

实验技术与方法

固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法
测定食用油脂中 3-氯丙醇酯

刘红河,陈慧玲,许欣欣,康莉,廖仕成,毛丽莎
(深圳市疾病预防控制中心,广东 深圳 518055)

摘要:目的 建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱联用法(SPE-UPLC-MS/MS)同时测定食品中 18 种 3-氯丙醇酯的方法,并对部分市售含油脂食品中氯丙醇酯的含量进行调查。方法 样品用叔丁基甲醚-乙酸乙酯(8:2, V/V)超声提取;经 Sep-Pak Silica 硅胶萃取小柱、OASIS HLB 固相萃取小柱(预先用甲醇活化)二次净化,以 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm,1.7 μm)分离,以多反应监测模式(MRM)进行监测,内标法定量。结果 18 种氯丙醇酯在 1.0~200.0 μg/L 范围内线性关系良好(r 为 0.999 1~0.999 8)。食用油在 0.10、1.0 和 10.0 mg/kg 3 个添加水平范围内的平均回收率为 80.2%~98.5%, $RSD < 8.1\%$ 。食用油中 18 种氯丙醇酯的检出限在 1.17~30.1 μg/kg 之间,92.0%(46/50)的食用油中检出多种 3-氯丙醇酯,含量分别在 7.55~5 360 μg/kg 之间;75.0%(9/12)的含油脂食品中检出多种 3-氯丙醇酯,含量在 6.62~1 569.8 μg/kg 之间。结论 建立的固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱联用法同时测定食品中 18 种 3-氯丙醇酯的方法快速简单、准确有效,可以满足各种食用油和含油脂食品中 3-氯丙醇酯的检测要求。

关键词:固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法;3-氯丙醇酯;食用油;食品安全;食品污染物

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)03-0327-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.011

Simultaneous determination of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) esters residues
in foods by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-electrospray
tandem mass spectrometry

LIU Hong-he, CHEN Hui-ling, XU Xin-xin, KANG Li, LIAO Shi-cheng, MAO Li-sha
(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: Objective To establish a sensitive quantitative method for the simultaneous determination of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) esters in foods by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with the pretreatment of solid phase extraction, and investigate ten types of 3-MCPD esters residues in some greasy foods from supermarket. **Methods** About 0.100 0 g oil sample was accurately weighted and dissolved in a mixture of 10 ml tert-butyl methyl ether (MTBE)-ethyl acetate (8:2, V/V) and spiked with internal standard. After vortex, the analyte of the extraction were purified by a Sep-pak silica cartridge and a OASIS HLB C₁₈ cartridge (preconditioned with methanol) in turn. The sample extract was separated on an acquity BEH C18 column (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm), identified by electrospray ionization (ESI) in positive mode using multiple reaction monitoring (MRM), and then detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantified with internal standards. **Results** By the quantification of internal standard, the 18 types of 3-MCPD esters were linear in the range of 1.0~200.0 μg/L with correlation coefficient of 0.999 1~0.999 8. The detection limit of the method was ranged from 1.17 to 30.1 μg/kg for edible oils. The recovery of spiked samples at three levels (0.10, 1.0 and 10.0 mg/kg) was ranged from 80.2%~98.5% ($n=7$). And the relative standard derivations (RSD) were lower than 8.1%. In 50 edible oils and 12 greasy foods, 3-MCPD esters were detected at the range of 7.55~5 360 μg/kg with a detection rate of 92.0%(46/50), and in 12 greasy foods, 3-MCPD esters was detected at the range of 6.62~1 569.8 μg/kg with a detection rate of 75.0%(9/12). **Conclusion** The method could be used to detect 3-MCPD esters in edible oils and greasy foods.

Key words: Solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; 3-chloro-1,2-

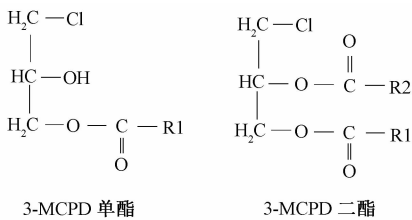
收稿日期:2015-10-10

基金项目:深圳市科技创新委员会知识创新计划基础研究项目(JCYJ20140410170519145)

