

同位素内标 - 气相色谱 - 质谱法测定 食用植物油中缩水甘油酯

张方圆, 王李平, 朱大林, 潘云山

(广东省科学院 广东省测试分析研究所(中国广州分析测试中心), 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东省保健食品功效成分检测与风险物质快速筛查工程技术研究中心, 广州 510070)

摘要:建立了一种同位素内标 - 气相色谱 - 质谱法测定食用植物油中缩水甘油酯(GEs)的检测方法。先将GEs转化成3-溴-1,2-丙二醇(3-MBPD)单酯,再通过水解、衍生化,然后气相色谱-质谱法测定3-溴-1,2-丙二醇(3-MBPD)含量,并对衍生条件进行优化。结果表明:优化的衍生条件为GEs质量浓度为21.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,苯硼酸(PBA)用量100 μL ,衍生温度50 $^{\circ}\text{C}$,衍生时间10 min。该方法在GEs质量浓度为0.021 8 ~ 2.178 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好($R = 0.999 9$),检出限为25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均加标回收率为91.4% ~ 97.0%,相对标准偏差为4.4% ~ 8.6%。该方法的可操作性强、重现性好,灵敏度、准确度和精密度均能满足实际工作中食用植物油中GEs的定性定量检测。

关键词:缩水甘油酯;同位素内标;水解;衍生;食用植物油;GC-MS

中图分类号:TS201.6;O657 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)12-0132-05

Determination of glycidyl esters in edible vegetable oil by isotopic internal standard - gas chromatography - mass spectrometry

ZHANG Fangyuan, WANG Liping, ZHU Dalin, PAN Yunshan

(Guangdong Provincial Engineering Research Center for Efficacy Component Testing and Risk Substance Rapid Screening of Health Food, Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, Guangdong Institute of Analysis (China National Analytical Center, Guangzhou), Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

Abstract: An isotopic internal standard - gas chromatography - mass spectrometry method was established for the determination of glycidyl esters (GEs) in edible vegetable oil. GEs were converted to 3 - monobromopropanediol (3 - MBPD) monoesters, and then the 3 - MBPD content was determined by gas chromatography - mass spectrometry (GC - MS) after hydrolysis and derivatization. The conditions of derivatization were optimized. The results showed that the optimal derivatization conditions were obtained as follows: mass concentration of GEs 21.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$, phenylboronic acid (PBA) dosage 100 μL , derivatization temperature 50 $^{\circ}\text{C}$, derivatization time 10 min. Good linearity was obtained ($R = 0.999 9$) with the mass concentration of GEs in the range of 0.021 8 - 2.178 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The limit of detection of GEs was 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the mean recovery rate of standard addition was 91.4% - 97.0% with a relative

standard deviation of 4.4% - 8.6%. The method was applicable and reproducible with good sensitivity, accuracy and precision, which could be used for qualitative and quantitative determination of GEs in edible vegetable oil in actual work.

Key words: glycidyl esters; isotopic internal; hydrolysis; derivatization; edible vegetable oil; GC - MS

收稿日期:2020-04-01;修回日期:2020-08-27

基金项目:广东省科学院青年科技工作者引导专项(2019 GDASYL-0105013);广东省测试分析研究所(中国广州分析测试中心)自筹科研基金项目(201902)

作者简介:张方圆(1989),女,助理研究员,硕士,研究方向为食品安全质量研究(E-mail)zhangfyde@163.com。

通信作者:王李平,助理研究员(E-mail)wangjiang0916@126.com。

缩水甘油酯(Glycidyl esters, GEs)是缩水甘油和脂肪酸的酯化产物。GEs在人体中会代谢为缩水甘油(又称环氧丙醇),在2017年世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)公布的致癌物清单中,缩水甘油被列入了2A类致癌物清单。动物实验证明缩水甘油具有致癌作用,食用后容易对人体中枢神经产生抑制作用,可能损害生育能力甚至致癌^[1]。另外,缩水甘油在氯离子和酸性条件下,易转换成氯丙醇,以3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)为主,而3-MCPD具有肾毒性、生殖毒性和致癌性^[2],对人体健康产生巨大的威胁。

