

腺嘌呤柱前衍生化-HPLC-FLD法测定 3-氯-1,2-丙二醇的方法优化

胡金华¹, 杜言¹, 李小敏¹, 胡志雄^{1,2}, 张维农^{1,2}, 齐玉堂^{1,2}, 张燕鹏^{1,2}

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 大宗粮油精深加工
教育部重点实验室(武汉轻工大学), 武汉 430023)

摘要: 3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)经高碘酸钠溶液氧化裂解、腺嘌呤衍生化后的产物——1, N6-亚乙烯基腺嘌呤(ϵ -Ade)为强荧光物质,通过对其荧光光谱与重要影响因素进行研究与优化,结合测定体系背景干扰的抑制,对高效液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)测定3-MCPD水溶液的条件进行了优化。得到优化条件为:使用耐碱性反相C18色谱柱进行测定,流动相中甲醇体积分数为20%,水相为pH 9.0的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液。食用油中3-MCPD的测定需以0.01 g/mL的NaCl溶液作为萃取水相,氧化裂解3-MCPD的高碘酸钠可采用等量的亚硫酸钠还原,1.1倍量的醋酸铅沉淀予以去除,从而抑制空白峰的干扰,将该方法应用于多种食用植物油样品的测定,结果表明:该方法准确度高、重现性好(RSD在0.32%~4.63%之间);样品谱图显示基质干扰很小,方法选择性高。

关键词: 食用油; 3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD); 高效液相色谱-荧光法; 腺嘌呤

中图分类号: TS225.1; TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-7969(2020)08-0130-08

Optimization of the method for determination of 3-chloro-1,2-propanediol by adenine pre-column derivatization-HPLC-FLD

HU Jinhua¹, DU Yan¹, LI Xiaomin¹, HU Zhixiong^{1,2}, ZHANG Weinong^{1,2},
QI Yutang^{1,2}, ZHANG Yanpeng^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil(Wuhan Polytechnic
University), Ministry of Education, Wuhan 430023, China)

Abstract: The 3-chloro-1,2-propanediol(3-MCPD) was oxidatively cleaved with sodium periodate solution and then derivatized with adenine to produce a strong fluorescent substance of 1, N6-vinylidene adenine (ϵ -Ade). According to the study of the product's fluorescence spectrum and the optimization of important influencing factors, the determination conditions of 3-MCPD by high performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD) method was optimized after the suppression of the background interference of the measurement system. The optimal conditions were obtained as follows: an alkaline-resistant reverse-phase C18 column used for determination, the volume fraction of methanol in

the mobile phase 20%, and sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer solution of pH 9.0 used as the aqueous phase. For the determination of 3-MCPD in edible oil, 0.01 g/mL NaCl solution should be used as the extraction aqueous phase, and the sodium periodate used for oxidative cracking of 3-MCPD was reduced by the same amount of sodium sulfite and finally removed by the pre-

收稿日期: 2019-11-29; 修回日期: 2020-04-13

基金项目: 湖北省粮食科技创新项目; 大宗粮油精深加工教育部重点实验室(武汉轻工大学)开放课题(2018JYBQGDFA02); 国家自然科学基金项目(31371783)

作者简介: 胡金华(1993), 男, 在读硕士, 研究方向为油脂质量检测与安全控制(E-mail) 381039286@qq.com。

通信作者: 胡志雄, 副教授(E-mail) e_huzhixiong@126.com; 张维农, 教授(E-mail) zhangweinong@163.com。

cipitation with 1.1 times its amount of lead acetate so as to suppress the interference of the blank peak. The method was applied in the determination of a variety of edible vegetable oil samples, and the results showed that the method was highly accurate and reproducible (*RSD* was between 0.32% and 4.63%). The edible oil samples' chromatography showed that the matrix interference was very low and the selectivity of the method was wonderful.

Key words: edible oil; 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD); high performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD); adenine

氯丙醇类物质作为一种食品污染物近年来受到广泛关注,该类污染物在食品生产过程中中以 3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)生成量最多,因而 3-MCPD 被作为一种主要指标以反映食品加工过程中氯丙醇类物质的形成状况^[1]。1995 年,欧共体委员会食品科学分会对氯丙醇类物质的毒理作出评价,认为其是一种致癌物;FDA 建议食物含 3-MPCD 水平不应超过 1 mg/kg(干基);2001 年,欧盟制定了限量标准,规定 3-MPCD 不得超过每日 2 μg/kg 的摄入量^[2]。因此,开发高灵敏的 3-MCPD 分析方法对食品中 3-MCPD 污染残留进行监控具有重要意义。

目前,3-MCPD 的检测方法主要有气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、毛细管电泳技术(capillary electrophoresis, CE)^[3-4]、分子印迹(molecular imprinting, MIP)^[5-6]等。其中基于 GC 的分析方法使用最为普遍,为了便于检测,通常需