作者简介:刘红河 男 主任技师 研究方向主要为食品中有机污染物研究 E-mail:liuhonghe@sina.com

propanediol esters; edible oils; food safety; food contaminants

脂肪酸氯丙醇酯,简称氯丙醇酯(fatty acid esters of chloropropanol)。氯丙醇酯污染是近年来国际上新出现的食品安全问题^[1]。氯丙醇酯会在加热、酸性、微生物或人体肠道胰脂酶的作用下水解成游离态的氯丙醇,可对人体健康产生不良影响^[2]。氯丙醇是于 1978 年首先发现的国际社会公认的一类重要食品污染物,是至今仍受广泛关注的食品安全热点问题^[3]。氯丙醇类化合物属于遗传毒性致癌物,具有致癌作用,能够使精子减少和精子活性减低,并有抑制雄性激素生成的作用,使生殖能力减弱,此外氯丙醇还具有较强的肾脏毒性。近几年来科学家在越来越多的食品中发现氯丙醇酯因为易转化成氯丙醇而引起越来越多关注^[4-5]。氯丙醇酯的主要成份包括 3-氯-1,2-丙醇(3-MCPD)酯和 1,3-二氯-2-丙醇(1,3-DCP)酯等,毒性最强的为 3-MCPD 酯,分单酯和双酯两类,结构式见图 1。目前国内外尚没有针对食品中的氯丙醇酯出台有效的监管措施。国外有调查资料表明,人体由于摄入氯丙醇酯可能使得人体氯丙醇的摄入量超出其每日最大耐受量(TDI)(2 μg/kg BW)的 5 ~ 100 倍^[6-7]。



注:R1 和 R2 为与甘油酯化的脂肪酸酰基基团

图 1 3-MCPD 酯结构式

Figure 1 Structure of 3-MCPD esters

由于氯丙醇酯的食品安全问题发现时间不长,加上检测技术有一定的难度,因此,目前关于氯丙醇酯的研究报道较少。目前文献报道的方法主要为将氯丙醇酯水解成氯丙醇再用气质联用仪测定的间接法^[8-13],只能以氯丙醇的总量来评估氯丙醇酯的含量,无法测定具体的氯丙醇酯种类,同时样品在水解处理时可能将油脂中的一些前体物质如缩水甘油醚等也会转化成氯丙醇,而影响测定的准确度,由于不同种类氯丙醇酯在人体内代谢产物和代谢速率有一定差异,因此采用间接法测定氯丙醇总量的方式有一定的局限性。液相色谱-串联四级杆质谱(LC-MS/MS)由于同时具备准确定性和准确定量的特点,已经越来越多地用于确证分析方法,可以对样品中不同种类的氯丙醇酯进行直接测定,

但由于目前商品化氯丙醇酯和同位素内标物质种类较少、价格昂贵,而影响方法的推广,目前报道的有采用液相色谱-飞行时间质谱联用法(LC-TOF)^[14-15]或液相色谱-串联四级杆质谱联用法测定^[16-18],但方法尚不成熟。我国国家食品风险评估中心 2015 年开始将 3-氯丙醇酯列入食品风险监测的项目,采用的是将氯丙醇酯水解成氯丙醇,进行衍生后用气质联用仪检测其中的氯丙醇,来间接检测其中氯丙醇酯含量,结果以氯丙醇酯总量进行评价。由于尚没有出台相关氯丙醇酯的监管规定,我国有关氯丙醇酯的污染状况和人体暴露情况的研究数据较少。本文建立了固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱联用法(SPE-UPLC-MS/MS)同时测定食品中主要 18 种 3-氯丙醇酯的方法,样品采用硅胶和 C₁₈ 两种固相萃取小柱进行净化, C₁₈ 色谱柱分离。该方法无需对样品中氯丙醇酯进行水解或衍生,具有快速、准确、灵敏等优点,采用建立的方法测定了各种类型含油脂食品,结果稳定可靠,可对 3-氯丙醇酯的每一种成份进行准确定性定量,优于现有文献报道方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

从深圳市各大超市和农贸市场采集不同品牌和种类食用油 50 份,油条、油饼、奶粉、辣椒酱等含油脂食品 12 份。

1.1.2 主要仪器与试剂

API QTRAP 4500 串联三级四极杆质谱仪(美国 AB Sciex), Shimadzu LC-20A 超快速液相色谱仪(配有 Turbo-V 源、蠕动泵以及 Analyst 1.6.2 数据处理系统,日本 Shimadzu), Peek Infinity 1031 氮气发生器(英国 Peek), 十万分之一天平, 超声清洗仪, 高速冷冻离心机, Turbo Vap II 型吹氮浓缩仪(美国 Caliper), 漩涡振荡器, Sep-Pak Silica 固相萃取柱(3 ml, 500 mg)、OASIS HLB 固相萃取柱(3 ml, 60 mg)、Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm)均购自美国 Waters, 0.22 μm 有机系针筒式微孔滤膜过滤器。

18 种 3-氯丙醇酯标准品: 3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯(3-MCPD-P, CAS: 30557-04-1)、3-氯-1,2-丙二醇油酸单酯(3-MCPD-O, CAS: 10311-82-7)、3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯(3-MCPD-PP, CAS: 51930-97-3)、3-氯-1,2-丙二醇亚油酸单酯(3-MCPD-L,

