

UPLC-MS 测定薄膜衣片中 16 种邻苯二甲酸酯类塑化剂

杨梅, 廉向金, 张亿(成都市食品药品检验研究院, 成都 610045)

摘要: 目的 建立 UPLC-MS 测定薄膜衣片中 16 种邻苯二甲酸酯类塑化剂含量的方法。方法 采用甲醇提取, Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)同时串联 Waters PFCs Isolator 捕集柱(2.1 mm×50 mm), 以 0.1% 甲酸水溶液和甲醇为流动相, 梯度洗脱, 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 采用电喷雾离子源, 正离子模式, 多反应监测模式检测。结果 在实验条件下, 16 种塑化剂分离良好; DBP、DIBP 检测限为 0.5 mg·kg⁻¹, 其余 14 种塑化剂检测限为 0.1 mg·kg⁻¹; DBP、DIBP 在 0.20~1.00 μg·mL⁻¹ 内, 其余 14 种塑化剂在 0.05~1.00 μg·mL⁻¹ 内, 峰面积与检测浓度之间的线性关系良好 ($r \geq 0.995$); 平均回收率均在 83%~115% 之间。结论 该方法操作简单、快速、准确, 适用于薄膜衣片中邻苯二甲酸酯类塑化剂的测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 邻苯二甲酸酯类化合物; 薄膜衣片; 塑化剂

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)10-1437-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.016

引用本文: 杨梅, 廉向金, 张亿, 等. UPLC-MS 测定薄膜衣片中 16 种邻苯二甲酸酯类塑化剂[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1437-1440.

Determination of 16 Kinds of Phthalates in Film-coated Tablets by UPLC-MS

YANG Mei, LIAN Xiangjin, ZHANG Yi(Chengdu Institute of Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an UPLC-MS method for simultaneous determination of 16 kinds of phthalates in film-coated tablets. **METHODS** Phthalates were extracted with methanol. Separation was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) connected in series with Waters PFCs Isolator column (2.1 mm×50 mm). 0.1% formic acid solution and methanol were used as mobile phases in gradient elution, flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. ESI⁺ and multi-reaction monitoring (MRM) were adopted in MS/MS. **RESULTS** Sixteen kinds of phthalates could be completely separated. The detection limits of DBP and DIBP were 0.5 mg·kg⁻¹, and other 14 kinds of phthalates were 0.1 mg·kg⁻¹. DBP and DIBP in the range of 0.20–1.00 μg·mL⁻¹, and other 14 kinds of phthalates in the range of 0.05–1.00 μg·mL⁻¹ had good linear relationships with relative coefficients ($r \geq 0.995$). The average recoveries were from 83% to 115%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and accurate, and can be applied to simultaneous determination of phthalates in film-coated tablets.

KEY WORDS: UPLC-MS; phthalates (PAEs); film-coated tablet; plasticizer

邻苯二甲酸酯类化合物(phthalates, PAEs)作为塑化剂广泛应用于塑胶工业中。制药工业中片剂、微丸、颗粒等的薄膜包衣可能会加入适量的 PAEs, 以改善材料特性。常用于药品生产的 PAEs 有 3 种, 分别为邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)^[1-2]。PAEs 具有相似的化学结构, 被归类为内分泌破坏性物质, 并表现出生物累积性。PAEs 对人体的危害主要表现在致癌、致畸、免疫抑制等方面, 其中尤以生殖毒性最为引人注目^[3-5]。

近年来, 对环境及食品中 PAEs 的研究报道屡见不鲜^[6-9], 对药品中 PAEs 的研究报道相对较少。查阅文献发现, 药品中 PAEs 的检测多采用

GC-MS^[2,10-11], LC-MS 在药品中检测 PAEs 的应用鲜见报道。本研究参考中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 3147-2012 出口食品中邻苯二甲酸酯的测定^[12]第二法液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS), 采用多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM)模式, 结合 PFCs Isolator 捕集柱去除本底干扰, 建立了针对薄膜衣片中 16 种塑化剂的定性和定量分析方法, 以便能更快速、准确地了解薄膜衣片中邻苯二甲酸酯类物质的添加或污染情况, 为监管部门提供数据支持。

1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪和 Xevo TQ MS 串联质谱仪(美国 Waters 公司);

