号: O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1671-8798(2018)03-0187-06

Detection of phthalate acid esters in rice wine by microemulsion capillary electrokinetic chromatography

HUANG Qi^{1,2}, JI Xiaojuan¹, XU Lifeng¹

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

Abstract: A microemulsion electrokinetic chromatographic (MEEKC) method was developed to separate and detect 12 phthalate acid esters (PAEs) in rice wine. A variety of factors were examined, including pH values, and mass concentration of buffer solution, sodium dodecyl sulfate (SDS) surfactant, co-surfactant, volume fraction of acetonitrile, in order to optimize their effects on the separations of 12 PAEs. The results indicated that an optimal MEEKC separation method was achieved by using a microemulsion solution of pH 9.0 containing 33.1 mg/mL (w/v) SDS, 66.1 mg/mL (w/v)

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 浙江省分析测试科技计划研究项目(2015C37072)

通信作者: 黄琦(1980—),女,河南省开封人,讲师,硕士,主要从事食品分析、药物分析研究。E-mail: huangqipharma@126.com。

1-butanol, 8.1 mg/mL (w/v) octane, 12% (v/v) acetonitrile and 77.3% (v/v) 6 mmol/L phosphate-borax buffer solution. The 12 PAEs were baseline separated within 20 min at 20 kV and 20 °C, when the detection wavelength being 230 nm. Under the optimized experimental conditions, the average recoveries and precision rates of 12 PAEs were in the ranges of 85.3%~96.9% and 3.4%~6.8%, respectively. The lowest limit of detection (LOD) was 0.5(μg/mL). The MEEKC method, simple in operation, high in sensitivity and reliable in result, has been successfully applied for the analysis of 12 PAEs in rice wine with satisfactory results.

Keywords: microemulsion capillary electrokinetic chromatography; phthalate acid esters; rice wine

邻苯二甲酸酯类(phthalate acid esters, PAEs)增塑剂广泛应用于塑料工业,普遍存在于食品包装材料、玩具、医用血袋和胶管、个人护理用品等数百种产品中,对人体的健康有严重的危害。研究表明,PAEs 又是一类环境激素,有类似雌性激素的作用,长期接触可干扰内分泌,尤其对于男性,可造成生殖问题^[1-3]。PAEs 比较容易迁移到环境中,可通过食品包装材料迁移到食品中而被人体吸收。近年来,对于邻苯二甲酸酯类产生的危害时有报道^[4],欧盟、美国、中国等国家和地区都制定了限制 PAEs 使用的法律法规。

黄酒是中国古老传统酒种之一,浙江省黄酒尤其是绍兴黄酒在国内外久负盛名。近年来,黄酒中邻苯二甲酸酯类增塑剂超标问题日益引起关注。黄酒中乙醇含量较高,而乙醇对 PAEs 有良好的溶解能力,在黄酒与塑料制品如塑料容器、塑料内盖、塑料接酒桶等的接触过程中 PAEs 有迁移到黄酒中的风险。黄酒中 PAEs 的测定方法大多采用 GC-MS 法^[5-8]、HPLC 法^[9-10]、UPLC 法^[11-12]等,这些方法对仪器要求比较高,而采用微乳毛细管电动色谱法(MEEKC)测定黄酒中 PAEs 鲜有报道。因此,本研究在经典微乳体系基础上加入有机添加剂乙腈,可分离并同时测定 12 种邻苯二甲酸酯类增塑剂,将其应用于黄酒中 PAEs 的检查。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:SQ-Agilent 7100 高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司);未涂层熔融石英毛细管:65.2 cm×75 μm,有效长度 57.5 cm(河北永年锐沣色谱器件有限公司);Oasis HLB Glass 柱(6 mL/200 mg,美国 Waters 公司);旋转蒸发器(上海予捷仪器有限公司)。

试剂:邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯(DMEP)、邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯(DEEP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二烯丙酯(DAP)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)、邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯(DBEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)、邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)、邻苯二甲酸二己酯(DHXP)标准品,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度均大于 96%;SDS(纯度>98%),美国 Sigma 公司;正己烷(色谱纯),美国 Sigma 公司。试验用水为三次重蒸水;试验过程避免接触塑料容器;黄酒样品购自本地超市。

1.2 溶液的制备

1.2.1 微乳液的制备

缓冲溶液 pH 值用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L H₃PO₄ 溶液调节。取 SDS、正丁醇、有机添加剂和油相溶于缓冲液,超声混合 30 min。