CAS: 74875-98-2)、3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸单酯(3-MCPD-Ln, CAS: 74875-99-3)、3-氯-1,2-丙二醇油酸二酯(3-MCPD-OO, CAS: 69161-73-5)、3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸单酯(3-MCPD-S, CAS: 22094-20-8)、3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸二酯(3-MCPD-SS, CAS: 72468-92-9)、3-氯-1,2-丙二醇亚油酸二酯(3-MCPD-LL, CAS: 74875-96-0)、3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸二酯(3-MCPD-LnLn, CAS: 74875-97-1)、3-氯丙醇-1-油酸-2-棕榈酸二酯(3-MCPD-OP, CAS: 1363153-60-9)、3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-亚油酸二酯(3-MCPD-PL, CAS: 1246833-87-3)、3-氯丙醇-1-油酸-2-亚油酸二酯(3-MCPD-OL, CAS: 1336935-03-5)、3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-硬脂酸二酯(3-MCPD-PS, CAS: 1185060-41-6)、3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯(3-MCPD-OS, CAS: 1336935-05-7)、3-氯丙醇-1-亚油酸-2-硬脂酸二酯(3-MCPD-LS, CAS: 1246833-46-4)、3-氯丙醇-1-亚麻酸-2-棕榈酸二酯(3-MCPD-LnP, CAS: 1246834-24-1)、3-氯丙醇-1-油酸-2-亚麻酸二酯(3-MCPD-OLn),纯度均大于99%,均购自日本和光(Wako)纯药工业株式会社;9种同位素内标: d_5 -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯(d_5 -3-MCPD-P)、 d_5 -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯(d_5 -3-MCPD-PP)、 d_5 -3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸二酯(d_5 -3-MCPD-SS, CAS: 1246818-85-8)、 d_5 -3-氯-1,2-丙二醇亚油酸二酯(d_5 -3-MCPD-LL, cas),纯度均大于99%,购于日本和光(Wako)纯药工业株式会社; d_5 -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚麻酸二酯(d_5 -3-MCPD-OLn, CAS)、 d_5 -3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-亚油酸二酯(d_5 -3-MCPD-PL, CAS: 1246833-66-8)、 d_5 -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚油酸二酯(d_5 -3-MCPD-OL, CAS)、 d_5 -3-氯丙醇-1-亚油酸-2-硬脂酸二酯(d_5 -3-MCPD-LS, CAS)、 d_5 -3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯(d_5 -3-MCPD-OS),纯度均大于99%,均购自加拿大多伦多化学试剂公司;3种2-氯丙醇酯标准品及内标:2-氯-1,3-丙二醇棕榈酸单酯(2-MCPD-P, CAS: 63326-63-6)、2-氯-1,3-丙二醇硬脂酸二酯(2-MCPD-SS, CAS: 26787-56-4)、2-氯-1,3-丙二醇棕榈酸二酯(2-MCPD-PP, CAS: 169471-41-4)、 d_5 -2-氯-1,3-丙二醇硬脂酸二酯(d_5 -2-MCPD-SS, CAS: 1246818-85-8),纯度均大于99%,均购自加拿大多伦多化学试剂公司。

甲醇、乙腈、异丙醇、叔丁基甲醚、乙醚、乙酸乙酯、正己烷、甲酸等均为色谱纯,乙酸铵(优级纯),其他试剂均为分析纯,水为二次蒸馏超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取18种氯丙醇酯标准物质0.001 00 g

于18个10 ml容量瓶中,用异丙醇溶解并定容至10.0 ml,配成浓度为1 g/L的标准储备液,-20℃下避光保存;分别移取各标准储备液100 μ l于10 ml容量瓶中,用异丙醇定容至10 ml,制备成浓度为10 μ g/ml的18种氯丙醇酯混合标准使用液,-20℃冰箱中保存。临用前根据需要用流动相稀释成适当质量浓度的标准系列工作液。

准确称取9种氯丙醇酯同位素内标0.001 00 g于9个10 ml容量瓶中,用异丙醇溶解并定容至10.0 ml,配成浓度为1 g/L的内标储备液,-20℃下避光保存;分别移取各标准储备液0.10 ml于10 ml容量瓶中,用异丙醇定容至10.0 ml,制备成浓度为10 μ g/ml的9种氯丙醇酯同位素内标使用液,-20℃冰箱中保存。

标准工作曲线的配制:分别取7个10 ml容量瓶,依次加入浓度为10 g/ml的氯丙醇酯混合标准使用液各0.0、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μ l,各加入氯丙醇酯同位素内标使用液(10 μ g/ml)10.0 μ l,用乙腈-甲醇-水(2:2:1, V/V)定容,混匀,各氯丙醇的质量浓度分别为0.0、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μ g/L。

1.2.2 样品前处理

食用动植物油样品直接称取0.100 0 g进行处理;对于含油脂固体食品样品,提取脂肪再进行处理。

称取粉碎均匀的含油脂的食品样品10.00 g(可根据油脂含量多少增减取样量)于干燥的250 ml三角瓶,加入适量的乙醚(以浸没样品为准),盖好磨口塞子,振摇30 min后,分离出乙醚,加入适量乙醚再次提取,盖上磨口塞子浸泡过夜。用定量滤纸把三角瓶中的乙醚提取液过滤到事先干燥好的250 ml鸡心瓶中,滤液旋转蒸发至约2.0 ml,转入事先干燥并称重的10 ml玻璃试管中。用3 ml乙醚分两次洗涤鸡心瓶内壁,并转入试管中,后于80℃下水浴加热至干,擦净外壁水分后,称取重量,前后两次的差值即为脂肪的重量。将提取的脂肪置于4℃冰箱中保存。