要对 3-MCPD 进行衍生化处理,常用的衍生化试剂主要有酮类(丙酮、丁酮、庚酮)^[7]、硼酸类(丁基硼酸、苯硼酸)^[8-11]、N,O-双三甲基-三氟乙酰胺(N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA)^[12]、三氟乙酸酐(trifluoroacetic anhydride, TFAA)、七氟丁酰咪唑(heptafluorobutyrylimidazole, HFBI)、heptafluorobutyric anhydride, HFBA)等^[13-17]。该类方法在实际应用中仍存在不少问题,如仪器设备条件要求高,分析所使用的氘代衍生化试剂比较昂贵,以及衍生化试剂稳定性较差等。而采用 CE 和 MIP 等方法检测时,由于 3-MCPD 的光谱性能较差、相对分子质量小,使得检测灵敏度较低。

本课题组在综合分析 3-MCPD 结构特点的基础上,利用 Malaprade 反应,建立了一种腺嘌呤(Ade)柱前衍生化 HPLC-FLD 定量检测 3-MCPD 含量的分析方法,其检测原理如图 1 所示。

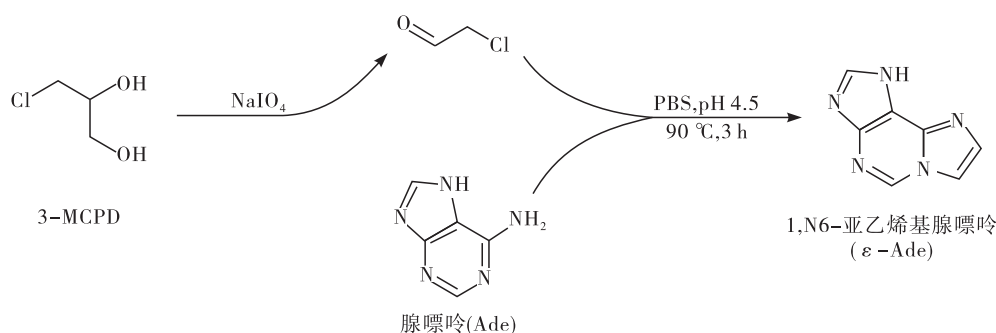


图 1 腺嘌呤柱前衍生化-HPLC-FLD 法检测 3-MCPD 原理^[18]

3-MCPD 结构中含有邻二醇基团,经高碘酸钠氧化裂解后可生成氯乙醛和甲醛,而氯乙醛与腺嘌呤(Ade)衍生化后生成强荧光物质——1,6-亚乙烯基腺嘌呤(ε-Ade),可用 HPLC-FLD 检测,根据 ε-Ade 的检测结果可间接定性定量检测 3-MCPD 的含量。该法由于使用了荧光检测器,具有良好的检测灵敏度与选择性,另外因为其预处理、衍生化过程均在水相中进行,使得操作也极为简便。本文在前期工作基础上,对衍生化产物的荧光光谱特点进行了较深入的研究,对液相色谱流动相进行了优化,

以期获得较佳色谱检测条件,进一步提高检测灵敏度与适应性。最后采用优化的检测条件对 6 种常见植物油样品中 3-MCPD 的含量进行了检测分析,以拓宽该方法的应用范围,同时为油脂生产企业与质量监督部门提供一种测定 3-MCPD 的新思路与新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆油、玉米油、花生油、稻米油、菜籽油、山

茶油,武汉某超市购买;3-MCPD(97%)、氯乙醛二乙缩醛(99.0%)、三水醋酸铅(99.9%),阿拉丁试剂公司;腺嘌呤(99.0%)、纯水(质谱级),百灵威试剂公司;浓盐酸(98%)、高碘酸钠、亚硫酸钠、氯化钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、无水乙醇(色谱级)、甲醇、正庚烷、乙酸乙酯,国药集团化学试剂有限公司;pH 4.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(8.82 mL 0.2 mol/L Na_2HPO_4 + 11.18 mL 0.1 mol/L 柠檬酸配制),腺嘌呤衍生化试剂用该缓冲液配制,现配现用。

1.1.2 仪器与设备

万分之一电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;HHS 电热恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司;PHS-3C 雷磁 pH 计,上海精科电子有限公司;SK3300 超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;XW-80A 微型旋涡混合仪,上海沪西分析仪器厂有限公司;Cary Eclipse 型荧光分光光度计,美国瓦里安仪器有限公司;ESI/MS 液相色谱-质谱联用仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;安捷伦 1260 高效液相色谱仪,日本岛津公司;InertSustain™ C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μm),日本 GL Sciences 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 氯乙醛二乙缩醛水解制备氯乙醛^[19]

量取 5 mL(约 32 mmol)氯乙醛二乙缩醛于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 15 mL 1.0 mol/L 盐酸和 5 mL 无水乙醇,混匀后于 70 °C 水浴中搅拌、回流反应 2 h,冷却至室温后,用 pH 4.5 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液稀释、定容至 32 mL,配制 1.0 mol/L 氯乙醛溶液,4 °C 冷藏保存备用。

1.2.2 3-MCPD 溶液的高碘酸钠氧化裂解预处理与荧光衍生化

移取 3.0 mL 3-MCPD 溶液于 5 mL 离心管中,加入 0.15 mL 250 mmol/L 高碘酸钠溶液,避光反应 30 min 后,加入 0.15 mL 250 mmol/L 亚硫酸钠溶液反应 20 min,取 2.2 mL 处理过的溶液,加入 0.2 mL 16.0 mg/mL 腺嘌呤溶液,在 90 °C 下反应 3 h,然后冷却至室温,经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后进 HPLC-FLD 检测。