1.2.2 标准溶液

准确量取 12 种邻苯二甲酸酯标准溶液,用微乳缓冲溶液超声溶解,定容至 100 mL,低温保存。

1.2.3 样品的提取、净化

参考文献[12],准确称取 5.00 g 黄酒样品置 25 mL 烧杯中,加水稀释,使乙醇体积分数小于 5%。将

稀释液加入活化后的 Oasis HLB Glass 柱,控制流速 1 mL/min,用 5 mL 5% 甲醇水溶液淋洗,待淋洗液流干,用 5 mL 乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液,氮气吹干,超声溶解于微乳缓冲溶液,定容至 1.0 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤,待进样分析。

1.3 试验方法

试验前分别用 0.5 mol/L NaOH、水和缓冲溶液冲洗毛细管 5 min,2 次运行之间按上述条件重复冲洗。分离电压 20 kV,进样时间 6 s,进样压力 5.0 kPa,温度 20 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 230 nm。

2 结果与讨论

2.1 微乳体系的组成

MEEKC 中经典的微乳体系由质量浓度为 33.1 mg/mL 的 SDS、66.1 mg/mL 的正丁醇、8.1 mg/mL 的正辛烷和体积分数为 89.3% 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值为 8.5)组成^[13]。pH 值会影响分离度,有机添加剂能明显改善分离选择性,而 SDS 浓度和水相电解质浓度会对分离时间产生影响^[14]。在 12 种邻苯二甲酸酯类增塑剂中,DIBP、BBP、DBEP 和 DBP 4 种增塑剂较难分离。因此,本试验以经典微乳体系作为研究起点,对影响结构相近物分离的因素进行优化,使 12 种邻苯二甲酸酯类增塑剂得以分离。

2.1.1 缓冲液体积分数

在 2~10 mmol/L 范围内,随着磷酸盐体积分数的增加,12 种 PAEs 的分离度有所改善,工作电流有所增大,但迁移时间没有明显变化。为减少工作电流,选择 6 mmol/L 的磷酸盐-硼砂缓冲液。

2.1.2 pH 值

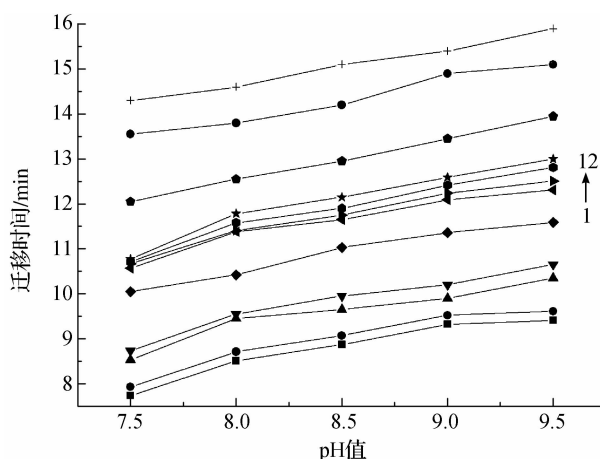
pH 值对 12 种 PAEs 分离度的影响见图 1。由图 1 可知,12 种 PAEs 的迁移时间随着 pH 值的增大而有所增加,相邻 PAEs 的分离度有所改善。在 pH 值为 9.0 时,12 种 PAEs 均能获得较好峰形和适宜的分离时间。综合考虑分离度、灵敏度和适宜的出峰时间,选择 pH 值为 9.0。

2.1.3 SDS 质量浓度

SDS 对形成稳定均一的微乳液是非常重要的,并可影响分离的效果。当 SDS 质量浓度过高时,电泳的电流会产生较大的焦耳热,工作电流也随之增加;当 SDS 质量浓度降到 20 mg/mL 时,微乳液会变浑浊,导致分离体系不稳定。结合分析时间和分离效率,仍采用质量浓度为 33.1 mg/mL 的 SDS。

