

# 使用 Agilent 8890 GC 与 Agilent 5977B GC/MSD 联用系统测定婴儿配方奶中的 2-MCPD 和 3-MCPD 脂肪酸酯

## 作者

Youjuan Zhang, Xia Yang 和  
Shuai Wang  
安捷伦科技（上海）有限公司  
中国上海，邮编 200131

## 摘要

本应用简报介绍了一种可靠的分析方法，用于测定婴儿配方奶中的 3-氯丙烷-1,2-二醇 (3-MCPD) 和 2-氯丙烷-1,3-二醇 (2-MCPD) 脂肪酸酯。评估了两种用于样品前处理的衍生化试剂：七氟丁酰基咪唑 (HFBI) 和苯硼酸 (PBA)。使用 Agilent 8890 GC 与 Agilent 5977B GC/MSD 的联用系统进行定性和定量分析。结果证明了此工作流程解决方案在分析婴儿配方奶中单氯丙二醇中的优势。获得了出色的峰形和分离度。回收率结果令人满意，在 86.9%–106.7% 范围内。精密度也表现出色，相对标准偏差小于 15%。

## 前言

对于食用脂肪和食用油，通常会监测其中的单氯丙二醇 (MCPDs)。MCPDs 是食品加工过程中产生的食品污染物。研究发现，食品中的许多 MCPDs 以氯丙二醇脂肪酸酯 (MCPDEs) 的形式存在。在消化过程中，游离形式的 MCPDs 从其酯化形式中释放出来。2-MCPD 和 3-MCPD 及其脂类的化学结构如图 1 所示。

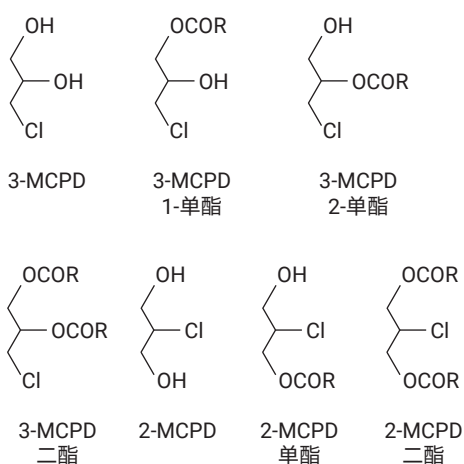


图 1. 2-MCPD 和 3-MCPD 及其脂类的化学结构

有两种测定 MCPDEs 的常用分析方法：直接测定和间接测定。通过 LC/MS 直接分析 MCPDEs 不会破坏其分子结构。由于 MCPDEs 的多样性以及不同基质中 MCPDEs 的差异，使用直接 LC/MS 方法进行定量分析需要相应的标准品和内标。MCPDEs 的间接测定需要将 MCPD 从其酯化形式中裂解出来，因此所需的标准品更少。有多种用于间接分析食品中 MCPDEs 的标准分析方法，例如：AOCS 2013a<sup>[1]</sup>、AOCS 2013b<sup>[2]</sup>、AOCS 2013c<sup>[3]</sup>、ISO 18363-1<sup>[4]</sup>、ISO 18363-2<sup>[5]</sup>、

ISO 18363-3<sup>[6]</sup>、GB 5009.191-2016<sup>[7]</sup> 和 SN/T 5220-2019<sup>[8]</sup>。这些间接方法都遵循类似的方案：裂解 MCPD、样品净化、衍生化和 GC/MS 分析。其中具有挑战性的步骤是将 MCPD 从其酯化形式中裂解出来（酯交换）以及衍生化反应。MCPDs 的裂解在酸性或碱性条件下进行，生成脂肪酸甲酯和 MCPDs。由于 MCPDs 的低挥发性和高极性，在 GC/MS 分析之前必须进行样品衍生化。虽然间接方法存在挑战且样品前处理复杂，但间接方法比直接方法更为流行。由于间接测定的标准品成本低、方法通用性更强，因此间接方法通常应用更多。

MCPDEs 可能存在于各种类型的加工食品中。许多研究已经报告了关于油中 MCPDs 的分析<sup>[9]</sup>，但少有牛奶基质中 MCPDs 分析的相关报告。本应用简报介绍了在单次分析中同时测定婴儿配方奶中的 2-MCPD 和 3-MCPD 脂肪酸酯的分析流程。该方法首先进行酸催化酯裂解，然后用 HFBI 或 PBA 衍生化裂解的（游离）分析物，最后进行 GC/MS 分析。对样品前处理和 GC/MS 条件均进行了优化，并评估了分析方法的性能。