准确称取上面提取的脂肪样品或者食用动植物油样品0.100 0 g,加入10 ml叔丁基甲醚-乙酸乙酯(8:2, V/V),加入100 μ l混合内标使用液(10 μ g/ml),混匀后超声5 min;取1.0 ml该混合溶液过预先用5 ml正己烷活化过的Sep-Pak Silica硅胶小柱,收集流出液,再用5 ml乙酸乙酯-正己烷(20:80, V/V)洗脱,合并流出液和洗脱液,在45℃水浴下氮气吹干,残渣用0.2 ml叔丁基甲醚-乙酸乙酯(8:2, V/V)漩涡溶解,加入1 ml甲醇-异丙醇

(1:1, V/V), 过预先用 5 ml 甲醇活化的 OASIS HLB 固相萃取小柱, 收集流出液, 再用 5 ml 甲醇-异丙醇 (1:1, V/V) 对小柱进行洗脱, 合并流出液及洗脱液, 在 50 ℃ 水浴下氮气吹干, 残渣用 1.0 ml 异丙醇溶解, 旋涡混匀 60 s, 过 0.22 μm 有机系微孔滤膜, 滤液供液相色谱与质谱联用仪测定。

1.2.3 仪器条件

色谱: 流动相 A 为乙腈-甲醇-水 (2:2:1, V/V), 含有 5 mmol/L 的乙酸铵; B 为含有 5 mmol/L 乙酸铵的异丙醇。梯度洗脱程序见表 1, 流速 0.30 ml/min; 柱温 50 ℃; 进样体积 25 μl。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution program for separation of 3-MCPD esters		
时间/min	A/%	B/%
0.0	100	0
3.0	100	0
10.0	60	40
20.0	15	85
30.0	5	95
35.0	5	95
35.1	100	0
45.0	100	0

质谱: 离子源为 ESI (+), 检测方式为多反应监测 (MRM) 方式。喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 550 ℃; 源内气 55 L/min, 辅助气 55 L/min, 碰撞气流速中等, 气帘气压力 138 Pa; 入口电压 10 V; 聚焦电压 400 V; 碰撞池出口电压 (CXP) 10 V; 驻留时间 40 ms; 其他 MRM 参数见表 2。

2 结果与分析

2.1 测定目标化合物的确定

3-氯丙醇单酯的种类较少, 但 3-氯丙醇双酯的种类较多, 目前可买到的商品化标准品种类不多, 因此无法获取所有的 3-氯丙醇酯。据文献报道^[17-18], 在所有 3-氯丙醇双酯中, 3-MCPD-LL、3-MCPD-PP、3-MCPD-OO、3-MCPD-SS、3-MCPD-LP、3-MCPD-OP、3-MCPD-LO、3-MCPD-SP、3-MCPD-OS、3-MCPD-LS、3-MCPD-LnP 和 3-MCPD-LnO 等 12 种是常见植物油中 (除棕榈壳油和椰子油) 的广泛存在的 MCPD 酯, 占总 MCPD 酯的 95%。本文研究对象中, 除常见的单酯外, 还包含以上所有的双酯, 共计 18 种氯丙醇酯, 测定结果基本能代表食用油中 3-氯丙醇酯的污染水平。

2.2 氯丙醇酯定性及定量离子的确定

氯丙醇酯在结构上可看成是氯丙醇类化合物与脂肪酸进行酯化反应的产物, 在常规的 ESI 或 APCI 源均不易离子化, 在进行母离子全扫描时只能检测出加氢或加钠离子。分别用浓度为 10 g/ml 的