2.1.4 有机添加剂的影响

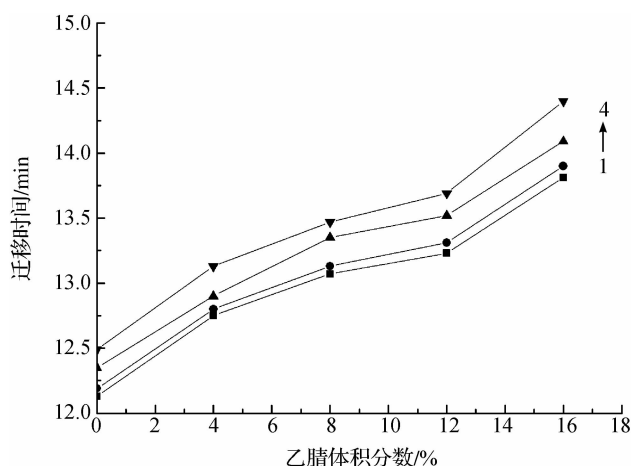
体积分数为 20% 以内的乙腈和甲醇常作为 MEEKC 的有机添加剂^[14]。有机添加剂可以改变被分析物在油相和水相的分配系数,增加时间窗口、改善峰形、提高柱效。对较难分离的 DIBP、BBP、DBEP 和 DBP,添加乙腈后可明显改善分离度。由图 2 可知,不同乙腈体积分数(4%、8%、12%、16%)



1—DMP; 2—DMEP; 3—DEEP; 4—DEP; 5—DAP; 6—DIBP; 7—BBP; 8—DBEP; 9—DBP; 10—DHXP; 11—DEHP; 12—DNOP。

图 1 pH 值对分离的影响

Fig. 1 Effect of pH values on separation



1—DIBP; 2—BBP; 3—DBEP; 4—DBP。

图 2 乙腈体积分数对 4 种 PAEs 分离的影响

Fig. 2 Effect of acetonitrile volume fraction on separation of 4 PAEs

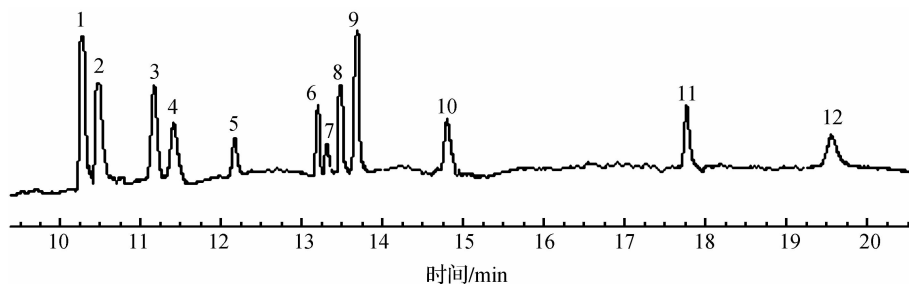
对 4 种 PAEs 的分离有明显改善,综合考虑出峰时间和分离度,本试验选择添加体积分数为 12% 的乙腈。

2.1.5 电泳条件

电压在 15~30 kV 范围内,随着电压的升高,12 种 PAEs 的迁移时间会减少,高电压会引起焦耳热问题,因此,选择分离电压 20 kV。当分离温度为 20 ℃ 时,能获得较好的重现性。

2.1.6 MEEKC 分离条件

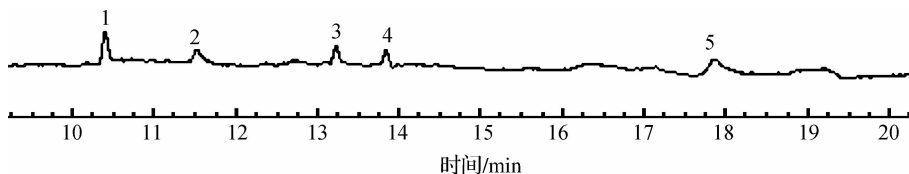
通过对各因素的考察,最终确定的微乳体系为:质量浓度为 33.1 mg/mL 的 SDS、66.1 mg/mL 的正丁醇、8.1 mg/mL 的正辛烷,体积分数为 12% 的乙腈、77.3% 的 6 mmol/L 磷酸盐-硼砂缓冲液(pH 值为 9.0)。分离电压 20 kV,分离温度 20 ℃,检测波长 230 nm。在该色谱条件下,12 种 PAEs 标准混合液微乳毛细管电动色谱分离谱图见图 3,较难分离的 DIBP、BBP、DBEP 和 DBP 达到基线分离。空白黄酒样品在 12 种 PAEs 的出峰时间范围内无干扰,检出 PAEs 的黄酒样品谱图见图 4。



