

周洁, 孙骥, 余晓玲, 等. 液相色谱-高分辨质谱快速测定奶粉中氯丙醇酯[J]. 环境化学, 2022, 41(7): 2458-2460.

ZHOU Jie, SUN Ji, YU Xiaoling, et al. Rapid determination of chloropropanol ester in milk powder by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41(7): 2458-2460.

液相色谱-高分辨质谱快速测定奶粉中氯丙醇酯

周洁^{1,2} 孙骥^{1,2} 余晓玲^{1,2} 于子丰^{1,2} 李双^{1,2*}

(1. 宁波中盛产品检测有限公司, 宁波, 315040; 2. 宁波海关技术中心, 宁波, 315040)

摘要 通过优化提取和净化过程建立了奶粉中氯丙醇酯的分级提取净化体系, 并通过高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱技术(HPLC-Q-Orbitrap-HRMS)对该体系效果进行评价. 实验采用在提取出的脂肪中加入内标再进行前处理的做法, 第一级采用甲醇振荡提取、C18固相萃取柱净化, 可完成对缩水甘油酯和部分氯丙醇单酯的提取和净化工作, 第二级采用甲醇提取, 二氯甲烷辅助提取, 中性氧化铝粉净化, 去除油脂干扰的同时, 可完成对氯丙醇双酯的提取与净化, 通过合并第一、二级提取液, 即可实现对奶粉中氯丙醇酯的高通量筛查, 方法检出限为 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 定量限为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 回收率 $\geq 80.6\%$, 标准偏差低于10%, 该方法对高蛋白、高脂肪的奶粉基质具有较强的适用性.

关键词 氯丙醇酯, 高通量筛查, 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(Q-Orbitrap HRMS).

Rapid determination of chloropropanol ester in milk powder by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry

ZHOU Jie^{1,2} SUN Ji^{1,2} YU Xiaoling^{1,2} YU Zifeng^{1,2} LI Shuang^{1,2*}

(1. Ningbo Zhongsheng Product Testing Company, Ningbo, 315040, China; 2. Ningbo Customs Technology Center, Ningbo, 315040, China)

Abstract A system of sequential extraction and purification coupled with UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS detection applied to the analysis of chloropropanol ester with very different physicochemical properties in milk powder was established. The experiment added internal labeling to the extracted fat. In the first-stage of extraction, the glycidyl esters and partial chloropropanol monoesters were extracted with methanol and purified effectively by C18, in the second-stage of extraction, the chloropropanol diester were mainly extracted with methanol-dichloromethane and purified effectively by Alumina-N. The detection limit was $0.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, quantification limit was $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the recoveries more than 80.6%, the standard deviation is less than 10%. The method has strong applicability for high protein, high fat milk powder matrix.

Keywords chloropropanol ester, high-throughput screening, quadrupole electrostatic field orbital trap high resolution mass (Q-Orbitrap HRMS).

氯丙醇酯是近年来发现的存在于婴幼儿配方奶粉中的一类新型污染物, 其水解产物氯丙醇被证实具有致癌性、遗传毒性、肾脏毒性等. 目前, 食品中氯丙醇酯的检测对象主要集中在食用油中^[1], 常见的前处理技术包括: 固相萃取、基质分散固相萃取、直接溶剂萃取、超声辅助提取等^[2]. 目前, 关于婴幼儿配方奶粉中氯丙醇酯的相关研究还不够深入. 本文采用在提取出的脂肪中加入内标再进行前处理的做法, 前处理结合固相萃取和基体分散净化技术, 依次采用甲醇-甲醇/二氯甲烷(2:1, V:V)作为提取溶剂, 联合了C18小柱和中性氧化铝粉除油, 通过一次前处理, 实现了奶粉中不同类型氯丙醇酯的同步提取净化, 并通过高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-Orbitrap-HRMS)技术对该体系效果进行评价.

* 通信联系人 Corresponding author, Tel: 18857497140; E-mail: 762446702@qq.com

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器与试剂

Q-Exactive 四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技 ThermoFisher Scientific 公司), 配置有 H-ESI II 源. 液相色谱系统为 UltiMate3000 高压液相色谱带自动进样器. 滤膜(DIKMA, PTFE 0.22 μm), C18 固相萃取柱(美国 WATERS 公司, 150 mg/6 cc).

氯丙醇酯标准品购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司和日本 Tsukishima Foods Industry 公司, 纯度 $\geq 95\%$. 标准品用二氯甲烷溶解, 甲醇(含 0.02 mmol·L⁻¹ 乙酸钠)定容, 配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的标准储备溶液, -20℃ 避光保存. 乙酸钠(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 甲醇、二氯甲烷和乙腈等其他试剂均为色谱纯, 采购于德国 Merck 公司, 实验用水为 Milli-Q 超纯水(18.2 $\Omega\text{M}\cdot\text{cm}$).

1.2 前处理流程

奶粉基质涵盖了婴幼儿配方奶粉、调制乳粉、特殊医学用途配方奶粉, 包括全营养配方, 氨基酸配方, 深度水解配方等, 品牌覆盖国内外常见奶粉生产公司. 参考 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》方法, 在提取出的脂肪中加入内标, 再进行前处理.