1.2.3 HPLC-FLD 分析条件

InertSustain™ C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μm),流动相为甲醇/碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH 9.0)(体积比 20:80)溶液,流速 0.5 mL/min,进样量 20 μL ,紫外检测波长 280 nm,最大激发波长 236.0 nm,最大发射波长 405.0 nm。

1.2.4 衍生化产物的荧光光谱及影响因素研究

取 2.0 mL 稀释至 0.1 mol/L 的氯乙醛标准溶液,加入 0.5 mL 0.1 mol/L 腺嘌呤溶液,按 1.2.2 方法衍生化处理后,使用 HPLC 于紫外波长 280 nm 处进行分离(甲醇-水体系流动相,体积比 15:85),在衍生化产物的色谱峰处(17.5 min)将其流出液接出,接出液稀释后采用荧光分光光度计测定荧光激发光谱和发射光谱。为了研究 HPLC 分析条件下流动相 pH、有机溶剂体积分数、离子强度对衍生化产物荧光性能的影响,将接出液取 0.1 mL,分别加入不同溶液 2.0 mL,混合均匀,以调节接出液的 pH、有机溶剂甲醇体积分数和离子强度,然后扫描其激发光谱与发射光谱,记录最佳测定波长条件下的荧光强度,并绘制相应变化规律曲线。

1.2.5 方法评价

1.2.5.1 可行性评价——检测体系背景与可能干扰物的影响

背景对照实验处理方法:磷酸盐缓冲液体系按 1.2.2 方法以纯水代替 3-MCPD 溶液、磷酸盐缓冲液代替腺嘌呤溶液进行处理;腺嘌呤标准溶液(不加热)和腺嘌呤标准溶液(加热)体系则分别按 1.2.2 方法以纯水代替 3-MCPD 溶液、腺嘌呤标准溶液加入后不加热或 90 °C 加热反应 3 h。

干扰物比较实验处理方法:1.0 $\mu\text{g/mL}$ 甲醛、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 乙醛、200.0 ng/mL 氯乙醛标准溶液分别量取 2.2 mL,加入 0.2 mL 腺嘌呤溶液衍生化反应;纯水、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 甘油、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 1,2-丙二醇溶液与 80.0 ng/mL 3-MCPD 标准溶液则按 1.2.2 方法的步骤进行处理。

1.2.5.2 方法的定量性能评价

配制 1.0 ~ 500.0 ng/mL 的 3-MCPD 标准溶液,按 1.2.2 方法进行衍生化处理后,采用 1.2.3 的分析条件进行检测,以 ϵ -Ade 的峰面积为纵坐标,3-MCPD 质量浓度为横坐标绘制标准曲线,进行线性回归得标准曲线回归方程。

1.2.6 食用油中游离 3-MCPD 的测定

1.2.6.1 食用油样品加标实验

取 150 mL 油样溶于 300 mL 正庚烷,加入 100 mL 氯化钠溶液(0.01 g/mL),慢速搅拌萃取 0.5 h 后,静置分层并弃去下层水相,重复处理 4 次后,各取上层油相 30 mL,分别加入 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 mg/L 3-MCPD 标准溶液(乙酸乙酯作溶剂)10 μL ,涡旋混匀作为加标样品,加入 6.0 mL 0.01 g/mL 氯化钠溶液后,磁力搅拌 20 min,静置分

层后分出下层水相 3.0 mL 待测。

1.2.6.2 食用油样品中 3-MCPD 的萃取处理

准确量取 32.0 g 食用油(体积约为 35 mL)置于 150 mL 三角瓶中,加入 70.0 mL 正庚烷进行稀释。搅拌均匀后,取 30.0 mL 混合油样置于 100 mL 烧杯中,加入 6.0 mL 0.01 g/mL 氯化钠溶液后,磁力搅拌 20 min,静置分层后分出下层水相 3.0 mL 待测,每种食用油准备 3 组平行处理样品。

1.2.6.3 食用油中游离 3-MCPD 氧化裂解预处理与荧光衍生化

移取 3.0 mL 油脂萃取的下层水相溶液于 5 mL 离心管中,加入 0.15 mL 250 mmol/L 高碘酸钠溶液,避光反应 30 min 后,加入 0.15 mL 250 mmol/L 亚硫酸钠溶液反应 20 min,再加入 275 mmol/L 的醋酸铅溶液 0.15 mL,涡旋振荡混匀,5℃静置 10 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,取 2.2 mL 上层清液,按 1.2.2 方法进行荧光衍生化,再按 1.2.3 条件进行 HPLC-FLD 测定分析。

