

实验技术与方法

固相萃取结合气相色谱质谱法检测牛奶中1,2-丙二醇

赵玉文¹,何颖霞²,薛香菊¹,杨萌¹,杨彩英¹,吉文亮²,荣维广²,张婧婧²

(1. 山东药品食品职业学院食品系, 山东 威海 264210; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立牛奶中1,2-丙二醇的固相萃取法富集净化,气相色谱-质谱法检测技术。方法 研究考察了牛奶检测中的前处理技术:蛋白沉淀技术,固相萃取技术,样品用亚铁氰化钾和醋酸锌沉淀蛋白,采用硅藻土固相萃取柱萃取净化。结果 在优化的条件下,在0.1~50 µg/mL范围内,1,2-丙二醇具有较好的线性相关性,线性相关系数为0.999 4,在0.33、0.5和2.0 mg/kg 3个添加浓度,回收率、相对标准偏差分别为81.8%~86.5%、3.1%~5.8%;方法的最低检出浓度为0.1 mg/kg。结论 该方法操作简单,环保,灵敏度高,准确性好。

关键词:牛奶; 1,2-丙二醇; 气相色谱-质谱法; 固相萃取

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)01-0031-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.01.004

Determination of 1,2-propanediol in milk using the solid phase extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry

ZHAO Yuwen¹, HE Yingxia², XUE Xiangju¹, YANG Meng¹, YANG Caiying¹, JI Wenliang²,
RONG Weiguang², ZHANG Jingjing²

(1. Department of Foods, Shandong Drug and Food Vocational College, Shandong Weihai 264210, China;

2. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** Developed a method based on solid phase extraction (SPE) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to determine 1,2-propanediol in milk. **Methods** The precipitation technology of protein and solid phase extraction, pretreatment technology in milk testing, were carefully investigated. Protein of sample milk was precipitated by potassium ferrocyanide and zinc acetate, then cleaned-up by silicious earth SPE. **Results** In the range of 0.1-50 µg/mL, 1,2-propanediol had good linear with $R^2=0.999\ 4$ under the selected conditions. The recovery and relative standard deviation were 81.8%-86.5 % and 3.1%-5.8 % at 0.33, 0.5 and 2.0 mg/kg spiked. And the minimum detection concentration of the method was 0.1 mg/kg. **Conclusion** The developed method has proved convenient, environmental-friendly, accurate and sensitive.

Key words: Milk; 1,2-propanediol; gas chromatography-mass spectrometry; solid phase extraction

1,2-丙二醇(1,2-Propanediol)为无色黏稠稳定的吸水性液体,是一种应用广泛的食物添加剂,可用作稳定剂和凝固剂、抗结剂、消泡剂、乳化剂、水分保持剂、增稠剂等同时也广泛应用于化妆品、药品和烟草中。1,2-丙二醇毒性相对较低,但当长期过量食用时,会在人体中不断积累,对人体神经、泌尿系统和呼吸系统等造成不同程度的损害^[1-3]。

2022年6月,市场监管局在某公司生产的2批次纯牛奶中检出丙二醇,经初步调查分析,纯牛奶中检出丙二醇为企业在生产过程中超范围使用食品添加剂香精所致。

根据《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760—2014)《食品安全国家标准 食品用香精》(GB 30616—2020)的规定,丙二醇是批准使用

收稿日期:2024-05-31

作者简介:赵玉文 男 副教授 研究方向为食品安全控制 E-mail:zyw29852@163.com

何颖霞 女 副主任技师 研究方向为理化检验 E-mail:heyingsia1974@Hotmail.com

赵玉文和何颖霞为并列第一作者

通信作者:荣维广 男 主任技师 研究方向为理化检验 E-mail:rongwg@jcsdc.cn

张婧婧 女 主任技师 研究方向为理化检验 E-mail:524839327@163.com

荣维广和张婧婧为共同通信作者

的食品添加剂,也是允许使用的食品用合成香料和食品用香精中允许使用的溶剂。食品添加剂丙二醇在生湿面制品、糕点中的最大使用量分别为1.5和3.0 g/kg。GB 2760—2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》中明确规定,丙二醇不允许在纯牛奶(巴氏灭菌乳、发酵乳和灭菌乳)中使用^[4]。

丙二醇的检测方法目前主要是气相色谱法^[5-7],气相色谱-质谱法^[8-9],GB 5009.251—2016食品中1,2-丙二醇的测定^[10],第一法采用无水乙醇提取样品中丙二醇,气相色谱法测定,适合于固态及液态食品,第二法采用无水乙醇提取样品中丙二醇,气相色谱-质谱法测定,适合于固态食品。查阅文献和现有标准,均无关于液态食品中1,2-丙二醇的气相色谱-质谱法检测技术的前处理技术。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂材料和标准物质配制