前处理步骤优化如下: (1) 提取的脂肪中, 加入 10 mL 甲醇溶液震荡 5 min, 超声提取 20 min, 以 12000 r·min⁻¹ 高速离心, 得到有机层及残渣; (2) 取上层有机相经 C18 柱净化, 甲醇淋洗, 12 mL 的 80% 的二氯甲烷-甲醇(V:V) 作为洗脱液进行洗脱, 洗脱液经氮吹浓缩近干, 准确加入 2.0 mL 甲醇溶液; (3) 剩余残渣加入 80% 的二氯甲烷-甲醇溶液(V:V) 进行二次提取, 震荡 5 min, 超声提取 20 min, 以 12000 r·min⁻¹ 高速离心, 得到有机层及残渣; (4) 取上层有机相, 氮吹浓缩近干, 准确加入 2.0 mL 甲醇溶液, 加入 0.5 g 中性氧化铝粉充分震荡, 以 12000 r·min⁻¹ 高速离心, 得到上清液及沉淀; (5) 合并(2)和(4)上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 待分析. 所有实验均为 3 平行处理, 实验数据采用平均值 \pm SD 表示.

1.3 色谱及质谱条件

液相条件: Synchronis C18(2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μm) 为固定相, 流动相 A: 甲醇-水(9:1, V:V, 含 0.02 mmol·L⁻¹ 乙酸钠), 流动相 B: 异丙醇-甲醇(1:1, V:V, 含 0.02 mmol·L⁻¹ 乙酸钠), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5.0 μL . 梯度见表 1.

表 1 在 ESI⁺模式下的液相色谱洗脱梯度
Table 1 HPLC elution procedure in ESI⁺ ion modes

时间/min	0	5	10	15	20	20.1	25
流动相A/%	100	100	50	0	0	100	100
流动相B/%	0	0	50	100	100	0	0

质谱条件: 正离子模式, 质量范围 m/z 100—1000, 分辨率 70000(m/z 200), 电压值 3500 V, 离子传输管温度为 320 °C, 鞘气(N₂)35 L·h⁻¹, 辅助气(N₂)15 L·h⁻¹, 气化室温度 380 °C, 源内裂解电压(In-source CID)为 40 eV. 二级采用自动触发模式(dd-MS²), 分辨率 35000 FWHM(m/z 200), 自动增益控制(AGC)目标值 5.0 e⁵, 相对碰撞能量范围 10%—40%.

1.4 定性、定量分析

定性分析: 利用高通量筛查软件 Exactfinder™(Thermo Scientific)对氯丙醇酯进行定性分析, 要求精确质量误差低于 5 $\times 10^{-6}$, 同时比对保留时间、同位素分布、主要二级碎片和二级质谱图相识度, 综合判断, 避免假阳性结果.

定量分析: 配制 7 种氯丙醇酯标准品的混合标准溶液(1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 并逐级稀释工作溶液, 其浓度范围为 10、20、50、100、200 ng·mL⁻¹. 绘制标准工作曲线, 作为目标物定量的依据.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 提取溶剂-二氯甲烷比例优化

分别考察了二氯甲烷体积占比为 30%、50%、80% 和 100% 时的上述 7 种代表性氯丙醇酯加标回收率. 结果表明, 偏极性的缩水甘油酯(缩水甘油-棕榈酸酯和缩水甘油-硬脂酸酯)和中等极性氯丙醇单酯(3-氯丙醇-2-硬脂酸单酯和 3-氯丙醇-1-棕榈酸单酯)主要存在甲醇提取液中, 受二氯甲烷比值影响不大, 该类化合物回收率稳定维持在 70% 以上. 然而, 低极性氯丙醇双酯(3-氯丙醇-1,2-棕榈酸二酯、2-氯丙醇-1,3-硬脂酸二酯和 3-氯丙醇-1-棕榈酸-2-硬脂酸二酯)的回收率受二氯甲烷所占比值的影响很大, 当二氯甲烷占比为 30% 和 50% 时, 提取效率较差, 回收率均小于 50%; 当二氯甲烷占比为 80% 和 100% 时, 提取率逐渐趋于稳定, 回收率数值均达到 70% 以上. 考虑到脂肪基质中甘油三酯等油脂成分的影响, 最终确定二级提取液中二氯甲烷所占比值为 80%.

