

致癌物 3-氯-1,2-丙二醇的毛细管电泳/电导分离检测

谢天尧, 李娜, 唐亚军, 莫金垣

(中山大学化学与化学工程学院, 广东广州 510275)

摘要 利用硼酸能与 3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)上的 2 个邻位羟基进行键合生成配合阴离子、从而增加多羟基化合物的负电荷的特性,在 15 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-10 mmol/L H_3BO_3 (pH 8.3)介质中,采用毛细管电泳/电导检测法分离检测了 3-MCPD,该方法的线性范围为 0.5~20 mg/L,检出限为 0.1 mg/L($S/N=3$)。对缓冲溶液的种类、浓度、pH 值以及硼酸与 3-MCPD 的相互作用对分离检测的影响作了探讨。应用于水解植物蛋白(HVP)中的 3-MCPD 的分离检测,取得了满意结果。

关键词 毛细管电泳;电导检测;3-氯-1,2-丙二醇;水解植物蛋白

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-871X(2003)05-0513-03

Determination of the Carcinogen 3-Monochloro-1,2-Propanediol by Capillary Electrophoresis with Conductivity Detection

XIE Tianyao, LI Na, TANG Yajun, MO Jinyuan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: 3-Monochloro-1,2-propanediol(3-MCPD) was the carcinogen existed commonly in hydrolyzed vegetable-protein(HVP) as condiments. Based on the characteristic that boracic acid(H_3BO_3) has a condensation and complexation reaction with 3-MCPD forming a negative-charged adduct in aqueous phase, a rapid method for the direct determination of 3-MCPD in HVP by capillary electrophoresis with conductivity detection was investigated. The compounding, pH and concentration of running buffer were investigated to optimize the separation efficiency. Well-defined resolution of 3-MCPD in HVP within 12 min was achieved under the conditions of uncoated capillary(50 cm \times 75 μ m i. d.), 15 mmol/L Tris-10 mmol/L H_3BO_3 (pH 8.3) as running buffer and separation voltage of 18 kV. The linear range was 0.5-20 mg/L with the detection limit of 0.1 mg/L. The average recoveries of added standards were 94%-102% according to the results of three samples of HVP. It demonstrates that the proposed method can be applied to the fast determination of 3-MCPD in HVP.

Key words: capillary electrophoresis; conductivity detection; 3-monochloro-1,2-propanediol; hydrolyzed vegetable-protein

水解植物蛋白(HVP)是近年来蓬勃发展起来的新型调味品,还可作为调味料的增强剂添加到酱油、豆酱、蚝油及各种复合调味品中^[1]。HVP是通过蛋白质在高温和浓酸中进行酸水解生成^[2],盐酸是最常用的酸,因此在水解产物中除含有多种氨基酸外,还含有一些副产物如氯丙醇和脂肪酸。蛋白水解物中氯丙醇的种类有:1,3-二氯-2-丙醇、2,3-二氯-1-丙醇、2-氯-1,3-丙二醇、3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)。经研究表明氯丙醇具有不同的毒性,其中以 3-MCPD 毒性最大^[3],3-MCPD 用量达到 30 mg/kg就会使大鼠肾小管产生扩张和坏死。经过两年的致癌性研究发现:饮水中 3-MCPD 的剂量水平

为 28 mg/kg时即可致癌。

目前 3-MCPD 的检测一般采用衍生化-气相色谱法。若采用七氟丁酰咪唑衍生、气相色谱电子捕获检测调味品中的氯丙醇,检出限为 0.01 mg/kg^[4]。该法操作环节多,试剂消耗量大,分析成本高,操作时间长(至少需 3 h)。本工作利用硼酸能与 3-MCPD 上的 2 个邻位羟基进行键合生成配合阴离子、从而增加多羟基化合物的负电荷的特性,在 15 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-10 mmol/L H_3BO_3 (pH 8.3)电泳介质中,采用毛细管电泳/电导检测法(CE-CD)分离检测了 3-MCPD,检出限为 0.1 mg/L($S/N=3$)。该法具有操作简单,试剂节省,