表 2 氯丙醇酯 MRM 部分参数表

Table 2 Some parameters of multiple reaction monitoring detection for 3-MCPD esters					
化合物	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	去簇电 压/V	碰撞气 能量/V	保留时 间/min
3-氯-1,2-丙二醇油酸单酯 (3-MCPD-O)	392.3	265.1 *	50	19	6.06
	392.3	247.0	50	23	
3-氯-1,2-丙二醇亚油酸单酯 (3-MCPD-L)	390.2	263.2 *	50	16	5.39
	390.2	245.2	50	19	
3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸单酯 (3-MCPD-Ln)	388.2	261.1 *	50	16	4.80
	388.2	243.1	50	18	
3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸单酯 (3-MCPD-S)	394.1	267.2 *	40	18	8.15
3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯 (3-MCPD-P)	366.2	239.2 *	35	18	6.45
3-氯-1,2-丙二醇油酸二酯 (3-MCPD-OO)	656.6	357.2 *	100	30	17.98
	656.6	265.3	120	30	
3-氯-1,2-丙二醇亚油酸二酯 (3-MCPD-LL)	652.5	355.2 *	90	35	15.10
	652.5	635.4	90	22	
3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸二酯 (3-MCPD-SS)	660.6	359.4 *	100	28	22.14
	660.6	267.0	120	29	
3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯 (3-MCPD-PP)	604.5	331.2 *	120	28	17.96
	604.5	239.3	120	33	
3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸二酯 (3-MCPD-LnLn)	648.5	353.2 *	90	33	15.01
	648.5	261.2	90	27	
3-氯丙醇-1-油酸-2-棕榈酸二酯 (3-MCPD-OP)	630.5	357.2 *	100	30	17.24
	630.5	331.2	100	28	
3-氯丙醇-棕榈酸-2-亚油酸二酯 (3-MCPD-PL)	628.5	355.2 *	90	35	16.81
	628.5	331.1	90	28	
3-氯丙醇-1-油酸-2-亚油酸二酯 (3-MCPD-OL)	654.5	355.2 *	90	35	16.95
	654.5	331.2	90	29	
3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-硬脂酸二酯 (3-MCPD-PS)	632.6	359.4 *	100	28	19.16
	632.6	331.1	100	29	
3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯 (3-MCPD-OS)	658.7	359.4 *	100	28	19.44
	658.7	331.1	100	28	
3-氯丙醇-1-亚油酸-2-硬脂酸二酯 (3-MCPD-LS)	656.5	359.4 *	100	28	18.92
	656.5	263.2	100	17	
3-氯丙醇-1-亚麻酸-2-棕榈酸二酯 (3-MCPD-LnP)	626.3	331.2 *	90	28	16.83
	626.3	261.2	90	27	
3-氯丙醇-1-油酸-2-亚麻酸二酯 (3-MCPD-OLn)	652.3	355.2 *	90	35	16.35
	652.3	263.2	90	16	
d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯 (d ₅ -3-MCPD-P)	371.3	239.3	40	18	6.46
d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-SS)	665.5	364.3	130	26	22.14
d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-PP)	609.5	336.2	100	23	17.95
d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇亚油酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-LnLn)	653.5	358.2	90	33	15.02
d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚麻酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-OLn)	657.3	358.2	90	35	16.35
d ₅ -3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-亚油酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-PL)	633.5	360.2	90	35	16.81
d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚油酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-OL)	659.5	360.2	90	35	16.95
d ₅ -3-氯丙醇-1-亚油酸-2-硬脂酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-LS)	661.5	364.4	100	28	18.92
d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯 (d ₅ -3-MCPD-OS)	663.7	364.4	100	28	19.44

注: * 为定量离子

各氯丙醇酯标准分别在 ESI 源正离子模式下进行全扫描,确定各物质的氨加合离子 $[M + NH_4]^+$ 作为母离子,再分别对各相应子离子进行全扫描。通过对去簇电压、碰撞池入口电压、碰撞气能量、碰撞池出口电压、聚焦电压等参数进行优化,确定最佳质谱参数。在优化质谱条件下,对氯丙醇单酯来说 $[M + NH_4]^+$ 离子裂解产生脂肪酸脱羧基后加氢离子 $[R + H]^+$ 的信号最强且稳定,选取该子离子作为相应氯丙醇单酯的定量离子;对双酯来说,信号最强的子离子主要为脱去一个脂肪酸后的加氢离子 $[(CH_2-Cl-CH-O-R-CH_3) + H]^+$,故实际检测时分别选取该子离子作为相应氯丙醇双酯的定量离子,另选择其他较强信号子离子作为定性离子。由于 3-MCPD-S 和 3-MCPD-P 仅子离子 $[R + H]^+$ 信号较强,其他碎片离子信号太弱,无法用于检测,故该两种物质仅选一对子离子作为定性及定量离子(表 2)。

2.3 提取和净化条件的选择和优化

氯丙醇酯是一类脂溶性酯类化合物,采用叔丁基甲醚-乙酸乙酯(8:2, V/V)可较好地溶解食用动植物油及其中的氯丙醇酯。文献[14]采用溶解稀释后直接进样检测,本试验中发现食品及食用动植物油成份较复杂,样品经稀释后直接测定有较强的基质效应,同时对质谱离子源和四极杆造成较严重污染,因此样品提取后需进行一定的净化处理。文献[13]采用氨基柱进行净化处理,本试验发现样品经氨基柱净化后仍有一定的基质干扰,氯丙醇二酯的回收率可达 80% 以上,但个别氯丙醇单酯的回收率不到 70%;本研究分别以硅胶、硅藻土、 C_{18} 和中性氧化铝等不同填料的固相萃取柱进行试验,效果均不够好;进一步以上不同填料的固相萃取柱采用两两组合进行试验,发现依次采用硅胶柱和 C_{18} 小柱两种萃取小柱来进行净化效果令人满意。硅胶柱主要用于除去样品中的部分甘油三酯、游离脂肪酸和甘油二酯,HLB 固相萃取柱主要用于除去样品中的部分甘油三酯和部分非极性干扰物^[16]。比较不同型号和规格的这两类固相萃取柱及两类萃取小柱的先后使用顺序,并改变洗脱溶剂的种类和使用量,采用在食用油中添加 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平的氯丙醇混合标准测定回收率的方式来确定最佳净化条件。结果表明:先采用 Sep-Pak Silica 硅胶型固相萃取柱净化,用 5 ml 乙酸乙酯-正己烷(20:80, V/V)洗脱,再采用 OASIS HLB 固相萃取柱,用 5 ml 甲醇-异丙醇(1:1, V/V)对小柱进行洗脱,可有效将样品的基质效应降到比较低的水平,又有较高的回收率(回收率均超过 80% 以上)。

