

吴红庆, 厉文辉, 高立红, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定婴幼儿奶粉中对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J]. 环境化学, 2020, 39(1): 275-278.

WU Hongqing, LI Wenhui, GAO Lihong, et al. Determination of parabens in infant milk powders by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(1): 275-278.

**ThermoFisher** 赛默飞世尔科技  
SCIENTIFIC

## 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定婴幼儿奶粉中 对羟基苯甲酸酯类防腐剂

吴红庆<sup>1,2</sup> 厉文辉<sup>1</sup> 高立红<sup>3</sup> 刘杰民<sup>1</sup>

(1. 北京科技大学化学与生物工程学院, 北京, 100083; 2. 遵义市公安局司法鉴定中心, 遵义, 563000;  
3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司应用研发中心, 北京, 100102)

**摘要** 建立了高效液相色谱-串联质谱法检测奶粉中 8 种对羟基苯甲酸酯类防腐剂的分析方法. 样品以乙腈为提取溶剂, 经 HLB 固相萃取柱富集净化, 分别用甲醇和丙酮溶液洗脱, 洗脱液经氮吹浓缩定容后, 高效液相色谱-串联质谱仪进行分析. 8 种对羟基苯甲酸酯加标浓度在 5、50、100  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$  时的回收率分别为 71.1%—96.1%、72.8%—99.8% 和 78.8%—118%, 相对标准偏差(RSD)为 3.2%—10% ( $n=5$ ), 内标法定量, 方法检出限为 0.04—0.43  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ . 将建立的方法应用于市场常见品牌的婴幼儿奶粉样品的分析, 结果表明 7 个品牌奶粉样品中共有 5 种防腐剂检出.

**关键词** 高效液相色谱-串联质谱, 对羟基苯甲酸酯, 防腐剂, 婴幼儿奶粉.

## Determination of parabens in infant milk powders by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

WU Hongqing<sup>1,2</sup> LI Wenhui<sup>1</sup> GAO Lihong<sup>3</sup> LIU Jieming<sup>1</sup>

(1. Chemistry and Biology Engineering School, University of Science and Technology Beijing, Beijing, 100083, China;  
2. Zunyi Public Security Judicial Identification Center, Zunyi, 563000, China;  
3. ThermoFisher Scientific China Limited Application Research Center, Beijing, 100102, China)

**Abstract:** A method for the determination of 8 parabens in infant milk powders by using high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry was developed. The target preservatives in infant milk powders were extracted by acetonitrile and cleaned-up by HLB solid-phase extraction, and then eluted with methanol and acetone solutions respectively. The eluate was collected and concentrated under a gentle stream of nitrogen gas, and then analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. The recoveries of 8 parabens in infant milk powders at 3 levels (5, 10 and 100  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) were 78.8%—118%, 72.8%—99.8% and 71.1%—96.1% and relative standard deviation (RSD,  $n=5$ ) was 3.2%—10%. The method detection limits were 0.04—0.43  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ . This developed method was applied to analyze the infant milk powders in Beijing and results showed that some PBs were detected all in seven samples.

**Keywords:** high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, parabens, preservative, infant milk powders.

对羟基苯甲酸酯类化合物(parabens, 以下简称 PBs)作为防腐剂广泛使用已有接近 100 年的历史. 其中, 对羟基苯甲酸甲酯(MeP)、乙酯(EtP)、丙酯(PrP)和丁酯(BuP)使用量较大, 为了增加防腐效果, 这几种防腐剂经常被联合使用<sup>[1-2]</sup>. 《GB2760—2014 食品添加剂使用标准》限定食品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂的最大使用量为 0.012—0.5  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (以对羟基苯甲酸计). 2011 年, 原国家质量监督检验检疫总局发布的《关于食品添加剂对羟基苯甲酸丙酯等 33 种产品监管工作的公告》中, 禁止对羟基苯甲酸丙酯及其钠盐生产、添加及在食品中的使用.