GEs已成为一种潜在的食品污染物,并引起了社会各界的广泛关注^[3]。2016年,欧盟(EFSA)对GEs和氯丙醇酯类化合物对人类健康进行了风险评估,结果表明绝大多数植物油中均含有GEs和氯丙醇酯,并制定了氯丙醇的每日许可限量(TDI)值为 $0.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。2018年,欧盟实施了对植物油和婴幼儿奶粉中GEs的限量管理^[5]。目前,我国缺少食品中GEs的相关检测方法和标准,文献报道的方法主要分为直接法和间接法两类。直接法主要应用液相色谱-质谱法(LC-MS),在不破坏GEs结构的条件下,对各类GEs进行直接测定^[6-7],但由于GEs种类较多,多种标准品还未商业化,导致标准品造价昂贵,且难以购得。间接法多采用气相色谱-质谱法(GC-MS),将GEs转化为其他特异性的物质,通过检测该物质的含量间接测定GEs的含量^[8-9]。《2018年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》采用间接法测定GEs的含量,将GEs经酯交换反应后,与氯离子反应生成氯丙醇,通过氯丙醇的差值折算得到GEs的含量。间接法适用于测定GEs的总量,但由于GEs和氯丙醇酯的形成机理相似,氯丙醇酯通常伴随GEs一起形成,GEs不是氯丙醇形成的唯一前体,且食品中存在氯丙醇本底值的干扰情况^[10]。因此,通过将GEs转化成氯丙醇间接测定GEs含量时,需先测定样品中氯丙醇及其酯的本底值,再测定样品中经GEs转化而来的氯丙醇和样品本身氯丙醇及其酯的总含量,通过计算氯丙醇含量的差值得到GEs的含量。这加大了实验工作量和实验所需样品量,且本底值测定的准确性会直接影响测定结果的准确性。

本研究采用间接法将GEs转化成3-溴-1,2-丙二醇(3-MBPD)酯,再通过水解和衍生化前处理方法,采用GC-MS测定3-MBPD含量,从而实现食用植物油中GEs的测定,并通过正交实验对衍生条件进行优化。溴丙醇和氯丙醇结构和性质

相似,且样品中不存在溴丙醇本底值干扰的情况,因此本方法可以通过测定溴丙醇含量直接得到GEs的含量,降低了样品中基质干扰,克服了氯丙醇本底值干扰,提高了检测的灵敏度和准确性,且减少了测定工作的样品需求量,可以更好地满足食用植物油中GEs含量的测定要求。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

食用植物油样品均购于广州市各大超市;棕榈酸缩水甘油酯(GEs, 98.0%, BePure),棕榈酸-D₅-3-氯-1,2-丙二醇酯(D₅-3-MCPDE, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, First Standard);正己烷、甲基叔丁基醚、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、三氯甲烷均为色谱纯;苯硼酸(PBA, 97.0%, 麦克林);实验用水为GB/T 6682—2008规定的一级水;其他试剂均为分析纯。

GEs标准储备液:准确称取棕榈酸缩水甘油酯标准品0.011 11 g(精确至0.000 01 g),用三氯甲烷配制成1 089 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液,临用时用三氯甲烷稀释成所需质量浓度。

内标棕榈酸-D₅-3-氯-1,2-丙二醇酯溶液:准确移取适量棕榈酸-D₅-3-氯-1,2-丙二醇酯标准品,用乙酸乙酯配制成10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标溶液。

1.1.2 仪器与设备

Agilent 7890A-5975C气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦科技有限公司;Sartorius BT125D电子天平;TD25-WS多管架自动平衡离心机;KQ-600E超声波清洗仪;HH-4数显恒温水浴锅;OXW-80A旋涡混合器。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