1.2.7 统计分析

所有数据均采用 Origin 6.0 绘图软件处理。

2 结果与分析

2.1 衍生化产物 ϵ -Ade 的荧光光谱及影响因素优化

2.1.1 ϵ -Ade 的荧光光谱

荧光检测波长的设定对于 HPLC-FLD 方法的检测灵敏度至关重要。为此,本实验按 1.2.4 方法,

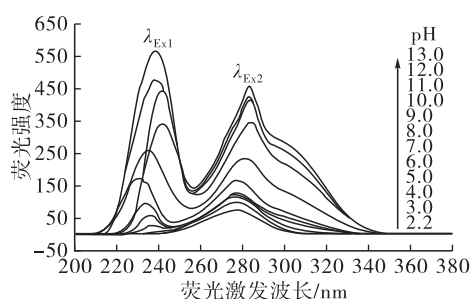


图3 pH对 ϵ -Ade荧光性能的影响

由图3可见:溶液 pH 较低($\text{pH} < 4.0$)时,基本上只出现一个较弱的激发峰($\lambda_{\text{Ex}} = 276.0 \text{ nm}$),这与文献[20]报道的激发波长基本一致,随着 pH 的递增,在 236.0 nm 波长处逐渐出现另一个激发峰,形成双峰形态,并且两峰的荧光强度均随着 pH 的升高而增强,236.0 nm 处的峰强增强速度大于 276.0 nm 处的激发峰,pH 为 8.0 时,两峰强基本相等,此后,随着 pH 的继续升高,236.0 nm 处峰强均大于 276.0 nm 处峰强。产生该现象的原因可能与 ϵ -Ade 在溶液中的存在形态有关,当 pH 较低($\text{pH} < 4.0$)时, ϵ -Ade 分子中 6 位 N 原子中的 n 电子质子

将较高浓度条件下制备的衍生化溶液在 280 nm 下分离后,接出 ϵ -Ade 色谱峰的流出液,稀释后进行荧光光谱测定,结果见图 2。从图 2 可以看出, ϵ -Ade 的最佳荧光发射波长为 405 nm,而激发光谱则出现 236 nm 和 276 nm 两处激发峰,并且 276 nm 处的荧光强度大于 236 nm 处的荧光强度,这可能与 ϵ -Ade 在溶液中的存在形态有关,为了对这一现象深入探索,本实验研究了 pH 与 ϵ -Ade 的荧光强度之间的变化规律。

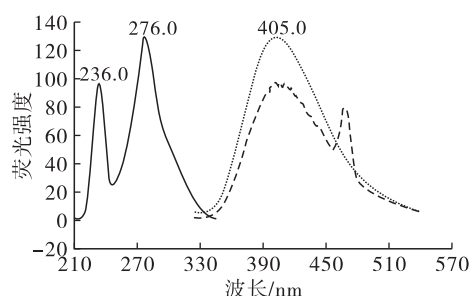
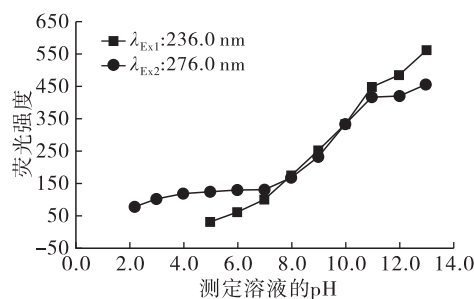


图2 ϵ -Ade 的荧光激发光谱(实线)和发射光谱(虚线)

2.1.2 pH 对 ϵ -Ade 荧光性能的影响

按 1.2.4 方法,用 pH 2.2~13.0 的缓冲液(磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液($\text{pH} 2.2 \sim 8.0$)、碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液($\text{pH} 9.0 \sim 11.0$)、磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液($\text{pH} 12.0$)、氯化钾-氢氧化钠缓冲液($\text{pH} 13.0$))调节色谱峰流出液 pH,测定在最大发射波长 405.0 nm 处的荧光激发光谱,结果见图 3。



化,质子化的 ϵ -Ade 只在 276.0 nm 附近产生一个激发峰,其共轭程度减弱导致相应激发波长均出现一定程度的蓝移;随着 pH 的升高, ϵ -Ade 逐渐转变为中性形态,共轭程度不断增强,荧光强度随之逐渐增强,另外,中性 ϵ -Ade 呈现两个激发峰,其中 236.0 nm 处激发峰变化较为剧烈,可能为中性 ϵ -Ade 特征激发峰。

在 HPLC 分析过程中,碱性样品在硅胶基质色谱柱上进行分离时易发生拖尾现象,增强流动相的 pH 可以抑制硅羟基的电离,从而减少该现象的发生;另外,流动相的 pH 对易电离物质在 HPLC

分析中的保留也会产生重要影响。为了提高本方法检测灵敏度,根据以上实验结果的分析,本实验选择具有一定耐碱性的色谱柱 InertSustain™ C18 进行测定,其 pH 耐受范围为 1.0 ~ 10.0,保守起见以下实验选择 pH 9.0 对分析条件进行优化,该 pH 下激发波长 236.0 nm 处的荧光强度稍大于 276.0 nm 处的,因此优选激发波长 236.0 nm,发射波长则选择 405.0 nm。

2.1.3 流动相甲醇体积分数对 ϵ -Ade 荧光性能的影响

HPLC 分离过程中,流动相中有机相的比例不仅会改变其洗脱强度,还会对溶质的解离状态产生影响,为此,本实验对流动相中甲醇的体积分数与 ϵ -Ade 荧光强度之间的关系进行了探索。按 1.2.4 方法控制流动相 pH 为 9.0,调节色谱峰流出液甲醇体积分数为 0 ~ 40.0%,在激发波长 236.0 nm 条件下测定相应荧光强度,结果如图 4 所示。

