

实验技术与方法

全自动样品处理平台在食用油脂中氯丙醇酯和缩水甘油酯测定的应用研究

蓝丽华^{1,2}, 林丽珊^{2,3}, 傅武胜^{1,2,3,4}, 陈丹^{2,4}, 叶洪⁵, 桂荣娟^{2,3}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350001; 3. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350000; 4. 福建医科大学公共卫生学院, 福建 福州 350108; 5. 福州国际旅行卫生保健中心, 福建 福州 350003)

摘要:目的 建立一种在线全自动快速测定食用油脂中氯丙醇酯(MCPDE)和缩水甘油酯(GE)含量的分析方法,并考察植物油种类、温度等因素对GE转化为3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)的影响。方法 参考AOCS Cd 29c-13基本原理,将样品置于全自动样品前处理平台进行水解、氯代、液-液萃取和衍生,采用毛细管柱(DB-5MS柱)分离,多反应监测模式(MRM)采集,内标法定量。结果 5种植物油中GE的转化率差异不明显,但温度的影响略大,当10℃下水解7 min时,MCPDE和GE水解基本完成。3-氯-1,2-丙二醇酯(3-MCPDE)、2-氯-1,3-丙二醇二酯(2-MCPDE)和GE的检出限均为5 μg/kg(以醇计),在0~0.4 μg/mL范围内浓度与峰面积比值呈良好的线性关系(决定系数 $R^2 \geq 0.999$);在20~2 500 μg/kg范围内加标,MCPDE和GE的回收率范围为90.3%~109.7%,相对标准偏差($n=6$)为1.3%~7.7%,精密性上全自动方法优于手工前处理操作。与食品安全国家标准方法(送审稿)进行对比,方法间结果具有可比性,将该方法用于FAPAS考核样的测定,结果满足要求。结论 全自动法操作简便,灵敏度较高,大大降低了人工操作的劳动强度,提高了检测效率和结果的重复性,较好满足了食用油脂中MCPDE和GE的定量测定。

关键词:氯丙醇酯; 缩水甘油酯; 苯基硼酸; 全自动样品处理平台; 气相色谱-质谱

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2022)03-0531-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.03.021

Application of fully automated sample processing platform for the determination of chloropropanol esters and glycidyl esters in edible fats and oils

LAN Lihua^{1,2}, LIN Lishan^{2,3}, FU Wusheng^{1,2,3,4}, CHEN Dan^{2,4}, YE Hong⁵, GUI Rongjuan^{2,3}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Fuzhou 350122, China; 2. Fujian Key Laboratory of Zoonoses, Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China; 3. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian Fuzhou 350000, China; 4. School of Public Health, Fujian Medical University, Fujian Fuzhou 350108, China; 5. Fuzhou International Travel Healthcare Center, Fujian Fuzhou 350003, China)

Abstract: Objective An online fully automated alkaline hydrolysis method for the determination of chloropropanol esters (MCPDE) and glycidyl esters (GE) in edible oils and fats was developed, and the effects of vegetable oil type and temperature on the conversion of GE to 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) were investigated. **Methods** Based on the basic principles of AOCS Cd 29c-13, the samples were subjected to hydrolysis, chlorination, liquid-liquid extraction and derivatization on a fully automated sample pretreatment platform, and then separated by a DB-5MS column after injection. The data was determined by multiple reaction monitoring mode (MRM) coupled with the internal standard method. **Results** The efficiency of GE conversion to 3-MCPDE in the five vegetable oils was significant different. However, the effect of temperature was relatively greater. The alkali hydrolysis time was optimized, and the hydrolysis of MCPDE and

收稿日期: 2021-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(81172671); 福建省科技创新平台建设项目(2019Y2001); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2013-ZQN-ZD-9); 福建省杰出青年基金(2011J06011)

作者简介: 蓝丽华 女 在读研究生 研究方向为药物分析 E-mail: 951815806@qq.com

通信作者: 傅武胜 男 主任技师 研究方向为食品化学污染物的检测技术和风险评估 E-mail: fwsfqm@126.com

GE was basically completed when the hydrolysis was carried out for 7 min at 10°C. The limits of detection for 2-chloro-1,3-propanediol (2-MCPDE), 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPDE) and GE were all 5 µg/kg calculated by their free forms. There was a good linear relationship between the concentration and ratio of the response ranged from 0 to 0.4 µg/mL. When spiked from 20 to 2 500 µg/kg, the recoveries of MCPDE and GE ranged from 90.3% to 109.7% with the relative standard deviation ($n=6$) of 1.3%-7.7%, indicating that the precision was better than that of the manual procedure. The method was comparable with the Chinese national standard method for food safety under reviewed and was successfully applied to the determination of FAPAS proficiency test samples. **Conclusion** The novel automatic procedure has the advantages of simple operation and high sensitivity, which reduces the labor intensity, improves the detection efficiency and repeatability compared with the reported manual procedure, and can better meet the requirement for quantification of MCPDE and GE in edible oils and fats.