称取植物油样品0.2 g(精确至0.000 1 g)于10 mL比色管中,准确加入20 μL 内标溶液,再加入2 mL甲基叔丁基醚-乙酸乙酯溶液(体积比2:1),涡旋溶解,作为待反应液。

向待反应液中加入酸化溴化钠溶液0.1 mL,涡旋混匀,在50℃水浴反应15 min;加入3 mL饱和碳酸氢钠溶液中止反应,并加入2 mL正己烷,涡旋,静置,取上清液于10 mL比色管中,用正己烷重复提取上清液2次,合并提取液于10 mL比色管中,40℃氮吹至近干,加入1 mL甲基叔丁基醚-乙酸乙酯溶液(体积比2:1)复溶,备用。

于上述提取液中加入2 mL 1.8%硫酸-甲醇溶液,混合均匀后,置于40℃恒温水浴中反应16~

20 h。加入 3 mL 饱和碳酸氢钠溶液中中止反应后,涡旋,静置分层,氮吹除去有机溶剂。再用 2 mL 正己烷除去反应液中的脂溶物,弃上层液,正己烷重复脱脂 2 次,得到下层清液备用。

加入 1.0 mL 乙酸乙酯于上述清液中,涡旋提取 1 min,取上层液于装有 1 g 无水硫酸钠的 10 mL 比色管中,重复提取 2 次,合并提取液,于 40 °C 氮吹吹干。

加入适量 PBA 溶液,振荡均匀后,于恒温水浴反应一段时间,冷却,40 °C 氮吹至近干,加入 1 mL 正己烷,涡旋溶解,转移至进样小瓶中,待测定。

1.2.2 标准曲线的绘制

将 GEs 标准储备液稀释得到质量浓度为 1.089 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液,分别移取 GEs 标准溶液 20、50、100、200、500、1 000、2 000 μL 于 10 mL 比色管中,并分别加入内标溶液 20 μL ,按 1.2.1 在酸性条件下与溴离子反应后,经 1.8% 硫酸-甲醇水解,乙酸乙酯提取,于 40 °C 氮吹吹干后,按优化后的衍生条件衍生化,得到目标物 3-MBPD-PBA 质量浓度依次为 0.021 8、0.054 4、0.109、0.218、0.544、1.089、2.178 $\mu\text{g}/\text{mL}$,内标质量浓度为 0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后进行 GC-MS 分析,以目标物峰面积与内标峰面积之比为纵坐标,3-MBPD-PBA 质量浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.2.3 GC-MS 分析条件

GC 条件:色谱柱为 DB-5MS 毛细管柱(30 m \times 250 μm \times 0.25 μm);进样口温度 280 °C;升温程序为 60 °C 保持 0 min,以 6 °C/min 速率升温至 180 °C,再以 60 °C/min 速率升温至 300 °C,保持 3 min;进样方式为脉冲不分流;进样量 1 μL 。

MS 条件:电子轰击离子源(EI);电离能量 70 eV;离子源温度 230 °C;四级杆温度 150 °C,传输线温度 280 °C;扫描方式为选择离子扫描(SIM);溶剂延迟 6 min;定量及定性离子见表 1。

表 1 3-MBPD-PBA、D₅-3-MCPD-PBA 的监测离子

待测物质	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
3-MBPD-PBA	147	240, 91
D ₅ -3-MCPD-PBA	150	201, 93

2 结果与讨论

2.1 3-MBPD 和 D₅-3-MCPD 衍生物的定性分析

本实验中,GEs 和内标 D₅-3-MCPDE 在酸性条件下与溴离子反应后,经硫酸-甲醇水解后生成 3-MBPD 和 D₅-3-MCPD。3-MBPD 和 D₅-3-MCPD 在 PBA 用量 100 μL 、衍生温度 50 °C、衍生时