1—DMP; 2—DMEP; 3—DEEP; 4—DEP; 5—DAP; 6—DIBP;
7—BBP; 8—DBEP; 9—DBP; 10—DHXP; 11—DEHP; 12—DNOP。

图 3 12 种 PAEs 标准混合液的分离谱图

Fig. 3 Electropherogram of 12 PAEs by MEEKC



1—DMP; 2—DEP; 3—DIBP; 4—DBP; 5—DEHP。

图 4 检出 PAEs 的黄酒样品的微乳电动色谱分离谱图

Fig. 4 Electropherogram of PAEs in rice wine sample by MEEKC

2.2 样品的提取、净化

黄酒中乙醇含量较高,对 PAEs 的溶解性较好,需要先降低样品中酒精含量,清除基质中的氨基酸等干扰物。本研究采用文献[12]的固相提取方法对黄酒样品提取、净化,检测时样品对 12 种 PAEs 无干扰。

2.3 线性范围和检出限

采用外标定量法,得到 12 种 PAEs 的线性回归方程和检出限(LOD, S/N=3),结果见表 1。GB 9685—2008《食品容器、包装材料用添加剂使用标准》规定食品容器、包装材料的添加剂中,DBP 迁移到食品中的最大量不得超过 0.3 mg/kg,DEHP 迁移到食品中的最大量不得超过 1.5 mg/kg^[15],分别相当于 1.5 μg/mL 和 7.5 μg/mL,高于该方法的检出限,因此该方法满足我国卫生部对食品、食品添加剂中 PAEs 的最大残留量检测要求。

表 1 校准曲线、线性范围和检出限

Table 1 Calibration curve, linear range and LOD

| PAEs | 线性回归方程 | 线性范围/(μg · mL ⁻¹) | <i>r</i> | LOD/(μg · mL ⁻¹) |
|------|-------------------|-------------------------------|----------|------------------------------|
| DMP | $Y=220.92X+676.3$ | 1~500 | 0.999 1 | 0.5 |
| DMEP | $Y=271.43X+578.6$ | 1~500 | 0.998 7 | 0.6 |
| DEEP | $Y=261.46X+782.1$ | 1~500 | 0.998 2 | 0.5 |

表 1(续)

| PAEs | 线性回归方程 | 线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | r | LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|------|----------------------|---|---------|--|
| DEP | $Y=371.38X+1\,014.6$ | 1~500 | 0.997 7 | 0.8 |
| DAP | $Y=341.53X+979.3$ | 1~500 | 0.998 0 | 0.5 |
| DIBP | $Y=281.46X+686.9$ | 1~500 | 0.997 9 | 0.5 |
| BBP | $Y=501.33X+1\,709.6$ | 3~500 | 0.995 9 | 1.0 |
| DBEP | $Y=254.37X+1\,200.3$ | 1~500 | 0.998 6 | 0.5 |
| DBP | $Y=279.03X+486.9$ | 1~500 | 0.999 0 | 0.5 |
| DHXP | $Y=501.33X+1\,709.8$ | 1~500 | 0.997 8 | 0.6 |
| DEHP | $Y=294.52X+761.3$ | 1~500 | 0.998 1 | 0.5 |
| DNOP | $Y=491.25X+986.9$ | 1~500 | 0.996 7 | 0.5 |

2.4 重现性

PAEs 混合标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的日内和日间精密度测定结果见表 2,12 种 PAEs 的迁移时间和峰面积重现性良好。

表 2 方法重现性($n=6$)

Table 2 Reproducibility($n=6$)%

| PAEs | 迁移时间 | | 峰面积 | |
|------|--------|--------|--------|--------|
| | 日内 RSD | 日间 RSD | 日内 RSD | 日间 RSD |
| DMP | 2.1 | 2.9 | 2.7 | 3.9 |
| DMEP | 2.6 | 3.1 | 3.3 | 4.6 |
| DEEP | 2.8 | 3.7 | 3.5 | 4.7 |
| DEP | 2.5 | 4.9 | 2.7 | 3.8 |
| DAP | 2.7 | 3.9 | 3.0 | 4.2 |
| DIBP | 2.6 | 3.0 | 2.5 | 3.6 |
| BBP | 3.4 | 4.7 | 4.7 | 6.8 |
| DBEP | 2.6 | 3.2 | 3.3 | 4.7 |
| DBP | 1.9 | 2.8 | 2.4 | 3.9 |
| DHXP | 2.7 | 3.7 | 3.7 | 4.4 |
| DEHP | 2.7 | 4.0 | 3.1 | 4.0 |
| DNOP | 2.9 | 3.8 | 4.4 | 5.7 |

2.5 加标回收率试验

对不含 PAEs 的黄酒样品,测定其分别在 10、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的添标水平下的加标回收率,结果见表 3。

表 3 方法回收率和精密度($n=6$)