作者简介: 杨梅, 女, 主管药师 Tel: (028)85362213 E-mail: 20705926@qq.com

BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); VORTEX GENIUS 3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); SK250H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); TGL-16M 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

16 种塑化剂混合对照品溶液(浓度均为 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 溶剂为正己烷, 批号: 50713HE, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)。共收集薄膜衣片 105 批, 其中 41 批为成都市食药监局在成都地区按照正常抽验程序抽取的流通样品, 其余 64 批样品是在成都市零售药店购买的样品。甲醇、甲酸为色谱纯, 其余试剂、试药为分析纯, 水为超纯水。

实验过程中避免接触塑料, 玻璃器皿洗净后, 用纯化水淋洗 3 次, 丙酮浸泡 1 h 以上, 再用超纯水淋洗 3 次, $200\ ^\circ\text{C}$ 以下烘干 2 h, 冷却至室温。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters PFCs Isolator 捕集柱 ($2.1\ \text{mm}\times 50\ \text{mm}$); Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 ($2.1\ \text{mm}\times 50\ \text{mm}$, $1.7\ \mu\text{m}$); 柱温: $40\ ^\circ\text{C}$; 流速: $0.4\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: $1\ \mu\text{L}$; 流动相 A 为

0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱程序如下: $0\sim 1\ \text{min}$, $40\%\rightarrow 50\%\text{B}$; $1\sim 5\ \text{min}$, $50\%\rightarrow 70\%\text{B}$; $5\sim 7\ \text{min}$, $70\%\rightarrow 95\%\text{B}$; $7\sim 9\ \text{min}$, $95\%\text{B}$; $9\sim 9.1\ \text{min}$, $95\%\rightarrow 40\%\text{B}$; $9.1\sim 10\ \text{min}$, $40\%\text{B}$ 。

2.2 质谱条件

离子源及扫描方式: 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, MRM; 电离电压: $3.5\ \text{kV}$; 离子源温度: $110\ ^\circ\text{C}$; 脱溶剂气温度: $550\ ^\circ\text{C}$; 脱溶剂气流量: $700\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ (氮气); 锥孔反吹气流量: $50\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ (氮气); 碰撞室压力: $4.01\times 10^{-3}\ \text{mbar}$ (碰撞气为氩气)。16 种邻苯二甲酸酯类化合物定性离子对、定量离子对及质谱参数见表 1, 16 种邻苯二甲酸酯类化合物对照品定量离子对 MRM 图谱见图 1。

2.3 溶液的制备

2.3.1 标准曲线溶液的制备 精密吸取 16 种塑化剂混合对照品溶液 $0.5\ \text{mL}$, 置 $50\ \text{mL}$ 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品贮备液(均为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。精密量取混合对照品贮备液适量, 加甲醇稀释制成每 $1\ \text{mL}$ 中含 16 种塑化剂分别为 $0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00\ \mu\text{g}$ 的标准曲线溶液。

