

快速测定厨房用具，染制品以及食品包装材料中的33种初级芳香胺

孙小杰¹, 程海燕¹, 李立军¹, Jianru Stahl-Zeng², 靳文海¹
¹ SCIEX, Shanghai, CHINA; ² SCIEX, Darmstadt, DE

引言

初级芳香胺 (PAA) 是一类化合物, 其中最简单的形式是苯胺。PAA 可用于生产某些着色剂 (例如一些偶氮类染料), 尤其是黄-橙-红色系列的着色剂。虽然大部分 PAA 都不会威胁人类的健康, 但某些 PAA 却是已知的人类致癌物。某些厨房用具餐巾纸烘焙食品包装袋上印有彩色图文或其他内容, 如果它们与食品接触时, 其中的 PAA 迁移到食品中, 会对人类健康构成威胁。

由于存在潜在的健康威胁, 监管机构规定了特定迁移限量。针对塑料的法规 EU 10/2011 规定: 塑料材料及塑料制品不得向食品或食品模拟物中释放超过可检出限量的初级芳香胺, 检出限量为每 kg 食品或食品模拟物中不超过 0.01 mg 此类物质。此检出限量的限定对象为释放出的初级芳香胺之总和。同样, 此法规要求应用于厨房用具染制品以及食品级包装材料。

小分子碱性化合物分析的挑战和难点

PAA 分子量比较小, 而且都是碱性化合物, 在低 PH 值条件下容易电离。由于这些化合物程碱性, 并且前处理使用了 3% 乙酸溶液作为样品处理溶剂, 一些 PAA 不能在色谱柱上有保留, 而且峰型较差, 给色谱分离带来了挑战。同时部分 PAA 存在同分异构体, 给整个分离带来了极大的难度。

本实验的优势以及特点

所有化合物都有良好的峰型以及保留, 同时 4 种同分异构体在 Kinetex F5 都有非常好的分离, 详见图 2。

整个分析时间在 12 分钟之内完成, 大大提高了分离分析的效率, 详见图 3。

在三个不同的浓度 0.1 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL 下, 该方法的回收率在 82.1% 到 105.7% 之间, 所有化合物的相对标准偏差 RSD% (n=6) 都小于 9% 利用两种模拟溶剂, 评估了此方法的基质效应。当使用 20% 乙醇溶剂作为模拟溶剂时, 每个化合物均没有基质效应。当使用 3% 乙酸溶剂作为模拟溶剂时, PAA30 和 PAA32 两种化合物大概有 50% 左右的基质抑制效应, 有可能是由



图 1. SCIEX Triple Quad™ 5500 System.