越来越多的研究表明对羟基苯甲酸酯类化合物具有弱的雌激素活性, 对生物体有内分泌干扰作用, 因此食品或环境中存在的 PBs 在动物生殖、发育、免疫和致癌等方面存在潜在的危害效应<sup>[3-4]</sup>. 近年来, 有关 PBs 的检测主要是在饮料、调味品、腌制品等食品基质中, 但是这些研究 PBs 检出限较高, 很难满足乳制品尤其是婴幼儿奶粉等 PBs 含量较低的实际

样品的测定.因此,建立可用于检测婴幼儿奶粉中低浓度 PBs 类防腐剂的的分析方法具有重要意义.

本文建立了以 Acclaim Mixed-Mode HILIC 色谱柱为分离柱,同位素内标法定量,HPLC-MS/MS 检测婴幼儿奶粉中 8 种 PBs 的分析方法.前处理方法选择固相萃取技术来富集奶粉中的痕量 PBs,并优化了前处理条件.该方法具有选择性强、灵敏度高等优点,可应用于婴幼儿配方奶粉中痕量 PBs 的测定中,满足实际样品测定的需要.

## 1 实验部分 (Experimental section)

### 1.1 试剂与材料

实验所用试剂均为色谱纯.甲醇、乙腈和丙酮购自美国 Fisher 公司,正己烷购自德国 CNW Technologies GmbH 公司,甲酸铵购自美国 Alfa Aesar 公司,实验用水为 Milli-Q 水(25 °C 时 18.2 MΩ·cm,美国 Millipore 公司).

对羟基苯甲酸酯类化合物标准品:对羟基苯甲酸甲酯(MeP,97.5%)、对羟基苯甲酸乙酯(EtP,99.0%)、对羟基苯甲酸丙酯(PrP,99.3%)、对羟基苯甲酸丁酯(BuP,100%)、对羟基苯甲酸苄酯(BzP,100%)、对羟基苯甲酸正戊酯(PeP>98.0%)、对羟基苯甲酸庚酯(HeP,99.0%)、对羟基苯甲酸正辛酯(OctP,98.0%)(均购于美国 Sigma-Aldrich 公司).同位素内标物质标准品:对羟基苯甲酸甲酯-d4(MeP-d4,98.0%)、对羟基苯甲酸乙酯-d5(EtP-d5,98.0%)、对羟基苯甲酸丙酯-d7(PrP-d7,98.0%)、对羟基苯甲酸丁酯-d9(BuP-d9,98.0%)和对羟基苯甲酸苄酯-d7(BzP-d7,98.0%)均购于加拿大 Toronto Research Chemicals 公司).

标准储备液及标准工作液的配制:各称取 25.0 mg 标准品,用甲醇溶解并定容于 25 mL 容量瓶中,配成 1000 mg·L<sup>-1</sup> 的单标标准储备液,并于-20 °C 下保存.然后取适量单标标准储备液,用甲醇配成所需浓度的混合标准工作液,在 4 °C 下密封保存备用.

同位素内标物质的配制:准确称取 12.5 mg 同位素内标物质,用甲醇溶解并定容于 25 mL 的棕色容量瓶中,配成 500 mg·L<sup>-1</sup> 的单标内标储备液,在-20 °C 下密封保存.然后取适量单标内标储备液,用甲醇配成所需浓度的混合内标工作液,在 4 °C 下密封保存备用.

样品信息:购买自北京市超市内的常见婴幼儿配方奶粉品牌,共 7 种,其中包括 1 段(0—6 个月)3 个、2 段(6—12 个月)2 个、3 段(12—36 个月)2 个,分别编为 1—7 号.

### 1.2 仪器和设备

色谱-质谱系统:液相色谱仪 UltiMate3000(美国 Thermo Fisher 公司),API3200 三重四极杆串联质谱检测系统(美国应用生物系统公司),配有电喷雾离子源(ESI).其他仪器:机械振荡仪(上海智城分析仪器制造有限公司),离心机(德国 Sigma 公司),氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司),Oasis HLB 固相萃取小柱(6 mL,200 mg,美国 Waters 公司),电子天平(梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司).

色谱条件:Acclaim Mixed-Mode HILIC 型色谱柱(2.1 mm×150 mm,3 μm);流动相:0.1% 甲酸铵水溶液(A)和乙腈(B);柱温:25 °C;流速:0.2 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:15 μL;梯度洗脱条件:0—2 min,A 保持 60%,2—3 min,A 由 60%变为 55%,3—6 min,A 由 55%变为 0%,保持 4 min,10—11 min,A 由 0%变为 60%,11—17.5 min,A 保持 60%.