Key words: Chloropropanol esters; glycidyl esters; phenylboronic acid; fully automated sample pretreatment; gas chromatography-tandem mass spectrometer

氯丙醇酯(Chloropropanol esters, MCPDE)与缩水甘油酯(Glycidyl esters, GE)是国内外广泛关注的一类食品加工污染物^[1-2]。大量调查结果显示,精炼食用油以及各类油脂性食品普遍存在 MCPDE、GE 的污染^[3-4]。缩水甘油(Glycidyl, Gly)、3-氯-1,2-丙二醇(3-Chloro-1, 2-propanediol, 3-MCPD)分别为 2A、2B 类致癌物^[5], 3-MCPD 及 MCPDE 具有肾脏毒性。2008 年以来,国际上多家机构对 MCPDE 与 GE 进行了风险评估^[6-7], 欧盟食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)以及 WHO/FAO 食品添加剂和污染物联合委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO/WHO/JECFA)对 3-MCPD 及其酯类制定了健康指导值(Tolerable daily intake, TDI),分别为 2.0、4.0 µg/kg·bw/d^[8,9];以基准剂量下限值(Benchmark dose lower limitation, BMDL₁₀)为 2.4 mg/kg·bw/d 评估,婴幼儿人群 GE 的暴露限值(Margin of exposure, MOE)为 490,存在致癌风险^[9]。因此,欧盟(European Union, EU)规定了食用油脂、婴幼儿配方食品和特殊膳食中 GE、3-MCPDE 的限量值^[10]。

食品中氯丙醇酯和 GE 种类多,测定难度较大,可分为直接法^[11]和间接法,美国油脂化学家协会(American Oil Chemists' Society, AOCS)推出的 AOCS Cd 28-10 为直接法,用于 5 种 GE 原型物的测定^[12]。国内外普遍使用间接法测定总含量,根据酯的水解方式可分为碱水解^[13-14]、酸水解^[15-16]和酶水解^[17],均有 AOCS 方法或国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)发布的标准方法。AOCS Cd 29b-13 法^[18]采用低温(-22 °C)水解,以最大程度克服碱性条件下 3-MCPD 转化为缩水甘油时对结果的不利影响,但水解长达 16 h。ISO18363-1:2015(AOCS Cd 29c-13)^[19]采用常温水解,并以差减法(3-MCPD 增加量)计算 GE 含量,水解快速,且仅需要 4 种标准品(MCPDE 及其同位

素)是目前使用较多的方法之一^[20-22]。本文基于该法基本原理,利用全自动样品处理平台结合气相色谱-三重四极质谱仪(Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometer, GC-MS/MS),实现了食用油脂中 MCPDE、GE 的快速、自动化测定,并减轻了衍生后苯基硼酸对色谱系统和离子源的污染;对方法的方法学指标进行了系统验证,并进行方法间对比。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

毛油(花生油、茶籽油、菜籽油、茶油、橄榄油)由相关企业提供,市售精炼茶油为 2020 年福建省食品安全风险监测样品,猪油由铁锅熬制所得。FAPAS 2658、2667 能力验证植物油来自英国食品与环境研究院(The Food and Environment Research Agency, FERA)。

1.1.2 主要仪器与试剂

气相色谱-串联质谱仪(7890A\7000B, 美国 Agilent 公司):配柱中反吹装置,并搭载全自动样品处理平台(Chronos, 德国 AS 公司),平台的基本配置包括涡旋混合器、加热振荡器、温度控制盒、液-液萃取装置、洗针装置、进样装置、溶剂瓶、内标瓶和样品瓶等;热电偶温度传感器(925 型, 德国 Testo 公司, -50~1 000 °C, 精度为 ±0.5 °C), 电子天平(CP225D, 感量为 0.01 mg, 德国 Sartorius 公司), 旋涡混合器(G-560E, 美国 Scientific Industries 公司), 冷却水循环装置(温度精度为 ±1.0 °C)。

缩水甘油棕榈酸酯、3-氯-1,2-丙二醇二棕榈酸酯、2-氯-1,3-丙二醇二硬脂酸酯、D₅-3-氯-1,2-丙二醇二棕榈酸酯和 D₅-2-氯-1,3-丙二醇二硬脂酸酯等标准品(纯度均为 98% 以上,加拿大 TRC 公司),氯丙醇酯混合标准液由 3-MCPDE、2-MCPDE 组成

(2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 混合内标由 D_5 -3-MCPDE、 D_5 -2-MCPDE 组成(1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$), GE(2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 以上溶液的介质均为甲苯, 浓度以醇计; 甲苯、甲醇、正己烷、叔丁基甲醚、乙酸乙酯均为色谱纯(美国 Merck 公司), 氢氧化钠、硫酸、溴化钠、氯化钠、无水硫酸钠、无水碳酸钠(分析纯, 国药集团上海分公司); 苯基硼酸(纯度为 97%, 分析纯, 上海迈瑞尔化学技术公司), 在无水乙醚中过饱和后使用。

