

实验技术与方法

固相萃取-气相色谱质谱联用法测定酱油中3种氯丙醇类污染物

刘伟,李兵,赵榕,吴国华,薛颖

(北京市疾病预防控制中心营养与食品卫生所,北京 100013)

摘要:目的 建立一种固相萃取-气相色谱质谱联用法测定酱油中多组分氯丙醇类污染物的检测方法。方法 酱油样品上样于硅藻土萃取柱,用乙酸乙酯洗脱目标物,再经七氟丁酰基咪唑衍生化,色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),采用气相色谱-质谱法测定,内标法定量。结果 本法中的 1,3-二氯-2-丙醇 (1,3-DCP)、2,3-二氯-1-丙醇 (2,3-DCP) 及 3-氯-1,2-丙二醇 (3-MCPD) 的检出限分别为 0.4、0.6 和 0.9 μg/kg,线性范围 5~100 μg/kg ($r^2 > 0.999$);加标回收实验在 5、20 及 50 μg/kg 浓度下进行,重复测定 5 次,3 种添加浓度下 1,3-DCP、2,3-DCP 及 3-MCPD 的平均回收率分别为 92.3%~99.2%、99.3%~103.4%、74.5%~93.5%,精密度分别为 0.5%~5.5%、1.4%~4.6%、3.2%~14.3%。结论 本法安全、高效、简单、灵敏,适用于大批量酱油样品中氯丙醇类污染物的检测。

关键词:氯丙醇;固相萃取;乙酸乙酯;气相色谱-质谱法;酱油;调味品;食品安全

中图分类号:TS264.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2011)05-0425-04

Determination of chloropropanols in soy sauce by means of solid phase extraction coupled gas chromatography-mass spectrometry

Liu Wei, Li Bing, Zhao Rong, Wu Guohua, Xue Ying

(Institute of Nutrition and Food Hygiene, Beijing Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To establish a method based on solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) for the determination of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD), 1, 3-dichloro-2-propanol (1, 3-DCP) and 2, 3-dichloro-1-propanol (2, 3-DCP) in soy sauce. **Methods** Soy sauce samples were spiked with deuterium-labeled isotope internal standards and loaded on market-available SPE cartridges, then the analytes were extracted with ethyl acetate and derivatized with N-heptafluorobutyrylimidazole (HFBI). The derivatized samples were determined by GC/MS with a HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), and quantified by internal standard method. **Results** The detection limits of 1, 3-DCP, 2, 3-DCP and 3-MCPD were 0.4, 0.6 and 0.9 μg/kg respectively. The linear relation for the 3 chloropropanols was identical in the range of 5-100 μg/kg with a correlation coefficient over 0.999. The mean recoveries of spiked samples at the level of 5, 20 and 50 μg/kg for 1, 3-DCP, 2, 3-DCP and 3-MCPD were in the range of 92.3%-99.2%, 99.3%-103.4% and 74.5%-93.5%, respectively. The relative standard deviations ($n=5$) were in the range of 0.5%-5.5%, 1.4%-4.6% and 3.2%-14.3% for 1, 3-DCP, 2, 3-DCP and 3-MCPD, respectively. **Conclusion** This method was validated to be safe, effective, simple and sensitive for the determination of 3 chloropropanols in a large number of real soy sauce samples.

Key words: Chloropropanols; solid-phase extraction; ethyl acetate; gas chromatography-mass spectrometry; soy sauce; condiment; food safety

氯丙醇类污染物包括 3-氯-1,2-丙二醇 (3-MCPD)、2-氯-1,3-丙二醇 (2-MCPD)、1,3-二氯-2-丙醇 (1,3-DCP)、2,3-二氯-1-丙醇 (2,3-DCP)。其中,3-MCPD 主要毒害神经系统和血液循环系统,容易

使人得神经病和心脏病,也可产生致癌效应。而 1,3-DCP 和 2,3-DCP 除了可引起肝、肾、甲状腺及口腔癌变外,还会影响雄性生殖系统^[1]。目前,氯丙醇类物质已被国内外公认为主要的食品污染物之一。

食品中的氯丙醇主要来源于水解植物蛋白 (HVP) 的盐酸水解过程^[2-3]。在水解过程中,为了提高氨基酸的转化效率,投入过量的盐酸,导致除蛋白质肽键以外的键也发生了分解,生成了甘油和游离脂肪酸,其中的丙三醇及其酯与盐酸的氯离子