1.1.1 仪器

岛津 GCMS-QP2010 Ultra;EI源;VF-624 ms弹性的石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×1.4 μm);KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);24位固相萃取仪(美国SUPELCO);冷冻离心机(Hettich);N-EvapTM111氮吹仪(OA-SYS);SHZ-D(III)循环水式真空泵(南京科尔仪器设备有限公司)烘箱和马弗炉(上海精宏精密仪器有限公司);氮气:纯度≥99.999%。

1.1.2 标准品、试剂材料及样品

1,2-丙二醇(≥99.7%,安谱瑾世);甲醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、四氢呋喃均为色谱纯,均购自美国天地化学试剂公司;无水硫酸镁、无水硫酸钠和氯化钠(均为优级纯,国药集团化学试剂有限公司);冰乙酸(分析纯,南京化学试剂有限公司);亚铁氰化钾和醋酸锌(分析纯,购自德国默克公司);硅藻土固相萃取柱(4 000 mg/12 mL,杭州福裕科技有限公司);0.45 μm津腾针筒式滤膜(尼龙66);纯净水(依云);牛奶样品从大型超市购买,放置4℃冰箱保存。

1.1.3 标准储备溶液和标准工作溶液配制

称取一定量1,2-丙二醇,用甲醇定容,配制成10 mg/mL储备液,取一定量标准储备溶液用四氢呋喃稀释,配制成浓度为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20和50 μg/mL的标准系列,放置4℃冰箱。

亚铁氰化钾溶液(92 g/L):称取106 g亚铁氰化钾,加适量水溶解,用水定容至1 000 mL。

醋酸锌溶液(183 g/L):称取220 g醋酸锌溶于少量水中,加入30 mL冰乙酸,用水定容至1 000 mL。

1.2 样品前处理

称取2.0 g牛奶于15 mL塑料离心管中,加入亚铁氰化钾溶液和醋酸锌溶液各0.2 mL涡旋混匀1 min进行蛋白沉淀,3 000×g离心5 min,离心后的上清液加入已经活化好的固相萃取柱(5 mL甲醇活化),下层沉淀物加入2 mL水再提取一次,加入固相萃取柱,抽干。5 mL四氢呋喃洗脱并收集,过尼龙66膜,滤液直接进样。

1.3 气相色谱-质谱测定

1.3.1 气相色谱参数

VF-624ms弹性的石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×1.4 μm)。进样口温度:250℃;柱温:初始温度60℃,保持1 min,以10℃/min升至130℃,再以20℃/min升至250℃保持5 min,载气:氮气,纯度≥99.999%;载气流速:1.0 mL/min;不分流进样,进样量:1 μL。

1.3.2 质谱仪参数

电子轰击电离(EI);电离能量:70 eV;离子源温度:200℃;传输线温度:250℃;扫描模式:选择离子监测模式(Selected ion monitor, SIM)。1,2-丙二醇的保留时间及监测离子见表1。

表1 1,2-丙二醇监测离子和保留时间
Table 1 The selected ion monitor and retention time of 1,2-Propanediol

化合物	保留时间/min	定性离子	定量离子
1,2-Propanediol	7.0	45,43,61,31	45

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的确定及固相萃取柱类型的选择

研究考察了液液萃取技术,称取2.0 g牛奶于15 mL塑料离心管中,加入2.3 g碳酸钾,并涡旋振摇混匀,使牛奶溶液饱和。分别使用5 mL的乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷三种溶剂萃取,3种溶剂萃取的添加回收率结果为41%、39%和49%,三氯甲烷溶剂萃取时,回收率高于另外两种溶剂,使用三氯甲烷溶剂继续试验,试验中10 mL和5 mL三氯甲烷两次萃取,合并提取液并于40℃水浴中使用氮气吹至小于5 mL,三氯甲烷定容至5 mL,进样检测,添加回收率为60.5%。此方法可作为牛奶中1,2-丙二醇的快速初筛检测技术。

与传统的液液萃取方法相比,固相萃取方法具有操作步骤简单、耗费溶剂少,快速等优势^[11-12]。研究中选择了针对牛奶中复杂基质较为常用的3种固相萃取柱作为考察对象:C18小柱、硅胶柱和硅藻土柱,并研究3种小柱对牛奶中1,2-丙二醇的净化效果以及对空白牛奶样品添加0.5 mg/kg 1,2-丙二醇的添加回收率试验。结果发现C18小柱净化效果