1.2 MCPDE 和 GE 含量的测定

1.2.1 标准曲线制备及换算系数确定

前处理步骤参考 AOCS Cd 29c-13^[19], 其中碱水解温度由室温改为 10 $^{\circ}\text{C}$, 水解时间增加至 7 min, 其他操作类似或微调。将 2 mL 进样瓶预先摆放于自动平台上, 后续操作由全自动样品处理平台进行操作, 于 A 管中分别加入 10、50、100、150、200 μL GE 标准液, 于 B 管中分别加入 10、50、100、150、200 μL 氯丙醇酯混合标准液, 均自动加入 100 μL 混合内标、75 μL 甲苯和 100 μL 甲基叔丁基醚, 然后加入 200 μL 氢氧化钠-甲醇(0.35 mol/L), 自动水解 7 min 后, 立即于 A 管、B 管中分别加入 600 μL 酸化 NaCl(200 g/L)、NaBr(600 g/L)溶液停止水解, 以 600 μL 正己烷萃取脂肪酸甲酯(Fattyacid methyl ester, FAME)1~2 次, 弃去上层溶液; 以 0.5 mL 乙醚/乙酸乙酯(V/V, 3:2)液-液萃取氯丙醇 1~2 次; 加入 30 μL 苯基硼酸(PBA)衍生, 用 30 μL 乙二醇/乙酸乙酯(0.1%)去除过量衍生剂后, 溶液转移至含 0.2 g 无水 Na_2SO_4 的进样瓶中, 脱水后 GC-MS/MS 分析。

氯丙醇酯标准曲线(B 管): 以 MCPDE 的质量(以醇计)为横坐标, MCPDE 与其对应内标的峰面积比为纵坐标, 得到 3-MCPDE、2-MCPDE 标准曲线。

GE 标准曲线以及换算系数(Transformation factor, TF)的确定(A 管): 计算其中 3-MCPD 与内标 D_5 -3-MCPD 的峰面积比值, 再通过 3-MCPDE 标准曲线计算得到 GE 转化而得 3-MCPD 的质量; 以 GE 的质量为 X 轴, 以 3-MCPD 的质量为 Y 轴, 绘制 GE 标准曲线。斜率(m)的倒数(1/m)即为 GE 计算时的 TF, 以 3-MCPD 增加量(A、B 管的差值)乘以 TF 得到 GE 的含量。

1.2.2 食用油样品中 MCPDE 和 GE 测定方法

准确称取同一食用油 2 份于 2 mL 样品瓶(A、B 两管)中, 每份 0.100 g(精确至 1 mg), 编辑好序列列表, 由全自动样品处理平台按照 1.2.1 步骤自动操作。

1.2.3 仪器参数

1.2.3.1 气相参数

色谱柱(2 根): DB-5 MS(15 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), 两根相连, 中间接反吹口, 8.7 min 反吹开始, 8.87 min 反吹结束; 进样方式: 不分流进样, 进样体积为 1.0 μL ; 进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 载气为高纯氦气(纯度为 99.999%), 恒流, 色谱柱 1、2 的流速分别为 1.5、1.6 mL/min; 程序升温条件: 70 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 2 min, 然后以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 再以 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min。

1.2.3.2 质谱参数

电离方式: 电子轰击电离源(EI); 电离能量: 70 eV; 监测方式: MRM 模式; 离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 溶剂延迟 3.75 min。

表 1 氯丙醇及其内标 PBA 衍生物的多级监测离子
Table 1 The multi-reaction monitoring ions of chloropropanols and their internal standards of PBA derivatives

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
3-MCPD	196	147*	8
	198	147	8
2-MCPD	196	104*	14
	198	104	14
D_5 -3-MCPD	201	150*	8
	201	93	8
D_5 -2-MCPD	201	107*	14
	203	107	14

注: 带*号为定量离子对

1.3 统计学分析

用 Excel 2019 进行数据统计, 通过 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。3-MCPDE、2-MCPDE 含量由 B 管标准曲线方程计算, GE 含量由 A、B 两管中 3-MCPDE 含量的差值(增加量), 乘以 TF 得到。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仪器方法的建立与优化

AOCS Cd 29c-13 采用 SIM 采集模式, GOH 等^[23]分析对比了 SIM 和 MRM 的差异, SIM 模式定量时灵敏度较低, 3-MCPDE、2-MCPDE 的 LOD 分别为 100、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, MRM 模式的灵敏度可分别提高 6、10 倍。因此, 为更好地满足痕量分析需求, 本文采用 MRM 采集模式。MCPDE 及其同位素内标水解后经 PBA 衍生, 3-MCPD、2-MCPD 的衍生物分别为 4-(氯甲基)-2-苯基-1,3,2-二氧硼烷、5-氯-2-苯基-1,3,2-二氧硼烷, 分子式均为 $\text{C}_6\text{H}_6\text{BO}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ^{35}Cl , 通过全扫描确认衍生物的特征离子, 分子离子峰分别为 m/z 198、196; 采用子离子扫描方式对子