2.2 净化条件的选择

实验中针对 C18 净化柱的淋洗、洗脱条件进行了详细优化. 7 种代表性氯丙醇酯类化合物的混合标准溶液 10 μL (1.0 mg·mL⁻¹), 甲醇定容至 10 mL, 每根 C18 净化柱使用前依次采用甲醇、水进行活化, 上样后平衡 5 min, 分别采用 0%、0%、20%、30%、50%、80% 和 100% 的二氯甲烷-甲醇(V:V) 溶液进行洗脱, 收集洗脱液, 氮吹浓缩后, 甲醇定容至 2.0 mL, 经 PTFE 滤膜过滤后, LC-MS 测定. 结果表明, 0% 的二氯甲烷-甲醇(V:V) 洗脱液中, 未检测到目标化合物; 10%、20%、30% 的二氯甲烷-甲醇(V:V) 洗脱液中, 缩水甘油酯和氯丙醇单酯逐渐完成洗脱, 强疏水性的氯丙醇双酯未能洗脱; 80% 和 100% 的二氯甲烷-甲醇(V:V) 洗脱液可实现全部目标化合物的完全洗脱, 从尽可能降低油脂类化合

物干扰的角度出发,确定 80% 的二氯甲烷-甲醇(*V:V*)作为洗脱液。

2.3 加标回收结果分析

根据上述优化得到的最佳分级提取体系,对奶粉中氯丙醇酯进行多级净化提取和液相色谱-质谱联用技术分析。结果显示,氯丙醇酯在 10—200 ng·mL⁻¹ 线性范围内,其线性关系良好($r^2 \geq 0.999$),检出限为 0.02 mg·kg⁻¹,定量限为 0.05 mg·kg⁻¹,加标回收率在 80.6%—94.2%,标准偏差均低于 10%,该方法对高蛋白、高脂肪的奶粉基质具有较强的适用性(表 2)。

表 2 7 种代表性氯丙醇酯在婴幼儿配方奶粉和特殊医学用途配方奶粉中的添加水平、线性范围及其回收率

Table 2 Experimental data on the spiked levels, linear range and recovery of 7 representative chloropropanols esters in infant formula and special medical use formula

种类	化合物	加标水平/(mg·kg ⁻¹)	婴幼儿配方奶粉		特殊医学用途配方奶粉		相关系数
			回收率/%	标准偏差/%	回收率/%	标准偏差/%	
氯丙醇酯 Glycidol esters	Glycidol-P	0.05	84.1	6.1	88.6	6.8	0.999
		0.1	86.9	7.7	91.2	5.5	
		0.2	88.7	5.6	93.4	3.9	
	Glycidol-S	0.05	86.1	5.5	86.2	6.6	
		0.1	84.9	6.7	88.8	6.2	
		0.2	90.3	7.2	90.5	4.8	
氯丙醇单酯 Chloropropanol monoesters	2-S-3-MCPD	0.05	83.9	5.5	91.3	7.1	0.999
		0.1	86.4	4.4	89.6	6.6	
		0.2	89.9	3.9	92.7	6.7	
	1-P-3-MCPD	0.05	90.6	7.8	89.3	6.9	
		0.1	91.8	5.5	93.5	5.0	
		0.2	94.2	5.0	94.2	4.4	
氯丙醇双酯 Chloropropanol diesters	1,2-diP-3-MCPD	0.05	88.7	7.1	82.6	5.1	0.999
		0.1	89.1	6.3	88.6	6.4	
		0.2	88.4	4.3	88.0	4.7	
	1,3-diS-2-MCPD	0.05	83.7	5.5	82.7	6.3	
		0.1	85.4	6.1	86.9	6.6	
		0.2	89.9	3.9	88.4	5.4	
1-P-2-S-3-MCPD	0.05	81.6	6.2	80.6	5.9	0.999	
	0.1	85.4	4.6	84.7	5.1		
	0.2	84.9	3.8	86.0	4.3		

P: 棕榈酸 palmitate, S: 硬脂酸 stearate, MCPD: 氯丙醇 chloropropanediol.

3 结论(Conclusion)

本文根据 3 大类氯丙醇酯类化合物的极性范围,包括: 缩水甘油酯, 氯丙醇单酯和氯丙醇双酯, 以及奶粉基质样品中高蛋白质、高脂肪的属性特征, 建立了奶粉中氯丙醇酯类化合物分级提取、净化方法。首先, 甲醇和二氯甲烷/甲醇(8:2, *V:V*)作为提取溶剂, 两种溶剂的极性覆盖范围广, 完全满足 3 大类氯丙醇酯类化合物的提取需求。第一级采用甲醇振荡提取、C18 小柱净化, 可实现对缩水甘油酯和氯丙醇单酯的有效提取分离; 第二级采用甲醇提取, 二氯甲烷辅助提取、中性氧化铝粉净化, 去除油脂的同时, 可实现对氯丙醇双酯的提取分离。其次, 通过合并第一、二级提取液, 即可实现奶粉中氯丙醇酯类化合物的高通量检测。本方法对不同奶粉基质及不同理化性质的化合物兼容性强, 为丰富奶粉中氯丙醇酯种类及后期探究婴幼儿奶粉中氯丙醇酯的毒理学奠定了实验基础。

参考文献 (References)

- [1] HAINES T D, ADLAF K J, PIERCEALL R M, et al. Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOF/MS [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2011, 88: 1-14.
- [2] 王力清, 陈洪涛, 廖继承, 等. 同位素稀释 GC-MS/MS 方法测定油脂中 3-MCPD 脂肪酸酯和缩水甘油脂肪酸酯的总量 [J]. *农业机械*, 2011, 23(8): 61-63.