2.4 色谱条件的优化

比较了几种液相色谱柱,发现使用多个品牌和规格的 C_{18} 柱均能得到比较好的分离和峰形,本试验采用 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μm),峰形尖锐对称。氯丙醇酯为脂溶性酯类物质,流动相考虑采用异丙醇为主的成分作为流动相,分别以甲醇-水-异丙醇、甲醇-乙酸铵-异丙醇、乙腈-水-异丙醇和甲醇-乙腈-水-异丙醇等作流动相,比较其色谱行为,最后选择流动相为乙腈-甲醇-水(2:2:1, V/V)和异丙醇为流动相,并采用梯度洗脱方式,为提高离子化效率和更好的峰形,在流动相中加入终浓度为 5 mmol/L 的乙酸铵。在此条件下,45 min 即可完成 18 种氯丙醇酯的分析,各氯丙醇酯分离效果好、干扰少、分析时间较短,峰形理想。

根据文献报道^[12-17],食用油中 2-MCPD 酯的污染也较普遍,污染水平略低于 3-MCPD 酯,对于具有相同脂肪酸组成的 3-MCPD 酯和 2-MCPD 酯来说,它们互为同分异构体,采用液质联用仪进行测定时,母离子和子离子相同,如果不能分开,将对测定结果有一定的影响。在 3-氯丙醇酯混合溶液中加入 3 种 2-氯丙醇酯标准(2-MPCD-P、2-MPCD-PP 和 2-MPCD-SS),通过比较不同的色谱柱和调整流动相,发现采用 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μm)才能使 3-氯丙醇酯和其相应的 2-氯丙醇酯同分异构体达到基线分离,由于获得的 2-氯丙醇酯的标准种类有限,根据文献报道^[16-17],一般情况下,如果 2-MPCD-PP 和 2-MPCD-SS 能与其对应的同分异构体 3-MPCD-PP 和 3-MPCD-SS 达到基线分离的话,也可以认为其他 2-MCPD 酯也基本能与相应的 3-MCPD 酯同分异构体达到基线分离。同时由于相同浓度的 2-MCPD 酯在液质联用仪上质谱信号要明显低于相应的 3-MCPD 酯的信号,因此即使实际样品中可能存在某种 2-MCPD 酯与对应的 3-MCPD 酯达不到基线分离造成干扰,也对测定结果不会产生干扰。

2.5 标准曲线线性范围和检出限

在上述分析条件下,以 18 种 3-氯丙醇酯标准峰面积与相应内标峰面积之比为纵坐标,以标准系列中氯丙醇酯的浓度为横坐标,计算标准工作曲线的线性回归方程,18 种 3-氯丙醇酯的相关系数(r)在 0.999 1 ~ 0.999 8 之间,见表 3。以三倍信噪比在标准曲线查得结果作为检出限(LOD),结合取样量分别计算食用动植物油的检出限,结果一并见表 3。

2.6 方法的精密度和回收率

由于含油脂食品测定采用的为提取脂肪后进

表 3 18 种 3-氯丙醇酯的标准曲线、线性范围及检出限

Table 3 Linear regression equations, correlation coefficient and limits of quantitation for 3-MCPD esters