质谱条件:本研究采用电喷雾离子源(ESI),目标化合物在负离子扫描下以多反应监测模式分析.先用针泵对每种分析物单独进样,分别进行母离子(Q1)和子离子(Q3)扫描,得到[M-H]<sup>-</sup>母离子和子离子.在选定色谱条件下,优化质谱的相关参数.质谱分析条件如下:气帘气压力 0.14 MPa,碰撞气压力 0.02 MPa,电喷雾电压 5000 V,雾化气温度(TEM) 600 °C,雾化气(Gas1)0.38 MPa,辅助雾化气(Gas2)0.45 MPa.质谱检测条件见表 1.

### 1.3 样品前处理

称取 1.00±0.02 g 奶粉于 50 mL 离心管中,加入 10 ng 内标物质和 10 mL 提取溶剂乙腈,涡旋 2 min,放入振荡仪中 350 r·min<sup>-1</sup> 的速度振荡 4 h.然后取出 5000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 转移上清液,重复提取两次后加入 3 mL 正己烷除脂,静置 5 min,去除上层正己烷,转移下层提取液加入正己烷重复操作 1 次.后将转移的清液氮吹浓缩至 2 mL,加入超纯水稀释至 100 mL,以便于采取固相萃取进行净化富集.HLB 小柱预先用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水活化,上样结束后,加入 6 mL 超纯水淋洗,最后分别用 6 mL 甲醇和 6 mL 丙酮洗脱.合并洗脱液并氮吹至近干后用初始比例流动相定容至 1 mL,冷冻离心后过 0.22 μm 尼龙滤膜,待 HPLC-MS/MS 检测.

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 SPE 条件优化

本文选择了 HLB 萃取柱对样品进行富集和净化.采用纯水加标进行固相萃取实验,采用 6 mL 甲醇洗脱,OctP 的回收率小于 50%,因此进一步采用丙酮进行洗脱.分别考察 2、4、6 mL 丙酮的洗脱效果,结果发现,洗脱液中加入丙酮后,BuP、HeP、OctP 的回收率显著提高.采用 6 mL 甲醇+6 mL 丙酮作为洗脱液分别进行洗脱时,8 种 PBs 的平均回收率为 99.7%—107%,8 种目标物质能被完全洗脱,因此后续实验选择上述两种溶液作为洗脱液.

表 1 质谱检测条件

Table 1 Experimental condition of electrospray tandem mass spectrometry

| Compounds          | Q1 Parent ion | Q3 Product ion | Entrance pressure/V | Solution cluster voltage/V | Collision entrance pressure/V | Collision energy/eV | Collision export pressure/V |
|--------------------|---------------|----------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| MeP                | 151.0         | 91.9 *         | -5                  | -27                        | -7                            | -26                 | -10                         |
|                    |               | 136.0          | -5                  | -27                        | -6                            | -27                 | -14                         |
| EtP                | 165.0         | 93.0 *         | -5                  | -25                        | -14                           | -30                 | -10                         |
|                    |               | 137            | -5                  | -25                        | -7                            | -17                 | -13                         |
| PrP                | 179.0         | 93.0           | -5                  | -30                        | -8                            | -28                 | -10                         |
|                    |               | 136 *          | -5                  | -30                        | -6                            | -20                 | -14                         |
| BuP                | 193.0         | 91.9 *         | -5                  | -30                        | -8                            | -35                 | -10                         |
|                    |               | 136            | -5                  | -30                        | -6                            | -35                 | -10                         |
| PeP                | 207.1         | 91.9 *         | -10                 | -35                        | -9                            | -34                 | -10                         |
|                    |               | 93.0           | -10                 | -35                        | -9                            | -30                 | -10                         |
| HeP                | 235.1         | 92.0 *         | -5                  | -40                        | -12                           | -38                 | -10                         |
|                    |               | 135.9          | -5                  | -40                        | -8                            | -25                 | -14                         |
| OcP                | 249.1         | 93.0 *         | -5                  | -45                        | -10                           | -35                 | -13                         |
|                    |               | 136            | -5                  | -45                        | -10                           | -27                 | -10                         |
| BzP                | 227.0         | 91.9           | -5                  | -25                        | -8                            | -34                 | -10                         |
|                    |               | 136 *          | -5                  | -25                        | -8                            | -18                 | -14                         |
| MeP-d <sub>4</sub> | 155.0         | 96.1 *         | -10                 | -25                        | -10                           | -28                 | -10                         |
|                    |               | 112.1          | -10                 | -25                        | -10                           | -28                 | -10                         |
| EtP-d <sub>5</sub> | 170.0         | 91.9           | -5                  | -26                        | -8                            | -30                 | -10                         |
|                    |               | 94.0 *         | -5                  | -26                        | -8                            | -30                 | -10                         |
| PrP-d <sub>7</sub> | 186.1         | 91.9           | -5                  | -30                        | -8                            | -33                 | -10                         |
|                    |               | 94.0 *         | -5                  | -30                        | -8                            | -33                 | -10                         |
| BuP-d <sub>9</sub> | 202.1         | 91.9 *         | -5                  | -30                        | -8                            | -34                 | -10                         |
|                    |               | 136.0          | -5                  | -30                        | -8                            | -34                 | -10                         |
| BzP-d <sub>7</sub> | 233.9         | 91.9           | -9                  | -40                        | -10                           | -40                 | -11                         |
|                    |               | 136.0 *        | -9                  | -40                        | -26                           | -22                 | -13                         |