收稿日期:2011-03-14

作者简介:刘伟 男 初级技师

通信作者:赵榕 女 副主任技师 研究方向为食品安全风险监测及检验 E-mail:lxyue@yeah.net

发生取代作用,便生成一系列氯丙醇类物质。

酱油中氯丙醇类物质的检测主要采用气相色谱质谱联用法^[4-7]。这其中,我国国家标准 GB/T 5009.191—2006^[8]规定了3种方法,分别是:针对3-MCPD的层析柱分离-GC/MS法,针对氯丙醇多组分的基质固相分散萃取-GC/MS法以及针对氯丙醇多组分的顶空固相微萃取-GC/MS法。美国分析化学家协会化学分析法 AOAC 2000.01^[9]规定了只针对3-MCPD的层析柱分离-GC/MS法。我国国标和AOAC的方法均采用填充层析柱的样品净化方法,制柱步骤较繁琐,对于批量样品的实验需要准备数十只层析柱,层析柱需要实验员手工填充,耗时且容易产生系统误差;若重复使用玻璃层析柱,易导致交叉污染,造成实验结果不准确。常用的洗脱剂乙醚,已被公安部^[10]列为“制毒化学品”而限制使用,并且由于其沸点较低($\approx 35\text{ }^{\circ}\text{C}$),危险性大,在使用前要进行重蒸馏等问题,使此实验的安全性和可行性都受到影响。

本方法针对以上方法进行了改进,使用商品化的硅藻土萃取柱代替填充层析柱,并选择15 ml乙酸乙酯为洗脱剂代替乙醚。实验结果表明,本方法安全、高效、简便、灵敏,适用于酱油等液体调味品中氯丙醇类污染物的检测。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1,3-二氯-2-丙醇、2,3-二氯-1-丙醇、3-氯-1,2-丙二醇(纯度 $>99\%$, Dr. Ehrenstorfer, 德国); d_5 -1,3-二氯-2-丙醇、 d_5 -3-氯-1,2-丙二醇(纯度 $>98\%$, CDN ISOTOPE, 加拿大); 七氟丁酰基咪唑(HFBI, 纯度 $>99\%$, Regis, 美国); 乙酸乙酯和正己烷均为色谱纯; 无水硫酸钠分析纯, $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灼烧4 h, 冷却后于干燥器中储存备用; 氯化钠, 分析纯; 超纯水(Millipore, 美国)。

ProElut LLE + 硅藻土萃取柱(5 ml, 迪马, 中国)。

1.2 仪器

GC/MS-QP2010 Plus 气相色谱质谱联用仪; AOC-20i 自动进样器(岛津, 日本); 旋转蒸发器; 涡旋混匀器。

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 混合标准工作液的配置

分别称取0.034 8 g 3-MCPD, 0.025 5 g 1,3-DCP及0.028 5 g 2,3-DCP至3个10 ml容量瓶中,加入乙酸乙酯溶解,并稀释至刻度,制备成标准储备液,3-MCPD浓度为3.48 mg/ml,1,3-DCP浓度为2.55 mg/ml,2,3-DCP浓度为2.85 mg/ml。再分别

取28 μl 的3-MCPD储备液、39 μl 的1,3-DCP储备液及35 μl 的2,3-DCP储备液至另一10 ml容量瓶中,加乙酸乙酯稀释至刻度,配置成10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合标准工作液。

1.3.2 混合内标工作液的配置

分别称取0.027 3 g d_5 -1,3-DCP及0.023 0 g d_5 -3-MCPD至2个10 ml容量瓶中,加入乙酸乙酯溶解,并稀释至刻度,制备成内标储备液, d_5 -1,3-DCP浓度为2.73 mg/ml, d_5 -3-MCPD浓度为2.30 mg/ml。再分别取37 μl 的 d_5 -1,3-DCP及43 μl 的 d_5 -3-MCPD储备液至另一10 ml容量瓶中,加乙酸乙酯稀释至刻度,配置成10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合内标储备液,再将此储备液稀释10倍配置成1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合内标工作液。

1.3.3 标准系列溶液的配制

取适量10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混合标准工作液及1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混合内标工作液,并分别稀释制得浓度分别为10、20、40、80、200 ng/ml的标准系列,内标浓度均为100 ng/ml。

