

气相色谱 - 质谱法测定食品中的 3 - 氯 - 1,2 - 丙二醇残留量

朱坚 盛永刚 张蓓雯

(上海出入境检验检疫局 上海 200135)

[摘要]本文建立了一个使用 GC - ECD 和 GC/MS 测定食品中 3 - 氯 - 1,2 - 丙二醇 (3 - MCPD) 的方法。本法将试样与 Extrelut (经过特殊处理的硅藻土) 拌匀, 装柱, 用乙醚取代乙酸乙酯提取, 经过弗罗里硅土柱净化, 其中的 3 - MCPD 经三氟乙酸酐 (TFAA) 在常温下衍生 30min 后, 用配有电子俘获检测器的气相色谱仪和气相色谱质谱联用仪测定。本方法对其净化步骤有很大突破, 即增加了以弗罗里硅土为层析柱的净化步骤。在 Extrelut、弗罗里硅土两次柱净化过程中, 确定了用一定比例的乙醚 - 正己烷预淋洗, 洗去了大量杂质。用三氟乙酸酐取代了七氟丁酰咪唑 (HFBI) 衍生。本法准确、稳定, 当氯丙醇的添加范围在 0.01 - 0.50mg/kg 时, 3MCPD 的回收率为 80.6 - 117%, 变异系数为 6.5 - 10.1%, 最低检出限为 3 μ g/kg。本方法可适用于肉制品、啤酒、HVP (水解植物蛋白)、酱油等调味品中的 3 - MCPD 的测定。

关键词:气相色谱 食品 3 - 氯 - 1,2 - 丙二醇

水解植物蛋白 Hydrolyzed Vegetable Protein (HVP) 作为风味剂在食品中使用已有几十年的历史, 主要用于方腿、红肠等加工食品中, 也用于汤、肉汁混合物风味快餐和固体汤料中。传统的水解植物蛋白的生产工艺, 是将植物蛋白质用浓盐酸水解。而在此过程中, 其原料(如豆粕等)中的脂肪和油脂中存在的三酰甘油, 也同时水解成丙三醇, 并可进一步反应产生大量的 3 - 氯 - 1,2 - 丙二醇。近来也有报导在啤酒加工过程中也会产生少量的 3MCPD。近几年的毒理研究表明 3 - MCPD 具有毒性, 在 1993 年, 美国在 FAO/WHO 的 WHO 第 837 号中报导了 3MCPD 的毒性报告, 报导 3MCPD 会引起癌症、影响肾脏及生育。随着氯丙醇毒性报告的增多, 基于对毒理数据的分析, 世界各国纷纷对食品中的 3 - MCPD 残留量作出了规定。部分国家和组织的推荐最高限量见表 1。

尽管我国即将推行 MRL (最高残留限量), 但目前没有测定方法, 因此, 有必要确定一个详尽、准确的检测方法, 测定食品中 3MCPD 残留量。本课题是在参考国外的有关方法, 经研究、改进后完成的。

2001 - 07 - 21 收

第一作者简介: 朱坚, 男, 1961.3. 出生, 高工, 上海出入境检验检疫局, 电话: 021 - 68563030 - 15127

表1 部分国家和组织的推荐最高限量

国家和组织	3-氯-1,2-丙二醇() 最高限量	国家和组织	3-氯-1,2-丙二醇() 最高限量
德国	1ppm [*]	英国	0.01ppm
美国	1ppm	中国 SB	1ppm
瑞士	10ppm	Food Chemicals Codex	1ppm

* 另有资料 Stadt Karlsruhe Stadtverinaramt 中为 0.5ppm。

** 于 2000. 12. 20 正式实行

根据不同的样品,采取均质、加盐等手段^{[1], [5]},将食品中的 3MCPD 溶解在氯化钠溶液中,经离心,提取液与 Extrelut 拌匀、装入层析柱^{[4], [6], [2]}。采用乙醚-正己烷(2:8)混合液作为预淋洗剂,先洗去部分杂质,继用纯乙醚洗脱 3-MCPD。本法在参考大量文献的基础上,经过反复地试验比较,建立了一个较好的净化过程,即增加了以弗罗里硅土为层析柱的净化步骤,以适用于复杂机体样品的测定,最后经三氟乙酸酐(TFAA)衍生后测定。当氯丙醇的添加范围在 0.01 - 0.50mg/kg 中时,3-氯-1,2-丙二醇的回收率为 80.6 - 117%,变异系数为 6.5 - 10.1%。实验结果表明本法准确、稳定,3MCPD 的最低检出限为 3μg/kg。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

正己烷、无水乙醚:重蒸馏;三氟乙酸酐(TFAA);氯化钠;Extrelut;

无水硫酸钠:于 650℃ 下灼烧 4h,贮于密闭容器中备用;弗罗里硅土:于 650℃ 下灼烧 4h,使用前于 130℃ 下活化 2h,冷却后,贮于密闭容器中备用;氯化钠水溶液:在 20g 氯化钠中加入 100mL 水。