\* :Quantitative ion.

2.2 提取溶剂的选择

本研究选择甲醇、乙腈及不同比例(1:9,2:8,5:5,8:2)的甲醇:乙腈混合溶剂分别作为提取试剂,采用某品牌实际样品进行加标回收实验,结果表明,纯乙腈作为提取试剂时,杂质干扰较少且回收率较高,8种PBs的平均回收率为70.9%—96.3%,因此选择乙腈作为提取试剂.

2.3 提取方法的选择

加入提取试剂后,分别采用超声30 min和振荡12 h两种提取方式,进行加标回收实验.结果发现,超声提取时8种PBs平均回收率为26.7%—104%.而振荡提取时8种PBs平均回收率为70.9—93.4%,超声提取各目标化合物的回收率普遍偏低,而且发现实验过程中超声萃取后的溶液易出现乳化现象,离心后仍较浑浊,从而影响了提取效果.对振荡的时间进行了优化(分别2、4、6、8 h),结果发现,当振荡的时间超过4 h后,目标化合物的回收率均大于70%且趋于稳定,因此选择的振荡时间为4 h.

2.4 沉淀蛋白方法的选择

本文已选择乙腈作为提取溶剂,乙腈在提取时同时具有沉淀蛋白的效果.在此基础上,进一步比较了乙腈和酸化乙腈(乙腈-0.5%乙酸)沉淀蛋白的效果.采用奶粉样品进行加标回收实验,实验结果表明,乙腈进行提取和沉淀蛋白时8种PBs平均回收率在70.9%—96.3%.酸化乙腈进行提取和沉淀蛋白时平均回收率在62.4%—94.5%之间.说明在酸性条件下,PBs的回收率没有显著提升,因此实验选择乙腈作为提取试剂和沉淀蛋白.

2.5 线性范围和检出限

在优化的色谱质谱条件下,进样15 μL,测定系列混合标准溶液,以被测组分的质量浓度对色谱峰面积作图绘制标准曲线,以3倍信噪比计算仪器检出限(LOD),以10倍信噪比计算仪器定量限(LOQ).本研究采用内标法定量,选择与待测

物质结构和性质相近的氘代同位素替代物作为内标进行过程控制和浓度校正.其中,MeP 使用 MeP-d<sub>4</sub>,EtP 使用 EtP-d<sub>5</sub>,PrP 使用 PrP-d<sub>7</sub>,BuP、PeP、HeP 与 OcP 使用 BuP-d<sub>9</sub>,BzP 使用 BzP-d<sub>7</sub> 作为相应的内标.标准曲线方程与检出限见表 2.由表 2可知,8 种 PBs 在 0.5—500 ng·mL<sup>-1</sup>范围内均有良好的线性关系,相关系数  $r^2$  为 0.9990—0.9998,仪器检出限为 0.04—0.43 ng·mL<sup>-1</sup>,仪器定量限为 0.13—1.43 ng·mL<sup>-1</sup>.由仪器检出限和样品前处理方法可知方法检出限为 0.04—0.43 ng·g<sup>-1</sup>.