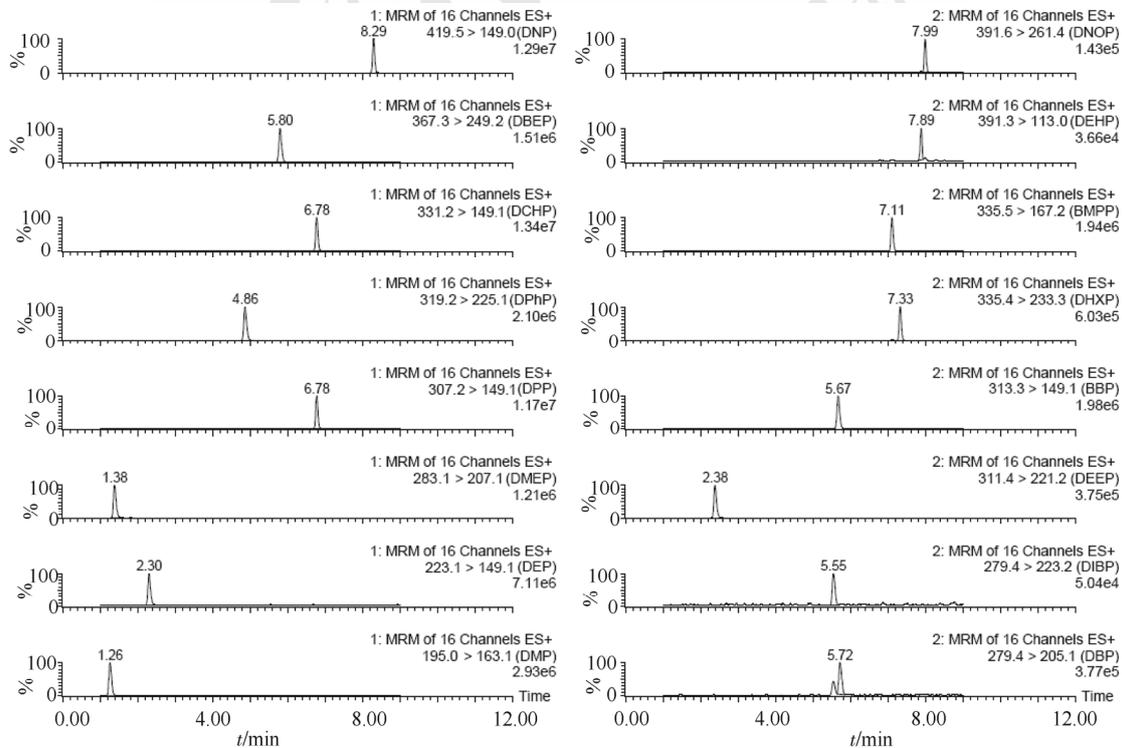


图 1 16 种邻苯二甲酸酯类化合物对照品定量离子对 MRM 图谱(浓度 $1.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Fig. 1 Quantitative ion pair of MRM chromatograms of 16 kinds of phthalates(conc. $1.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

表 1 16 种邻苯二甲酸酯类化合物定性离子对、定量离子对及质谱参数

Tab. 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair and MRM condition of 16 kinds of phthalates

序号	化合物名称	相对分子质量	保留时间/min	定性离子对	去簇电压/V	碰撞能量/V
1	邻苯二甲酸二甲酯, DMP	194.19	1.26	195.0>77.0; 195.0>163.1*	12	30; 14
2	邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯, DMPEP	282.30	1.38	283.1>59.1; 283.1>207.1*	14	14; 8
3	邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯, DEEP	310.30	2.38	311.4>149.0; 311.4>221.2*	14	40; 10
4	邻苯二甲酸二乙酯, DEP	222.24	2.30	223.1>149.1*; 223.1>177.1	12	18; 8
5	邻苯二甲酸二苯酯, DPhP	318.33	4.86	319.2>77.0; 319.2>225.1*	12	38; 14
6	邻苯二甲酸二异丁酯, DIBP	278.35	5.55	279.4>223.2*; 279.4>267.2	10	13; 16
7	邻苯二甲酸丁基苯基酯, BBP	312.36	5.67	313.3>149.1*; 313.3>205.1	17	18; 10
8	邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯, DBEP	366.45	5.80	367.3>101.1; 367.3>249.2*	16	12; 8
9	邻苯二甲酸二丁酯, DBP	278.35	5.72	279.4>149.2; 279.4>205.1*	14	20; 11
10	邻苯二甲酸二戊酯, DPP	306.40	6.78	307.2>149.1*; 307.2>219.2	16	14; 8
11	邻苯二甲酸二环己酯, DCHP	330.43	6.78	331.2>149.1*; 331.2>167.0	16	24; 12
12	邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯, BMPP	334.43	7.11	335.5>167.2*; 335.5>251.4	17	17; 12
13	邻苯二甲酸二己酯, DHXP	334.45	7.33	335.4>149.1; 335.4>233.3*	19	21; 11
14	邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯, DEHP	390.56	7.89	391.3>113.0*; 391.3>148.7	26	14; 25
15	邻苯二甲酸二正辛酯, DNOP	390.56	7.99	391.6>149.2; 391.6>261.4*	19	19; 13
16	邻苯二甲酸二壬酯, DNP	418.61	8.29	419.5>149.0*; 419.5>275.4	22	12; 14

注: *-定量离子对。

Note: *-quantitative ion pair.