标准品:3-氯-1,2-丙二醇,纯度 ≥98%;

1.1.2 仪器和设备

离心机;旋转蒸发器;层析柱:15mm(OD) ×300mm,具砂芯板;无水硫酸钠柱:20mm(OD) ×60mm,内装 20mm 高的无水硫酸钠;涡旋混合器;均质机;绞肉机;气相色谱仪-电子俘获检测器和气相色谱-质谱仪。

1.2 测定方法

1.2.1 提取

(1) 酱油、水解植物蛋白液

精确称取 2.000g 样品于 50mL 烧杯中,加入 2g Extrelut,充分拌匀。

(2) 啤酒

精确称取 10.000g 啤酒样品于 50mL 烧杯中,加入 2g 氯化钠,用玻棒搅拌直到氯化钠完全溶解并且气泡完全消失。精确称取 2.000g 于另一 50mL 烧杯中,加入 2g Extrelut,充分拌匀。

(3) 肉制品

先将肉样经绞肉机绞碎,精确称取 50.000g 样品,加入 100mL 20% 的氯化钠溶液,均质 2~3min,于 4000rpm 下离心 2~3min。上清液滤入 10mL 容量瓶并定容至刻度,移取 2.0mL 于 50mL 烧杯中,加入 2g Extrelut,充分拌匀。

(4) 水解植物蛋白粉和调味包(固体、半固体)

精确称取 0.500g 样品,加入 1.5mL 水,加入 2g Extrelut,充分拌匀。

于 15mm(OD) ×300mm 柱中,加入 1cm 无水硫酸钠,将上述与 Extrelut 拌匀的样品装入柱中,最后填入 1cm 无水硫酸钠,放置 15min。用 40mL 正己烷-无水乙醚(8:2)淋洗,淋洗速度约为 2mL/min,弃去流出液,继用 40mL 无水乙醚洗脱,洗脱液收集于 50mL 离心瓶中。在 40℃ 下,旋转蒸发到约 2.5mL(切勿蒸干)。

1.2.2 净化

在 15mm(OD) ×300mm 柱中依次装入 0.5cm 无水硫酸钠、5g 弗罗里硅土、1cm 无水硫酸钠,先用 20mL 无水乙醚淋洗。将浓缩液倒入层析柱中,用 80mL 正己烷-无水乙醚(9:1)淋洗,淋洗速度约为 2mL/min,弃去流出液,继用 140mL 无水乙醚洗脱,洗脱液收集于 250mL 的平底烧瓶中。将洗脱液于 40℃ 下,旋转蒸发至 10mL 左右,移入离心瓶中,用 2 × 5mL 正己烷洗涤平底烧瓶,并入离心瓶中,再次浓缩至约 5mL。

1.2.3 衍生

用定量加液器吸收 100μL 三氟乙酸酐,注入浓缩液中,摇匀,在室温中静止 30min。加入 2 × 5mL 蒸馏水,每次激烈振荡 1min,于 1000rpm 下离心 1min,吸去水层。倒入无水硫酸钠柱中,将流出液收集于 10mL 刻度试管中,用少量正己烷淋洗无水硫酸钠柱,并定容至适当体积,以供测定。

1.2.4 标准工作液

标准品配制:取适量 3-氯-1,2-丙二醇标准品,用正己烷配成浓度约为 1mg/mL 的贮备液,根据需要配成适当浓度的工作液。

取适量的 3-氯-1,2-丙二醇标准品,于 50mL 离心管中,加入 5mL 正己烷,再按以上步骤 3 进行衍生。

1.2.5 测定

1.2.5.1 GC/ECD 条件

- (1) 色谱柱:SE-30 30m ×0.32mm ×0.5μm;
- (2) 色谱柱温度:50 (保持 0.5min) 1 /min 65 2 /min 70 (3min) 30 /min 250 (2min);
- (3) 进样口温度:280 ;
- (4) 检测器温度:300 ;
- (5) 载气:氮气 流量 1.0mL/min;
- (6) 尾吹气:30mL/min;
- (7) 进样方式:无分流进样。

1.2.5.2 GC 测定

按仪器条件,对标准工作液和样液等体积穿插进样。根据标准品的峰面积用外标法定量。

1.2.6 气相色谱-质谱确证

将样液在一小股氮气流下浓缩至0.2mL进行测定；

1.2.6.1 GC/MS 条件

- (1) 色谱柱: HP - 5MS 30m × 0.25mm × 0.25μm;
- (2) 色谱柱温度: 50 (保持0.5min) 1 /min 65 2 /min 70 (3min) 30 /min 250 (2min);
- (3) 进样口温度: 280 ;
- (4) 接口温度: 280 ;
- (5) 载气: 氮气 流量 1.0mL/min;
- (6) 进样方式: 无分流进样;
- (7) 电离模式: EI(70eV);
- (8) 选择离子: (M/Z): 153、175、253。