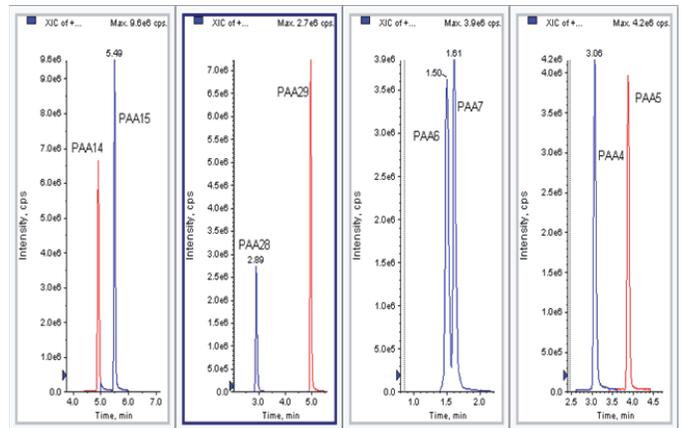


图 2. 在 Kinetex F5 色谱柱上 4 种同分异构体的分离。

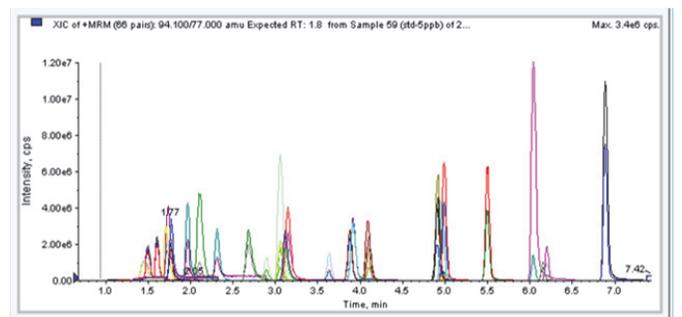


图 3. 33 种初级芳香胺提取离子流图。

于这两种化合物跟乙酸存在化学作用，呈现离子状态，导致灵敏度变差。

实验方法

样品前处理

根据欧盟 EU10/2011 的指导原则，所有的样品都是使用 3% 的乙酸溶液和 20% 的乙醇溶液作为提取剂。

对于厨房用具，染制品以及食品包装材料统一制成 1-2 cm² 左右的片状。称取 10 g 左右的样品到 200 mL 容量瓶中，食品级包装材料使用 20% 的乙醇溶剂作为迁移模拟物，在 40 °C 条件下浸泡 7 天。厨房用具以及染制品使用 3% 乙酸溶液作为迁移模拟物，在 100 °C 条件下浸泡 2 个小时左右。

在回收率实验中，选取了不含有此类化合物的空白样品进行实验，实际进行了三个浓度水平的加标测试，在 0.1, 5, 20 ng/mL 三个浓度下，通过上述的前处理提取方法进行分析。三个浓度加标均进行了 6 次平行实验，进行回收率的计算以及方法重现性实验。

液相分离条件以及质谱条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD

色谱柱：Phenomenex, Kinetex 2.6 μm F5 100 Å, 100 × 3.0 mm

流动相：A 0.05% Formic Acid; B MeOH

流速：0.3 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：5 μL

运行时间：12 min

梯度洗脱条件详见 表 1

表 1. 液相梯度分离条件。

Time (min)	A (%)	B (%)
0	70	30
7	10	90
9	5	95
9.1	70	30
12	70	30

质谱：SCIEX Triple Quad™ 5500 System

采集方式：Scheduled MRM™

离子源参数详见 表 2

表 2. SCIEX Triple Quad™ 5500 LC-MS/MS 系统离子源参数。

Source Parameters

Curtain Gas(CUR)	30psi
Collision Gas(CAD)	9psi
IonSpray Voltage(IS)	1200v
Temperature(TEM)	600° C
Ion Source Gas(GS1)	65psi
Ion Source Gas(GS2)	60psi

色谱条件优化

在色谱条件优化过程中，首先考虑进行所有化合物色谱峰型以及保留时间的优化。从实验中得知，起始流动相的比例以及 PH 值的变化，都会对分离以及灵敏度产生很大的影响。所以本实验重点研究了甲醇和已腈的选择，初始流动相比比例的选择，色谱柱的选择以及甲酸添加浓度的选择。在详细讨论甲酸含量的选择上，我们通过添加不同浓度的甲酸浓度，进行灵敏度的对比，在甲酸浓度为 0.0%，0.01%，0.05%，0.1% 以及 0.2% 的优化选择中，发现浓度为 0.05% 时，所有化合物的相应都是最佳，最终固定了水中甲酸浓度的添加水平为 0.05%。

同时，在选择甲醇或已腈作为洗脱相时，进行了详细的对比，通过灵敏度实验，发现在甲醇体系里，所有化合物灵敏度均优于在已腈的体系中，故而选择甲醇作为洗脱相。流动相起始比例的变化，对极性较强的化合物灵敏度有非常大的影响，所以在兼顾化合物分离以及灵敏度的同时，进行了梯度起始比例的优化。

通过优化发现，当甲醇含量越来越高时，大部分化合物的灵敏度都得到了很大的提高，同时也发现，部分同分异构体不能完全分离，最终在兼顾灵敏度以及分离度的前提下，选择了 30% 的甲醇作为梯度分离的起始比例。本实验中，化合物数量偏多，极性分布比较宽，为了保证每个化合物都有良好的保留行为以及峰型，又要提高分离效率，故对部分色谱柱进行优化选择。通过对比发现，在 Phenomenex Omega; Phenomenex F5; Waters HSS T3 中，Phenomenex F5 能够提供更好的分离效果，对同分异构体有比较好的分离，所以最终选择了 Phenomenex F5 作为本实验的分离色谱柱。