收稿日期:2002-10-29

作者简介:谢天尧,男,1966年生,博士,副教授,E-mail:cesxyt@zsu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20175037),广东省自然科学基金资助项目(984146)。

分析成本低的优点,且分析时间短(仅需 12 min),直接测定 HVP 中的 3-MCPD 取得了满意结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CES2000 型毛细管电泳仪(高压电源、电导检测器、毛细管电泳数据工作站,中山大学研制);pHS-25 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);CQ-2B 型超声波清洗器(广州明珠电器有限公司)。熔融石英毛细管柱 50 cm × 75 μm i.d.(河北永年光导纤维厂)。Tris(上海试剂二厂,分析纯);硼酸(广州试剂一厂,分析纯);3-MCPD 标准品和 HVP 样品(广州出入境检验检疫局食品检测中心提供);其余试剂均为分析纯;水为石英重蒸水。电极制作和实验装置参见文献[5]。

1.2 缓冲溶液和标准溶液的配制

分别配制 0.1 mol/L 的 Tris、H₃BO₃、磷酸二氢钾和柠檬酸储备液。再按需配成不同 pH 值和不同浓度的 Tris-柠檬酸、Tris-磷酸二氢钾、Tris-H₃BO₃ 缓冲溶液体系。

称取适量标准品和水解植物蛋白样品,用缓冲溶液溶解定容。在近沸水浴中加热 9 min,流水冷却后直接进样测定。

1.3 实验方法

连接好毛细管电泳仪和检测装置,毛细管柱在使用前依次用 0.1 mol/L NaOH、蒸馏水和电泳运行液各冲洗约 5 min。电化学检测池体和检测电极用超声波进行清洗。更换运行液时需按上述步骤清洗毛细管和电极。以 15 mmol/L Tris-10 mmol/L H₃BO₃(pH 8.3)为电泳运行液,采用重力进样,高度差为 20 cm,时间为 15 s,分离电压为 18 kV。电导检测器的输出信号经数据工作站采集到微机中进行实时数据处理、图形显示和数据文件存储。在恒温(25 ℃)、恒湿(70%)的条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液体系的选择以及硼酸的配位作用

由于 3-MCPD 是一个中性有机分子,在溶液中难以以离子的形式存在,在毛细管区带电泳中,不论缓冲溶液是碱性还是酸性,3-MCPD 均与其他中性分子一起流出毛细管,因而达不到分离的目的。作者曾考虑采用胶束电动色谱分离模式,但未取得满意结果。文献[6]报道,硼酸能与多羟基化合物形成配位键,因而增加负电性(其反应式如图 1 所示),因此硼酸盐是分离多羟基化合物的良好缓冲体系。3-MCPD 分子中具有 2 个邻位羟基,能与硼酸键合生

成配合阴离子,因此可望通过硼酸与 3-MCPD 分子的配位作用,使其成为负电离子,从而实现 3-MCPD 的 CE-CD 分离检测。

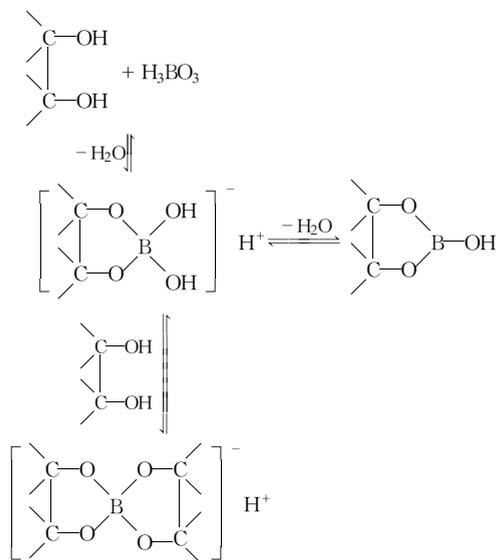


图 1 H₃BO₃ 与邻二羟基化合物的配位作用

Fig. 1 Interaction between H₃BO₃ and ortho-dihydroxy compounds

实验结果验证了设想:在电泳运行液中不加硼酸的情况下,3-MCPD 不能得到分离,随着硼酸量的增加,与 3-MCPD 有定量关系的电泳峰逐渐增大;当 H₃BO₃ 浓度大于 10 mmol/L 时,峰面积增加变化不明显,说明硼酸和 3-MCPD 的配位作用达到平衡。试验了 NaH₂PO₄-H₃BO₃、Tris-H₃BO₃、Na₂B₄O₇-H₃BO₃ 等几种不同浓度配比的缓冲体系,结果表明,NaH₂PO₄-H₃BO₃ 和 Na₂B₄O₇-H₃BO₃ 体系由于离子强度大、背景电导值高,增大分离电压会引起电泳电流更快增加,表现为由于焦耳热使检测结果变坏,而 Tris-H₃BO₃ 体系中,由于 Tris 具有离子质量大、电导较低的特点,即使是采用高浓度、高分离电压也不会产生大的电泳电流。因此本文确定采用 Tris-H₃BO₃ 体系作为电泳缓冲体系。

2.2 缓冲溶液浓度及酸度的影响

电导检测器输出的分析信号来自待测组分的电导值与缓冲溶液背景电导的差值,因此需要考虑到缓冲溶液的背景电导的影响,通过选择合适的缓冲溶液浓度以获得最佳的灵敏度、信噪比和良好的分离度。在固定 H₃BO₃ 浓度为 10 mmol/L 的前提下,改变 Tris 的浓度(5~25 mmol/L)进行分离,结果表明:Tris 浓度低,峰形拖尾严重;Tris 浓度高时,峰形得到改善。考察了 pH 值从 7 变化到 9 时对水解蛋白中 3-MCPD 的分离效果的影响,结果表明:缓冲溶液在 pH 为 6.0 时,3-MCPD 不能与水解蛋白样品中的其他组分有效分离,这时电泳峰表现为一个宽而钝的拖尾峰,而当 pH 值逐渐增大至 8.0~

9.0 时 3-MCPD 与样品中的其他组分有效地分离,且峰形变得尖锐。从分离效果和基线情况考虑,选择 15 mmol/L Tris-10 mmol/L H₃BO₃ 为电泳运行液,该缓冲体系的 pH 值为 8.3。

2.3 反应时间的影响

为了确定 3-MCPD 与缓冲溶液中的 H₃BO₃ 相互作用生成稳定产物所需的时间,进行了 3-MCPD 与 H₃BO₃ 作用的动力学平衡研究。各取 5.0 mL 10 mg/L 的 3-MCPD 标准溶液于比色管中,在近沸水浴中加热,然后流水冷却后直接进样测定。结果表明:起初随着加热时间的增加,电泳峰随之增高,8 min 后 3-MCPD 与缓冲体系的作用趋于平衡。但过长的加热时间对检测反而不利,因此本文采用了在近沸水浴中加热 9 min 以保证其键合反应完全。

2.4 分离电压的影响

提高分离电压,可以提高分离度和缩短分析时间,但分离电压过高,由于不能有效地驱散所产生的

焦耳热,反而会引起柱效和分离度的降低。考察了分离电压从 9 kV 变化至 21 kV 的情况,结果表明,18 kV 时可获得最佳的出峰时间和分离效果。

2.5 线性范围、检出限和重现性

按实验方法,对 3-MCPD 的标准溶液进行测定,结果表明,3-MCPD 在 0.5~20 mg/L 时峰面积(Y)与质量浓度(C,mg/L)成线性关系,线性回归方程为:Y=8.1+143C,r=0.993。检出限为 0.1 mg/L(S/N=3)。对于 5 mg/L 的 3-MCPD,重复进样 6 次,迁移时间和峰面积的相对标准偏差分别为 1.4% 和 4.0%。表明本方法具有良好的重现性。

2.6 样品测定和加标回收实验

定量称取 3 种水解蛋白粉溶于缓冲溶液中,按实验方法直接进样测定,电泳谱图如图 2-b 所示。图 2-a 是标准品的色谱图。由回归方程计算 3-MCPD 含量。在测试液中加入 3-MCPD 标准品,按实验方法进行加标回收实验,计算回收率(见表 1)。

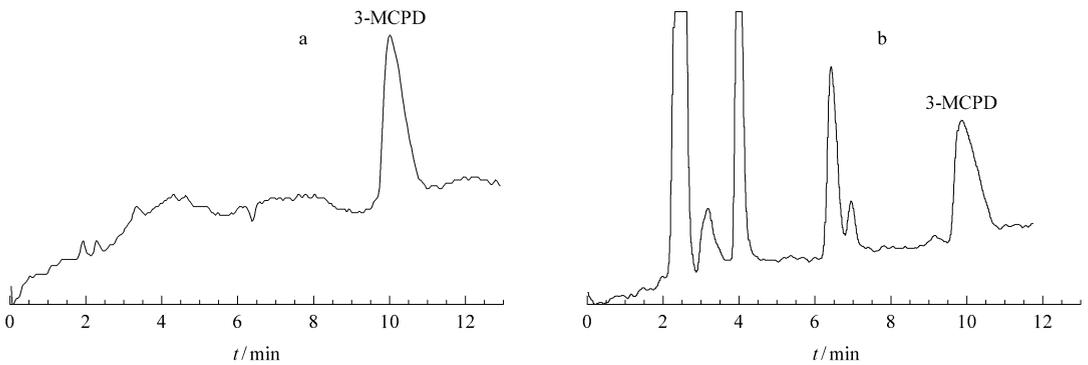


图 2 3-MCPD 标准品(a)及水解植物蛋白样品(b)的毛细管电泳图

Fig. 2 Electropherograms of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) standard (a) and a hydrolyzed vegetable-protein (HVP) sample (b)

Conditions: uncoated capillary, 50 cm × 75 μm i.d.; 15 mmol/L Tris-10 mmol/L H₃BO₃ (pH 8.3) as running buffer; separation voltage, 18 kV; conductivity detection.

表 1 水解植物蛋白中 3-MCPD 含量和加标回收率实验结果

Table 1 Determination results and recoveries of 3-MCPD in HVP samples

Sample No.	Conc./ (mg/L)	RSD/% (n=5)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/% (n=5)
1	6.7	3.5	5	11.8	102
2	3.1	3.8	5	7.8	94
3	0.9	4.2	5	5.7	95

2.7 共存组分的干扰

其他类型的氯丙醇,如 1,3-二氯-2-丙醇、2,3-二氯-1-丙醇和 2-氯-1,3-丙二醇等,由于其分子中不具备邻二羟基的结构,与硼酸的作用很弱,故不影响 3-MCPD 的测定结果。

参考文献:

[1] Gao Jianhua. Chinese Condiment, 1994, (6):7

高建华. 中国调味品, 1994, (6):7

[2] Li Guoji. China Brewing, 1997, (5):26

李国基. 中国酿造, 1997, (5):26

[3] Zhang Siqun, Wang Zhiyuan, Xu Yi, Pang Shiqi. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2002, 12(4):387

张思群,王志元,许毅,庞世琦. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4):387

[4] Van Bergen C A, Collier P D, Cromie D D O, Lucas R A, Preston H D, Sissons D J. J Chromatogr, 1992, 589:109

[5] Xie Tianyao, Zheng Yining, Mo Jinyuan, Lai Rong. Journal of Instrumental Analysis, 2000, 19(3):5

谢天尧,郑一宁,莫金垣,赖蓉. 分析测试学报, 2000, 19(3):5

[6] Chen Yi. Capillary Electrophoresis Technique and Applications. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 47

陈义. 毛细管电泳技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 2000. 47