离子的碰撞能量进行优化,3-MCPD 的分子离子 m/z 196 失去 $-\text{CH}_2^{35}\text{Cl}$ (m/z 49) 后形成 m/z 147, 2-MCPD 的分子离子 m/z 196 失去 $-\text{OCH}_2(\text{CH}^{35}\text{Cl})\text{CH}_2$ 后形成 m/z 104。D₅-3-MCPD、D₅-2-MCPD 衍生物的裂解方式与待测物类似,质谱参数见表 1。3-MCPD 衍生物的特征离子对 m/z 196→147 和 2-MCPD 衍生物的离子对 m/z 196→104 丰度高、响应较强、干扰少,因此确定作为定量离子对,加标(100 ng)花生油基质的 MRM 色谱图见图 1。

2.2 GE 定量的换算系数

2.2.1 植物油品种对 GE 的转化率和 TF 值的影响

Gly 和 3-MCPD 的相对分子质量分别为 74、110,当 GE 完全转化为 3-MCPD 时,可得到由 3-MCPD 增加量换算为 GE 含量的 TF 为 0.672。实际水解过程中,GE 也会少量转化为 2-MCPD,因此 GE 对 3-MCPD 的转化率通常低于 100%,使得 TF

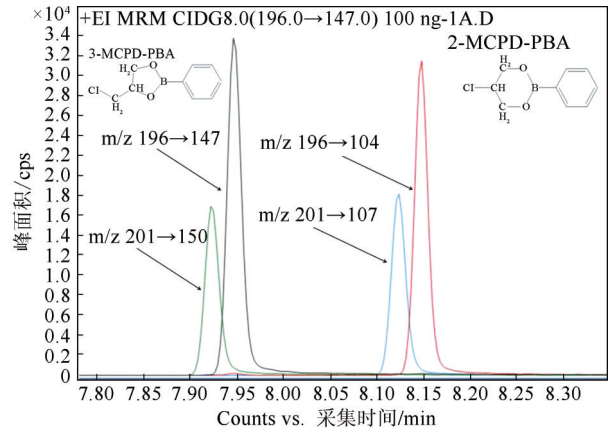


图1 加标花生油中氯丙醇(100 ng)衍生物的MRM色谱图
Figure 1 MRM Chromatogram of chloropropanol (100 ng) derivatives in spiked peanut oil

值也大于 0.672^[14]。考察了不同种类毛油以及空白试剂加标后 GE 转化为 3-MCPD、2-MCPD 的效率,并比较 TF 的大小,结果见表 2。

表2 植物毛油基质及空白试剂中 GE 转化为 3-MCPD 的线性方程及 TF 值

Table 2 Linear equation and TF of 3-MCPD used for quantification of GE in selected vegetable oil and blank solution spiked with GE

样品	线性方程	斜率/m	TF 值	转化率		总转化率
				(GE→3-MCPDE)/%	(GE→2-MCPDE)/%	
茶油	$y=1.1865x-17.094$	1.187	0.843	79.7	8.92	88.6
花生油	$y=1.1867x-15.493$	1.187	0.843	79.7	9.05	88.8
橄榄油	$y=1.1843x-15.598$	1.184	0.844	79.6	9.09	88.7
菜籽油	$y=1.1934x-7.5298$	1.193	0.838	80.2	9.16	89.4
茶籽油	$y=1.1815x-14.086$	1.182	0.846	79.4	8.86	88.3
空白试剂	$y=1.1801x+0.9715$	1.180	0.847	77.7	9.90	92.0

5 种植物油 GE 加标后测定,TF 值在 0.838 ~ 0.846 之间,GE 对 3-MCPD 的转化率为 79.4% ~ 80.2%,GE 对 2-MCPDE 的转化率为 8.86% ~ 9.16%,用 2-MCPD 增加量换算得到 GE 的含量时,TF 为 7.32 ~ 7.59。由表 2 可知,说明 GE 转化为 3-MCPD 的产率远高于转化为 2-MCPD 的产率,是后者的 8 ~ 9 倍,因此国际上均用 3-MCPD 增加量来定量 GE^[24-25]。早期欧盟、我国曾采用固定的换算系数来计算 GE 的含量^[14,26],如国家食品安全风险监测手册(2017 版)采用换算系数 0.856,但这可能会带来 GE 含量的偏差;为了更准确定量,本文在与样品制备相同的条件下,单独制作 GE 标准曲线,以此计算得到 TF 值。本研究表明,以任何一种植物油或空白试剂为基质制备标准曲线时,得到的 TF 值较为一致[相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)仅为 1.54%],这说明日常检测中无需为不同品种食用油脂制作各自的标准曲线以得到 TF。

2.2.2 反应温度对 GE 定量的影响

为考察水解温度对 TF 值的影响,对比了 4 种温度下水解时 TF 值的大小,结果见图 2。由图 2 可得,水解温度由 10 °C 升高至 28 °C,转化率由 82.0%