间 10 min 条件下与 PBA 衍生后生成 3-MBPD-PBA 和 D₅-3-MCPD-PBA。衍生产物在 GC-MS 分析条件下,经全扫描模式分析后,得到相应的总离子流图和质谱图,如图 1 所示。

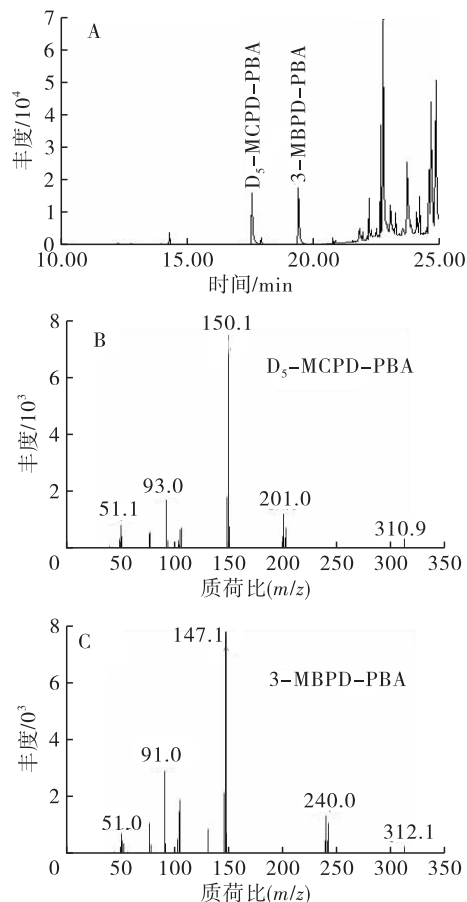


图 1 2.178 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3-MBPD、2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ D₅-3-MCPD-PBA 的总离子流图(A)及 D₅-3-MCPD-PBA(B)、3-MBPD-PBA(C)的质谱图

从图 1A 可以看出,3-MBPD-PBA 和 D₅-3-MCPD-PBA 在该 GC-MS 分析条件下的出峰时间分别为 19.4 min 和 17.6 min,两种物质的响应较好,且分离度良好。从图 1B、图 1C 可以看出:D₅-3-MCPD-PBA 的特征离子为 m/z 150.1、201.0、93.0,其中 m/z 150.1 的响应最高;3-MBPD-PBA 的特征离子为 m/z 147.1、240.0、91.0,其中 m/z 147.1 的响应最高。因此,可采用选择离子监测模式对 D₅-3-MCPD-PBA 和 3-MBPD-PBA 进行定性分析,以降低噪声和其他干扰效应,提高检测灵敏度。其中:D₅-3-MCPD-PBA 定量离子 m/z 150,定性离子 m/z 201、93;3-MBPD-PBA 定量离子 m/z 147,定性离子 m/z 240、91。

2.2 衍生条件的优化

采用正交实验对 3-MBPD 与 PBA 的衍生反应条件进行优化。通过分析实验条件和前期单因素实

验,在 GEs 质量浓度为 21.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下,以 PBA 用量、衍生温度和衍生时间为因素,3-MBPD-PBA 峰面积为指标进行正交实验设计。正交实验设计和结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 正交实验设计和结果

实验号	A PBA 用量/ μL	B 衍生 温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 衍生 时间/ min	3-MBPD-PBA 峰面积/ 10^7
1	100	25	5	1.40
2	100	50	10	1.61
3	100	70	15	1.45
4	200	25	10	1.09
5	200	50	15	1.11
6	200	70	5	0.84
7	300	25	15	0.87
8	300	50	5	0.84
9	300	70	10	0.90
k_1	1.49×10^7	1.12×10^7	1.03×10^7	
k_2	1.01×10^7	1.19×10^7	1.20×10^7	
k_3	0.87×10^7	1.06×10^7	1.14×10^7	
R	0.62×10^7	0.13×10^7	0.17×10^7	