化合物	内标	标准曲线	线性范围 /(μg/L)	r	检出限 /(μg/kg)
3-氯-1,2-丙二醇油酸单酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯	y = 0.0118x + 0.0666	1.0 ~ 200	0.999 3	30.1
3-氯-1,2-丙二醇亚油酸单酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯	y = 0.0224x + 0.0157	1.0 ~ 200	0.999 2	27.7
3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸单酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯	y = 0.0102x + 0.0772	1.0 ~ 200	0.999 8	18.3
3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸单酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯	y = 0.00983x + 0.0029	1.0 ~ 200	0.999 6	18.3
3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸单酯	y = 0.0116x + 0.0894	1.0 ~ 200	0.998 9	15.3
3-氯-1,2-丙二醇油酸二酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯	y = 0.0184x + 0.0105	1.0 ~ 200	0.999 7	1.90
3-氯-1,2-丙二醇亚油酸二酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸二酯	y = 0.00945x + 0.00565	1.0 ~ 200	0.999 5	1.50
3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸二酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇硬脂酸二酯	y = 0.015x + 0.0757	1.0 ~ 200	0.999 5	1.80
3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇棕榈酸二酯	y = 0.0162x + 0.00963	1.0 ~ 200	0.999 2	2.40
3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸二酯	d ₅ -3-氯-1,2-丙二醇亚麻酸二酯	y = 0.00699x + 0.00404	1.0 ~ 200	0.999 8	1.75
3-氯丙醇-1-油酸-2-棕榈酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇—1-油酸-2-亚麻酸二酯	y = 0.0141x + 0.0197	1.0 ~ 200	0.999 9	3.41
3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-亚油酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-亚油酸二酯	y = 0.0134x + 0.00279	1.0 ~ 200	0.999 9	1.17
3-氯丙醇-1-油酸-2-亚油酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚油酸二酯	y = 0.00952x + 0.00529	1.0 ~ 200	0.999 8	2.67
3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-硬脂酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-亚油酸-2-硬脂酸二酯	y = 0.0159x + 0.0118	1.0 ~ 200	0.999 1	3.34
3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯	y = 0.0166x + 0.0143	1.0 ~ 200	0.999 9	4.72
3-氯丙醇-1-亚油酸-2-硬脂酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-硬脂酸二酯	y = 0.00899x + 0.00908	1.0 ~ 200	0.999 7	2.35
3-氯丙醇-1-亚麻酸-2-棕榈酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚麻酸二酯	y = 0.00964x + 0.00878	1.0 ~ 200	0.999 2	3.32
3-氯丙醇—1-油酸-2-亚麻酸二酯	d ₅ -3-氯丙醇-1-油酸-2-亚麻酸二酯	y = 0.0175x + 0.00934	1.0 ~ 200	0.999 6	4.10

行测定,样品基质和食用油基本一致,因此本研究仅采用食用油进行方法学验证试验。取同一份花生油样品,称取 23 份,每份约 0.100 0 g。其中两份作为样品本底,其余 21 份分成三组(每组 7 份),分别加入各种氯丙醇酯含量为 10、100、100 0 ng 的低、中、高 3 个水平混合标准,加入 100 μl 浓度为 10 μg/ml 混合内标使用液,按样品处理方法处理后进样测定,计算方法的精密度和回收率。得出实际样品加入 3 种水平氯丙醇酯重复测定的相对标准偏差在 2.6% ~ 8.1% 之间,各氯丙醇酯的平均加标回收率在 80.2% ~ 98.5% 之间,相对标准偏差均小于 8.1%。本研究方法能满足各种食品样品中 3-氯丙醇酯残留分析要求。

2.7 实际样品检测

用建立的方法分析了采自于深圳市各大超市的 50 份食用油和 12 份含油脂食品,在 46 份食用油样品中检测出多种氯丙醇酯,检出率达 92%,研究对象中几种单酯和 3-MCPD-LL、3-MCPD-PP、3-MCPD-OO、3-MCPD-SS、3-MCPD-LP、3-MCPD-OP、3-MCPD-LO、3-MCPD-SP、3-MCPD-OS、3-MCPD-LS、3-MCPD-LnP、3-MCPD-LnO 等重要双酯均有检出;其中以 3-MCPD-PP 和 3-MCPD-OO、3-MCPD-LL、3-MCPD-PL 和 3-MCPD-OL 五种氯丙醇酯检出率最高,所有检出氯丙醇酯的阳性样品均检出 3-MCPD-PP,各氯丙醇酯含量分别在 7.55 ~ 5 360 μg/kg 之间,在 9 份含油脂食品中检出多种氯丙醇酯,检出率为 75.0%,含量(以脂肪量计)分别在 6.62 ~ 1 569.8 μg/kg 之间,提示食用油和含油脂食品中氯丙醇酯污染严重,应引起有关食品监管部门的重

视,并加强监管。

3 小结

本次建立的食用油中 5 种单酯、13 种双酯共 18 种 3-氯丙醇酯的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱联用法(SPE-UPLC-MS/MS)同时测定确证分析方法,食用动植物油样品中氯丙醇酯经叔丁基甲醚-乙酸乙酯(8:2, V/V)超声提取,再依次用 Sep-Pak Silica 硅胶萃取小柱和 OASIS HLB 固相萃取小柱净化,流出液在 50 ℃水浴下氮气吹干,残渣用流动相溶解,用超高效液相色谱-串联质谱联用仪测定,采用内标法定量。对方法的线性范围、检出限、精密度和准确度等技术参数进行评价。用此法检测了市售 50 份食用油和 12 份含油脂食品中 3-氯丙醇酯的含量,检出率高达 88.7% (55/62),提示在我国市售食用油和含油脂食品中氯丙醇酯污染严重,应引起有关食品监管部门的重视。

参考文献

[1] Svejkovska B, Novotny O, Divinova V, et al. Esters of 3-chloropropane-1,2-diol in foodstuffs[J]. Czech J Food Sci,2004, 22(5):190-196.

[2] Seefelder W, Varga N, Studer A, et al. Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD[J]. Food Additives & Contaminants; Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessmen, 2008,25(4):391-400.

[3] Hamlet C G, Sadd P A, Crest C, et al. Occurrence of 3-chloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review[J]. Food Additives and Contaminants, 2002, 19(7): 619-631.