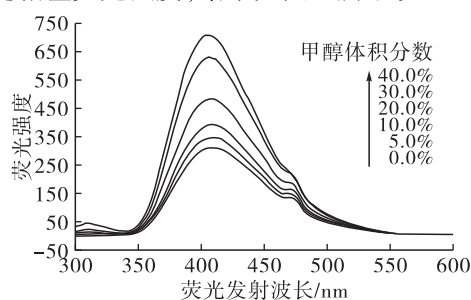


图 4 流动相甲醇体积分数对 ϵ -Ade 荧光性能的影响

由图 4 可见,随着甲醇体积分数的升高, ϵ -Ade 的荧光强度不断增强,甲醇体积分数为 40.0% 时的荧光强度较 5.0% 时增强约 1 倍。可能是因为流动相中甲醇体积分数升高时, ϵ -Ade 的解离抑制作用不断增强,另外,甲醇对于中性 ϵ -Ade 具有一定增溶性,从而使得体系中 ϵ -Ade 中性形态比例增加所致。考虑到保留时间过短会影响方法的准确度与抗干扰能力,在权衡检测灵敏度与保留时间的基础上,最终确定流动相中甲醇体积分数为 20.0%,该条件下 ϵ -Ade 保留时间为 12.1 min。

2.1.4 离子强度对 ϵ -Ade 荧光性能的影响

在 HPLC 分离过程中,流动相中无机盐的离子强度一定程度上也会影响样品的解离状态、质子化程度,从而对其色谱峰的对称性、保留性能及荧光强度、检测灵敏度产生一定程度的影响。为此,本实验控制流动相 pH 为 9.0 (1.0 mL 0.1 mol/L Na_2CO_3 + 9.0 mL 0.1 mol/L NaHCO_3)、甲醇体积分数 20%,按 1.2.4 方法添加适量 NaCl 使其在色谱峰流出液中的浓度分别为 0.00 ~ 1.00 mol/L,在激发波长 236.0 nm 条件下测定相应荧光强度,结果如图 5 所示。

由图 5 可见,增强流动相的离子强度,对于 ϵ -Ade 具有一定的荧光猝灭效应,随着体系中离子强度的增加,荧光强度不断降低,NaCl 浓度为 1.00 mol/L 时的荧光强度相比未添加 NaCl 时降低约 10.33%。通常,对于易解离的样品来说,增强溶液的离子强度将会抑制其解离,使质子化程度降低,对于分子态发光样品而言,荧光强度将有所增强。本实验条件下的结果似乎与该规律有所相悖。可能是因为在 pH 9.0、甲醇体积分数 20% 的条件下, ϵ -Ade 已基本处于分子态,荧光性能处于较优化状态,继续增强离子强度时,盐析效应所带来的荧光增强作用较小,而分子间距离缩短带来的碰撞猝灭效应反而更明显;另外,氯离子的重原子效应也可能会产生一定的荧光猝灭作用。因此,为了提高检测灵敏度,本实验条件下不宜在流动相中添加额外的无机盐来增强离子强度。

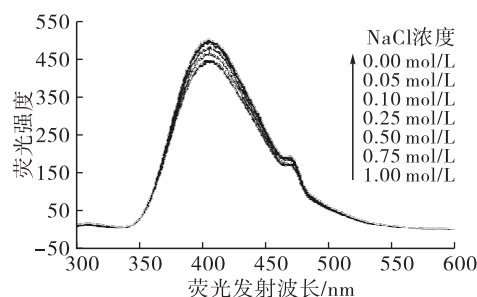
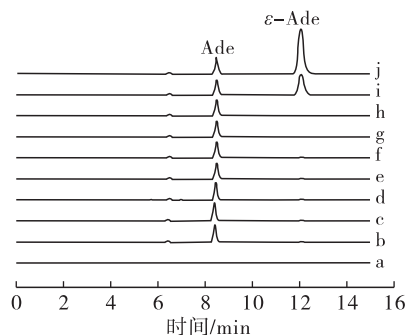


图 5 NaCl 浓度对 ϵ -Ade 荧光性能的影响

2.2 检测方法的评价

2.2.1 方法选择性与抗干扰性

为了评价方法检测的选择性以及样品基质中可能存在的干扰物对该方法准确度的影响,实验选择了甲醛、乙醛以及氧化裂解后可生成的相关物质甘油、乙二醇作对照,并对体系本身的一些成分按 1.2.5.1 方法进行处理并检测,得到 HPLC 谱图,结果如图 6 所示。



注:a. 磷酸盐缓冲液;b. 腺嘌呤标准溶液(不加热);c. 腺嘌呤标准溶液(加热);d. 纯水;e. 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 甘油;f. 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 1,2-丙二醇;g. 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 甲醛;h. 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 乙醛;i. 80.0 ng/mL 3-MCPD;j. 200.0 ng/mL 氯乙醛。