表 3 方差分析

误差来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
校正模型	0.695	6	0.116	171.000	0.006
截距	11.334	1	11.334	16722.951	0.000
A	0.627	2	0.314	462.607	0.002
B	0.023	2	0.011	16.934	0.056
C	0.045	2	0.023	33.459	0.029
误差	0.001	2	0.001		
总计	12.031	9			
校正的总计	0.697	8			

注: $R^2=0.998, R^2_{\text{Adj}}=0.992$ 。

从表 2 可以看出,各因素对 3-MBPD-PBA 峰面积影响的主次顺序为 $A > C > B$,最佳因素水平组合为 $A_1B_2C_2$,即 PBA 用量为 100 μL ,衍生温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,衍生时间为 10 min。

从表 3 可以看出,各因素对 3-MBPD-PBA 峰面积影响的主次顺序为 $A > C > B$,与极差分析结果一致。因素 A 和因素 C 对响应值有显著性影响 ($P < 0.05$)。

2.3 标准曲线与检出限

GEs 在 0.021 8 ~ 2.178 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度范围内的标准工作曲线方程为 $y = 4.255x - 0.0489$,相关系数 (R) 为 0.999 9。在该分析条件下,仪器信噪比为 41,以 3 倍信噪比对应的质量浓度为检出限,可确定检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果表明,本方法的线性关系良好,检出限能满足食用植物油中 GEs

的测定要求。

2.4 精密度和回收率

选取葵花籽油作为基质进行加标回收和精密度实验,考察方法的准确度和精密度。在 3 个不同水平上进行加标,分别进行 6 次平行实验,计算得到 GEs 的平均回收率和相对标准偏差 (RSD),结果见表 4。

表 4 基质加标回收率和精密度实验结果 ($n=6$)

加标量/ (mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
0.10	91.4	8.6
0.50	94.7	6.3
2.50	97.0	4.4

由表 4 可知,3 个不同水平加标的平均回收率范围为 91.4% ~ 97.0%,RSD 小于 10%,准确度和精密度良好。这说明本实验所确定的前处理步骤和衍生化条件,适用于植物油中 GEs 的测定,测定结果准确、可靠,满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中检测方法确认的技术要求,可应用于植物油中 GEs 的测定。

2.5 样品测定

分别选取市售的 10 种食用植物油产品,按 1.2.1、1.2.3 方法进行 GEs 含量的测定,每个样品平行测定 2 次,取平均值,结果见表 5。

表 5 10 种食用植物油样品中 GEs 的含量 mg/kg

样品	GEs 含量
一级大豆油	0.216
精炼一级大豆油	0.873
100% 纯花生油	0.527
一级花生油	0.419
压榨一级花生油	0.114
葵花籽油	ND
压榨玉米油	0.228
压榨玉米油	0.073
浓香菜籽油	0.711
菜籽油	0.289

注:ND 表示未检出。

从表 5 可以看出,10 个食用植物油样品中 9 个样品检出 GEs,GEs 的检出率高达 90%,含量为 0.073 ~ 0.873 mg/kg 。欧盟 EU 2018/290 对植物油中 GEs 限量标准为 1.0 mg/kg ,参照欧盟限量标准可知,食用植物油中 GEs 的污染水平相对较高,存在一定的风险,这可能与食用植物油的生产过程和工艺有关,其中油脂精炼过程中的脱臭工艺是 GEs 产生的重要环节^[11]。因此,建立准确可靠的测定方法用于监测食用植物油中 GEs 含量,控制 GEs 的污

染风险,确保食用植物油的安全,是十分必要和紧迫的。

3 结 论

本文建立了同位素内标-气相色谱-质谱法用于食用植物油中 GEs 含量的测定。采用正交实验对衍生条件进行优化,确定 3-MBPD 与 PBA 的最佳衍生条件为 GEs 质量浓度为 21.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, PBA 用量 100 μL ,衍生温度 50 $^{\circ}\text{C}$,衍生时间 10 min。本方法的检出限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均加标回收率为 91.4%~97.0%,RSD 为 4.4%~8.6%。方法可操作性强、重现性好,灵敏度、准确度和精密度均能满足实际工作中食用植物油中 GEs 的定性定量检测,可为食用植物油中 GEs 含量的检测标准制定和 GEs 风险监控提供重要依据。