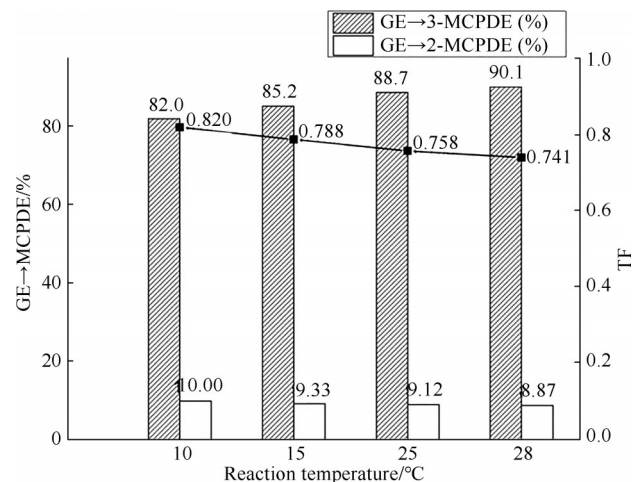


图2 4种温度下水解GE转化为3-MCPD的效率对比
Figure 2 Comparison of the conversion rate of GE to 3-MCPD at four temperatures

提高至 90.1%,对应的 TF 也由 0.820 降至 0.741。在 10 °C 下,GE 转化为 3-MCPD 的转化率为 82.0%,低于其余温度下的转化率,说明温度对换算系数产生了一定的影响。

温度会影响 TF 值,并可能对 GE 定量结果产生影响,因此考察了市售精炼茶油在 3 种不同温度

(5、10、25 °C)下碱水解对结果的影响。样品于 5、10、25 °C 下水解测定,GE 含量分别为 3.27 ± 0.05 、 3.32 ± 0.03 、 3.43 ± 0.01 mg/kg,由此可知随水解温度的升高,GE 含量有轻微的升高。由于 TF 值会随温度的变化而波动,影响转化率,若制备标准曲线与样品制备时温度不一致,则对 GE 的定量结果产生一定的影响。故实际操作时应确保标准曲线制作与样品测定时水解时温度一致。ZWAGERMAN^[25]提出在氢氧化钠/甲醇条件下,部分 3-MCPD 的烷氧负离子攻击邻位碳上的 Cl,发分子内 SN_2 反应(即 Williamson 反应),形成 Gly,从而导致 GE 含量的偏高,因此应当控制碱水解的温度,尽量减少 3-MCPD 转化为 Gly。

2.2.3 碱水解时间的优化

AOCS Cd 29b-13 法中采用低温来自抑制 3-MCPD 转化为 Gly,在 -22 °C 下水解需要持续 16 h,低温时需要明显延长碱水解的时间。ISO 18363-4:2021^[27]中提出低温(10 °C)快速碱水解的方式,将时间缩短到 12 min。故本实验为减少水解中 3-MCPD 转化为 Gly 的发生,综合考虑后采用与 ISO 18363-4:2021 同样的碱水解温度(10 °C),并在此基础上对碱水解时间进行优化。A 管水解后加入 NaCl 溶液中和后,GE 的水解产物缩水甘油即转化为 3-MCPD,B 管中加入 NaBr 溶液后,由于体系中无氯离子,因此避免了缩水甘油转化为 3-MCPD 的发生。为了探究 GE 在碱水解过程中的变化,本实验通过花生油空白基质(毛油)中加标(5.0 mg/kg),测定 B 管中各目标物的响应($n=3$),探究水解时间对目标物水解程度的影响。

如图 3 所示,在 10 °C 下,水解 2.5 min 后 3-MCPD 与 2-MCPD 的响应基本达到峰值。随后 3-MCPD 响应进入短暂的平台期(5~8 min),随着水解时间的继续增加,少量 3-MCPD 转化为 Gly,3-MCPD 响应逐渐

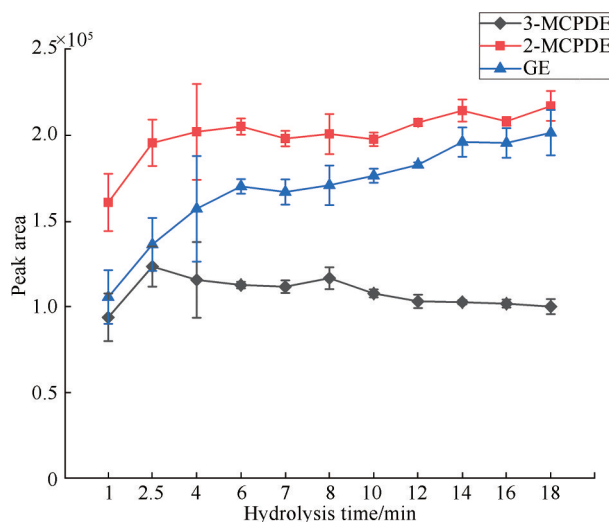


图3 加标花生油中碱水解时间对 MCPDE 及 GE 响应的影响
Figure 3 Effect of alkali hydrolysis time on the response of the derivatives of MCPDE and GE