图 6 多种流动相背景及可能干扰物与 3-MCPD、氯乙醛的 HPLC 谱图

由图 6 可见:衍生化试剂 Ade 与衍生化产物 ε -Ade 的色谱峰能够很好地分离,其保留时间分别为 8.50 min 和 12.10 min;体系本身的成分如磷酸盐缓冲液、腺嘌呤标准溶液(加热或不加热)无 ε -Ade 的色谱峰出现,常见裂解产物甲醛、乙醛虽然质量浓度远大于 3-MCPD,其色谱图中亦无 ε -Ade 的色谱峰出现;纯水、甘油、1,2-丙二醇经氧化裂解处理后进行衍生化,其色谱图中在目标峰处呈现极其微弱的小峰,为了探究该峰产生的原因,实验以质谱级纯水为样品,改变 1.2.2 方法中高碘酸钠氧化裂解后的处理程序,发现不添加还原剂亚硫酸钠时该峰比添加之后大很多,而添加亚硫酸钠处理之后,继续添加醋酸铅处理(添加 0.15 mL 275 mmol/L 的醋酸铅溶液),将体系中高碘酸、碘酸根沉淀除去可以将该峰抑制至最低。这一现象说明,该处空白峰的出现可能是因为残存的高碘酸具有较强的氧化性,可以将衍生化试剂 Ade 氧化产生疏水性与 ε -Ade 相近的物质所致。甘油、1,2-丙二醇在目标峰处与纯水峰高一致,说明该干扰情况主要来源与水样一致。综上所述,衍生化试剂与 3-MCPD 氧化裂解产物氯乙醛的反应选择性非常高,基于该反应的检测方法抗干扰性好、灵敏度高。

2.2.2 方法定量性能

按 1.2.5.2 方法得到纯水体系下 3-MCPD 定量标准曲线方程为 $y = 5.046x - 12.842$ (y 为峰面积; x 为 3-MCPD 的质量浓度,ng/mL),线性回归系数(R^2)为 0.997,说明线性关系优良。按信噪比 3 和 10 可得方法的检测限与定量限分别为 0.06、

0.20 ng/mL。与文献[12]报道的 GC-MS/MS 方法检测限相近,但远低于 Matthew 等^[21]的 GC-ECD 法测定水样中 3-MCPD 的结果。

取 20.0、100.0 ng/mL 3-MCPD 样品 2 mL,分别加入 50、100、200 μ L 800.0 ng/mL 的 3-MCPD 标准溶液,按 1.2.2 方法处理后检测,得到 ε -Ade 的实际峰面积,然后根据标准曲线计算的理论值统计加标回收率。结果表明,所有样品的加标回收率均在 93% 以上,平均加标回收率为 96.12%,相对标准偏差在 2.51%~3.48% 之间,说明该方法的准确度与精密度很高。

分别取 5.0、20.0、50.0 ng/mL 3-MCPD 样品,按 1.2.2 方法处理后检测,以日内 5 次测定和连续 5 d 测定的方式对方法稳定性、重现性进行评价。结果表明,日内测定相对标准偏差为 2.8%~4.6%,日间测定相对标准偏差为 3.2%~5.6%,说明该方法的稳定性好,重复性高。

2.3 食用油中游离 3-MCPD 的测定

2.3.1 食用油中 3-MCPD 氧化裂解预处理条件优化

由于 3-MCPD 与油脂中各组分的极性相差较大,极易溶于水,所以采用简单的液-液萃取方法即可实现对其分离预处理。为了避免萃取中产生乳化现象,可采用 NaCl 溶液(0.01 g/mL)作为水相进行萃取。但是实验发现增加水相盐浓度后,出现空白溶液的目标干扰峰增大的情况。为此,按 1.2.2 方法对 0.01 g/mL NaCl 溶液的氧化裂解预处理条件进行比较优化,处理方法参数设置见表 1,不同处理方法所测得的对应空白溶液 HPLC 谱图如图 7 所示。

表 1 降低空白峰的 3 种方法

方法	高碘酸钠(250 mmol/L)		亚硫酸钠(250 mmol/L)		醋酸铅(275 mmol/L)	
	添加量/mL	处理时间/min	添加量/mL	处理时间/min	添加量/mL	处理方法
a	0.15	30	0.15	20	0.15	5℃、静置 10 min;3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液
b	0.15	30			0.15	同上
c	0.15	30	0.10	20		

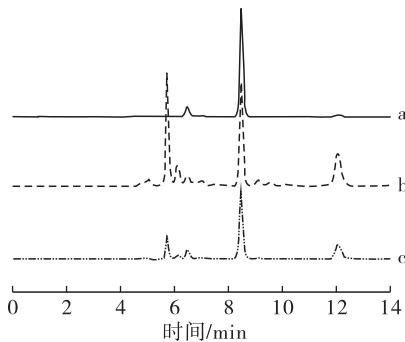


图 7 3 种降低空白峰的方法结果比较

从图 7 可以看出,按 c 方法进行处理时,在目标峰处会出现相对较高的背景干扰,这可能是由于离子强度增大时,亚硫酸钠对于高碘酸钠的还原反应会受到一定程度的抑制,残留的痕量高碘酸根离子含量增强,使得 ε -Ade 的干扰产物有所升高所致,如果在亚硫酸钠处理后,加入醋酸铅使体系中的氧化性阴离子沉淀脱除后,干扰峰减弱至可忽略不计的水平,所以对于油脂样品中 3-MCPD 的检测,采取了方法 a 对液-液萃取后的水相体系进行处理,