虽然较好,能够去除脂类,但是添加回收率 37.4%,硅胶柱和硅藻土柱净化效果均较好,硅胶柱平均添加回收率 70.6%,硅藻土柱平均添加回收率高于 80%。硅藻土吸附剂是强极性、高活性的吸附剂,可以吸附极性化合物。1,2-丙二醇是极性化合物,能够被硅藻土吸附富集。采用 1.2 步骤操作,回收率达到 82.7%。与液液萃取技术相比较,采用固相萃取技术的净化效果更好,添加回收率更高,最终确定采用固相萃取技术。

液态牛奶含有较多蛋白质,直接上样会堵塞固相萃取小柱,上样前先沉淀蛋白。考察了亚铁氰化钾溶液和醋酸锌溶液的加入体积,设置了 0.2 mL 和 0.2、0.5 mL 和 0.5、1.0 mL 和 1.0 mL,3 种加入体积组合考察蛋白沉淀的效果,结果当蛋白沉淀剂加入体积为 0.2 mL 和 0.2 mL 时,能达到较好的蛋白沉淀效果。遵循减少带入干扰的原则,选择最低的试剂加入量。

2.1.1 上样体积的确定

水也是强极性溶剂,过多的水上样时会导致 1,2-丙二醇被水洗脱下来。实验考察了 2、3、4、5 和 6 mL 水上样时,1,2-丙二醇的保留情况。当 2、3 和 4 mL 水上样时,1,2-丙二醇的回收率最高,当 5 mL 水上样时,回收率开始降低,说明 1,2-丙二醇开始

流出固相萃取柱,因此确定最大上样体积为 4 mL 水溶液。见图 1。

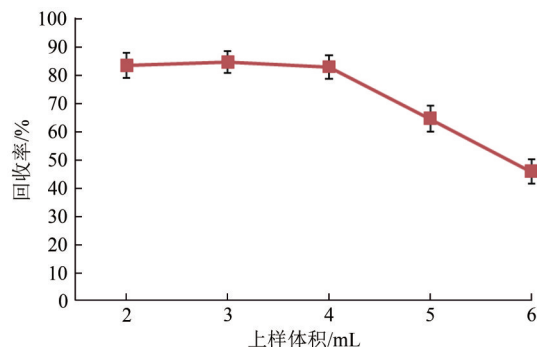
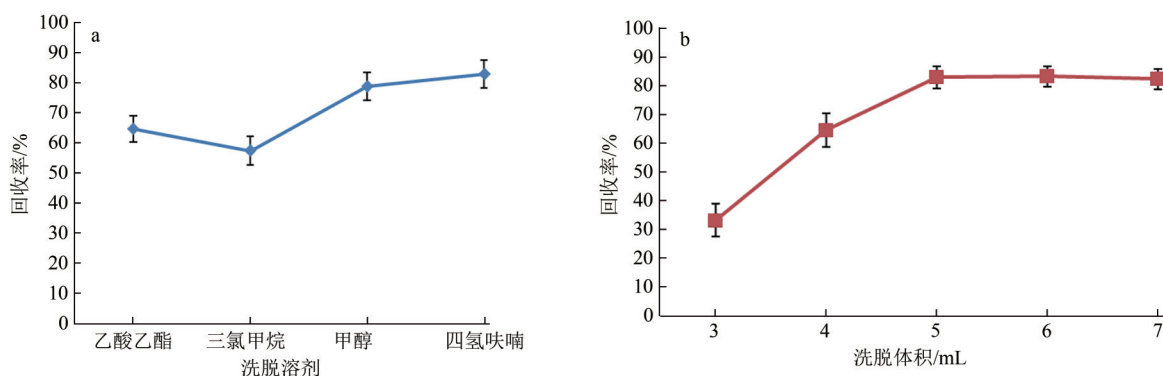


图1 不同上样体积的回收率/%

Figure 1 Recovery of different added volume/%

2.1.2 洗脱溶剂及洗脱体积的确定

试验考察了乙酸乙酯、三氯甲烷、甲醇和四氢呋喃 4 种溶剂进行洗脱。结果当选择四氢呋喃洗脱时,1,2-丙二醇的回收率以及溶液的澄清度都是最好,见图 2a。同时考察了四氢呋喃的洗脱体积,考察了 3、4、5、6、7 mL 的四氢呋喃进行洗脱,结果当选择 5 mL 四氢呋喃进行洗脱时,1,2-丙二醇的回收率达到 82.7%,当洗脱体积 6 mL 和 7 mL,回收率并没有增加,因此,确定四氢呋喃的洗脱体积为 5 mL。见图 2b。