下降。GE 随着水解时间的增加响应也增加,在 5~8 min 时响应进入短暂的平台期,随后由于 3-MCPD 的转化,导致 3-MCPD 响应随着水解时间而增加。GE 的测定含量范围在 4.89~5.25 mg/kg,RSD 范围为 0.63%~5.62%,并进行多样本秩和检验, $P=0.148$,不同水解时间下 GE 测定结果基本一致,不存在统计学上显著性差异。为了最大程度减少 3-MCPD 转化为 Gly,确定合适的水解时间为 7 min。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围、检出限和定量限结果

在优化好的试验条件下,考察其线性范围为 0~4 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$;以花生毛油为基质,采用样品加标方式考察检出限、定量限,样品经全自动样品前处理平台前处理后 GC-MS/MS 测定,按照信噪比(S/N)分别为 3、10,确定检出限(Limit of detection, LOD)和定量限(Limit of quantification, LOQ)。根据 3-MCPD 增加量计算 GE 的 LOD,结果见表 3。

表 3 空白试剂下 MCPDE 和 GE 的线性方程及决定系数

Table 3 Linear equation and correlation coefficient of MCPDE and GE in blank reagents

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	质量浓度范围/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	线性方程	决定系数 R^2	检出限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	定量限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
3-MCPDE	0~4 000	0~0.4	$y=0.0041x+0.0139$	0.9991	5	15
2-MCPDE	0~4 000	0~0.4	$y=0.0124x+0.0488$	0.9991	5	15
GE	0~4 000	0~0.4	$y=1.2201x+0.9715$	0.9992	5	15

2.3.2 方法间结果的对比

2.3.2.1 全自动法与手动法之间的对比

称取花生油、猪油样品,按照 20、100、500、1 000、2 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度水平进行加标试验,在上述优化条件下进行试验,考察方法的正确度与精密度,分别以加标回收率和 RSD 表示,对比全自动法和手动法的效果,见表 4。

由表 4 可知,全自动样品处理平台测定时,3-MCPDE、2-MCPDE 及 GE 的回收率分别为 91.7%~109.7%、90.3%~108.4% 和 92.2%~107.7%,均满足 GB/T 27417—2017 中对加标回收率的要求。在同一加标浓度下,全自动化法测定时,3-MCPDE、2-MCPDE 及 GE 的 RSD 分别为 1.3%~7.8%、1.4%~5.9% 和 1.7%~7.7%;采用手动法测定时,3 种组分

表4 全自动法和手动前处理法之间氯丙醇酯和GE的加标回收率和RSD结果

Table 4 Recovery rates and RSDs of MCPDE and GE between fully automated and manual methods

目标物	浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	花生油						猪油					
		全自动法			手动法			全自动法			手动法		
		测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSD /%	测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSD /%	测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSD /%	测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSD /%
3-MCPDE	20	18.8	94.7	3.9	18.8	94.5	7.1	21.6	109.7	6.0	22.0	111.2	6.2
	100	90.8	94.5	3.8	92.4	94.1	12.9	96.2	94.8	7.8	87.5	90.6	3.7
	500	467	96.8	5.6	536	109.7	6.4	515	104.3	3.7	452	95.0	6.3
	1 000	895	91.7	1.3	1 080	108.7	3.0	961	97.3	4.3	942	99.1	5.0
	2 500	2 291	94.8	1.9	2 395	101.5	4.6	2 383	98.2	3.5	2 277	95.1	2.6
2-MCPDE	20	21.5	108.4	3.2	21.9	110.7	4.3	20.7	103.5	4.7	20.7	104.9	5.0
	100	87.0	90.3	5.9	106	108.1	7.1	102	99.8	2.7	94.2	97.5	4.8
	500	452	93.9	2.9	508	104.0	1.6	503	102.1	2.0	495	104.0	6.1
	1 000	908	93.1	1.4	1 018	102.4	1.4	959	97.1	3.9	959	100.8	3.8
	2 500	2 259	93.5	1.5	2 327	98.6	3.4	2 434	100.3	4.5	2 338	97.8	4.5
GE	20	21.4	107.7	6.2	21.0	106.6	9.0	20.1	101.0	7.7	20.8	103.7	8.6
	100	93.0	103.3	3.0	109	108.9	9.4	104	101.5	5.4	86.7	89.6	7.6
	500	474	96.9	4.7	445	90.9	8.9	502	99.2	4.0	464	97.6	6.9
	1 000	899	92.2	2.1	870	91.2	9.0	929	95.9	3.2	978	103.0	7.0
	2 500	2 387	95.0	1.7	2 245	92.3	6.8	2 308	95.8	3.6	2 565	107.3	5.7

的RSD分别为2.6%~12.9%、1.4%~7.1%和6.8%~9.4%，这表明全自动样品处理平台较手动法的精密度更优，可以减少由于操作带来的误差，减轻手动法检测的劳动强度。

