

固相萃取-气相色谱-质谱法测定酱油中 3-氯-4,2-丙二醇

刘宝峰 刘平平 谢文兵*

(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

摘要 建立了酱油中 3-氯-4,2-丙二醇(3-MCPD) 残留量的固相萃取-气相色谱-质谱(GC/MS) 分析方法。利用 SampliQ OPT 固相萃取柱净化样品, 考察了乙醇、丙酮、乙醚、乙醚-正己烷(9:1, V/V) 4 种洗脱液对 3-MCPD 回收效果的影响。洗脱液在室温下经氮气吹干后用双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷(BSTFA-TMS 99:1, V/V) 衍生, 采用气相色谱质谱的选择离子模式(SIM: m/z 116, 147) 进行定量测定。本方法的检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 添加浓度在 0.025 ~ 0.1 $\mu\text{g/g}$ 范围内, 平均回收率为 96% ~ 102%, 相对标准偏差(RSD) 为 1.6%。衍生物的峰面积与浓度在 5.0 ~ 100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系($r=0.9984$)。

关键词 3-氯-4,2-丙二醇; 固相萃取; 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺; 三甲基氯硅烷; 气相色谱-质谱; 酱油

1 引言

酱油是日常生活常用的调味料之一, 通常以植物蛋白为原料。植物蛋白在水解过程中会产生一种有毒的物质 3-氯-4,2-丙二醇(3-MCPD)。欧洲环保局已经将 3-MCPD 列为潜在的致癌物质, 长期大量食用 3-MCPD 可能引起肾脏及生育等方面的疾病^[1,2]。

有关 3-MCPD 检测的早期研究多采用气相色谱(GC)法^[3,4], 但 GC 法对食品和调味品中的 3-MCPD 检测存在相对误差大、重复性差等缺点, 而且 GC 法以保留时间为定性依据, 这对于复杂的目标残留物的鉴定不可靠。当前, 国际上普遍采用气相色谱质谱联用(GC/MS)法对 3-MCPD 残留量进行分析, 利用 GC/MS 特有的选择离子模式(SIM)进行定量分析, 显著提高了分析灵敏度^[5-9]。3-MCPD 作为多羟基化合物在直接进行 GC/MS 分析时, 特征离子少、峰形较差、灵敏度低, 而且酱油中存在的大量杂质严重干扰 3-MCPD 的定量分析。因此, 必需对其进行有效的前处理。目前, 普遍采用弗罗里硅土柱或 Extrelut 硅藻土柱去除酱油中的杂质, 再以三氟乙酸或七氟丁酸为衍生化试剂进行乙酰化。这些处理方法比较烦琐, 回收率不稳定^[6,10,11]。本实验利用以聚合物基为填料的 SampliQ OPT 固相萃取柱对酱油进行净化, 溶剂用量少, 时间短, 用硅烷化试剂 BSTFA + TMS(99:1, V/V) 对 3-MCPD 进行衍生处理, 其在 GC/MS 定量分析时的灵敏度明显提高。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

6890N-5975 型气-质联用仪和固相萃取装置(美国 Agilent 公司); 恒温水浴锅(金坛市江南仪器厂); 微型旋涡混合仪(上海沪亚分析仪器厂); 氮吹仪(金坛市嘉灵仪表有限公司); SampliQ OPT 固相萃取柱(60 mg 3 mL)。无水 Na_2SO_4 、无水乙醚、无水乙醇、丙酮、正己烷等试剂均为分析纯。

标准品 3-MCPD(纯度为 98%); 硅烷化试剂: 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷(BSTFA-TMS 99:1, V/V); 三甲基氯硅烷(BSTFA 美国 Supelco Park 公司)。

2.2 气相色谱-质谱条件

HP-1MS 石英毛细柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm); 进行口温度 260 $^\circ\text{C}$; 传输线温度 280 $^\circ\text{C}$; 载气 高纯氮; 流量 1 mL/min。柱起始温度 80 $^\circ\text{C}$ (保持 3 min), 以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 程序升温到 200 $^\circ\text{C}$, 再以 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温到 260 $^\circ\text{C}$ (保持 5 min); 不分流进样 0.3 min 开阀; 进样量 1.0 μL 。

EI 电离源, 电离电压 70 eV; 离子源温度 230 $^\circ\text{C}$; 四极杆温度 150 $^\circ\text{C}$ 。

2.3 样品处理

将 4 个 SampliQ OPT 固相萃取柱置于固相萃取装置上,分别用 3 mL 甲醇活化 30 min,利用无油空气泵抽干小柱。然后加无水 Na_2SO_4 (高 1 cm) 于每个固相萃取小柱上,分别上样 1 g 酱油样品,平衡 5 min,控制流量阀以 10~20 滴/min 的速度抽干。加正己烷 10 mL 淋洗去除酱油中非极性的杂质,淋洗速度为 10~20 滴/min,抽干。再分别以乙醇、丙酮、乙醚、乙醚-正己烷(9:1, V/V) 作为淋洗液对 3-MCPD 进行洗脱。淋洗速度为 10~20 滴/min,抽干,洗脱液分别移至 10 mL 锥形试管中。