质谱条件优化

本实验在 SCIEX Triple Quad™ 5500 系统上进行，选择了电喷雾电离源。每个化合物都严格根据欧盟的要求，选择两个子离子进行定量定性分析。每个化合物的优化参数详见表格 3。数据采集使用了 Analyst® 1.6.3 软件，数据处理以及定性分析使用 MultiQuant™ 3.0.2 软件。除了同分异构体外的 25 种 PAAs 的提取离子流图详见图 4。

表 3. List of analytes with MRM transitions.

Compound	MH+	Product ion(Q/C) ^a
Aniline (PAA 1)	94.1	77/51
o-Toluidine (PAA 2)	108	91.1/93
M-phenylenediamine (PAA 3)	109	92/65
2,4-dimethylaniline (PAA 4)	122	77.1/105.1
2,6-dimethylaniline (PAA 5)	122	77.1/105.1
2,4-diaminotoluene (PAA 6)	123.1	106.1/77.1
2,6-diaminotoluene (PAA 7)	123.1	106.1/77.1
o-Anisidine (PAA 8)	124.1	109.1/65
4-chloroaniline (PAA 9)	128.1	93.1/75
2,4,5-trimethylaniline (PAA 10)	136	91.1/121.1
P-cresidine (PAA 11)	138	123.1/78
4-methoxy-1,3' -phenylenediamine (PAA 12)	139	124.1/108.1
2-naphthylamine (PAA 13)	144	127/77.1
4-aminobiphenyl (PAA 14)	170	152/153.1
2-aminobiphenyl (PAA 15)	170	152/153.1
4,4-diaminobiphenyl (PAA 16)	185	168.1/167
4-aminoazobenzene (PAA 17)	198	77.1/105.1
Bis-(4-aminophenyl)methane (PAA 18)	199	106.1/77
4,4' -oxydianiline (PAA 19)	201	108.1/184
3,3' -dimethylbenzidine (PAA 20)	213	180/196.1
4,4' -diaminodiphenylsulfide (PAA 21)	217	124/200
o-Aminoazotoluene (PAA 22)	226	91/121.1
4,4' -diamino-3,3' -dimethylphenylmethane (PAA 23)	227	120.1
3,3' -dimethoxybenzidine (PAA 24)	245.1	230.1/187.1
3,3' -dichlorobenzidine (PAA 25)	253.1	217.1/182.1
4,4' -methylene-bis(2-chloroaniline) (PAA 26)	267	231.1/140.1
3-amino-4-methylbenzamide (PAA 27)	151	108.1/93
3-chloro-4-methoxyaniline (PAA 28)	158	123.1/80.1
5-chloro-2-methoxyaniline (PAA 29)	158	143/108.1
1,5-diaminonaphthalene (PAA 30)	159	115.1/143.1
4-chloro-2,5-dimethoxyaniline (PAA 31)	188	173.1/130
3-amino-p-anisilide (PAA 32)	243	212.1/227
2-methoxy-4-nitroaniline (PAA 33)	169	152/122.1

Note: ^a (Quantitation Ion / Confirmation Ion)