## 实验部分

### 化学品与试剂

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。水为超纯水，来自纯化系统。正己烷、四氢呋喃 (THF)、庚烷、硫酸（纯度 ≥ 95%）、甲醇、丙酮、七氟丁酰基咪唑 (HFBI，纯度 ≥ 99%)、rac 1,2-双棕榈酰-3-氯丙二醇（纯度 ≥ 98%）、rac 1,2-双棕榈酰-3-氯丙二醇-d<sub>5</sub>（纯度 ≥ 99%）、

1,3-二硬脂酰-2-氯丙二醇（纯度 ≥ 98%）、1,3-二硬脂酰-2-氯丙二醇-d<sub>5</sub>（纯度 ≥ 98%）和苯硼酸 (PBA，纯度 ≥ 98%) 购自上海安谱实验科技股份有限公司，碳酸氢钠（纯度 ≥ 99.5%）购自百灵威科技有限公司，硫酸钠（纯度 ≥ 99%）购自国药集团化学试剂有限公司。

### 溶液与标准品

- 使用己烷作为溶剂配制 MCPD 酯的储备液
- 取 1.8 mL 硫酸加入 100 mL 容量瓶，用甲醇定容至刻度线，制备硫酸/甲醇溶液（1.8%，体积分数）
- 称取 9.6 g 碳酸氢钠称置于 100 mL 容量瓶中，用超纯水定容至刻度线，配制碳酸氢钠溶液（9.6%，质量浓度）。进行超声水浴，确保试剂完全溶解
- 称取 2.5 g 苯硼酸，加入 20 mL 丙酮/超纯水混合物（19/1，体积分数），制备苯硼酸溶液（PBA 溶液）。剧烈振摇混合物
- 称取 20 g 硫酸钠置于 100 mL 容量瓶中，用超纯水定容至刻度线，配制硫酸钠溶液（20%，质量浓度）。进行超声水浴，确保试剂完全溶解

## 样品前处理和校准标样配制

婴儿配方奶样品购自当地超市。完整的样品前处理流程如图 2 所示。样品前处理过程包括四个主要部分：样品萃取、酸催化酯交换、样品净化以及用 HFBI 或 PBA 衍生化裂解的（游离）分析物。所有样品的前两个步骤（样品萃取和酸催化酯交换）相同。后两个步骤（净化和衍生化）具体取决于所用的衍生化试剂。用户可以

根据自己的偏好和实验室情况选择上述两种样品前处理步骤之一。

使用纯净的婴儿配方奶样品进行整个样品前处理流程，得到基质空白。在样品萃取后和酸催化酯交换之前，将标准溶液加标到基质中，制备基质匹配校准标样。校准标样浓度对应于 10、20、50、100、200、500、1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （游离态当量）。本研究中提到的浓度水平均相当于

MCPD 游离形式。分别使用 Rac 1,2-双棕榈酰-3-氯丙二醇- $\text{d}_5$  和 1,3-二硬脂酰-2-氯丙二醇- $\text{d}_5$  作为 3-MCPD 和 2-MCPD 酯的内标。制备浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的内标。将适量的标准工作溶液加标至婴儿配方奶中，涡旋 1 分钟，静置 5 分钟，使样品萃取过程达到平衡，获得预加标质量控制 (QC) 样品。根据校准曲线定量分析 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  QC 样品，重复测定五次。