参考文献:

- [1] ARISSETO A P, SILVA W C, TIVANELLO R G, et al. Recent advances in toxicity and analytical methods of monochloropropanediols and glycidyl fatty acid esters in foods[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 24:36-42.
- [2] 向晓玲,赵波,李春松,等. 食用油中 3-氯丙醇酯的研究进展[J]. *中国油脂*, 2017, 42(7): 59-64.
- [3] 宁柠,王卫飞,李道明,等. 食用油脂中缩水甘油酯的风险评估研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(1): 1-6.
- [4] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for human health related to the

presence of 3- and 2- monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food [J/OL]. *Efsa J*, 2016, 14(5) [2020-08-27]. <https://doi.org/10.29031j.efs.2016.4426>.

- [5] Amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of glycidyl fatty acid esters in vegetable oils and fats, infant formula, follow-on formula and foods for special medical purposes intended for infants and young children; Commission Regulation (EU) 2018/290 [S]. Brussels: Official Journal of European Union, 2018.
- [6] 刘京,张晖,王瑛瑶,等. 液相色谱-质谱法测定食用油中缩水甘油酯的含量[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(15): 308-311.
- [7] 宁柠. 油脂工业中缩水甘油酯的产生规律及风险评估研究[D]. 广州:华南理工大学, 2015.
- [8] 袁蕊. 对植物油中缩水甘油酯的两种气相色谱质谱测定方法的比较分析[J]. *分析仪器*, 2018(4): 159-163.
- [9] 李利君,司天雷,马传国. 食用油中缩水甘油酯的检测方法研究进展[J]. *中国油脂*, 2017, 42(9): 83-87.
- [10] 李荷丽,罗季阳,苗虹,等. 氯丙醇和氯丙醇脂肪酸酯检测方法研究进展[J]. *检验检疫学刊*, 2019, 29(6): 124-127,131.
- [11] 胡守江,周静,张妮,等. 同位素内标-气相色谱-质谱法测定婴幼儿配方乳粉中缩水甘油脂肪酸酯的含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2018, 54(7): 745-751.

(上接第 131 页)

- [17] SHARMA U, BHANDARI P, KUMAR N, et al. Simultaneous determination of ten sugars in *Tinospora cordifolia* by ultrasonic assisted extraction and LC-ELSD [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(7): 633-638.
- [18] 汪兴杰,张予林,刘吉彬,等. 基于氨基柱的高效液相色谱-示差折光检测器方法分析媚丽葡萄香气糖苷的糖基组成[J]. *分析化学*, 2017, 45(5): 681-686.
- [19] HONDA S, AKAO E, SUZUKI S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180(2): 351-357.
- [20] VORAGEN A G J, SCHOLS H A, DE VRIES J A, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of uronic acids and oligogalacturonic acids[J]. *J Chromatogr A*, 1982, 244(2): 327-336.
- [21] WEI Y A, FANG J N. Studies on the chromatographic

behavior of some uronic acids and neutral sugars on an amino-bonded phase column [J]. *J Chromatogr A*, 1990, 513: 227-235.

- [22] HAMMAD L A, DERRYBERRY D Z, JMEIAN Y R, et al. Quantification of monosaccharides through multiple-reaction monitoring liquid chromatography/mass spectrometry using an aminopropyl column [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1565-1574.
- [23] 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定:GB 5009.8—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [24] XU W, LIANG L, ZHU M. Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction[J]. *Int J Food Prop*, 2015, 18(3): 547-557.
- [25] BRONS C, OLIEMAN C. Study of the high-performance liquid chromatographic separation of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk [J]. *J Chromatogr A*, 1983, 259: 79-86.