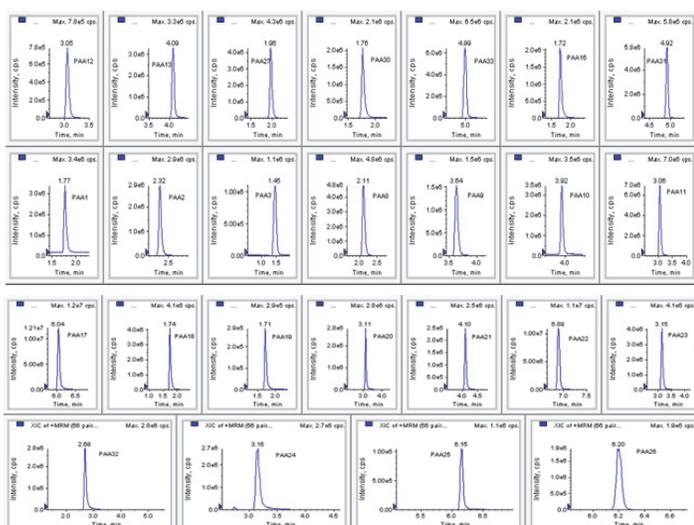


图 4. 25 PAA 提取离子流图。

为了获得最佳的灵敏度，本实验对离子源参数部分进行了详细的优化，在进行离子源喷雾电压优化时发现，当电压越来越小时，灵敏度反而越来越强，所以进行了离子源喷雾电压的优化。最终发现，当电压设定为 1200 v 时，所有化合物的灵敏度都是最佳。图 5 详细的展示了不同离子源喷雾电压对每个化合物灵敏度的影响。

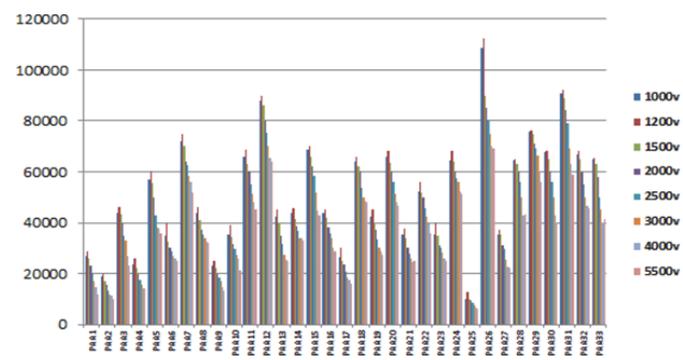


图 5. 离子源喷雾电压的优化结果。

结果和讨论

分析方法验证结果

重现性实验，通过在实际空白样品中添加 0.1 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL 的标准品，通过两种模拟提取液进行提取实验，每种化合物的重现性 (RSD%) 都在 1.9% 到 8.9% 范围内。在不同时间下，

测得所有化合物的日间重现性都在 2.3% 到 9.1% 范围内。

回收率实验，30 种化合物的平均回收率均 85%，另外有 3 种化合物的平均回收率在 60-85% 之间。详细结果见表 4。

线性实验，在浓度 0.05-50 ng/mL 范围内进行实验，每种物质均有良好的线性关系，相关系数均在 0.992-0.999 范围内。所有化合物的最低检出限 LODs 都在 0.001-0.029 ng/mL 范围内。最低检出限均远远低于欧盟法规 No.10/2011 塑料制品中初级芳香胺的限制要求。

样品分析结果

本实验研究的样品信息详见表 5，所有样品均来源于市场。利用外标法以及标准曲线进行样品测定，三类样品的测定结果详见表 6。

表 5. 样品的详细信息。

样品类型		
厨房用具	塑料勺子	5
	塑料叉子	5
	一次性纸杯	2
染制品	染色纸巾	5
食品包装材料	塑料饼干类 包装袋	5

在这些样品中，部分 PAA 有检出，但是所有检出化合物浓度总量在 10 ng/mL 以下，没有超出 (EU) No.10/2011 对塑料制品总含量的要求。图 6 展示了在部分样品中检测出的一些 PAA 类化合物色谱图信息。

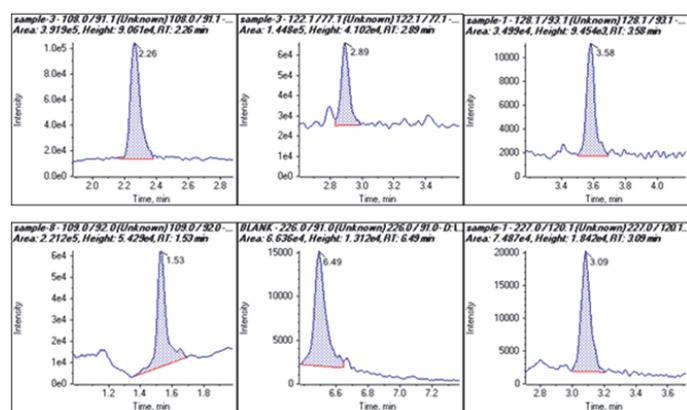


图 6. 部分样品检出的PAA类化合物色谱图。

表 4. Main analytical parameters a.