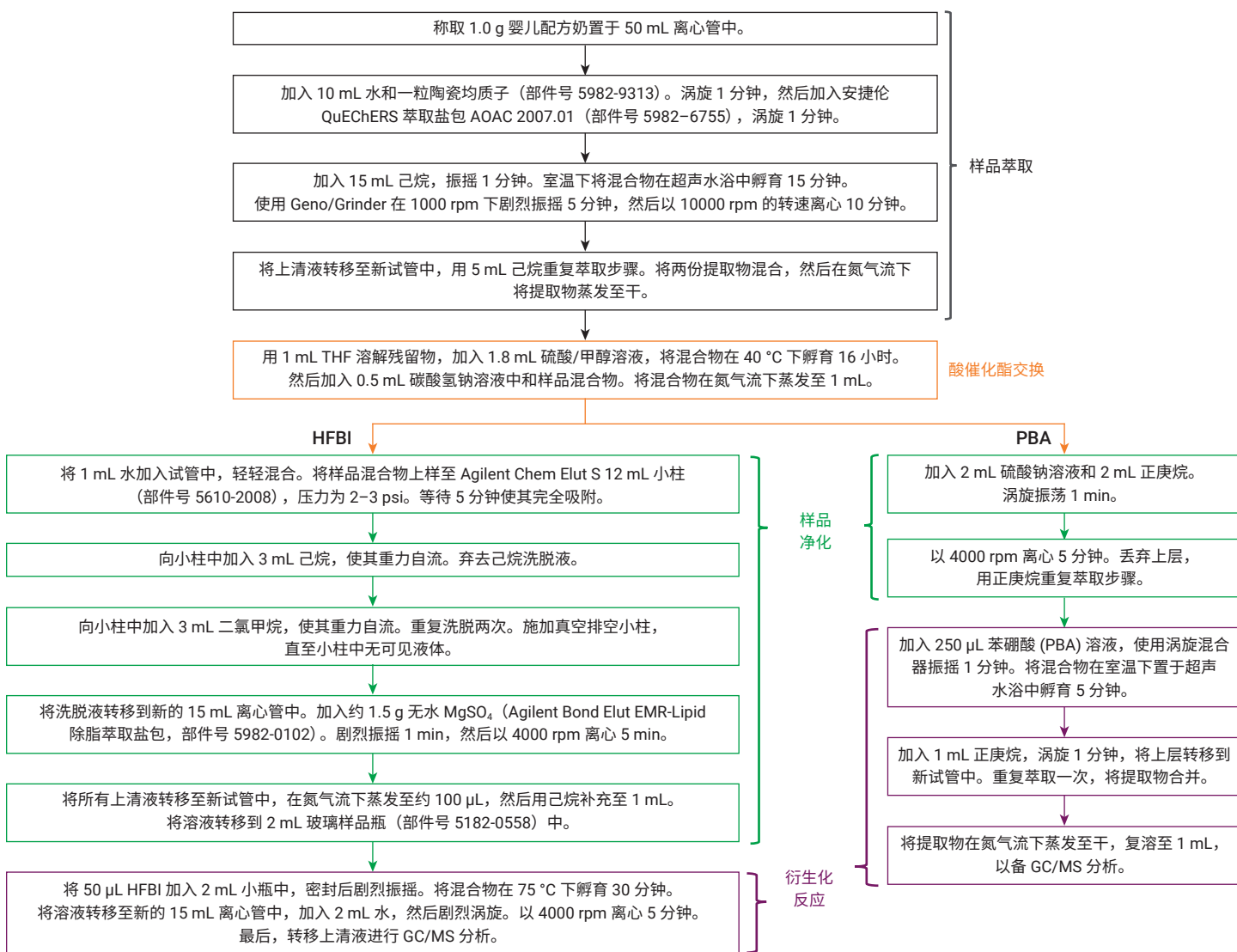


图 2. 使用 HFBI 或 PBA 作为衍生化试剂的样品前处理详细步骤

## 仪器与材料

样品前处理所用的设备和材料包括：

- SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Eppendorf 离心机 (Hamburg, Germany)
- Agilent Vac Elut 20 真空萃取装置 (部件号 12234101)
- 安捷伦 QuEChERS 萃取盐包, AOAC 2007.01 方法 (部件号 5982-6755)
- Agilent Bond Elut EMR-Lipid 除脂萃取盐包, 3.5 g 无水 MgSO<sub>4</sub> (部件号 5982-0102)
- 安捷伦陶瓷均质子, 用于 50 mL 管 (部件号 5982-9313)
- Agilent Chem Elut S, 3 mL 样品, 12 mL 管 (部件号 5610-2008)