进一步用FAPAS国际能力验证食用油样品进行比较，3个指标的结果均为满意($Z < 2.0$)，结果见

表5。对于同一组分，全自动样品处理平台与手动法所得氯丙醇酯和GE含量一致，进行 T 检验，3-MCPDE、2-MCPDE、GE的 P 值分别为0.398~0.903、0.129~0.229、0.100~0.336，表明两种操作方式之间对测定值不存在统计学差异($P > 0.05$)。

表5 全自动法与手动法测定FAPAS能力验证

Table 5 Comparison of fully automated and manual methods for the determination of FAPAS

项目号	组分	指定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	全自动法		手动法	
			测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Z值	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Z值
FAPAS 2658	3-MCPDE	310	246±1.52	-1.1	250±7.57	-1.0
	2-MCPDE	149	144±4.1	-0.2	121±16.6	-0.9
	GE	201	202±16.5	0.0	215±13.2	0.3
FAPAS 2667	3-MCPDE	479	402±14.8	-0.3	401±9.87	-0.3
	2-MCPDE	213	206±2.00	-0.2	191±17.8	-0.5
	GE	671	686±18.8	-0.1	711±9.07	0.4

2.3.2.2 全自动法与其他测定方法的对比
分别采用食品安全国家标准(送审稿)(第二

法,酸水解法)、ISO 18363-4:2021^[27]和本方法对3种浓度水平的茶油进行测定($n=3$),结果见表6。

表6 不同测定方法间茶油中MCPDE与GE含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)Table 6 The contents of MCPDE and GE in vegetable oil detected by different methods ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

样品	3-MCPDE			2-MCPDE			GE		
	酸水解法	ISO 18363-4	全自动法	酸水解法	ISO 18363-4	全自动法	酸水解法	ISO 18363-4	全自动法
茶油1	225±15.9	209±12.7	243±11.4	109±12.2	99±2.0	110±5.1	191±6.0	190±9.3	198±7.8
茶油2	1 618±129.1	1 540±46.2	1 710±66.3	769±27.4	774±5.2	814±14.6	1 012±10.5	975±60.6	1 216±93.4
茶油3	2 412±120.2	2 517±232.4	2 655±98.2	1 157±52.5	1 143±23.8	1 287±119.2	980±31.2	891±58.0	1 192±156.5

注:ISO 18363-4指ISO 18363-4-2021

由表6可得,3种方法测定3种茶油时,方法结果基本一致,并进行方法间两两比较,3-MCPDE、2-MCPDE、GE的 P 值范围分别为0.111~0.456、0.08~0.919、0.054~0.618,表明3种方法测得结果之间均不存在统计学差异($P > 0.05$),即3种方法具有等效性。

3 结论

本试验采用全自动样品前处理平台建立了测定食用油脂中MCPDE和GE的自动化方法,研究了植物油基质种类和水解温度对TF值及GE定量的影响,并进行了方法验证及实际样品比对测定。结果表明,不同品种植物油中TF值差异较小(RSD

为 1.54%),但 TF 受温度影响较大,温度越低,转化率越低,TF 越大,在日常检测时应根据实际 TF 值计算 GE 的含量。以 3-MCPDE 的增加量来计算 GE 含量时可获得更高的灵敏度,2-MCPDE 增加量不适用于 GE 的定量。考察了碱水解方法中影响 TF 值的因素,提高了 GE 测定的准确度,为实际应用提供了理论依据;本方法操作简单,灵敏度、准确度和精确度均满足方法指标要求,减轻了检测人员的工作量,为食用油脂中 MCPDE 和 GE 的检测监测提供了科学的技术支撑。