[4] Hamlet C G, Asuncion L, Velišek J, et al. Formation and occurrence of esters of 3-chloropropane-1, 2-diol (3-CPD) in foods: what we know and what we assume[J]. Eu J Lipid Sci Technol, 2011, 113(3) :279-303.

[5] Zelinkova Z, Dolegal M, Velisek J. Occurrence of 3-chloro-propane-1,2-diol fatty acid esters in infant and baby foods[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(4) :571-578.

[6] Weisshaar R. Fatty acid esters of 3-MCPD: overview of occurrence and exposure estimates[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113(3) :304-308.

[7] WeiBhaar R, Perz R. Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010, 112(2) :158-165.

[8] Weisshaar R. Determination of total 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils by GC-MS after ester cleavage with sodium methoxide[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008, 110(2) :183-186.

[9] Karasek L, Wenzl T, Ulberth F. Determination of 3-MCPD esters in edible oil-methods of analysis and comparability of results[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113(12) :1433-1442.

[10] 王力清, 陈洪涛, 廖继承, 等. 同位素稀释 GC-MS/MS 方法测定油脂中 3-MCPD 脂肪酸酯和缩水甘油脂肪酸酯的总量[J]. 农业机械, 2011, 53(8) :61-63.

[11] Razak R A A, Kuntoma A, Siew W L, et al. Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils[J]. Food Control, 2012, 25(2) :355-360.

[12] LIU Q, HAN F, XIE K, et al. Simultaneous determination of total fatty acid esters of chloropropanols in edible oils by gas chromatography-mass spectrometry with solid-supported liquid-liquid extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1314(9) :208-215.

[13] 傅武胜, 吴少明, 华娟, 等. 油脂类食品中脂肪酸单氯丙醇单酯和双酯的分离测定[J]. 分析化学, 2014, 42(4) :469-474.

[14] Haines T D, Adlaf K J, Rabert M, et al. Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOFMS[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011, 88(1) :1-14.

[15] Moravcova E, Vaclavik L, Lacina O, et al. Novel approaches to analysis of 3-chloropropane-1, 2-diol esters in vegetable oils[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 402(9) :2871-2883.

[16] Yamazaki K, Ogiso M, Isagawa S. A new, direct analytical method using LC-MS/MS for fatty acid esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD esters) in edible oils[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, 30(1) :52-68.

[17] Dubois M, Tarres A, Uchikata T, et al. Comparison of indirect and direct quantification of esters of monochloropropanediol in vegetable oil[J]. J Chromatogr A, 2012, 1236(3) :189-201.

[18] LI H L, CHEN D W, MIAO H, et al. Direct determination of fatty acid esters of 3-chloro-1, 2-propanediol in edible vegetable oils by isotope dilution-ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1410(7) :99-109.

实验技术与方法

气相色谱-质谱法测定食用植物油中氯丙醇酯的含量方法验证研究

龚蕊¹, 苗虹², 金绍明³, 江小明¹, 侯靖¹, 杨永¹, 卢跃鹏¹

(1. 武汉食品化妆品检验所, 湖北 武汉 430012; 2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要:目的 建立一种同时测定食用植物油中 3-氯-1, 2-丙二醇脂肪酸酯(3-MCPD 酯)、2-氯-1, 3-丙二醇脂肪酸酯(2-MCPD 酯)、1, 3-二氯-2-丙醇脂肪酸酯(1, 3-DCP 酯)和 2, 3-二氯-1-丙醇脂肪酸酯(2, 3-DCP 酯)含量的气相色谱-质谱(GC-MS)方法。方法 植物油样品经叔丁基甲基醚-乙酸乙酯溶液(8:2, V/V)溶解, 在甲醇钠-甲醇溶液中发生酯键断裂反应, 用冰乙酸中和正己烷去脂, 经硅藻土小柱净化, 七氟丁酰基咪唑(HFBI)衍生, 以 GC-MS 法测定, 采用同位素内标进行定量。结果 经 5 家检验机构验证, 4 种氯丙醇酯(以对应的氯丙醇计)在 0.02~0.4 mg/L 范围内线性良好, 相关系数 r^2 均大于 0.999, 在 0.2~2.0 mg/kg 水平的加标回收率在 78.5%~109.8% 之间, RSD 为 2.2%~18.8%, 检出限均为 0.1 mg/kg。结论 2014 年英国 FAPAS 分析实验室能力验证和 5 家机构协同验证的结果证实, 该方法线性良好, 准确度、精密度高, 检测成本较低, 适用于食用植物油中氯丙醇酯的检测。

关键词:氯丙醇酯; 气相色谱-质谱法; 食用植物油; 测定; 方法; 验证

中图分类号:R155.5; TQ645.1; O623.42⁺6.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2016)03-0333-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.012

收稿日期:2015-08-21

作者简介:龚蕊 女 工程师 研究方向为食品检测 E-mail:948548733@qq.com

通信作者:江小明 女 教授级高级工程师 研究方向为食品安全 E-mail:jxm_01@163.com