## 仪器条件

在 Agilent 8890 GC 与 Agilent 5977B GC/MSD 的联用系统上进行分析。仪器条件列于表 1。

表 1. MCPD 分析的条件

参数	值
进样量	1 µL
进样口	分流/不分流; 温度: 280 °C; 不分流模式, 0.75 min 时吹扫流速 60 mL/min
进样口衬管	安捷伦超高惰性不分流单锥衬管, 带玻璃毛 (部件号 5190-2293)
色谱柱	Agilent J&W DB-5ms 超高惰性气相色谱柱, 30 m × 0.25 mm, 1 µm (部件号 122-5533UI)
载气	氦气, 1 mL/min, 恒流
柱温箱升温程序	<b>HFBI 衍生物:</b> 50 °C (保持 1 分钟), 以 20 °C/min 升至 90 °C, 以 2 °C/min 升至 100 °C (保持 4 分钟), 然后以 30 °C/min 升至 300 °C; 后运行温度: 310 °C, 后运行流速: 3 mL/min, 后运行时间: 5 min <b>PBA 衍生物:</b> 50 °C (保持 1 分钟), 以 25 °C/min 升至 180 °C (保持 2 分钟), 以 2 °C/min 升至 190 °C (保持 2 分钟), 然后以 30 °C/min 升至 230 °C (保持 10 分钟); 后运行温度: 310 °C, 后运行流速: 3 mL/min, 后运行时间: 5 min
传输线温度	280 °C
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
采集模式	SIM
电子倍增器电压增益模式	2
溶剂延迟	5 min
调谐文件	Etune.u

## 结果与讨论

### 色谱图

本研究在配备分流/不分流进样口的 8890 GC 系统和配备电子电离 (EI) 离子源的 5977B GC/MSD 上进行。在选择离子监测 (SIM) 模式下采集 MSD 数据, 并通过 Agilent MassHunter 软件进行分析。2-MCPD 和 3-MCPD 的定量分别基于 2-MCPD-d<sub>5</sub> 和 3-MCPD-d<sub>5</sub> 的信号比。图 3 和图 4 显示了婴儿配方奶中目标化合物的提取离子色谱图 (EIC), 其中加标浓度为 200 µg/kg, 使用 HFBI 进行了衍生化。系统显示出优异的分离度。目标化合物 (包括内标) 实现了基线分离。图 5 显示了

200 µg/kg 加标浓度以及 PBA 衍生化下的 EIC 迹线。与 HFBI 相比, 使用 PBA 时, 内标和目标化合物的分离并不理想。这些共洗脱化合物不会产生相同 MSD 片段, 因此可以提取每种化合物的独有离子并单独处理。在色谱图中, 可以看到在目标化合物之前和之后洗脱许多非目标峰, 这些峰来自样品前处理中的多步反应。MassHunter 软件的后运行功能用于更高的柱温箱温度和色谱柱流速。这种后运行功能可以缩短分析时间、提高样品通量、减少 MSD 污染。虽然本研究未使用柱后反吹装置, 但我们仍建议使用柱后反吹, 以有效保护色谱柱, 减少色谱柱和 MSD 的污染。

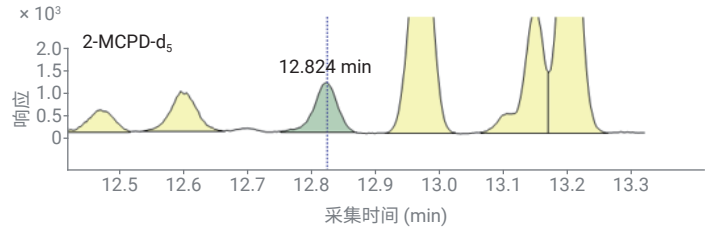
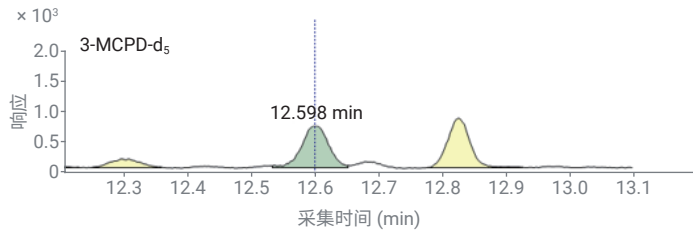
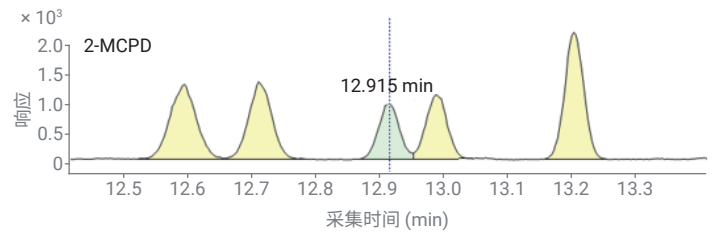
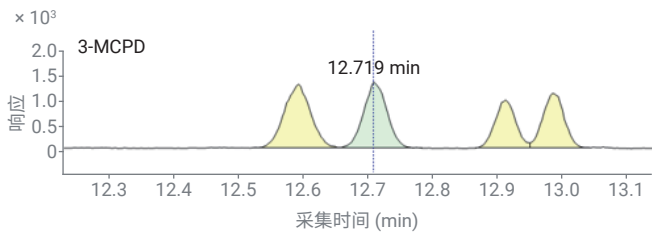