2 结果与讨论

2.1 提取

由于3-氯-1,2-丙二醇含有二个羟基易溶于水,当它在酱油或啤酒等液体中时,很难用有机溶剂通过液-液分配直接提取。根据文献报道,一般采用柱层析的方法进行提取,层析柱大都选择Extrelut与样品拌匀,而Extrelut具有强吸水性,当液体样品与它拌和时,就将水份吸收。当再用有机溶剂淋洗时,3-氯-1,2-丙二醇就较容易洗脱。本法也采用Extrelut进行层析。先用一定比例的正己烷与乙醚混合液预淋洗,以淋去部分低极性的杂质,继用乙醚洗脱3-氯-1,2-丙二醇。

2.1.1 预淋洗的正己烷-乙醚混合液的比例及淋洗量的确定

在2mL的20%氯化钠溶液中,添加浓度为4μm/mL标准品1mL,再与5g Extrelut混匀,分别采用9:1、8:2和5:5的正己烷-乙醚混合液淋洗,淋洗量均为100mL,结果在用9:1和8:2的正己烷-乙醚混合液的洗脱液中,均未测出3-氯-1,2-丙二醇。而在用5:5的正己烷-乙醚混合液的洗脱液中在40mL以后发现有3-氯-1,2-丙二醇被洗脱。因此本法采用8:2的正己烷-乙醚混合液80mL预淋洗。

2.1.2 乙醚洗脱量的确定

文献中有用乙酸乙酯和乙醚淋洗的报导,但在本实验室的测定过程中发现,用乙酸乙酯洗脱时用量很大,且洗脱效果不好,所以就采用乙醚提取样品中的3MCPD,其用量需通过淋洗曲线确定。得出的淋洗曲线图,见图1。

从淋洗曲线图中可得知,当乙醚用至35mL时,3-MCPD全被淋洗下来,因此可确定,在提取过程中用40mL乙醚足够。

2.2 柱净化

2.2.1 柱的选择

由于文献中报道的3MCPD测定仅是针对于水解蛋白,其中杂质含量较少,无需进行净化处理,而本方法主要是测定食品中的3MCPD含量,食品的基体比较复杂,对于酱油、肉等含有较多杂质与色素的样品,提取得到的溶液略显黄色,说明本法需经净化处理才能测定。分别取5g硅胶、中性氧化铝、弗罗里硅土进行试验。用乙醚淋洗,最终发现硅胶柱

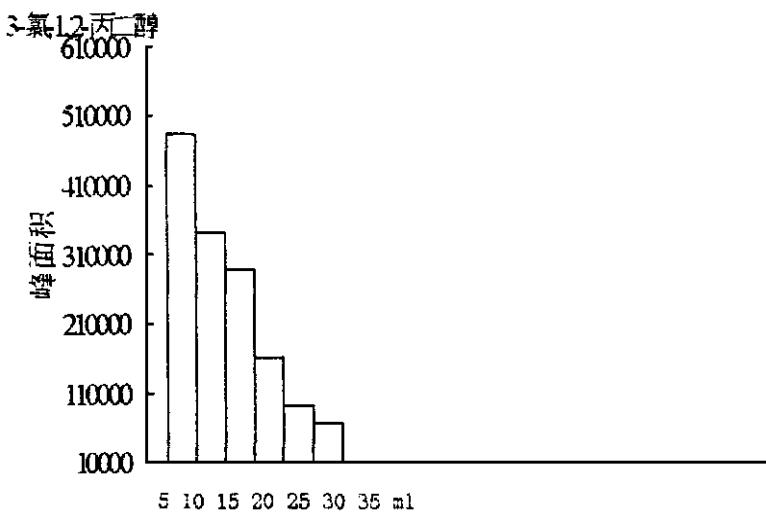


图1 乙醚淋洗曲线图

洗脱液稍呈黄色,氧化铝、弗罗里硅土柱洗脱液无色,色谱图中无杂峰干扰,而在测定肉样时弗罗里硅土对油脂的吸附较氧化铝强,且氧化铝柱需用大量乙醚才能洗脱3-MCPD。因此本法采用弗罗里硅土柱净化。

2.2.2 预淋洗剂的选择及用量

用不同比例的正己烷与乙醚作为预淋洗剂,分别以80mL淋洗剂的量来作试验,混合液的比例分别为:

(1) 乙醚-己烷(1:9);(2) 乙醚-己烷(2:8);(3) 乙醚-己烷(1:1)分别预淋洗。

a. 在乙醚-己烷(1:9)洗脱液中,没有测出3MCPD。

b. 在乙醚-己烷(2:8)和乙醚-己烷(1:1)洗脱液中,分别有少量的3MCPD被洗脱。

因此本法选择用80mL乙醚-己烷(1:9)作预淋洗剂。

2.2.3 洗脱液的选择及用量

分别用(1)乙醚-己烷(2:8);(2)乙醚-己烷(1:1)和纯乙醚作为洗脱剂,以考察洗脱效果,结果发现在用(1)乙醚-己烷(2:8);(2)乙醚-己烷(1:1)洗脱时其洗脱效果不好,即要用大量的洗脱液才能洗脱完全。因此采用纯乙醚直接淋洗,乙醚的用量见淋洗曲线,乙醚淋洗曲线图见图2。