1.4 样品前处理方法

称取酱油样品4 g(精确至0.001 g)于25 ml烧杯中,加入20 μl 混合内标溶液(d_5 -3-MCPD和 d_5 -1,3-DCP的浓度均为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$),涡旋混匀20 s后,上样于5 ml的硅藻土小柱中,待液体完全进入硅藻土担体后,静置平衡10 min。然后,用15 ml乙酸乙酯在重力作用下洗脱目标物,洗脱液经装有无水硫酸钠的漏斗过滤后收集到茄形瓶中,在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下经减压蒸发浓缩至近干。加入2 ml正己烷至茄形瓶中,再将混合液转移至顶空瓶中,待衍生。

1.5 衍生化

向顶空瓶中加入50 μl 七氟丁酰基咪唑衍生剂,涡旋混匀20 s后,将顶空瓶放置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应30 min。取出后冷却至室温,向顶空瓶中加入2 ml饱和氯化钠溶液,涡旋混匀后静置,取上层有机相经无水硫酸钠脱水后装入进样瓶中,上机测定。

1.6 仪器条件

1.6.1 气相色谱条件

色谱柱:HP-5MS毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);进样口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;程序升温条件: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持1 min,以 $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$,再以 $40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持6 min;载气氦气(纯度 $>99.99\%$);流量控制模式压力60.0 kPa;进样量1 μl ,不分流进样。

1.6.2 质谱条件

全扫描(SCAN)质谱条件 离子化方式EI;离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$;接口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;电离电压70 eV;

扫描质量数范围 m/z 30 ~ 500; 扫描时间 4.5 ~ 29 min; 溶剂延迟时间 4.5 min。

选择离子监测扫描 (SIM) 质谱条件 离子化方式 EI; 离子源温度 230 °C; 接口温度 250 °C; 电离电压 70 eV; 溶剂延迟时间 7 min。组 1 扫描时间: 7 ~ 10 min, 组 1 扫描离子: 75, 77, 114, 116, 169, 253, 275, 277, 278; 组 2 扫描时间: 11.5 ~ 14 min, 组 2 扫描离子: 253, 257, 275, 289, 294, 453, 456。

各组分氯丙醇及同位素稀释内标物的特征碎片监测离子和定量离子见表 1。

表 1 氯丙醇及同位素稀释内标物衍生产物的特征碎片监测离子和定量离子

Table 1 Quantitative and characteristic ions in EI mass spectra of HFBI derivatives for chloropropanols and corresponding internal standards

化合物	保留时间 (min)	定量离子 (m/z)	参考离子 (m/z)
1,3-DCP	8.773	275	75, 277
2,3-DCP	9.274	75	77, 114
3-MCPD	12.810	453	275, 289
d_5 -1,3-DCP	8.594	278	116, 114
d_5 -3-MCPD	12.619	456	294, 257

2 结果与分析

2.1 线性范围及方法检出限

本方法利用内标法定量。以 d_5 -3-MCPD 作为 3-MCPD 的内标物质, 以 d_5 -1,3-DCP 作为 1,3-DCP 和 2,3-DCP 的内标物质分别绘制标准曲线, 线性范围、线性方程及其相关系数见表 2。

本实验采取信噪比 (S/N) 为 3 时, 样品中 1,3-DCP、2,3-DCP 和 3-MCPD 的含量作为方法的检出限。1,3-DCP、2,3-DCP 及 3-MCPD 的检出限分别为 0.4、0.6 和 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 2 线性范围、线性方程及其相关系数

Table 2 Linear range, linear equation and correlation coefficient

化合物	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性方程	相关系数
1,3-DCP	5 ~ 100	$y = 1.229852x + 0.027986$	> 0.999
2,3-DCP	5 ~ 100	$y = 2.312253x + 0.044919$	> 0.999
3-MCPD	5 ~ 100	$y = 1.198288x + 0.024591$	> 0.999

2.2 加标回收实验

选取市售阴性酱油样品, 分 5、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平进行加标回收实验。如表 3 所示, 3 种添加浓度下 1,3-DCP、2,3-DCP 及 3-MCPD 的平均回收率分别为 92.3% ~ 99.2%, 99.3% ~ 103.4%, 74.5% ~ 93.5%。精密度分别为 0.5% ~ 5.5%, 1.4% ~ 4.6%, 3.2% ~ 14.3%。实验数据表明此方法的准确度和精密度均符合超痕量分析要求。