图 3. 采用 HFBI 衍生化的目标化合物的 GC/MSD EIC 迹线 (婴儿配方奶中加标浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

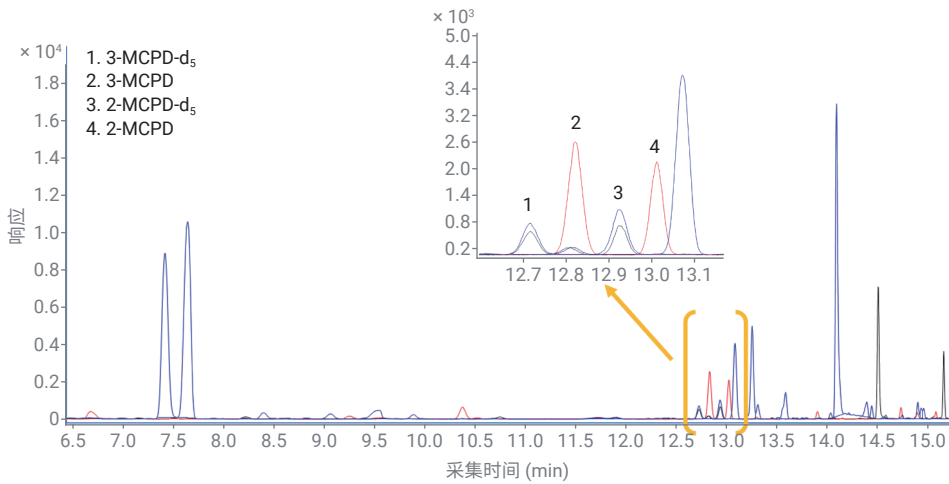


图 4. HFBI 衍生物的 GC/MSD EIC 迹线 (婴儿配方奶中加标浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