注:(a)不同洗脱溶剂的回收率;(b)四氢呋喃洗脱体积的回收率

图2 洗脱溶剂的优化

Figure 2 Optimization of elution solvent

2.2 基质效应、标准曲线方程、检出限和定量限

实验考察了基质效应。以 1,2-丙二醇在基质匹配溶液中的响应值及其在纯溶剂四氢呋喃中的响应值评价基质效应(ME), $ME = (\text{基质匹配溶液中的 1,2-丙二醇的响应值} / \text{四氢呋喃中 1,2-丙二醇的响应值} - 1) \times 100\%$ 。当 ME 值>0 时为基质增强效应,ME 值<0 时为基质抑制效应,ME 绝对值<20% 时认为不存在明显的基质效应,并且 ME 值越小,基质效应越弱。试验设置 3 个浓度点(最低检出浓度,标准曲线中间点和测定上限)的 ME 值 3.8%~10.0%,

基质效应不明显,因此最终确定用纯溶剂的标准曲线定量。

本研究采用外标法进行定量,以各目标化合物的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标建立标准曲线,回归方程及相关系数见表 2。在 0.1~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,线性良好,线性相关系数 R^2 为 0.999 4,详见表 2。

以 3 倍的信噪比确定方法的最低检出浓度为 0.1 mg/kg,10 倍的信噪比确定方法的最低定量浓度为 0.33 mg/kg。

表2 1,2-丙二醇的回归方程、相关系数、最低检出浓度和最低定量浓度

成分	最低检出浓度/(mg/kg)	最低定量浓度/(mg/kg)	回归方程	R ²
1,2-Propanediol	0.10	0.33	y=202 438.0x+9820.3	0.999 4

2.3 方法的精密度、准确度

准确称取牛奶样品,牛奶中添加 1,2-丙二醇的浓度分别为 0.33,0.5,2.0 mg/kg,每个浓度做 6 个平行实验,运用本方法,做添加回收率实验并计算回收率和相对标准偏差。1,2-丙二醇的回收率和相对标准偏差分别为 81.8%~86.5% 和 3.1%~5.8%。见表 3。

表3 牛奶中 1,2-丙二醇的回收率,相对标准偏差(n=6)
Table 3 Recoveries, RSDs of 1,2-propanediol in milk (n=6)

化合物	加标浓度/ (mg/kg)	结果	
		回收率/%	相对标准偏差/%
1,2-Propanediol	0.33,0.5,2.0	81.8,82.5,86.5	5.8,3.7,3.1

2.4 实际样品分析

对采集的 70 份牛奶进行了 1,2-丙二醇的检测,共有 13 份样品检出 1,2-丙二醇,检出率为 18.6%。含量 0.1~1.0 mg/kg 为 7 份,含量 1.0~6 mg/kg 为 1 份,含量>6 mg/kg 为 5 份。阳性牛奶样品的总离子流图见图 3。

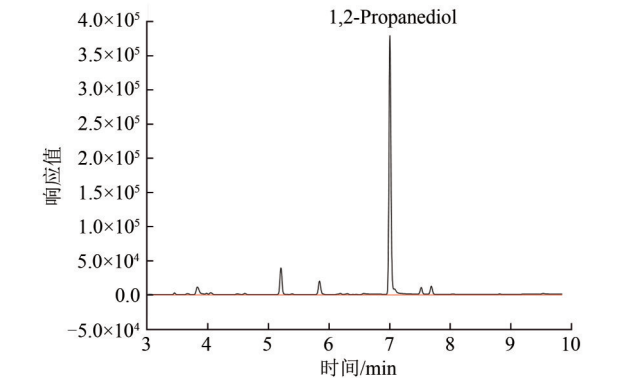


图3 阳性牛奶样品的总离子流图
Figure 3 The total ion current of positive milk

3 结论

本研究建立了硅藻土固相萃取小柱富集和净化牛奶中的 1,2-丙二醇,气相色谱质谱法进行测定,改善了基体的净化效果,降低了假阳性风险,提高了定性的准确度。运用该程序,可实现牛奶中 1,2-丙二醇的快速检测,准确定量。为国家建立牛奶中 1,2-丙二醇的检测方法以及为建立和完善牛奶的卫生标准提供依据。

参考文献

[1] BERTHELOT-RICOU A, PERRIN J, DI GIORGIO C, et al. Assessment of 1, 2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse

oocytes by comet assay[J]. Fertility and Sterility, 2011, 96(4): 1002-1007.

[2] KHAN M, VARTANYAN A, SCALZO A, et al. Propylene glycol neurotoxicity due to sodium citrate therapy in an infant with renal tubular acidosis[J]. Clinical Nephrology-Case Studies, 2020, 8: 33-36.