表 3 加标回收率及相对标准偏差

Table 3 Mean recoveries of spiked samples, and RSD ($n = 5$)

化合物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均测定值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1,3-DCP	5	4.62	92.3	5.5
	20	19.32	96.6	3.1
	50	49.60	99.2	0.5
2,3-DCP	5	5.17	103.4	4.6
	20	20.00	100.0	1.4
	50	49.65	99.3	1.8
3-MCPD	5	3.72	74.5	14.3
	20	18.62	93.1	3.2
	50	46.75	93.5	3.4

2.3 硅藻土萃取柱的选择

本实验中, 采用了商品化的硅藻土萃取柱, 避免了人工填柱过程中可能造成的系统误差, 也大大缩减了实验时间。按国标规定取 4 g 样品进行分析, 可加载于 5 ml 容量的硅藻土小柱, 实验结果表明, 此类小柱可以达到样品净化效果。此外, 当样品比较浓稠时, 可以加入适量的超纯水进行稀释 (总体积需小于 5 ml)。

2.4 洗脱剂的选择

目前常用方法中一般用乙醚作为洗脱剂。但由于乙醚已被公安部列为“制毒化学品”而限制使用, 因此该试剂除了在实验中具有危险性外, 其购买手续也很繁琐。本实验根据洗脱剂极性, 分别考察了乙酸乙酯、正己烷以及乙酸乙酯与正己烷混合溶液的洗脱效率。实验结果表明, 当采用 50 ml 洗脱剂时, 乙酸乙酯及乙酸乙酯含量超过 50% 体积分数的混合溶液的洗脱效率比较高, 而 50 ml 正己烷只能洗脱少量的 1,3-DCP 和 2,3-DCP, 对于 3-MCPD 则未能检出。为提高洗脱效率, 本方法采用色谱纯乙酸乙酯作为洗脱剂。

2.5 洗脱体积的确定

由于容量为 5 ml 的硅藻土萃取柱的推荐洗脱体积为 15 ml, 且当采用 10 ml 进行洗脱时, 只能收集到约 4 ml 的洗脱液, 因此在优化最佳洗脱体积时, 又分别采用了 10、15、20、30 ml 洗脱液进行对比。结果表明, 采用 15 ml 乙酸乙酯可以将添加的目标物完全洗脱下来, 此方法相对于国标方法来讲, 有机溶剂的使用量可以大大减少; 同时, 这也解释了前述实验结果, 即当乙酸乙酯用量超过 15 ml 时 (纯乙酸乙酯或乙酸乙酯含量超过 15 ml 的混合溶液), 可以认为目标物被完全洗脱。

2.6 定量离子的选择

本实验通过全扫描 (SCAN) 得到目标物的标准质谱图, 见图 1。在进行选择离子监测扫描 (SIM) 时, 分别选择 275、75、453 作为 1,3-DCP、2,3-DCP 和 3-MCPD 的定量特征例子, 通过绘制标准曲线, 考