2.4 衍生化

室温下用氮气吹干锥形试管中洗脱液,加入 100 μL 硅烷化试剂,然后在旋涡混合器上振荡 1 min,调节水浴温度进行硅烷化衍生,待冷却后用正己烷定容至 10 mL,进行 GC/MS 分析。

2.5 标准工作液的配制

称取 100.0 mg 3-氯-1,2-丙二醇标准品,用无水乙醚定容至 10 mL。取 100 μL 上述试剂于 10 mL 锥形试管中,在室温下用氮气吹干,加入 100 μL 硅烷化试剂进行硅烷化处理。衍生后冷却,用正己烷定容至 10 mL。以正己烷稀释,分别配制不同浓度系列标准工作液,备用。

3 结果与讨论

3.1 谱柱及质谱定量条件的选择

3-MCPD 分子中含有两个羟基,是强极性化合物,在 GC/MS 分析中需要衍生化才能提高其测试灵敏度。图 1 为 3-MCPD 衍生物分子的结构图和电子轰击质谱图。结构图显示 3-MCPD 衍生化后羟基上的氢被三甲基硅基团取代,形成极性相对较弱的衍生化产物。这种衍生物沸点低,挥发性强,易于在色谱柱中流出。考虑到酱油中随洗脱溶剂一起流出杂质对目标物定量分析时的干扰,本实验在选择非极性的 30 m DB-1MS 石英毛细柱,这种毛细柱高温下流失很低,非常适于对低浓度非极性目标物的分析。

由图 1 可见 3-MCPD 的分子离子峰 m/z 254 很弱,几乎无法检测,不能作为定量离子。在质谱碎片峰中, m/z 147 是基峰, m/z 116 相对丰度为 70%,它与分子离子失 $-\text{Cl}$ 、甲基 $-\text{CH}_3$ 、三甲基硅氧烷 ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{O}$) 相对应,是 3-MCPD 衍生物比较特征的碎片峰。选择 m/z 147 和 m/z 116 作为定量离子,即保证了定性分析的准确性,又可以提高定量分析的灵敏度。

3.2 净化提取条件的选择

3.2.1 萃取柱和洗脱液的选择

实验中选用 SampliQ OPT 作为固相萃取柱,它是利用聚酰胺化学技术制成的,具有与水 and 大多数有机溶剂,及 pH 0~14 的酸性和碱性溶剂都兼容的特性,对极性和非极性化合物都可以保留。同其它固相萃取柱相比, SampliQ OPT 具有回收率高、重现性好、耐受溶剂种类多的特点。由于 SampliQ OPT 萃取柱对极性和非极性物质都有较好的吸附作用,因此洗脱剂的正确选择对提高萃取率有很重要的作用。3-MCPD 是极性较强化合物,依据相似相溶原理,它通常溶于极性比较强的溶剂。依据极性的强弱,本研究分别选择了乙醇、丙酮、无水乙醚和无水乙醚-正己烷(9:1, V/V) 作为洗脱液。分别取上述 4 种洗脱液各 5 mL 对样品进行洗脱处理,从洗脱衍生化后测试结果可见,无水乙醚和无水乙醚-正己烷(9:1, V/V) 的洗脱效果优于乙醇和丙酮,并且无水乙醚的洗脱效果与无水乙醚-正己烷(9:1, V/V) 的差别不大。由于乙醚和正己烷的沸点都较低,所以无水乙醚和无水乙醚-正己烷(9:1, V/V) 作为洗脱液可以缩短氮吹时间,提高分析效率。乙醇和丙酮作洗脱溶剂时,酱油中强极性物质流出,这些物质与硅烷化试剂反应,降低 3-MCPD 了衍生效率,干扰 3-MCPD 衍生物的色谱分析。图 2 为以乙醚洗脱溶剂衍生测试后的质谱 SIM 定量离子流图。从图 2 可见,保留时间 6.656 min 对应 3-MCPD 衍生物色谱峰位置基本无杂峰干扰,保证了定量分析的准确性。

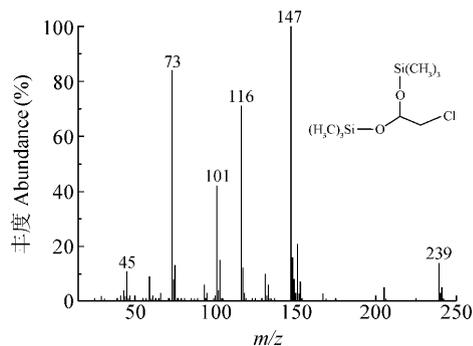


图 1 3-MCPD 衍生物质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of 3-mono-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) derivation