PAA	Equation	R	LOD(ng/ml)	LOQ(ng/ml)	RSD(%)	Rec(%)
Aniline	$y=1.905e6x+1.604e5$	0.9962	0.029	0.09	8.9	94.2
o-Toluidine	$y=2.12e6x+14137$	0.9981	0.012	0.04	3.67	87.4
M-phenylenediamine	$y=1.329e6x+10356$	0.9998	0.02	0.062	2.22	106.1
2,4-dimethylaniline	$y=1.7840e6x+8177$	0.9977	0.01	0.041	2.08	103.4
2,6-dimethylaniline	$y=1.6121e6x+25871$	0.9975	0.009	0.033	1.9	105.9
2,4-diaminotoluene	$y=1.444e6x+23110$	0.9995	0.011	0.045	4.12	98.3
2,6-diaminotoluene	$y=1.23246e6x+20386$	0.9930	0.008	0.028	2.89	94.3
o-Anisidine	$y=4.354e6x+3.0078e4$	0.9945	0.0049	0.015	4.83	100.9
4-chloroaniline	$y=1.1465e6x+5264$	0.9987	0.0048	0.021	4.9	86.8
2,4,5-trimethylaniline	$y=2.5363e6x+25932$	0.9972	0.01	0.034	3.68	91.9
P-cresidine	$y=6.667e6x+3.307e4$	0.9966	0.001	0.0045	3.98	99.4
4-methoxy-1,3'-phenylenediamine	$y=5.8050e6x+2242$	0.9993	0.01	0.05	3.20	109.5
2-naphthylamine	$y=2.5801e6x+3999.3$	0.9991	0.005	0.016	2.96	105.5
4-aminobiphenyl	$y=2.8274e6x+8232.5$	0.9972	0.01	0.038	4.30	89.1
2-aminobiphenyl	$y=3.8334e6x+4.6294e4$	0.9899	0.01	0.030	4.16	87.9
4,4-diaminobiphenyl	$y=1.5268e6x+13989$	0.9984	0.005	0.019	3.09	93.1
4-aminoazobenzene	$y=1.4826e6x+7.47e5$	0.9958	0.001	0.0036	3.25	91.0
Bis-(4-aminophenyl)methane	$y=3.0494e6x+3.23e4$	0.9980	0.005	0.018	2.65	98.2
4,4'-oxydianiline	$y=2.2383e6x+18163$	0.9987	0.001	0.0033	2.08	95.5
3,3'-dimethylbenzidine	$y=2.269e6x-8183$	0.9990	0.01	0.045	2.77	107.3
4,4'-diaminodiphenylsulfide	$y=1.769e6x+9944$	0.9988	0.01	0.048	3.46	106.1
o-Aminoazotoluene	$y=1.1079e7x+4.6817e5$	0.9944	0.001	0.0041	4.03	86.0
4,4'-diamino-3,3'-dimethylphenylmethane	$y=3.4679e6x+29360$	0.9955	0.005	0.015	3.49	85.8
3,3'-dimethoxybenzidine	$y=2.6076e6x+5.7198e4$	0.9955	0.05	0.13	3.37	100.7
3,3'-dichlorobenzidine	$y=6.5351e6x+27514$	0.9992	0.01	0.030	3.33	99.5
4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline)	$y=1.0702e6x+4.7568e4$	0.9986	0.005	0.0178	3.54	101.1
3-amino-4-methylbenzamide	$y=3.0257e6x+27540$	0.9952	0.005	0.0164	3.66	109.4
3-chloro-4-methoxyaniline	$y=1.0783e6x+3546$	0.9997	0.01	0.0334	3.15	102.3
5-chloro-2-methoxyaniline	$y=2.8078e6x+26640$	0.9957	0.005	0.0152	3.45	85.2
1,5-diaminonaphthalene	$y=1.4086e6x+2846$	0.9992	0.02	0.068	2.59	64.2
4-chloro-2,5-dimethoxyaniline	$y=3.681e6x+4.046e4$	0.9923	0.005	0.0193	4.23	86.4
3-amino-p-anisilide	$y=2.269e6x+2.763$	0.9962	0.05	0.163	3.17	69.1
2-methoxy-4-nitroaniline	$y=4.946e6x+25359$	0.9956	0.005	0.0152	2.69	88.3

Note: ^a Calibration curve equations, regression coefficients (R), limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), repeatability of three different concentrations, and mean recovery of 3 (0.1, 5, 20 ng/ml) spike levels.