[3] MASSARSKY A, ABDEL A, GLAZER L, et al. Neurobehavioral effects of 1, 2-propanediol in zebrafish (Danio rerio) [J]. Neurotoxicology, 2018: 111-124.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard Hygienic standard for food additive: GB 2760—2014[S]. Beijing: Standard Press of China, 2014.

[5] 国家市场监督管理总局. 食品补充检验方法 凉拌菜中 1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇的测定: BJS 202004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.

State Administration for Market Regulation. Food supplementary inspection methods Determination of 1, 2-propanediol and 1, 3-propanediol in cold dishes: BJS 202004[S]. Beijing, Standard Press of China, 2020.

[6] 郝鹏飞, 刘东风, 孟慧琴, 等. 气相色谱法测定生湿面制品中的乙二醇、1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3870-3874.

HAO P F, LIU D F, MENG H Q, et al. Determination of ethylene glycol, 1, 2-propanediol and 1, 3-propanediol in wet flour products by gas chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(12): 3870-3874.

[7] 王维维, 张丽, 阮艺斌. 气相色谱法同时测定烟草中水分及 1,2-丙二醇与丙三醇的含量[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(3): 39-43.

WANG W W, ZHANG L, RUAN Y B. Simultaneous Determination of Moisture, 1, 2-propanediol and 1, 3-propanediol in Tobacco by Gas Chromatography [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(3): 39-43.

[8] 张杰, 李鹏, 孙世豪. GC/MS 法同时检测无烟气烟草制品中的 1,2-丙二醇、丙三醇和甘油[J]. 烟草科技, 2011(3): 36-42.

ZHANG J, LI P, SUN S H. Simultaneous determination of 1, 2-propylene glycol, glycerol and triethylene glycol in smokeless tobacco products by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Tobacco Science & Technology, 2011(3): 36-42.

[9] 刘亚, 何靓, 王文元. 气相色谱-质谱联用法同时测定烟草中的 1-丙醇、二甘醇、三甘醇、丙二醇与丙三醇[J]. 分析测试学报, 2013, 32(9): 1101-1105.

LIU Y, HE J, WANG W Y. Simultaneous determination of 1-propyl alcohol, diethylene glycol, propylene glycol, glycerol and triethylene glycol in tobacco by gas chromatography-mass spec-

- trometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(9): 1101-1105.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中1,2-丙二醇的测定: GB 5009.251—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-Determination of 1,2-propanediol in food: GB 5009.251—2016[S]. Beijing: Standard Press of China, 2016.
- [11] 孟玥. 新型固相萃取材料在环境水体多环芳烃分析中的应用[D]. 郑州: 郑州大学化工学院, 2020.
- MENG Y. The application of novel solid-phase extraction material in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon in environmental water samples[D]. Zhengzhou: Academy of Chemical Engineering, Zhengzhou University, 2020.
- [12] 刘运明, 李放. 固相萃取-气相色谱同时测定含西洋参保健食品中18种有机氯农药残留[J]. 江苏预防医学, 2017, 28(6): 706-708.
- LIU Y M, LI F. Simultaneous determination of 18 organochlorine pesticide residues in health food containing American ginseng by solid-phase extraction and gas chromatography[J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine, 2017, 28(6): 706-708.

(上接第23页)

- 刘长青(河北省疾病预防控制中心)
- 刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
- 刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
- 刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
- 刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
- 刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
- 孙长颢(哈尔滨医科大学)
- 李 宁(国家食品安全风险评估中心)
- 李 黎(中华预防医学会)
- 李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
- 李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
- 李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
- 李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
- 杨 方(福州海关技术中心)
- 杨 钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
- 杨大进(国家食品安全风险评估中心)
- 杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
- 杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
- 肖 荣(首都医科大学公共卫生学院)
- 吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
- 何更生(复旦大学公共卫生学院)
- 何来英(国家食品安全风险评估中心)
- 何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
- 聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
- 贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
- 徐 娇(国家食品安全风险评估中心)
- 徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
- 高志贤(军事科学院军事医学研究院)
- 郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
- 郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
- 唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
- 黄 薇(深圳市疾病预防控制中心)
- 黄锁义(右江民族医学院药学院)
- 常凤启(河北省疾病预防控制中心)
- 崔生辉(中国食品药品检定研究院)
- 章 宇(浙江大学生物工程与食品学院)
- 章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
- 梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
- 程树军(广州海关技术中心)
- 傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
- 谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
- 赖卫华(南昌大学食品学院)
- 裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
- 廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
- 熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
- 樊永祥(国家食品安全风险评估中心)