2.3.2 供试品溶液的制备 取供试品 20 片, 精密称定, 研细, 混匀, 精密称取供试品约 1.0 g, 置 10 mL 具塞试管中, 精密加入甲醇 5 mL, 密塞, 浸泡 16 h 以上, 涡旋 1 min, 超声提取 30 min, 摇匀, 静置, 吸取上清液置进样瓶中, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液作为供试品溶液。若供试品溶液浓度超出标准曲线最高点, 稀释后测定。

2.3.3 空白基质溶液 在 10 mL 具塞试管中, 自“精密加入甲醇 5 mL”起, 按“2.3.2”项下制备空白基质溶液。

2.4 定性和定量测定方法

如果供试品溶液与标准曲线溶液检出的色谱峰保留时间一致, 并在扣除背景后的供试品色谱图中, 各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比, 其相对偏差在以下范围内可以定性确认为与标准物质一致(相对丰度>50%时, 相对偏差≤20%; 相对丰度>20%~50%时, 相对偏差≤25%; 相对丰度>10%~20%时, 相对偏差≤30%; 相对丰度<10%时, 相对偏差≤50%)。用标准曲线进行定量。

2.5 专属性试验

精密量取塑化剂标准曲线溶液(1.00 μg·mL⁻¹)和空白基质溶液各 1 μL, 分别注入液相色谱-质谱联用仪, 在拟定的 MRM 条件下进行测定, 16 种塑化剂之间的分离度良好, 基质无干扰。

2.6 检测限、定量限

取空白样品 1.0 g, 精密称定, 加入一定量的

标准曲线溶液(1.00 μg·mL⁻¹), 按“2.3.2”项下方法进行处理, 精密量取 1 μL, 注入液相色谱-质谱联用仪, 记录色谱图, 按信噪比 S/N≥3 计算检测限, 信噪比 S/N≥10 计算定量限。结果: DBP、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)检测限为 0.5 mg·kg⁻¹、定量限为 1.0 mg·kg⁻¹, 其余 14 种塑化剂检测限为 0.1 mg·kg⁻¹、定量限为 0.3 mg·kg⁻¹。

2.7 线性关系考察

精密量取标准曲线溶液各 1 μL, 注入液相色谱-质谱联用仪, 记录色谱图, 以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(C)为横坐标, 进行线性回归。结果表明, DBP、DIBP 在 0.20~1.00 μg·mL⁻¹ 内, 其余 14 种塑化剂在 0.05~1.00 μg·mL⁻¹ 内, 峰面积与检测浓度之间的线性关系良好($r \geq 0.995$)。

2.8 准确度试验

取空白样品 6 份, 每份约 1.0 g, 置 10 mL 具塞试管中, 精密称定, 分别精密加入混合对照品贮备液(10 μg·mL⁻¹)各 0.5 mL, 密塞, 涡旋 1 min, 室温放置 30 min, 再精密加入甲醇 4.5 mL, 自“密塞, 浸泡 16 h 以上”起, 按拟定的供试品溶液制备方法进行处理, 精密量取 1 μL, 注入液相色谱-质谱联用仪, 记录色谱图, 计算回收率。16 种塑化剂回收率均在 83%~115%之间(RSD≤5%, n=6)。

2.9 样品测定结果

按照拟定的定性和定量分析方法, 对 105 批薄膜衣片进行测定, 其中 15 批样品检出塑化剂, 总检出率为 14.3%(15/105), 结果见表 2。

表 2 薄膜衣片中塑化剂测定结果

Tab. 2 Determination results of phthalates in film-coated tablets

检出成分	检出批次	检出量/mg·kg ⁻¹	检出率/%	检出成分	检出批次	检出量/mg·kg ⁻¹	检出率/%
DEP	4	0.6~73.7	3.8	DBP & DMP	1	3.0(DBP)	1.0
DBP	1	1.3	1.0			1.4(DMP)	
DMP	2	0.2~0.3	1.9	DBP & DEHP	2	1.0~1.1(DBP)	1.9
DIBP	5	0.5~2.7	4.8			1.6~14.7(DEHP)	

3 讨论

3.1 PFCs Isolator 捕集柱的应用

在 PAEs 的检测分析中, LC-MS 较 GC-MS 分析时间更短、操作更便捷。使用 LC-MS 检测 PAEs 最大的问题是内分泌干扰物的背景干扰。内分泌干扰物(如双酚 A、邻苯二甲酸酯类、烷基酚类等)作为本底残留广泛存在于分析系统的各个环节(如试剂瓶、溶剂、管路中), 在液相系统的二元溶剂管理器的混合器与样品管理器的进样器之间的流路中加入 PFCs Isolator 捕集柱, 可延缓背景中干扰物的出峰时间, 使其与目标物良好分离, 排除干扰。