3.2.2 洗脱液的用量 本实验分别选择 2, 4, 6, 8 和 10 mL 洗脱溶剂对酱油样品进行洗脱, 衍生化后进行 GC/MS 分析。实验结果表明, 洗脱液用量为 2 和 4 mL 时, 衍生物在 GC/MS 分析中产生的色谱峰面积, 分别为洗脱液用量为 6 mL 时的 52% 和 81%; 而洗脱液用量为 6, 8 和 10 mL 时 3-MCPD 衍生物色谱峰面积的变化非常小。因此, 本实验洗脱液用量选择 6 mL。

3.3 衍生化条件的选择

实验中分别选用两种硅烷化试剂 BSTFA 和 BSTFA-TMS (99: 1 V/V) 对 3-MCPD 进行衍生化处理。此衍生过程中不需要添加任何催化剂, 简化了实验步骤。本研究考查了衍生化温度 (30, 40, 50, 60, 70 和 80 °C)、衍生时间 (10, 20, 30, 40, 50 和 60 min) 3-MCPD 的衍生效果的影响。结果表明, 衍生温度过低, 降低了硅烷化试剂的反应速度; 衍生温度过高, 导致硅烷化试剂的挥发, 从而降低了回收率。衍生时间过短, 硅烷化不完全; 衍生时间过长, 会降低工作效率。图 3a 为 30 min 内, 两种衍生化试剂在不同温度下衍生产物所对应的色谱峰面积; 图 3b 为在 50 °C 水浴中, 不同衍生时间下两种衍生化试剂的衍生产物所对应的色谱峰面积。以峰面积代表衍生化效率, 从图 3 可见, 在同等条件下, 硅烷化试剂 BSTFA-TMS (99: 1 V/V) 的硅烷化效率明显优于 BSTFA。在硅烷化试剂 BSTFA-TMS (99: 1 V/V) 的作用下, 衍生温度 50 °C, 反应时间 30 min, 色谱峰面积达到最大, 衍生化效率最高。

3.4 线性实验、检出限和精密度

取 100 μ L 3-MCPD 乙醚溶液于锥形试管中, 于室温下用氮气吹干, 加入 100 μ L 硅烷化试剂, 在旋转振荡器上振荡 1 min, 于 50 °C 水浴中硅烷化 30 min, 用正己烷定容至 10 mL。用正己烷分别稀释至 100, 50, 25, 10 和 5 μ g/L, 在上述优化后的色谱条件下进样分析。3-MCPD 硅烷化衍生物浓度在 5 ~ 100 μ g/L 范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 工作曲线为 $y = 16421.1x - 16267$, 相关系数为 0.9984。检出限 ($S/N=3$) 为 0.1 μ g/kg。按照提取净化和检测步骤, 对 50 μ g/L 的样品进样 6 次, 其相对标准偏差 (RSD) 为 1.6%。

3.5 方法的回收率

在未检出 3-MCPD 的酱油中, 添加 0.1, 0.075, 0.05 和 0.025 μ g/g 的 3-MCPD 进行回收率分析, 其回收率分别为 96.5%, 96.0%, 103.0% 和 102%。

3.6 实际样品分析

利用本方法测定了市场上常见的 4 种酱油中 3-MCPD 的含量, 检出量分别为 7.5, 15.1, 4.1 和 6.2 μ g/kg。图 4 为某一实际样品的 SIM 图。

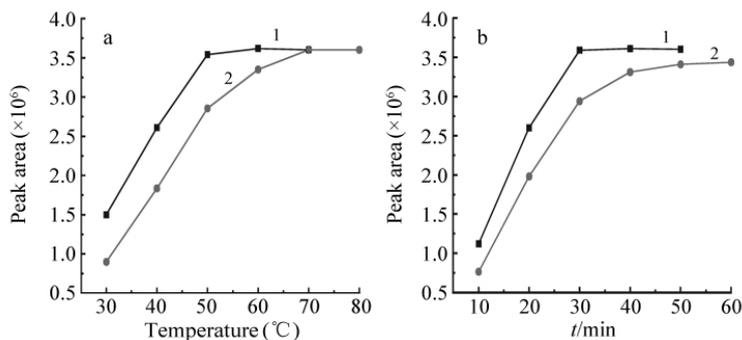


图 3 衍生化温度 (a) 和时间 (b) 对衍生产物峰面积的影响

Fig. 3 Effect of temperature (a) and time (b) on derivatization peak area

1. Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide-trimethyl chlorosilane (BSTFA-TMS);