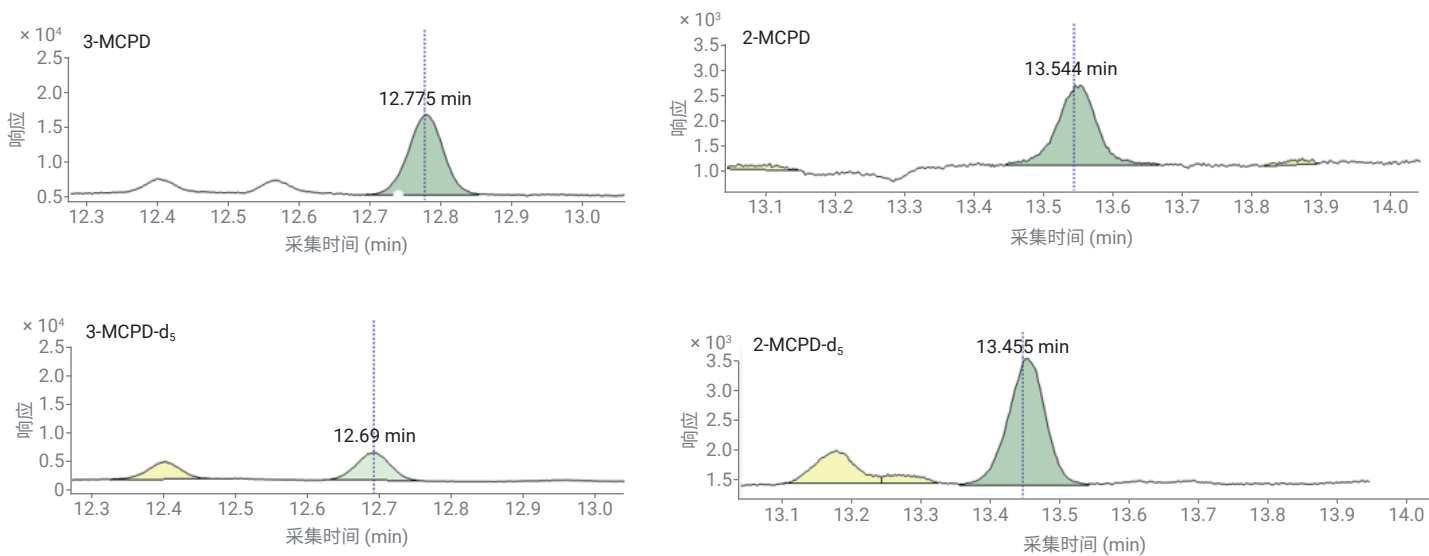


图 5. 采用 PBA 衍生化的目标化合物的 GC/MSD EIC 迹线 (加标浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

## 方法优化

**色谱柱评估:** 在选择毛细管 GC 色谱柱时, 固定相和色谱柱规格是最重要的考虑因素。在 GB5009.191-2016 和 SN/T5220-2019 方法中, 建议使用规格为 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  的低极性色谱柱。但使用 HFBI 作为衍生化试剂时, 3-MCPD 和 2-MCPD 无法在 Agilent J&W HP-5ms, 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  超高惰性色谱柱上实现基线分离, 3-MCPD 和 2-MCPD 使用相同的定量离子 ( $m/z$  289) 实现高灵敏度。本研究使用具有更厚薄膜的 Agilent J&W DB-5ms, 30 m  $\times$  0.25 mm, 1  $\mu\text{m}$  超高惰性色谱柱, 以提高分离度。

**盐包评估:** 在样品萃取过程中, 向 1 g 婴儿配方奶中加入 10 mL 水和 1 粒陶瓷均质子, 然后加入 15 mL 己烷进行萃取。在己烷萃取过程中发生乳化现象。不过向样品中加入盐后, 观察到水相和有机相明显分离。加入的盐提高了水相的离子强度, 有利于脂质分配到有机相中, 有效降低了乳化作用。本研究采用 QuEChERS 萃取盐包 (AOAC 2007.01 方法), 不同层之间分离清晰, 萃取效率稳定, 回收率高。

**使用 HFBI 衍生化的净化评估:** 可通过不同的流程净化样品。比较了 Agilent Chem Elut S 12 mL 固相支持液液萃取 (SLE) 小柱和传统液/液萃取 (LLE)。使用 Chem

Elut S 的详细步骤见图 2。使用二氯甲烷作为洗脱溶剂, 在离心管中进行 LLE。为提高萃取效率, 使用涡旋混合器充分混合样品。离心后, 二氯甲烷位于下层以待收集。将上层水层转移到新试管中进行重复萃取, 操作时需要格外小心。重复该过程三次, 有效地提取目标分析物, 将二氯甲烷层合并。两个净化过程的响应结果相似, 但 LLE 更耗费时间和人力。与 LLE 相比, SLE 萃取流程无需人员值守, 也无需特殊预防措施。SLE 方法耗费的人力更少, 使样品萃取变得更加简单, 且显著提高了效率和通量。因此, 本研究使用 SLE 以简化工作流程。

**使用 HFBI 衍生化的溶剂评估：**在衍生化前的净化过程中，使用二氯甲烷作为洗脱溶剂。考察了己烷和二氯甲烷这两种溶剂用于衍生化反应，以及用作 MCPD 衍生物最终样品溶剂的影响。如图 6 所示，使用己烷作为样品溶剂时 3-MCPD 和 2-MCPD 的响应更高，即灵敏度更高。因此，在 SLE 样品净化和除水后，将收集的洗脱液（二氯甲烷）在氮气流下蒸发至约 100  $\mu$ L。然后用己烷将样品复溶至 1 mL，再进行衍生化反应。

### 方法验证

MCPD 化合物具有高极性、高沸点，可能导致峰形问题。为改善峰形和灵敏度，在 GC 分析之前通常会对 MCPD 化合物进行衍生化。选择合适的衍生化试剂对于方法成功至关重要。反应速度、易操作性、产生的潜在干扰副产物和选择性都是需要考虑的因素。在 GB5009.191-2016 方法中推荐使用 HFBI 衍生化试剂，而