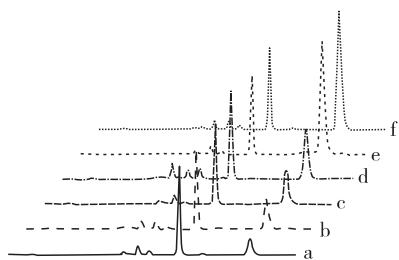
具体操作步骤如 1.2.6.3 方法中所述。

2.3.2 食用油中 3-MCPD 定量测定方法评价

采用 0.01 g/mL NaCl 溶液代替纯水作为 3-MPCD 萃取溶剂后,其定量标准曲线也会因此有所差异,为此,需要用 0.01 g/mL NaCl 溶液配制 1.0 ~ 500.0 ng/mL 的 3-MPCD 标准溶液,按 1.2.6.3 方法进行预处理后进行 HPLC-FLD 测定,再根据 1.2.5.2 方法绘制相应标准曲线,所得定量标准曲线方程为 $y = 4.33x + 2.99$ ($R^2 = 0.9999$)。按 1.2.6.1 方法进行加标回收率测定,可得加标回收率为 90.11% ~ 102.70%,说明该方法标准曲线线性关系良好,准确度与精密度高,可用于食用油中游离 3-MPCD 的检测。

2.3.3 实际食用油样品检测

本实验以 6 种常见植物油样品为例进行了相关测定,按 1.2.6.2 方法对其液-液萃取,萃取所得下层水相按 1.2.6.3 方法进行预处理、HPLC-FLD 检测,6 种常见植物油 HPLC 谱图如图 8 所示。



注:a.玉米油;b.山茶油;c.稻米油;d.大豆油;e.花生油;f.菜籽油。

图 8 几种常见植物油中 3-MCPD 的 HPLC 谱图示意

由图 8 可见,采用该方法对 6 种常见植物油中游离 3-MCPD 检测时,谱图中衍生化产物峰形对称,基质干扰少,目标物检测选择性好。按上述定量标准曲线进行定量分析,玉米油、山茶油、稻米油、大豆油、花生油、菜籽油中 3-MCPD 的含量分别为 6.28、10.53、12.17、17.70、59.99、89.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$,3 次重复测定的相对标准偏差为 0.32% ~ 4.63%。不同油脂 3-MCPD 含量之间差异较大,这可能与各种油料的理化特性以及精炼工艺处理方式不同有关。

3 结 论

本文在前期研究的基础上,对 3-MCPD 经高碘酸氧化裂解、腺嘌呤衍生化后产物的荧光光谱特点进行了深入探讨,并对影响衍生化产物荧光性能的因素进行了研究,对 HPLC-FLD 检测条件进行了优化。另外,在优化的检测条件下,对植物油样品中 3-MCPD 的检测进行了应用评价。结果表明:

在流动相 pH 9.0、流动相甲醇体积分数 20%、流动相中不添加额外的盐离子、激发波长 236.0 nm、发射波长 405.0 nm 时,对于水相体系中 3-MCPD 具有更高灵敏度(检测限与定量限分别为 0.06、0.20 ng/mL);用于植物油中游离 3-MCPD 测定时,以 0.01 g/mL 的 NaCl 溶液作为萃取水相,在 3-MCPD 氧化裂解后的高碘酸钠处理过程中,加入 1.1 倍的醋酸铅溶液可以抑制空白峰的干扰。将其应用于 6 种常见食用植物油样品的测定,结果表明该方法准确度高、重现性好(RSD 在 0.32% ~ 4.63% 之间),样品谱图显示基质干扰很小,选择性高。本方法可为油脂生产企业与质量监督部门提供一种 3-MCPD 测定的新思路与新方法。

参考文献:

- [1] 杨娇,金青哲. 食用植物油中 3-氯丙醇酯的研究进展[J]. 中国油脂,2011,36(9):1-4.
- [2] 金青哲,王兴国. 氯丙醇酯——油脂食品中新的潜在危害因子[J]. 中国粮油学报,2011,26(11):119-123.
- [3] 谢天尧,李娜,唐亚军,等. 致癌物 3-氯-1,2-丙二醇的毛细管电泳/电导分离检测[J]. 色谱,2003(5):513-515.
- [4] 邢晓平,曹玉华. 毛细管电泳-电化学检测法检测水解植物蛋白调味液中的 3-氯-1,2-丙二醇及其应用[J]. 色谱,2006(2):192-195.
- [5] FANG M, ZHOU L, ZHANG H, et al. A molecularly imprinted polymers/carbon dots-grafted paper sensor for 3-monochloropropane-1,2-diol determination[J]. Food Chem,2019,274:156-161.
- [6] LI Y, ZHENG C M, SUN X L, et al. Identification of 3-chloro-1,2-propandiol using molecularly imprinted composite solid-phase extraction materials[J]. Anal Bioanal Chem, 2014,406(25):6319-6327.
- [7] FABIAN M D, MILADY R N. Development of an analytical method for 3-monochloropropane-1,2-diol in soy sauce using 4-heptanone as derivatizing agent[J]. Food Addit Contam, 2004, 21(3):204-209.
- [8] PESSELMAN R L, FEIT M J. Determination of residual epichlorohydrin and 3-chloropropanediol in water by gas chromatography with electron-capture detection[J]. J Chromatogr A,1988, 439:448-452.
- [9] HUANG M J, JIANG G B, HE B, et al. Determination of 3-chloropropane-1,2-diol in liquid hydrolyzed vegetable proteins and soy sauce by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry[J]. Anal Sci, 2005, 21:1343-1347.
- [10] DIVINOVA V, SVEJKOVSK A B, DOLEZAL M, et al. Determination of free and bound 3-chloropropane-1,2-diol by gas chromatography with mass spectrometric