3.2 限度与结果分析

国家食品药品监督管理局对药品中塑化剂的限度暂无规定。本次检出 5 种塑化剂(DEP、DBP、DMP、DEHP、DIBP)中, 其中 3 种(DEP、DBP、DEHP)各国、地区、国际组织颁布了每日允许摄入量(TDIs)^[13]。按其最严格的要求, 体质量以 60 kg 计算, 3 种塑化剂的 TDIS 为 30 mg DEP、0.6 mg DBP、1.2 mg DEHP。本次检测的各种薄膜衣片中塑化剂每日最大摄入量(最大值 0.12 mg)远低于 TDIS。文献报道^[14], 每日通过空气摄入的 PAEs 约为 0.07 mg, 通过谷物、蔬菜、水果和奶制品摄入的 PAEs 约为 3 mg。由此可见, 日常口服薄膜衣片带入的 PAEs 并不是人体内 PAEs 的主要来源, 人体内的 PAEs 主要还是通过食物摄入的。除 1 个品种的 3 批次样品 DEP 含量较高(55.8~73.7 mg·kg⁻¹)外(推测该品种包衣材料中含 DEP), 其余 12 批阳性样品 PAEs 检出值都较低(<20 mg·kg⁻¹), 可能是在药品生产和贮存过程中, 塑化剂通过接触、渗透等方式迁入药品中, 从而造成药品塑化剂污染。

REFERENCES

- [1] SUN S P, RUAN W J. Harmful substances in food plastic package [J]. Chin J Chem Edu(化学教育), 2007, 28(6): 3-6.
- [2] FENG Z B, BAO T R, GUO M L. Determination of 16 kinds of phthalates in capsules by GC-MS [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2016, 30(7): 675-680.
- [3] ZHANG Y H, CHEN B H, ZHENG L X, et al. Study on the level of phthalates in human biological samples [J]. Chin J Pre Med(中华预防医学杂志), 2003, 37(6): 429-434.
- [4] LIU H J, SHU W Q. Toxicological effect and risks of phthalate acid esters on the health of population [J]. Acta Acad Med Mil Tert(第三军医大学学报), 2004, 26(19): 1778-1781.
- [5] ZHAO W H, LI S G, CAI Z M. Advances in toxicological studies on plasticizers of phthalate esters [J]. J Environ Occup Med(环境与职业医学), 2003, 20(2): 135-138.
- [6] WU P G, HAN G G, WANG H H, et al. An Investigation on Phthalates in Drinking Water [J]. J Environ Health(环境与健康杂志), 1999, 16(6): 338-339.
- [7] HU X Y, LIU K R, SUN J H, et al. Environmental comamination by phthalates in China [J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2003, 13(1): 9-14.
- [8] LIU X F, CHEN D W, LYU J C, et al. Determination of the 18 types of phthalates plasticizer in part whiter spirits in Beijing [J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2016, 26(3): 347-349.
- [9] QIN G F, ZOU K T, LI Y B, et al. Investigation and evaluation of phthalate esters in edible vegetable oils in Xi'an in 2015 [J]. Mod Pre Med(现代预防医学), 2016, 43(14): 2538-2544.
- [10] GUO Y, WANG X Q. GC-MS determination of 20 types of phthalates in oral preparation [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(12): 2221-2225.
- [11] ZHONG H, GE D Z, LIU H, et al. Research on residues of 16 phthalate ester plasticizers in oral liquid preparations [J]. China Pharm(中国药师), 2014, 17(4): 556-560.
- [12] 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 3147-2012 出口食品中邻苯二甲酸酯的测定[S]. 2012: 1-47.
- [13] HUANG C Y, CAI W H, MO X Q. The toxicity and limited provisions of phthalate esters in food [J]. Pack Food Mach(包装与食品机械), 2014, 32(2): 66-69.
- [14] ZHANG Y H, CHEN B H, ZHENG L X, et al. Determination of phthalates in environmental samples [J]. J Environ Health(环境与健康杂志), 2003, 20(5): 283-286.

收稿日期: 2017-02-21

(本文责编: 李艳芳)