2. BSTFA.

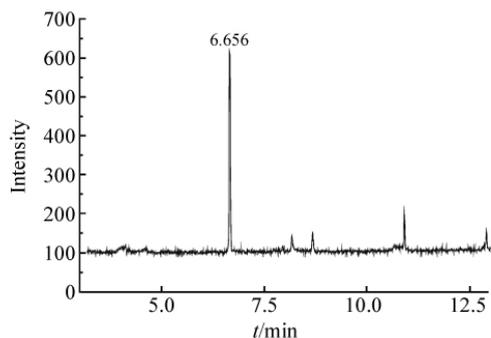


图 2 3-MCPD 衍生物 SIM 图

Fig. 2 3-MCPD derivatization SIM chromatogram

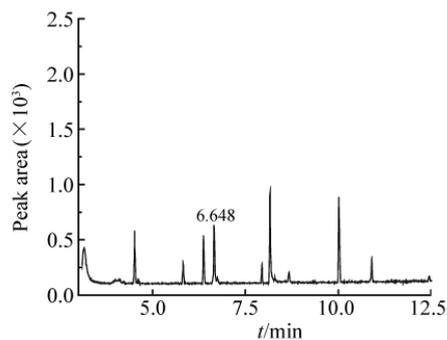


图 4 实际样品的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of real samples

References

- 1 Anonymous. *Food Technology in New Zealand*, **2002**, 37: 17 ~ 18
- 2 GAO Xiu-Jie, SUN Yuan-Ming(高秀杰,孙远明). *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*(中国食品科学), **2006**, 6(1): 377 ~ 381
- 3 Pesselman R L, Feit M J. *J. Chromatogr.*, **1988**, 439(2): 448 ~ 452
- 4 WANG Zhi-Yuan, LI Guo-Ji, ZHANG Si-Qun, RONG Hui(王志元,李国基,张思群,容慧). *Chinese Ndiment*(中国调味品), **1999**, 5: 25 ~ 27
- 5 XIAO P, YU H. *Food Control*, **2007**, 18(2): 167 ~ 172
- 6 ZHU Jian, SHENG Yong-Gang, ZHANG Bei-Ji(朱坚,盛永刚,张蓓霖). *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*(质谱学报), **2001**, 22(1): 32 ~ 45
- 7 WANG Yue-Hong, YAN Jin-Chang, LIU Jun-Hui, XU Rui-Feng, XUE Jing, WANG Wei-Hua, SHI jin-E, CHEN Da-Wei, YAN Fu-Cheng(王悦宏,闫吉昌,刘俊会,徐锐峰,薛静,王卫华,石金娥,陈大伟,闫福成). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2007**, 35(11): 1657 ~ 1660
- 8 Crews C, LeBrun G, Brereton P A. *Food Additives and Contaminants*, **2002**, 19(4): 343 ~ 349
- 9 Chung W C, Hui K Y, Cheng S C. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 952(1-2): 185 ~ 192
- 10 WU Hui-Qin, ZHANG Gui-Ying, HUANG Fang, LIN Xiao-Shan(吴慧勤,张桂英,黄芳,林晓珊). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2003**, 31(3): 345 ~ 347
- 11 YU Wei-Shen, ZHANG Hui-Di, SONG Xu-Yan(于维森,张慧娣,宋旭岩). *Occupation and Health*(职业与健康), **2003**, 19(2): 44 ~ 46

Determination of 3-Mono-chloropropane-1,2-diol in Soy Sauce by Solid Phase Extraction with Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LIU Bao-Feng, LIU Ping-Ping, XIE Wen-Bing*

(National Analytical Research Center of Electrochemistry & Spectroscopy, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract A novel method was developed for the determination of trace 3-mono-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in soy sauce by solid phase extraction with gas chromatography-mass spectrometry. The sample was clarified by SampliQ OPT solid extraction column. Four kinds of eluent solvent (ethanol, acetone, ether, ether-hexane) affecting on recoveries of 3-MCPD were examined. The eluent was derivated with trimethyl chlorosilane and bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA-TMS, 99: 1, V/V) after it was dried by nitrogen in room temperature. The selected ion mode (SIM) detection method (ions elected: m/z 116 and 147) was used for the detection of the 3-MCPD derivative. The detection limit was 0.1 $\mu\text{g/L}$ for 3-MCPD. The sample average recoveries were 96% - 102% in 0.025 - 0.1 $\mu\text{g/g}$ and the relative standard deviation was 1.6%. There was a good linear correlation ($r = 0.9984$) between the peak areas and concentration of derivative in the range of 5.0 - 100 $\mu\text{g/L}$.

Keywords 3-Mono-chloropropane-1,2-diol; Solid phase extraction; Trimethyl chlorosilane; Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide; Gas chromatography-mass spectrometry; Soy sauces

(Received 30 June 2010; accepted 10 August 2010)