- detection using deuterated 3 - chloropropane - 1,2 - diol as internal standard [J]. Czech J Food Sci, 2004, 22: 182 - 189.
- [11] KUSTERS M, BIMBER U, OSSENBRUGGEN A, et al. Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3 - MCPD and 3 - MCPD esters in different foodstuffs [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58: 6570 - 6577.
- [12] RACAMONDE I, GONNZALES P, LORENZO R A, et al. Determination of chloropropanols in foods by one - step extraction and derivatization using pressurized liquid extraction and gas chromatography - mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(39): 6878 - 6883.
- [13] BERGER P E, GERLING S, APEL E, et al. Development and validation of an analytical method for determination of 3 - chloropropane - 1,2 - diol in rat blood and urine by gas chromatography - mass spectrometry in negative chemical ionization mode [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 398: 313 - 318.
- [14] CHUNG W C, HUI K Y, CHENG S C. Sensitive method for the determination of 1,3 - dichloropropan - 2 - ol and 3 - chloropropane - 1,2 - diol in soy sauce by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr A, 2002, 952: 185 - 192.
- [15] MATTHEW B M, ANASTASIO C. Determination of halogenated mono - alcohols and diols in water by gas chromatography with electron - capture detection [J]. J Chromatogr A, 2000, 866: 65 - 77.
- [16] BEL - RHLID R, TALMON J P, FAY L B, et al. Bio-degradation of 3 - chloro - 1,2 - propanediol with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 6165 - 6169.
- [17] ROBERT M C, OBERSON J M, STADLER R H. Model studies on the formation of monochloropropanediols in the presence of lipase [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 5102 - 5108.
- [18] HU Z X, CHENG P, GUO M L, et al. A novel approach of periodate oxidation coupled with HPLC - FLD for the quantitative determination of 3 - chloro - 1,2 - propanediol in water and vegetable oil [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(27): 6614 - 6621.
- [19] VIRTÀ P, HOLMSTRÖM T, MATTIAS U, et al. New nucleoside analogs from 2 - amino - 9 - (β -D-ribofuranosyl) purine [J]. Org Biomol Chem, 2004, 2(6): 821 - 827.
- [20] HUANG Z, WAXMAN D J. High - performance liquid chromatographic - fluorescent method to determine chloroacetaldehyde, a neurotoxic metabolite of the anticancer drug ifosfamide, in plasma and in liver microsomal incubations [J]. Anal Biochem, 1999, 273(1): 117 - 125.
- [21] MATTHEW B M, ANASTASIO C. Determination of halogenated mono - alcohols and diols in water by gas chromatography with electron - capture detection [J]. J Chromatogr A, 2000, 866: 65 - 77.
-
- (上接第 124 页)
- [4] 帅瑞艳, 刘飞虎. 亚麻起源及其在中国的栽培与利用 [J]. 中国麻业科学, 2010, 32(5): 282 - 286.
- [5] BEKHITA E D A, SHAVANDI A, JODJIAJA T, et al. Flaxseed: composition, detoxification, utilization, and opportunities [J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2018(3): 129 - 152.
- [6] SHIM Y Y, GUI B, ARNISON P G, et al. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: a review [J]. Trends Food Sci Technol, 2014, 38(1): 5 - 20.
- [7] RODRIGUEZ - BONILL P, GANDI - HERRERO F, MATENCIO A, et al. Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS⁺, and FRAP techniques [J]. Food Anal Meth, 2017, 10(9): 2994 - 3000.
- [8] 李达, 马聪玉, 吕青林, 等. 不同产地脱脂乳木果仁总酚含量测定及其生物活性 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(5): 572 - 579.
- [9] ZUK M, RICHTER D, MATULA J, et al. Linseed, the multipurpose plant [J]. Ind Crops Prod, 2015, 75: 165 - 177.
- [10] 孙伟洁. 亚麻木酚素的提取和分离纯化技术研究 [D]. 黑龙江 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009.
- [11] 李媛, 陈媛梅. 超声波法提取加杨叶总酚条件的优化 [J]. 林业科技开发, 2010, 24(6): 96 - 99.
- [12] 刘滨, 樊金拴, 冯慧英, 等. 响应面法优化巴山冷杉针叶多酚的超声提取及纯化研究 [J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2015, 36(2): 41 - 48.
- [13] 臧茜茜, 魏晓珊, 陈鹏, 等. 不同品种亚麻籽木酚素多聚体水解物的组成及含量 [J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(2): 253 - 259.
- [14] 禹晓, 黄沙沙, 程晨, 等. 不同品种亚麻籽组成及抗氧化特性分析 [J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(6): 879 - 888.
- [15] 朱秀灵, 戴清源, 木朝丽, 等. 安徽不同产地芝麻中木酚素和总酚含量及芝麻提取物抗氧化能力比较 [J]. 农产品加工(上), 2018(8): 38 - 43.
- [16] 杨希娟. 青海蚕豆多酚的提取工艺优化及不同品种(系)酚类含量及抗氧化活性 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 237 - 243.