发现整个净化过程用140mL乙醚足够洗脱3-氯-1,2-丙二醇。根据气相色谱测定,杂质对3-氯-1,2-丙二醇无干扰,且其回收率也较好。

2.3 衍生

根据文献报道,3-氯-1,2-丙二醇直接由GC-ECD测定,其重现性较差,必须经过衍生后测定,其结果才较稳定。国外早期采用苯硼酸钠衍生法^[5],但后来发现其质谱碎片的灵敏度不够。目前采用(HFB)即“七氟丁酰咪唑”衍生法^[4],质谱碎片的灵敏度高,但需在70℃下密闭反应,对操作和器皿有特殊的要求。本方法采用的是三氟乙酸酐作为衍生剂,在室温下反应30min即可,测定结果也较好。

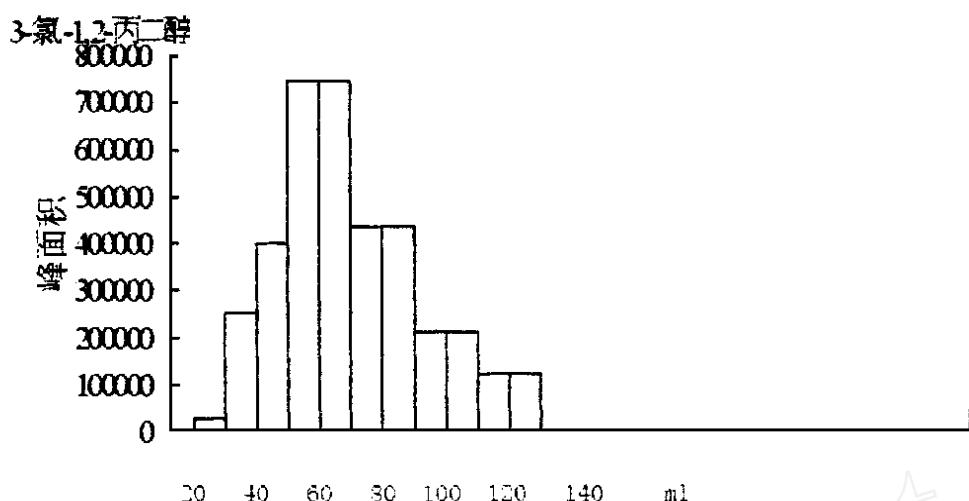


图2 乙醚淋洗曲线图

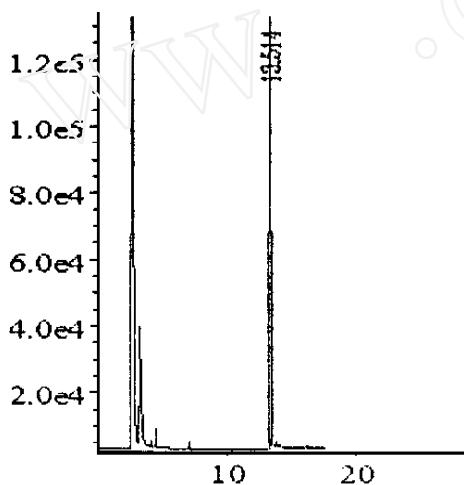


图3 经衍生的3-MCPD在柱1上色谱图

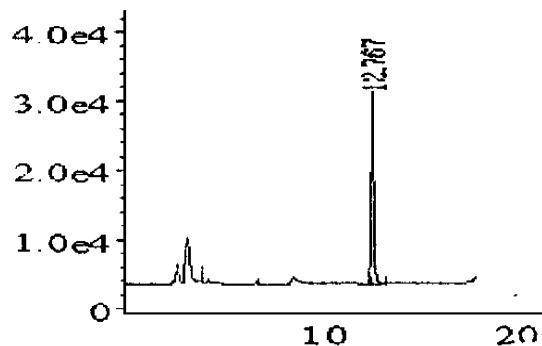


图4 经衍生的3-MCPD在柱2上色谱图

2.4 色谱条件的选择

本试验选用了两种色谱性,均取得了较好的色谱图:

柱1. 30m ×0.32mm ×0.5μm(长 ×内径 ×涂层厚) SE-30,

色谱柱温度:50 (保持0.5min)₁ /min 65₂ /min 70 (3min)₃₀ /min 250 (2min)

载气流速:N₂: 1.0mL/min。

柱2. 30m ×0.25mm ×0.25μm(长 ×内径 ×涂层厚) HP-5MS,

色谱柱温度:50 (保持0.5min)₁ /min 65₂ /min 70 (3min)₃₀ /min 250 (2min)

载气流速: N_2 : 0.5 mL/min。

2.5 质谱条件的选择

将经 TFAA 衍生后的 3MCPD 在全扫描的方式下得到 EI 全扫描图, 见下:

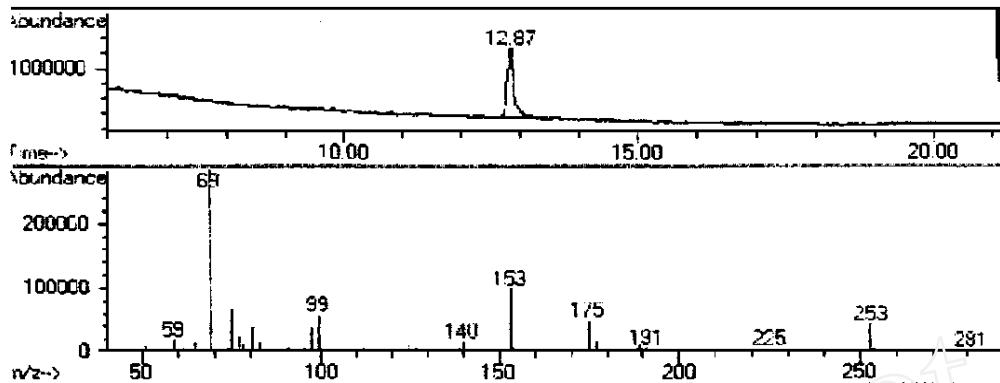
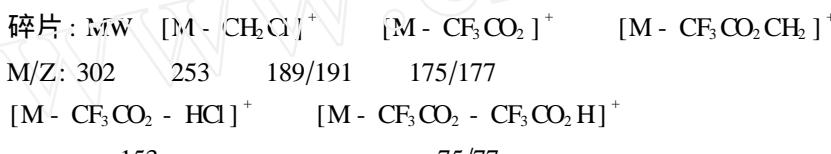


图 5 标准品(经 TFAA 衍生)的质谱图

其特征离子为:



而离子丰度最高的 $M/Z: 69$ 为 CF_3^+ 所产生, 与 3MCPD 结构无关, 因此选择离子为: $(M/Z) 153, 175$ 和 253 。

其标准品和样品的质谱图见下:

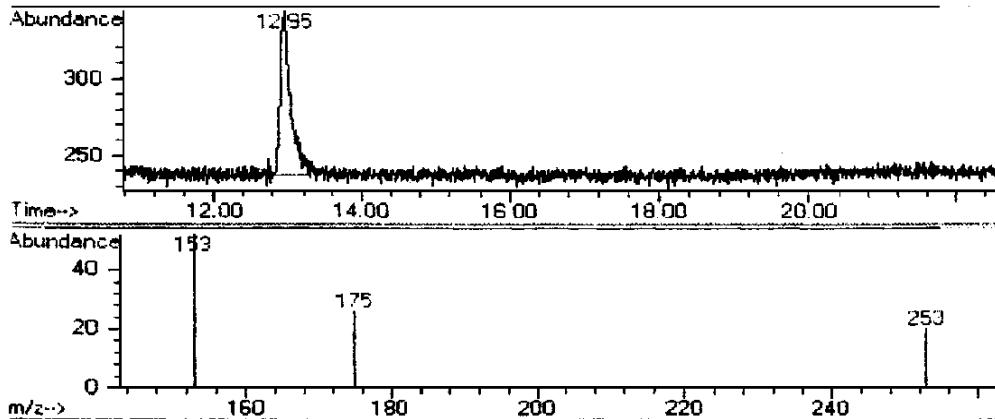


图 6 标准品 0.10ng 的质谱图

2.6 回收率、精密度和最低检出限试验

2.6.1 回收率、精密度

2.6.1.1 采用在不含3MCPD的啤酒中添加3MCPD法进行考察,结果见下表:

表2 啤酒中添加3MCPD回收率试验

添加量(mg/kg)	0.010	0.050	0.100
测得值1	0.0098	0.0487	0.0976
测得值2	0.0092	0.0463	0.0985
平均	0.0095	0.0475	0.0980
平均回收率(%)	95.0	95.0	98.0

2.6.1.2 采用在不含3MCPD的酱油中添加3MCPD法进行考察,结果见下表:

表3 酱油中添加3MCPD精密度、回收率

添加量(mg/kg)	0.010	0.050	0.500
1	0.0093	0.0507	0.5258
2	0.0093	0.0493	0.4697
3	0.0099	0.0455	0.5870
4	0.0086	0.0454	0.4826
5	0.0096	0.0432	0.5435
6	0.0105	0.0523	0.4875
7	0.0111	0.0513	0.5000
8	0.0108	0.0432	0.5000
9	0.0088	0.0556	0.5125
10	0.0097	0.0403	0.4940
\bar{x} 平均	0.00969	0.0477	0.5103
平均回收率(%)	96.9	95.4	102.1
S 标准差	0.00084	0.0049	0.0344
变异系数 CV, %	8.7	10.1	6.5

2.6.1.3 采用在不含3MCPD的肉样中添加3MCPD法进行考察,结果见下表:

表4 肉样中添加3MCPD回收率试验

添加量(mg/kg)	0.010	0.050	0.100
测得值1	0.0093	0.0466	0.0957
测得值2	0.0097	0.0437	0.0974
平均	0.0095	0.0452	0.0966
平均回收率(%)	95.0	94.0	96.6

2.6.1.4 以某牌号的含有 3MCPD 的方腿肉, 测定十次, 得到其精密度见下表:

表 5 肉中测定精密度

次数	测的值 (mg/kg)	次数	测得值 (mg/kg)
1	0.396	8	0.427
2	0.413	9	0.380
3	0.418	10	0.440
4	0.479	x 平均	0.414
5	0.378	S 标准差	0.0317
6	0.429	变异系数 CV, %	7.65
7	0.383		

2.6.2 最低检出限

本方法的 3MCPD 的最低检出限为 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6.3 气相色谱图

衍生化 3 - MCPD 标准品的气相色谱图、样品中添加标准品 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 量时的色谱图见下:

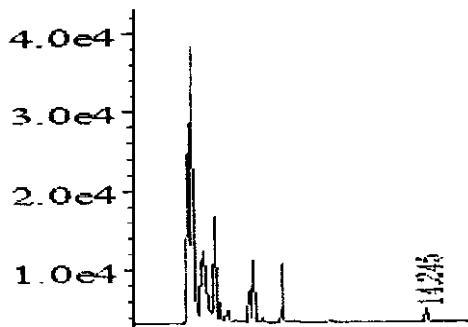


图 7 标准品 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 色谱图