察其相关系数表明,此方法线性良好。

氯丙醇标准及其内标物质衍生产物的选择离子监测扫描(SIM)总离子流图(TIC)见图2。

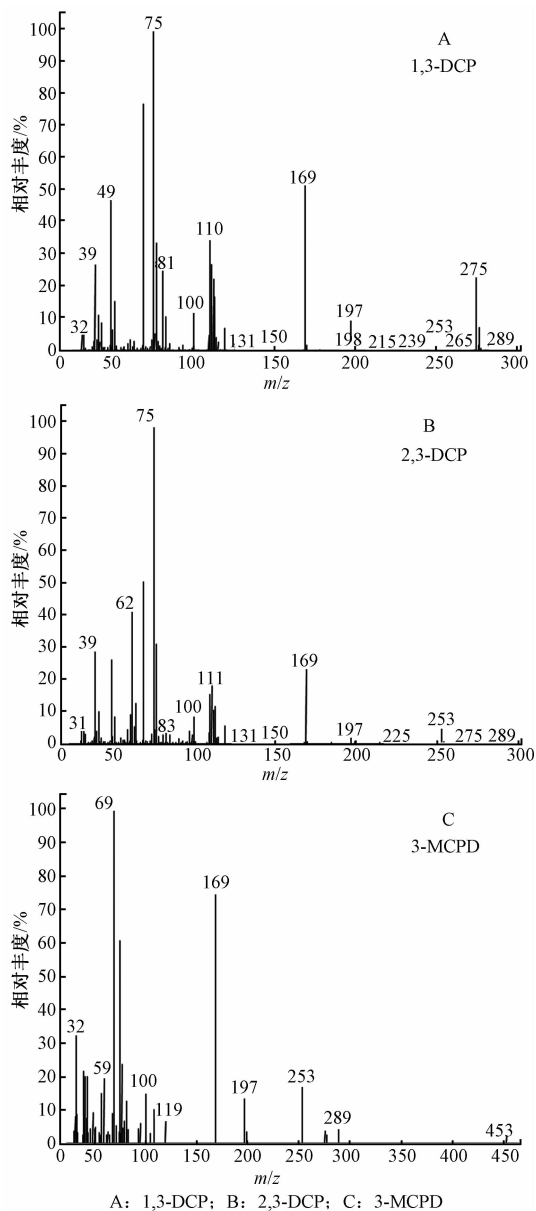
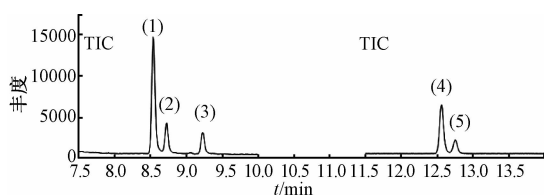


图1 3种氯丙醇标准衍生物全扫描质谱图

Figure 1 The full scan mass spectrum of chloropropanols derivated by HFBI



(1):d,-1,3-DCP;(2):1,3-DCP;(3):2,3-DCP;(4):d,-3-MCPD;(5):3-MCPD

图2 氯丙醇标准及内标物衍生产物的选择离子监测扫描总离子流图

Figure 2 Total ion current chromatogram of HFBI derivatives for chloropropanols and corresponding internal standards

3 结论

本文介绍了采用商品化的硅藻土萃取柱对样品进行提取净化,并采用色谱纯的乙酸乙酯对目标物进行洗脱,GC/MS测定,同位素稀释内标法定量测定液体调味品中3种氯丙醇类污染物的方法。实验结果表明,本方法主要具备以下特点:首先,采用商品化的硅藻土萃取柱避免了层析柱填料制柱的复杂过程以及人工填柱差异造成的系统误差;其次,采用相对少量的乙酸乙酯进行洗脱,既减少了有机溶剂的使用量,又避免了重蒸乙醚的危险性。该方法对于污染物检测等样品量较多的实验来讲,可以节省实验时间,提高实验效率;同时,其检出限满足国际上针对氯丙醇类污染物限量的检测要求。

参考文献

- [1] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Summary of the Fifty-seventh Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives[M]. Rome:JECFA,2001.
- [2] 刘晓艳,张妍. 发酵调味品中氯丙醇的危害与检测[J]. 中国调味品,2005,5(30):8-12.
- [3] 张焯,丁晓雯. 食品中氯丙醇污染及其毒性[J]. 粮食与油脂,2005,7:44-46.
- [4] HAMLET C G. 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 [J]. Food Add Contamn,1998,15(4):451-465.
- [5] MEIERHANS D C, BRUEHLMANN S, MEILI J, et al. Sensitive method for the determination of 3-chloropropane-1,2-diol and 2-chloropropane-1,3-diol by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection[J]. J Chromatgr A,1998,802(2):325-333.
- [6] 傅武胜,吴永宁,赵云峰,等. 稳定性同位素稀释技术结合GC-MS测定酱油中多组分氯丙醇的研究[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(4):289-294.
- [7] 傅武胜,吴永宁. 食品中氯丙醇测定方法研究进展[J]. 食品科学,2007,28(3):353-357.
- [8] 卫生部. GB/T 5009.191—2006 食品中氯丙醇含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [9] BRERETON P, KELLY J, CREWS C, et al. Determination of 3-chloro-1,2-propanediol in foods and food ingredients by gas chromatography with mass spectrometric detection: collaborative study[J]. J AOAC Int,2001,84(2):455-465.
- [10] 公安部. 易制毒化学品购销和运输管理办法[S]. 2006-08-22.