表 2 8 种对羟基苯甲酸酯的线性范围和检出限  
Table 2 Linear range and detection limit of 8 parabens

| Compounds | Internal standard  | Linear range/<br>(ng·mL <sup>-1</sup> ) | $r^2$  | LOD/<br>(ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------|--------------------|-----------------------------------------|--------|--------------------------------|
| MeP       | MeP-d <sub>4</sub> | 0.1—500                                 | 0.9997 | 0.10                           |
| EtP       | EtP-d <sub>5</sub> | 0.1—500                                 | 0.9996 | 0.08                           |
| PrP       | PrP-d <sub>7</sub> | 0.5—500                                 | 0.9990 | 0.27                           |
| BuP       | BuP-d <sub>9</sub> | 0.05—500                                | 0.9991 | 0.05                           |
| PeP       | BuP-d <sub>9</sub> | 0.5—500                                 | 0.9994 | 0.43                           |
| HeP       | BuP-d <sub>9</sub> | 0.5—500                                 | 0.9993 | 0.04                           |
| BzP       | BzP-d <sub>7</sub> | 0.05—500                                | 0.9990 | 0.04                           |
| OcP       | BuP-d <sub>9</sub> | 0.1—500                                 | 0.9998 | 0.07                           |

2.6 方法的精密度和准确度

采用奶粉样品进行加标回收实验,每个加标水平平行测定 5 份,分别考察 5、50、100 ng·g<sup>-1</sup>加标水平下 8 种 PBs 的回收率和重现性,8 种 PBs 的回收率分别为 71.1%—96.1%、72.8%—99.8%、78.8%—118%,相对标准偏差(RSD)为 3.2%—10%,表明方法具有良好的精密度和准确度.

2.7 实际样品的测定

对市售的 7 个品牌奶粉样品进行分析.研究表明,7 个品牌均含有 PBs 防腐剂,主要含有 MeP、EtP 和 BuP,其中,EtP 的检出率为 100%,且含量最高为 2.45 ng·g<sup>-1</sup>.PBs 总含量最高的为 7 号品牌奶粉,总含量为 6.05 ng·g<sup>-1</sup>.样品中 PBs 的含量均没有超过国家限定添加量标准(0.012—0.5 g·kg<sup>-1</sup>),但是部分样品中含有国家质监局禁止添加的对羟基苯甲酸丙酯(PrP),其含量为 0.49—2.53 ng·g<sup>-1</sup>.这一发现需要引起关注,可进一步采用其他检测方法和采集更广泛的样本进行确证.

3 结论(Conclusion)

本文建立了奶粉样品中 8 种 PBs 类防腐剂的固相萃取和液相色谱-质谱串联的定量分析方法.该方法提取效果好,基质干扰较少,可同时测定短链和长链防腐剂,满足奶粉中 PBs 类防腐剂的定量分析要求和实际工作的需要.最后将该方法应用于市场常见的 7 个品牌奶粉的 PBs 类防腐剂分析,结果表明不同品牌奶粉中均有 PBs 防腐剂检出,其中对羟基苯甲酸乙酯(EtP)的检出率和含量较高.

参考文献(References)

[ 1 ] JIMÉNEZ-DÍAZ I, VELA-SORIA F, RODRÍGUEZ-GÓMEZ R, et al. Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages[J].Analytica Chimica Acta, 2015, 892: 27-48.

[ 2 ] GRZEŚKOWIAK T, CZARCZYŃSKA-GOŚLIŃSKA B, ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK A. Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls, alkylphenols, and parabens[J]. Trends in Analytical Chemistry,2016, 75:209-226.

[ 3 ] ESIMBEKOVA E N, ASANOVA A A, DEEVA A A, et al. Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases[J]. Food Chemistry, 2017, 235: 294-297.

[ 4 ] LENNERZ B, VAFAI S B, DELANEY N F, et al. Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans[J]. Molecular Genetics & Metabolism, 2015, 114(1):73-79.