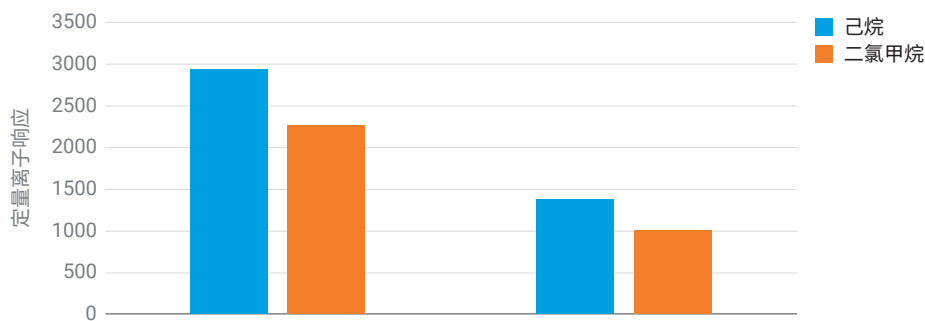


图 6. 采用 HFBI 衍生化的情况下，不同样品溶剂的对比

在 ISO 18363-3、AOCS Cd 29a 和 SN/T5220-2019 方法中使用的是 PBA。对于 HFBI 方法，衍生化试剂对水敏感，有水情况下衍生化反应会失败。因此，在 HFBI 衍生化前完全去除水分非常关键。同时应注意 HFBI 的储存，要避免试剂因受潮而失效。HFBI 方法相对于 PBA 方法的优点是，PBA 仅与二醇反应生成非极性环状产物，而 HFBI 可以与所有亲核分子反应。因此在测定 2-MCPD 和 3-MCPD

时，通常选择 PBA 作为衍生化试剂。HFBI 更适合用于同时测定 MCPD 和二氯丙醇。使用质谱进行检测时，HFBI 衍生物可以选择高片段离子，以避免低分子量化合物形成干扰。相比 HFBI 方法，PBA 方法的优点在于更简单、更省时。对于 PBA，可以在有水的情况下进行衍生化反应，并且所需反应时间更短。本研究对 HFBI 和 PBA 均进行了评估，两者均实现了令人满意的性能。

**HFBI 方法:** 本研究通过考察线性、重现性、检测限和回收率,对采用 HFBI 衍生化的定量方法进行了评估。根据在 10–1000 µg/kg 浓度范围内制备的基质匹配校准标样,两种分析物的相关系数 ( $R^2$ )  $\geq 0.997$ 。校准曲线如图 7 所示。通过 10、100 和 1000 µg/kg 加标样品的 8 次进样评估重现性 (浓度 %RSD)。表 2 列出了浓度 RSDs, 范围在 0.5%–3.1% 之间, 表明具有出色的重现性。对 10 µg/kg 低浓度基质匹配校准标样进行 8 次重复进样, 计算检测限。3-MCPD 和 2-MCPD 的检测限分别为 1.35 µg/kg 和 1.30 µg/kg。根据 200 µg/kg 加标样品的 5 次重复测定, 计算回收率和精密度。如表 3 所示, 3-MCPD 和 2-MCPD 的平均回收率分别为 86.9% 和 106.7%,  $RSD < 15\%$ 。

**PBA 方法:** 对于 PBA 方法, 将相同加标浓度的 200 µg/kg 样品作为 QC 样品分析, 进行方法验证。详细的定量结果如表 3 所示。两种分析物均获得了 80%–120% 的可接受回收率,  $RSD < 10\%$ 。