表 6. Some detected PAAs in samples.

PAA	Plastic Spoon	Plastic Fork	Paper cup	Napkin	Plastic packaging
o-Toluidine	0.05	0.04	N/A	0.07	0.04
M-phenylenediamine	0.04	N/A	N/A	0.04	N/A
2,4-dimethylaniline	N/A	N/A	N/A	0.13	0.038
2,6-diaminotoluene	0.048	0.078	0.057	0.088	N/A
4-chloroaniline	N/A	N/A	N/A	0.061	N/A
4,4-diaminobiphenyl	N/A	N/A	N/A	0.138	N/A
Bis-(4-aminophenyl)methane	0.023	0.031	N/A	0.23	N/A
4,4'-oxydianiline	0.047	0.038	N/A	0.028	N/A
4,4'-diaminodiphenylsulfide	N/A	N/A	N/A	0.025	N/A
o-Aminoazotoluene	N/A	N/A	0.02	0.027	0.021
4,4'-diamino-3,3'-dimethylphenylmethane	N/A	N/A	0.065	0.022	N/A
3,3'-dichlorobenzidine	N/A	0.155	N/A	N/A	N/A
3-amino-4-methylbenzamide	N/A	N/A	N/A	0.136	N/A
3-chloro-4-methoxyaniline	0.32	N/A	N/A	N/A	N/A
5-chloro-2-methoxyaniline	N/A	0.197	N/A	0.222	0.049
3-amino-p-anisanilide	0.06	N/A	N/A	0.04	N/A

Note: unit, ng/ml; N/A, not detected

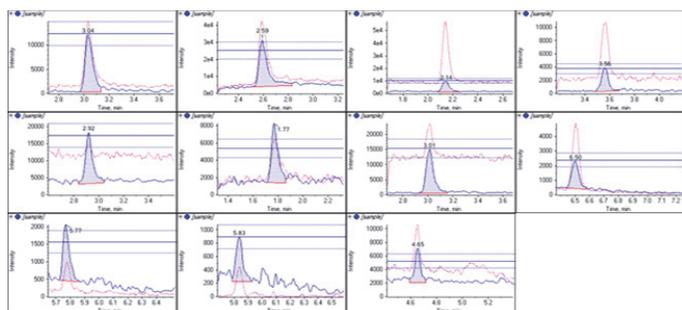


图 7. 样品中部分PAAs检出结果展示。

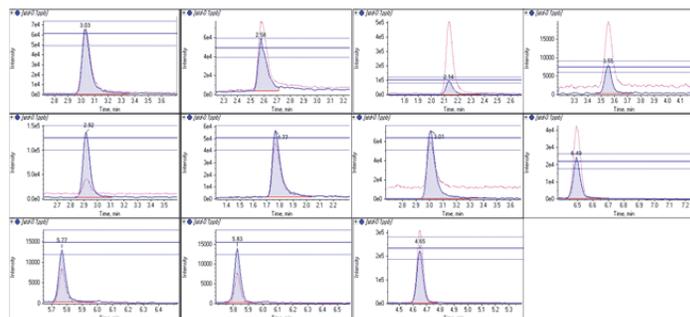


图 8. 部分PAAs标准品色谱图。

总结

本实验开发了针对厨房用具，染料制品以及包装材料中多种初级芳香胺的快速检测方法。

样品的前处理简单快捷，所有化合物均具有良好的回收率，线性关系以及重现性，每种化合物均可以在 50 ng/mL 以下具有较宽的线性范围。

待测样品均有部分化合物检出，但实际总含量均远低于 (EU) No. 10/2011 法规的要求，即所测总含量低于 0.01 mg/kg。

参考文献

1. Commission regulation (EU) No.10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union L 12, 15.1.2011. <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj>

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8491-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX