

气相色谱-质谱联用法测定香肠中3种单甘油酯

贾海涛, 马育松, 陈瑞春

(河北出入境检验检疫局, 河北 石家庄 050051)

摘要: 建立一种气相色谱-质谱联用检测香肠中3种单甘油酯含量的方法。3种单甘油酯分别为单辛酸甘油酯、单癸酸甘油酯和单月桂酸甘油酯。样品以二氯甲烷-正己烷(1:1)提取, 提取液经浓缩后, 经凝胶渗透色谱净化, 气相色谱-质谱联用检测和确证, 外标法定量。本方法测定低限为50 mg/kg。3种单甘油酯在20~1 000 µg/mL范围呈良好线性, 线性相关系数不小于0.999 6。回收率范围在81.3%~105%, 测定结果的相对标准偏差($n=8$)为3.64%~8.56%。该方法具有快速、简便、准确度高、精密度高的特点, 适用于香肠中3种单甘油酯的测定。

关键词: 气相色谱-质谱联用; 香肠; 单甘油酯

Determination of Three Monoglycerates in Sausage by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

JIA Hai-tao, MA Yu-song, CHEN Rui-chun

(Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A method for the determination of three monoglycerate, mono-glycerate glycerate monocaprylin, glyceryl monodecanoate and glyceryl monolaurate, in sausage by GC-MS was established. Samples were extracted with dichloromethane-*n*-hexane (1:1), and the extract was concentrated, purified by gel permeation chromatography (GPC), and detected and confirmed by GC-MS. The quantitative analysis was conducted by using an external standard method. The limit of quantification was 50 mg/kg. Satisfactory linearity was observed with a correlation coefficient of no less than 0.999 6 in the concentration range of 20–1 000 µg/mL. Spiked recoveries were in the range of 81.3%–105% with RSD of 3.64%–8.56% ($n=8$). The method is rapid, convenient, accurate and precise, which can be applied to determine monoglycerate in sausage.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); sausage; monoglycerate

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)06-0094-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201406019

单甘油酯就是甘油分子中的3个羟基之一与有机酸脱水缩合成的单酯化合物, 由于它具有一个亲油的长链烷基和两个亲水的羟基, 因而具有很好地亲油亲水能力, 被广泛应用于食品工业中。在食品工业中, 单脂肪酸甘油酯主要作为乳化剂和稳定剂使用, 其用量占食品乳化剂总用量的70%左右, 添加在食品中可起到乳化、起酥、膨松和保鲜的作用。可用于糕点、饮料、肉制品等食品中^[1]。单辛酸甘油酯、单癸酸甘油酯和单月桂酸甘油酯是目前在食品中使用比较广泛的3种单甘油酯。单辛酸甘油酯是一种新型无毒高效广谱防腐剂, 它在人体内和脂肪一样, 能分解代谢, 无任何积蓄和不良反应。单月桂酸甘油酯是一种亲脂性的非离子型表面活性剂, 天然存在于母乳和美洲蒲葵中, 是一种优良的食品乳化剂, 同时又是一种国际公认的安全、高效、广谱的抑菌剂。单月桂酸甘油酯同时也是一种天然防腐剂, 抑菌效果不受酸度大小的影响且抗菌谱广, 对食品中常见

细菌均有较强作用, 同时还具有抑制多种病毒和原生动物的功效, 美国食品与药物管理局于1977年批准该产品为“一般公认安全”食品添加剂^[2-3]。

中国与世界各国和组织对于单甘油酯类的使用都有相关的规定, GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》中规定: 单辛酸甘油酯常用作面制品防腐剂, 用于豆馅、蛋糕、月饼、湿切面, 其最大使用量为1.0 g/kg; 用于肉肠为0.5 g/kg; 单月桂酸甘油酯作为食品乳化剂可在各类食品中按生产需要适量使用^[4]。日本食品添加剂公定书第八版中规定单甘油酯类为不需限量使用的食品防腐剂, 可应用于所有食品。国际食品法典委员会规定单甘油酯类可应用于各种食品, 并且未规定最大使用量。欧盟规定单甘油酯类可在各类食品中使用, 最大使用量范围为5~10 g/kg。

目前尚无单甘油酯检测的国际标准和国家标准, 相关的文献报道主要是应用气相色谱法、液相色谱法测定

收稿日期: 2013-05-06

基金项目: 国家标准化管理委员会资助项目(2009B52)

作者简介: 贾海涛(1978—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。E-mail: ciq_jiahait@sina.com

单甘油酯产品的含量^[5-25],而对于食品中单甘油酯的检测方法文献报道较少,均是对某一种单甘油酯进行测定并且样品前处理需甲酯化,操作步骤复杂^[12],这就造成食品检验方面的缺陷,产品结论的判定有很大的风险,因此,建立单甘油酯的检测方法很有意义。本实验通过凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)技术,优化净化条件,确立气相色谱-质谱联用检测香肠中3种单甘油酯的方法,也为其他单甘油酯的检测提供了思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

香肠,自制(把猪肉制成肉馅,灌入肠衣中,通风处晾干即得)。

二氯甲烷、正己烷、丙酮、乙酸乙酯、环己烷(均为色谱纯) 美国Dikma公司;正己烷-二氯甲烷(1:1, V/V, 量取50 mL二氯甲烷和50 mL正己烷混合);乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V, 量取50 mL乙酸乙酯和50 mL环己烷混合);单辛酸甘油酯(CAS: 19670-49-6)、单癸酸甘油酯(CAS: 26402-22-2)、单月桂酸甘油酯(CAS: 142-18-7)标准品(纯度均不低于99%)上海安谱公司。

标准溶液配制:分别适量称取单甘油酯标准品,用丙酮溶解并定容,配制成10 mg/mL的单一标准储备液,于4℃冰箱保存。使用前再根据需要将标准储备液用正己烷稀释成适当质量浓度的标准工作液。

1.2 仪器与设备

7890A气相色谱仪、5975C质谱仪 美国安捷伦公司;PT3100均质器 瑞士Kinematic公司;VORTEX-2 GENE漩涡混合器 美国Scientific Industries公司;KN-70型离心机 日本Kubota公司;MPS凝胶色谱样品净化系统 美国J2Scientific公司;LABOROTA 4000旋转蒸发器 德国Heidolph公司;TurboVap氮气吹干仪美国Zymark公司;0.22 μm有机系滤膜。

1.3 方法

1.3.1 提取

称取试样2 g(精确至0.01 g)于50 mL离心管中,加入15 mL正己烷-二氯甲烷(1:1),10 000 r/min均质提取2 min,再超声提取10 min,4 000 r/min离心10 min,将上清液经滤纸过滤至50 mL鸡心瓶中。再用10 mL正己烷-二氯甲烷(1:1, V/V)重新提取残渣一次,合并提取液于同一鸡心瓶中,于40℃旋转蒸发至0.5 mL左右,将浓缩液转移至10 mL离心管中,用5 mL乙酸乙酯-环己烷(1:1)分两次洗涤鸡心瓶,合并溶液至上述10 mL离心管中,用乙酸乙酯-环己烷(1:1)定容至刻度。

1.3.2 净化

以上溶液用GPC系统按照净化程序进行净化,收集的洗脱液于40℃旋转蒸发至溶液体积少于2 mL,溶液转移至离心管中,用5 mL正己烷分两次洗涤残渣,合并溶液至离心管中,于40℃氮气吹干至少2 mL,正己烷定容至2 mL,经0.22 μm有机滤膜过滤,供气相色谱-质谱分析。

1.3.3 气相色谱条件

色谱柱:DB-5MS石英毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);升温程序:150℃保持10 min,以20℃/min升至280℃,保持5 min;进样口温度:300℃;载气:氮气,纯度≥99.999%;载气流速:恒流模式 1 mL/min;进样方式:不分流;开阀时间:1 min;进样量:2 μL。

1.3.4 GPC条件

GPC柱:200 mm×22 mm,填料:S-X3 Bio-Beads,粒径38~75 μm;流动相:乙酸乙酯-环己烷(1:1);流速:4.7 mL/min;进样量:5 mL;净化程序:0~8 min弃去洗脱液,8~12.5 min收集洗脱液。

1.3.5 质谱条件

离子源:电子电离;离子源温度:230℃;电离能量:70 eV;接口温度:300℃;扫描方式:选择离子监测;3种单甘油酯的选择离子及相对丰度见表1。

表1 3种单甘油酯的选择离子及相对丰度
Table 1 Selected ions and relative ion intensities for three monoglycerates

组分	单辛酸甘油酯				单癸酸甘油酯				单月桂酸甘油酯			
选择离子(<i>m/z</i>)	127*	145	187	158	141*	159	201	172	183*	98	201	243
相对丰度/%	100	30	15	8	100	31	15	9	100	65	36	18

注:*,定量离子。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

表2 提取溶剂的选择(添加量500 mg/kg)
Table 2 Selection of the optimal extraction solvent at the spiked level of 500 mg/kg

提取溶剂	mg/kg		
	单辛酸甘油酯	单癸酸甘油酯	单月桂酸甘油酯
乙酸乙酯	100	40	250
乙腈	50	35	300
丙酮	125	60	325
二氯甲烷	475	480	250
甲醇	150	170	25
乙醇	100	100	100
正己烷	200	250	485
正己烷-二氯甲烷(3:1)	410	415	475
正己烷-二氯甲烷(2:1)	430	430	470
正己烷-二氯甲烷(1:1)	473	477	470
正己烷-二氯甲烷(1:2)	470	470	430
正己烷-二氯甲烷(1:3)	475	475	410

3种单甘油酯都溶于乙醇、乙酸乙酯、氯仿及其他氯化烃或苯,本方法选择乙酸乙酯、乙腈、丙酮、二氯甲烷、甲醇、乙醇和正己烷作为提取溶剂进行提取效率实验。采用自制香肠的方法,在制作香肠时定量加入这3种单甘油酯,添加量为500 mg/kg。结果发现,二氯甲烷对单辛酸甘油酯和单癸酸甘油酯的提取效率最高、正己烷对单月桂酸甘油酯的提取效率最高,所以首先确定用正己烷和二氯甲烷混合溶液作为提取溶剂。然后对两者的混合比例进行实验比较,考察正己烷和二氯甲烷体积比分别为3:1、2:1、1:1、1:2、1:3条件下的提取效果,结果发现当正己烷和二氯甲烷的比例为1:1时,提取效率最好,结果见表2。

2.2 净化条件的选择

提取液用气相色谱-质谱仪直接测定,其干扰比较明显。主要是基质中蛋白质和油脂产生的干扰,所以采用GPC进行净化,经实验发现,可以较好地去除基质的干扰。GPC又称为尺寸排阻色谱,它是按溶质分子大小进行分离的一种色谱技术。它可有效去除样品中脂类、色素、蛋白等大分子干扰物,常用于脂肪含量较高的动物源性食品的净化。在净化过程中,采用系统自带的紫外检测器结合分段采集分析的方法确定并收集流出物,以确定合适的收集时间段,结果见图1。结果表明脂类、蛋白及绝大多数色素干扰物在8 min前流出GPC柱,而3种单甘油酯混合物的流出时间为8~12.5 min,所以确定GPC净化程序为0~8 min弃去洗脱液,8~12.5 min收集洗脱液,尽管仍有部分杂质,但通过气相色谱的分离,不干扰目标组分的测定。

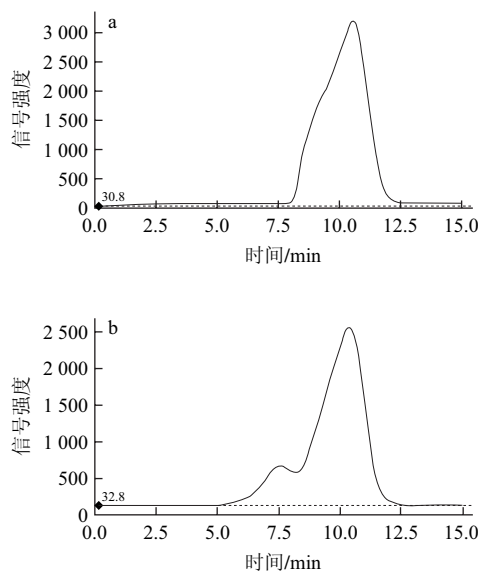


图1 3种单甘油酯混合标准溶液(a)和添加3种单甘油酯的香肠提取物(b)的GPC色谱图

Fig.1 GPC chromatograms of (a) mixed standard solution of three monoglyceride; (b) extracts of sausage spiked with three monoglycerides

实验过程中发现,在进行浓缩的过程中,提取液不能吹干,并且浓缩时的温度也要控制在40℃以下,否则待测组分的回收率很低,考虑原因可能是溶液由于吹干以后再复溶时不能充分溶解,所以在浓缩过程中要控制好浓缩温度并且防止提取液被吹干。

2.3 气相色谱条件的选择

在优化气相色谱法条件时,根据待测物沸点高,不容易气化,极性较强的性质,比较DB-5、DB-1301、DB-5MS、INNOWax和FFVP毛细管色谱柱,以较高温度为起始温度,两阶升温程序,发现用DB-5MS毛细管色谱柱时峰形最理想。

2.4 质谱条件的优化

首先利用全扫描采集方式,根据各组分的全扫描质谱图(图2)以及背景干扰情况,选择各组分的定量及定性离子。为减少干扰,提高方法的选择性和灵敏度,本实验采用选择离子监测法,尽量选择丰度高、高质量端的离子进行定性和定量。根据样品中各组分的离子种类和各离子的相对丰度,结合保留时间,在不增加前处理步骤的情况下,可以对疑为阳性的样品进行确证。香肠空白样品以及测定低限的气相色谱-质谱图见图3。

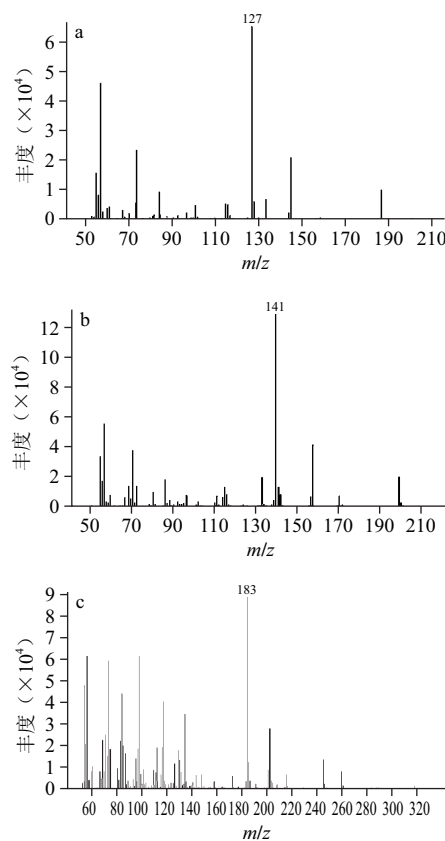


图2 单辛酸甘油酯(a)、单癸酸甘油酯(b)和单月桂酸甘油酯(c)的全扫描质谱图

Fig.2 Full scan mass spectra of glycerate mono-caprylin (a), glycerol monodecanoate (b) and glycerol monolaurate (c)

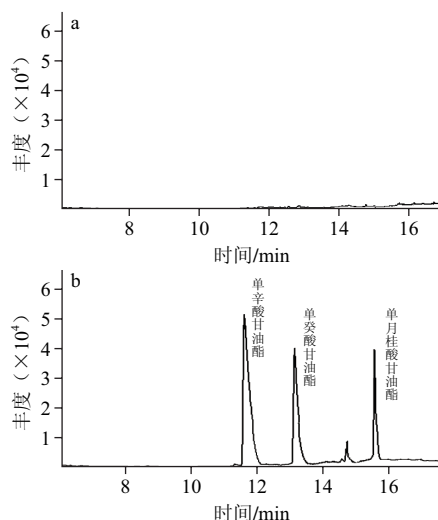


图3 香肠空白样品 (a) 以及测定低限 (b) 的气相色谱-质谱图
Fig.3 GC-MS profile of sausage blank sample (a) and GC-MS profile for the limit of quantification (b)

2.5 线性范围及测定低限

将各单甘油酯标准储备液逐级稀释为20、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合标准工作溶液, 在选定的气相色谱-质谱条件下进样测定, 以被测物峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 得出线性方程和相关系数, 3种单甘油酯在20~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系, 其相关系数不小于0.999 6。将一定质量浓度标准品添加到自制香肠中, 经过前处理和上机检测分析, 当 R_{SN} 为10时作为分析方法的测定低限实验方法, 实际测定低限为50 mg/kg 。3种单甘油酯的线性回归方程线性、相关系数以及测定低限见表3。

表3 3种单甘油酯的线性方程、线性相关系数和测定低限
Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients and limit of quantification of three monoglycerates

化合物名称	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	线性回归方程	相关系数	测定低限/ (mg/kg)
单辛酸甘油酯	20~1 000	$y=10.46x-232.93$	0.999 6	50
单癸酸甘油酯	20~1 000	$y=9.551x-246.41$	0.999 7	50
单月桂酸甘油酯	20~1 000	$y=7.321x-152.31$	0.999 9	50

2.6 回收率实验

表4 3种单甘油酯的回收率及其精密度的实验数据 ($n=8$)
Table 4 Spiked recoveries and RSD of 3 monoglycerates ($n=8$)

单甘油酯	添加水平/ (mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
单辛酸甘油酯	50	88.4~105	6.47
	100	81.3~97.7	6.37
	200	92.4~103	3.64
单癸酸甘油酯	50	81.7~91.3	6.44
	100	81.5~91.2	3.66
	200	88.4~101	4.27
单月桂酸甘油酯	50	83.5~101	8.56
	100	84.2~103	7.88
	200	88.2~101	5.30

本方法在自制香肠中添加3种单甘油酯标准储备溶液进行回收率实验, 添加水平为50、100、200 mg/kg ,

按照选定的实验条件测定, 每个水平平行测定8次, 结果见表4。结果表明, 在以上3个添加水平下, 回收率范围为81.3%~105%, 相对标准偏差范围为3.64%~8.56%, 说明建立的该方法能满足样品的检测要求。如果在实际样品检测中发现有超出线性范围的情况, 可以将样品溶液稀释至线性范围之内再进行测定。

3 结论

本方法建立了GPC净化, 气相色谱-质谱法测定香肠中单辛酸甘油酯、单癸酸甘油酯、单月桂酸甘油酯含量的方法。通过对各项参数的实验, 找出了最佳的提取和净化方法, 使检测仪器参数达到最优化。在选定的仪器条件下, 3种单甘油酯能很好地分离和检测, 方法简便、结果准确, 能满足样品的检测要求。本方法与现有方法相比, 检测单甘油酯的种类多, 通过GPC净化, 净化效果理想, 操作过程简单, 定性定量准确, 灵敏度高, 重现性好, 能满足香肠中3种单甘油酯共同检测的定量和确证要求, 为食品中单甘油酯的检测提供了思路。

参考文献:

- [1] 丁晓莉, 黄会刚, 张大金. 单月桂酸甘油酯的合成及应用[J]. 广东化工, 2000(5): 21-22.
- [2] 冯凤琴, 杜鹤, 王小刘. 食品防腐乳化剂月桂酸单甘油酯及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2009(增刊1): 173-177.
- [3] 修祥菊, 郑尚基, 刘春宪, 等. 新型防腐剂单辛酸甘油酯在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 1997(4): 29-32.
- [4] GB 2760—2011 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [5] 邹建凯. 辛酸甘油酯的气相色谱/质谱分析[J]. 香料香精化妆品, 2002, 12(6): 16-17.
- [6] JAVIER P. ISIDRE C, BOATELLA J, et al. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by HPLC-APCI-MS of triacylglycerols and GC of non-saponifiable compounds[J]. Journal Chromatography A, 2000, 881: 149-158.
- [7] 孔浩辉, 陈翠玲, 汪军霞, 等. 三乙酸甘油酯检测方法的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(2): 215-217.
- [8] 刘传华, 刘师莲, 王小明, 等. 气相色谱法测定油脂中棕榈酸单甘油酯与油酸单甘油酯含量[J]. 色谱, 1998, 16(5): 460-461.
- [9] 冯凤琴, 杨宏杰. 气相色谱法测定月桂酸单甘油酯含量的方法研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(1): 59-63.
- [10] 赵婉娟. 气相色谱法测定食品中防腐剂单辛酸甘油酯[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(11): 1354-1356.
- [11] 张晶, 汤均, 谭莹, 等. 食品中月桂酸甘油酯的气相色谱检验[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11): 2753-2756.
- [12] 李长秀, 唐忠, 杨海鹰. 气相色谱法测定生物柴油样品中脂肪酸甲酯和脂肪酸甘油酯的含量[J]. 分析测试学报, 2005(5): 66-68.
- [13] 孟祥河, 章银军, 毛忠贵. 甘油酯的分析方法[J]. 中国油脂, 2004, 29(1): 44-46.
- [14] 易路遥, 郑为完, 廖和菁. 气质联用法测定丁酸单甘油酯[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 402-405.
- [15] 倪永全, 杜志云, 黄旭东, 等. 不饱和酸单甘酯的研制[J]. 无锡轻工业学院学报, 1995(2): 55-57.
- [16] 张秀芹, 杜柏林, 陈玉艳. 气相色谱法检测进口饲料添加剂中混合丁酸甘油酯[J]. 现代畜牧兽医, 2012(6): 41-42.
- [17] 石贞, 李昌模, 柴佳, 等. 食用油脂中缩水甘油酯检测方法的研究[J]. 中国食物与营养, 2011(11): 5-9.
- [18] 戴祥如, 张晨晓. 气相色谱法检测液体奶中单硬脂酸甘油酯的质量分数[J]. 中国乳品工业, 2012(11): 43-44; 64.
- [19] 钟南京, 李琳, 李冰, 等. 甘油酯的液相色谱分析[J]. 现代食品科技, 2012(1): 123-126.
- [20] 刘涛, 尹春华, 谭天伟. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定脂肪酸和甘油酯的含量[J]. 中国油脂, 2005(9): 50-53.
- [21] 邹建凯. 椰子油甘油三酯的高温气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学, 2002, 30(4): 428.
- [22] 张鼎方, 陆鸣. 三乙酸甘油酯的酯含量测定方法研究[J]. 福建分析测试, 2006(4): 43-44.
- [23] 王丽丽, 汪勇, 胡长鹰, 等. 高温气相色谱分析甘油酯的研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(7): 75-79.
- [24] 汪勇, 宋珂珂, 王丽丽, 等. 反相高效液相色谱法测定甘油二酯含量研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(3): 119-123.
- [25] 李长秀, 唐忠, 杨海鹰. 气相色谱法测定生物柴油样品中脂肪酸甲酯和脂肪酸甘油酯的含量[J]. 分析测试学报, 2005(5): 67-69.