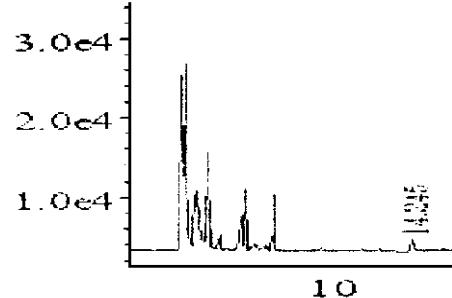


图 8 啤酒样品中添加标准品 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 量

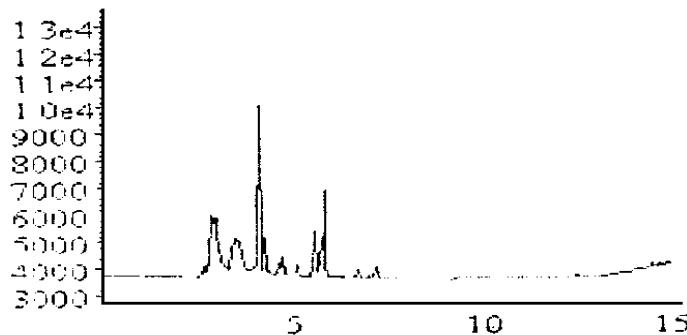


图 9 啤酒空白样品色谱图

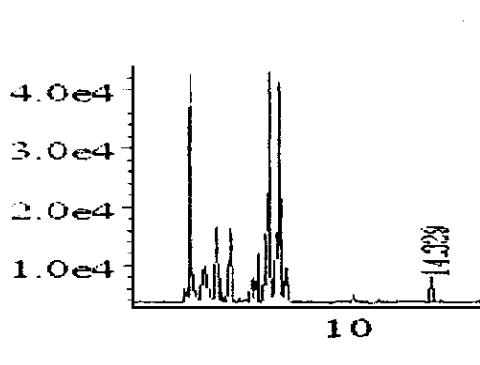


图 10 某方腿肉的测定色谱图

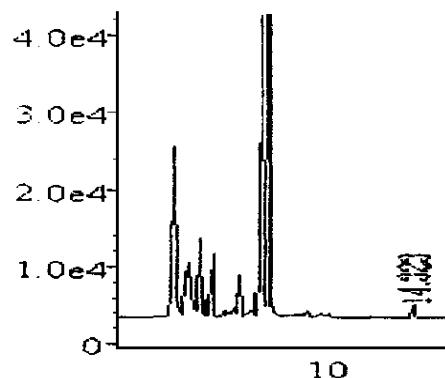


图 11 某酱油的测定色谱图

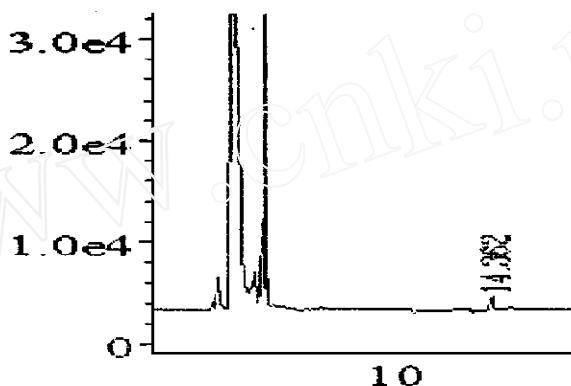


图 12 某 HVP 的测定色谱图

2.6.4 样品气相色谱-质谱图

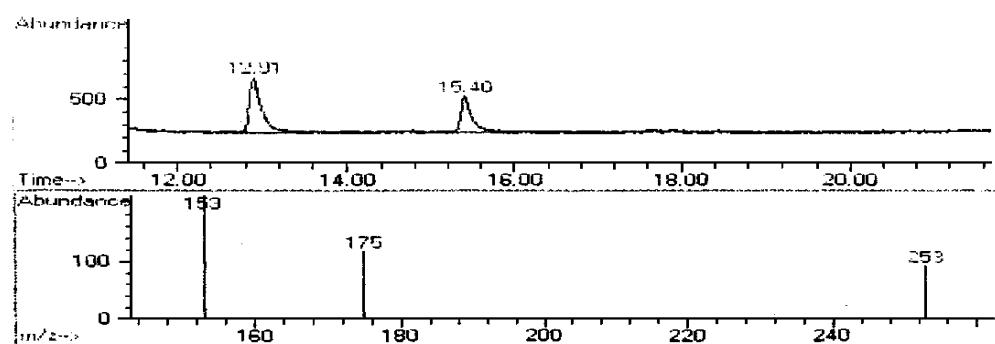


图 13 某种牌号方腿肉的质谱定性

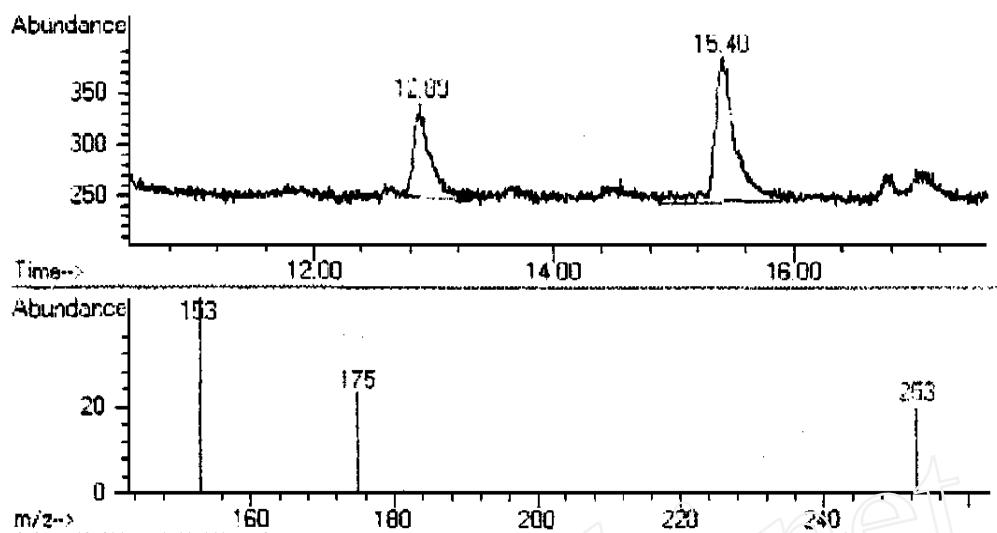


图 14 某种酱油的质谱定性

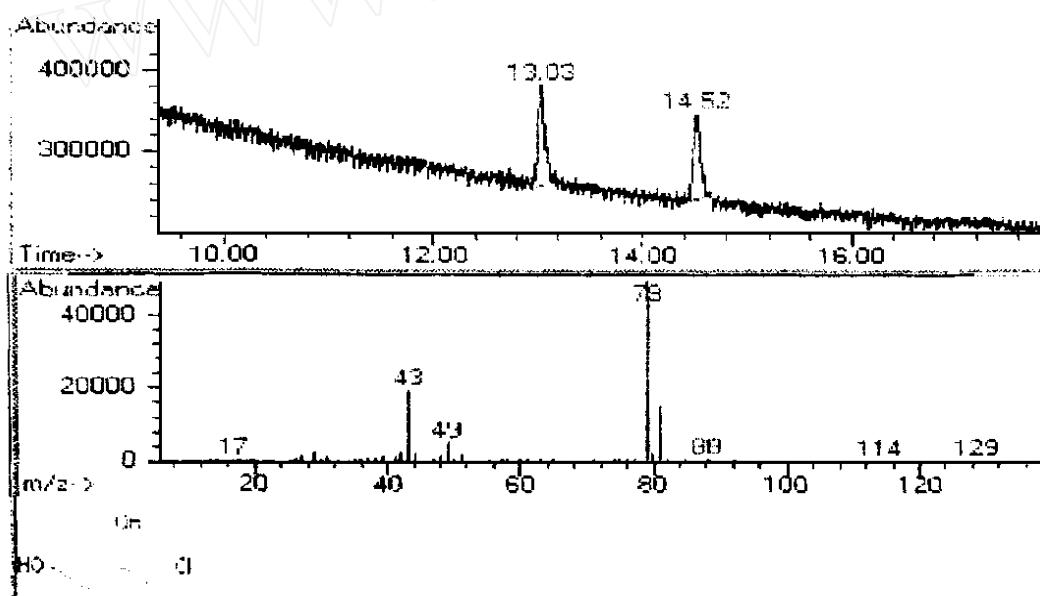


图 15 酱油样品的色谱—质谱及检索图

2.7 线性范围及相关系数

对衍生化 3 - 氯 - 1,2 - 丙二醇进行了测定, 其线性范围及相关系数如下:

衍生化 3 - 氯 - 1,2 - 丙二醇, 在 0.003 ~ 20ng 范围内, 相关系数: = 0.9983。

2.8 抽样试验

将市场上进口和出口的部分啤酒样品,用本法对它们进行测试。测试结果见下表:

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
3MCPD 含量(ppb)	ND	ND	23.3	ND	3.9	ND	43.1	ND
编号	9	10	11	12	13	14	15	16
3MCPD 含量(ppb)	16.9	ND	14.4	13.5	40.0	12.4	13.3	5.0

3 结论

水解植物蛋白作为风味剂被广泛使用于调味品中,植物蛋白用盐酸水解过程中会产生大量的氯丙醇。近年来研究表明氯丙醇对人体有致癌作用,世界各国纷纷对食品中的3MCPD残留量作了规定,基于此,检测食品中的3MCPD残留量变得非常重要。

本法采用柱层析预处理的方法,将试样与 Extrelut 拌匀、装柱,用乙醚提取,经弗罗里硅土柱净化,再经三氟乙酸酐在常温下衍生 30min 后,用 GC - ECD 和 GC/MS 测定食品中的 3MCPD 含量。本法建立了一个较好的净化方法,即增加了弗罗里硅土柱净化。在 Extrelut 提取过程中,用 2:8 比例的乙醚-正己烷预淋洗,在弗罗里硅土柱净化过程中,确定了 1:9 的乙醚-正己烷预淋洗,有效地去除了杂质对 3MCPD 的干扰。

试验结果表明本方法准确、稳定,氯丙醇的添加范围在 0.01 - 0.50mg/kg 时,3MCPD 的回收率为 80.6 - 117 %,变异系数为 6.5 - 10.1 %,可达到的最低检出限为 3 μ g/kg。本方法适用于复杂机体样品中 3MCPD 残留量的测定。

参 考 文 献

- 1 Colin G,Hamlet. Analytical Methods for the Determination of 3 - chloro - 1 ,2 - propanediol and 2 - chloro - 1 ,3 - propanediol in Hydrolysed Vegetable Protein ,Seasonings and Food Products Using Gas Chromatography/ion Trap Tandem Mass Spectrometry. Food Additives and Contaminants ,1998 ,15(4) : 451 - 465
- 2 Velisek J ,J Davidek ,V Kubelka ,G Janicek ,Z Svobodova ,Z Simicova. New Chlorinecontaining Organic Compounds in Protein Hydrolysates.J Agric Food Chem. ,1980 ,28 :1142 - 1144
- 3 Van Bergen C A ,P D Collier ,D D O Cromie ,R A Lucas ,H D Preston ,D J Sissons. Determination of Ohloropropanols in Protein Hydrolysates.Journal of Chromatography ,1992 ,589 :109 - 119
- 4 Spyres G. Determination of 3 - chloropropene - 1 ,2 - diol in Hydrolyzed Vegetable Proteins by Capillary Gas Chromatography with Electrolytic Conductivity Detection. Journal of Chromatography ,1993 ,638 :71 - 74
- 5 Larry E. Rodman and R Dudley Ross. Gas - liquid chromatography of 3 - chloropropanediol.Journal of Chromatography ,1986 ,369 :97 - 103

Determination of 3 - chloro - 1 ,2 - propanediol Residues in Food Products Using Gas Chromatofrophy Mass Spectrometry

Zhu Jian , Sheng Yonggang , Zhang Beiwen

(SHCIQ ,上海 200135 ,China)

Received 2000 - 07 - 21

Abstract

The paper studied the method of determining 3MCPD in food by GC/ECD and GC/MS. Samples and Extrelut were filled into the column before mixed equably ,and then extracted with diethyl ether instead of ethyl acetate. The sample was clarified by Florisil and derived for 30 minutes with TFAA under normal temperature ,then determined with GC/ECD and GC/MS. There was a great innovation in the method of the clarification of Florisil. Certain ratio of diethyl ether - hexane was used to wash off the impurity during the clarification of Extrelut and Florisil. TFAA replaced HFBI to derive 3MCPD. The rate of recovery and variation coefficient was 80. 6 - 117 % and 6. 5 - 10. 1 % when the content of chloropropanol ranged from 0. 01mg/kg to 0. 50mg/kg ,the minimum detection of 3MCPD was 3 μ g/kg. This method is precise and stable. It can be applied to the determination of 3MCPD in the seasonings of meat products ,beer ,HVP and soy et al.

Key Words :gas chromatography ,food ,3 - chloro - 1 ,2 - propanediol (3MCPD)