参考文献

- [1] 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.
FU W S, WU S M, HUA J, et al. Separation and determination of fatty acid mono- and diesters of monochloropropane-1, 2-diol in fat-rich foods[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(4): 469-474.
- [2] OEY S B, VAN DER FELS-KLERX H J, FOGLIANO V, et al. Mitigation strategies for the reduction of 2- and 3-MCPD esters and glycidyl esters in the vegetable oil processing industry[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(2): 349-361.
- [3] 刘卿,周萍萍,杨大进. 2015—2017年中国市售食用植物油中氯丙醇酯和缩水甘油酯的污染状况[J]. 卫生研究, 2021, 50(1): 75-78.
LIU Q, ZHOU P P, YANG D J. Chloropropanol and glycidyl esters content in edible vegetable oils in China in 2015-2017[J]. Journal of Hygiene Research, 2021, 50(1): 75-78.
- [4] 黄彬红. 婴配奶粉中氯丙醇酯和缩水甘油酯污染暴露情况调查分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(7): 2656-2661.
HUANG B H. Investigation analysis of contamination exposure of chloropropanols esters and glycidyl esters in infant formula[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(7): 2656-2661.
- [5] 林丽珊,傅武胜,张一可,等. 气相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方奶粉中氯丙醇酯和缩水甘油酯[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 295-300.
LIN L S, FU W S, ZHANG Y K, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of chloropropanol esters and glycidyl esters in infant formula[J]. Food Science, 2020, 41(22): 295-300.
- [6] CREWS C, CHIODINI A, GRANVOGL M, et al. Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, 30(1): 11-45.
- [7] 白顺,孙建霞,邹飞雁,等. 食品污染物3-氯-1,2-丙二醇毒理作用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 358-362.
BAI S, SUN J X, ZOU F Y, et al. Review on the toxicological effect of 3-Monochloropropane-1, 2-diol in food contaminant[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(5): 358-362.
- [8] KNUTSEN H K, ALEXANDER J, et al. Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters[J]. EFSA Journal, 2018, 16(1): e05083.
- [9] Joint F A O, World Health Organization, WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain contaminants in food: Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives[M]. World Health Organization, 2017.
- [10] European Union (EU). Commission Regulation (EU) 2020/1322 of 23 September 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of 3-monochloropropanediol (3-MCPD), 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in certain foods[S]. Office Journal of Europe Union, 2021, 310: 2-5.
- [11] SIM B I, KHOR Y P, LAI O M, et al. Mitigation of 3-MCPD esters and glycidyl esters during the physical refining process of palm oil by micro and macro laboratory scale refining[J]. Food Chemistry, 2020, 328: 127147.
- [12] AOCS. Joint AOCS/JOCS AOCS official method Cd 28-10: Glycidyl fatty acid esters in edible oil [S]. American Oil Chemists' Society, 2012.
- [13] KARL H, MERKLE S, KUHLMANN J, et al. Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2016, 118(3): 406-417.
- [14] 郑晓玲,刘文著,傅武胜,等. 植物油中氯丙醇酯和缩水甘油酯测定方法的验证结果[J]. 海峡预防医学杂志, 2019, 25(2): 1-3, 13.
ZHENG X L, LIU W J, FU W S, et al. Validation result in laboratories for monitoring method of fatty acid of chloropropanediol and glycidol in vegetable oils[J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2019, 25(2): 1-3, 13.
- [15] 杜恣闲,谢恺,郑建莉,等. 柱前反吹GC-MS/MS法同时测定食品中氯丙醇酯和缩水甘油酯[J]. 海峡预防医学杂志, 2021, 27(2): 66-68.
DU Z X, XIE K, ZHENG J L, et al. Simultaneous determination of chloropropanol esters and glycidyl esters in foods by pre-column back-flushing-technique GC-MS/MS[J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2021, 27(2): 66-68.
- [16] 魏佳丽,彭文怡,陈凤香. 菜籽油中氯丙醇酯的定量分析[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(11): 155-157.
WEI J L, PENG W Y, CHEN F X. Quantitative analysis of chloropropyl ester in rapeseed oil[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(11): 155-157.
- [17] MIYAZAKI K, KOYAMA K. An improved enzymatic indirect method for simultaneous determinations of 3-MCPD esters and glycidyl esters in fish oils[J]. Journal of Oleo Science, 2017, 66(10): 1085-1093.
- [18] AOCS. AOCS official method Cd 29b-13: Determination of bound monochloropropanediol- (MCPD-) and bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol-) by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)[S]. American Oil Chemists' Society, 2013.
- [19] AOCS. AOCS Official Method Cd 29c-13: Fatty-acid-bound 3-

- chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxy-propane-1-ol (glycidol), determination in oils and fats by GC/MS (differential measurement)[S]. American Oil Chemists' Society, 2013.
- [20] 陈啟荣, 邵鹏, 孟祥福, 等. 食品中氯丙醇酯和缩水甘油酯污染状况及检测技术进展[J]. 化学通报, 2019, 82(9): 801-805.
- CHEN Q R, SHAO P, MENG X F, et al. Pollution status and progress in detection technology of chloropropanol and glycidyl ester in foods[J]. Chemistry, 2019, 82(9): 801-805.
- [21] CHENG W W, LIU G Q, WANG L Q, et al. Glycidyl fatty acid esters in refined edible oils: A review on formation, occurrence, analysis, and elimination methods[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(2): 263-281.
- [22] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF). DGF standard method C-VI 18: Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and 2, 3-epoxypropane-1-ol (glycidol) Determination in oils and fats by GC/MS (differential measurement) [S]. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 2011.
- [23] GOH K M, WONG Y H, ANG M Y, et al. Comparison assessment between SIM and MRM mode in the analysis of 3-MCPD ester, 2-MCPD ester and glycidyl ester [J]. Food Research International, 2019, 121: 553-560.
- [24] ZWAGERMAN R, OVERMAN P. A novel method for the automatic sample preparation and analysis of 3-MCPD-, 2-MCPD-, and glycidylesters in edible oils and fats[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2016, 118(7): 997-1006.
- [25] ZWAGERMAN R, OVERMAN P. Optimized analysis of MCPD- and glycidyl esters in edible oils and fats using fast alkaline transesterification and ¹³C-correction for glycidol overestimation: validation including interlaboratory comparison [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2019, 121(4): 1800395.
- [26] KUHLMANN J. Determination of bound 2, 3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113(3): 335-344.
- [27] ISO. ISO 18363-4: 2021. Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS — Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol by GC-MS/MS[S]. Brussels, Belgium: Comité Européen de Normalisation, 2021.