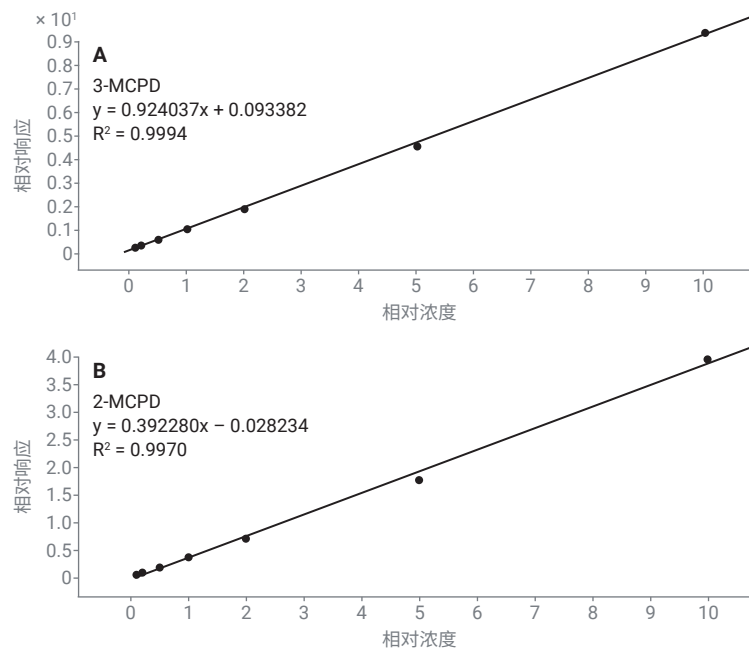


图 7. A) 3-MCPD HFBI 衍生物和 B) 2-MCPD HFBI 衍生物的校准曲线 (10–1000 µg/kg)

表 2. HFBI 衍生物的方法定量结果

化合物名称	保留时间 (min)	浓度 RSD% (n = 8)			检测限 (µg/kg)
		10 µg/kg	100 µg/kg	1000 µg/kg	
3-MCPD	12.820	3.1	1.3	0.5	1.35
2-MCPD	13.012	2.1	1.6	1.3	1.30

表 3. 200 µg/kg QC 样品的回收率和精密度结果 (n = 5)

化合物名称	HFBI			PBA		
	定量离子	平均回收率 (%)	RSD%	定量离子	平均回收率 (%)	RSD%
3-MCPD	289	86.9	14.3	147	103.4	9.2
2-MCPD	289	106.7	5.8	198	100.9	4.2

## 结论

本应用简报介绍了同时测定婴儿配方奶中 2-MCPD 和 3-MCPD 脂肪酸酯的解决方案。我们开发了两种使用不同的衍生化试剂进行样品前处理的可靠、稳定的工作流程。使用 Agilent 8890 GC 系统与 Agilent 5977B GC/MSD 进行数据采集和分析。通过 HFBI 衍生物的线性、检测限、回收率和精密度对方法进行了验证。还评估了 PBA 衍生物的回收率和精密度结果。两种样品前处理流程均获得了满意的结果，可作为婴儿配方奶中 MCPD 酯分析的实用参考。

## 参考文献

1. 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification. *American Oil Chemist Society (AOCS)* **2013**
2. Determination of Bound Monochloropropanediol-(MCPD-) and Bound 2,3-Epoxy-1-Propanol (Glycidol-) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (2013). *American Oil Chemist Society (AOCS)* **2013**
3. Fatty-Acid-Bound 3-Chloropropane-1,2-Diol (3-MCPD) and 2,3-Epoxy-Propane-1-ol (Glycidol), Determination In Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement). *American Oil Chemist Society (AOCS)* **2013**
4. Animal and Vegetable Fats and Oils—Determination of Fatty-Acid-Bound Chloropropanediols (MCPDs) and Glycidol by GC/MS—Part 1: Method Using Fast Alkaline Transesterification and Measurement for 3-MCPD and Differential Measurement for Glycidol. *International Organization for Standardization* **2015**, ISO 18363-1:2015
5. Animal and Vegetable Fats and oils—Determination of Fatty-Acid-Bound Chloropropanediols (MCPDs) and Glycidol by GC/MS—Part 2: Method Using Slow Alkaline Transesterification and Measurement for 2-MCPD, 3-MCPD, and Glycidol. *International Organization for Standardization* **2018**, ISO 18363-2:2018
6. Animal and Vegetable Fats and Oils—Determination Of Fatty-Acid-Bound Chloropropanediols (MCPDs) and Glycidol by GC/MS—Part 3: Method Using Acid Transesterification and Measurement for 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol. *International Organization for Standardization* **2017**, ISO 18363-3:2017
7. Determination of Chloropropanol And its Fatty Acid Esters in Food. *National Food Safety Standard* **2016**, GB 5009.191-2016
8. Determination of 3-Chloropropanol Esters (3-MCPDE) and Glycidol Esters GE in Food Products for Export—Gas Chromatography Mass Spectrometry Method. **2019**, SN/T 5220-2019
9. Arisseto, A.; Marcolino, P. Determination of 3-MCPD Diesters and Monoesters in Vegetable Oils and Fats (测定植物油和脂肪中的 3-MCPD 二酯和单酯), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-3406EN, **2013**

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE44301.716712963

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021  
2021年4月16日，中国出版  
5994-3233ZH-CN