Table 3 Recovery and precision rates($n=6$)%

| PAEs | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | | 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | |
|------|----------------------------|-----|-----------------------------|-----|
| | 回收率 | RSD | 回收率 | RSD |
| DMP | 95.1 | 4.7 | 96.4 | 3.4 |
| DMEP | 93.2 | 4.9 | 94.9 | 4.6 |
| DEEP | 90.6 | 5.3 | 93.1 | 4.8 |
| DEP | 89.3 | 6.3 | 91.5 | 5.7 |
| DAP | 91.9 | 4.4 | 92.7 | 4.5 |
| DIBP | 94.1 | 4.3 | 95.9 | 4.9 |
| BBP | 85.3 | 7.4 | 88.5 | 5.9 |
| DBEP | 90.6 | 5.4 | 93.4 | 4.7 |
| DBP | 96.1 | 4.6 | 96.9 | 4.2 |
| DHXP | 88.7 | 6.1 | 89.8 | 5.5 |
| DEHP | 89.6 | 5.6 | 90.2 | 5.1 |
| DNOP | 87.8 | 6.8 | 89.3 | 5.6 |

2.6 样品的检测

对市场上 10 种黄酒品牌(每种品牌 6 批)测定,有 1 个品牌样品检出 DMP、DEP、DIBP、DBP 和 DEHP 5 种 PAEs,有 1 个品牌样品检出 DMP、DBP 和 DEHP 等 3 种 PAEs,有 2 个品牌样品检出 DIBP 和 DEHP 等 2 种 PAEs,其余品牌中未检出 PAEs。

3 结 论

本研究在常用微乳毛细管电动色谱的微乳体系中添加乙腈,可使 2 种 PAEs 达到基线分离。试验所用仪器易于普及,试验所用试剂环境友好。本研究所建立的 MEEKC 方法能检测黄酒中的 12 种 PAEs,方法检测限低至 $0.5 \mu\text{g/mL}$,精密度和准确度良好,能满足黄酒样品中常见 PAEs 的限量检测要求。

参考文献:

- [1] SONNENSCHIN C, SOTO A M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 65(16): 143.
- [2] 刘慧杰. 邻苯二甲酸酯类化合物的毒理学效应及对人群健康的危害[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(19): 1778.
- [3] 张景, 王竹天, 樊永祥, 等. 邻苯二甲酸酯类的毒性、分析方法及使用规定[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 504.
- [4] 樊继彩, 黄希汇, 任韧, 等. 杭州地区食品中 20 种邻苯二甲酸酯的污染调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(10): 1474.
- [5] 荣维广, 阮华, 马永建, 等. 气相色谱-质谱法检测白酒和黄酒中 18 种邻苯二甲酸酯类增塑剂[J]. 分析试验室, 2013, 32(9): 40.
- [6] 吴鹏, 於香湘, 缪建军. 小体积液液萃取气相色谱-质谱法测定水体中邻苯二甲酸酯[J]. 分析科学学报, 2013, 29(1): 139.
- [7] 盛建华, 祝建华, 张卉, 等. 气相色谱-串联质谱法同时测定食品中 18 种邻苯二甲酸酯[J]. 分析科学学报, 2012, 28(6): 855.
- [8] 郑向华, 林立毅, 方恩华, 等. 固相萃取-气相色谱-质谱法测定食品中 23 种邻苯二甲酸酯[J]. 色谱, 2012(1): 27.
- [9] 马燕玲, 陈令新. 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.
- [10] 佟晓波, 李莹, 矫筱曼, 等. HPLC 法测定化妆品中十六种邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 香精香料化妆品, 2012(6): 33.
- [11] 和佳驾, 蒲彦利, 闻向梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定醋和黄酒中邻苯二甲酸酯类塑化剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(18): 3063.
- [12] 吴敏, 郑向华, 张志刚, 等. 前吸附技术-超高压液相色谱-串联质谱法同时测定酒中 24 种邻苯二甲酸酯[J]. 分析试验室, 2016, 34(7): 673.
- [13] HUANG H Y, CHUANG C L, CHIU C W, et al. Determination of food colorants by microemulsion electrokinetic chromatography[J]. Electrophoresis, 2005, 26(4/5): 867.
- [14] 彭振磊, 林金明. 毛细管微乳电动色谱应用的研究进展[J]. 色谱, 2009, 27(5): 621.
- [15] 中国国家标准化管理委员会. 食品容器、包装材料用添加剂使用卫生标准: GB 9685—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 12-13.