

毛细管电泳-电化学检测法检测水解植物蛋白 调味液中的3-氯-1,2-丙二醇及其应用

邢晓平^{1,2}, 曹玉华¹

(1. 江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 盐城工学院, 江苏 盐城 224003)

摘要 :运用毛细管电泳-电化学检测法研究了水解植物蛋白液中3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)含量的测定。探索了3-MCPD检测的最佳电泳条件。以328 μm的铜圆盘电极为工作电极,在电极电位为+0.65 V(参比电极为饱和甘汞电极),检测池缓冲液为0.05 mol/L氢氧化钠,运行缓冲液为30 mmol/L硼砂(pH 9.24)时,3-MCPD能被很好地分离。3-MCPD的线性范围为6.6~200 mg/L,检测限为0.22 mg/L。研究了水解缓冲液的pH值、水解温度、水解时间等因素对3-MCPD水解反应的影响,用毛细管电泳-电化学检测法检测水解反应过程中3-MCPD的含量。结果表明,在pH 8.0的水解缓冲液中,将水解植物蛋白调味液前体于90℃条件下恒温加热1 h,能有效地控制3-MCPD的含量在1.0 mg/kg以下,从而达到我国食品安全允许的限量标准。

关键词 :毛细管电泳;电化学检测;3-氯-1,2-丙二醇;水解植物蛋白调味液;水解反应

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2006)02-0192-04 栏目类别:研究论文

Study on Elimination of 3-Chloro-1,2-Propanediol in Hydrolyzed Vegetable Protein by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection

XING Xiaoping^{1,2}, CAO Yuhua¹

(1. School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangze University, Wuxi 214036, China;

2. Department of Science and Industry, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China)

Abstract : A method was developed to estimate 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in hydrolyzed vegetable protein (HVP) by capillary electrophoresis with electrochemical detection. The optimum conditions were investigated to determine 3-MCPD in hydrolyzed vegetable protein. In 30 mmol/L borax (pH 9.24) running buffer, separation of 3-MCPD from glycerol was achieved. A 328 μm copper-disk electrode used as the working electrode exhibited a good response at +0.65 V (vs. saturated calomel electrode (SCE)) in 0.05 mol/L sodium hydroxide solution. The effects of pH value, temperature and hydrolysis time on the elimination of 3-MCPD in hydrolyzed vegetable protein were studied. By adjusting hydrolyzed vegetable protein to pH value of 8.0 and heating up for 1 h at 90℃, the content of 3-MCPD in hydrolyzed vegetable protein could be controlled under the level of 1.0 mg/kg, which coincides with the criterion of food safety in China.

Key words : capillary electrophoresis (CE); electrochemical detection; 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD); hydrolyzed vegetable protein (HVP); hydrolysis

酸水解植物蛋白调味液(HVP)是利用蛋白质在浓盐酸中高温水解产生氨基酸而制成的。HVP的制备方法简单、经济,周期短,原料利用率高,因而得到广泛的应用。但HVP在高温水解的过程中易产生具有毒害作用的副产物氯丙醇^[1,2]。研究表明,氯丙醇对人体有不同程度的毒性,其中3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)的毒性最大^[3]。毒理试

验表明,3-MCPD用量超过30 mg/kg就能引起大鼠的肾小管扩张和衰死^[4]。很多国家已制定了3-MCPD的含量标准。我国规定水解植物蛋白调味液中的最高含量标准为1.0 mg/kg^[5]。目前HVP生产中有效去除氯丙醇的方法^[6]主要有在生产过程中采用酸解和酶解相结合的方法控制3-MCPD的生成,但此法未能进入工业化成熟阶段。蛋白酸

解后对 HVP 产品的后续处理可以采用减压蒸馏法、凝胶渗透色谱法、碱处理等方法,但上述这些方法还存在着很多不足:凝胶渗透色谱法耗时太长、耗能太大,给工业应用带来困难;减压蒸馏法操作繁琐,易使香气和风味成分减少,从而改变产品的感官品质。日本曾报道^[7]采用碱反应法对蛋白酶解后的产品进行处理,但没有给出实验条件。本文运用毛细管电泳-电化学检测法系统研究了水解缓冲液的 pH 值、水解温度、水解时间对 3-MCPD 水解反应的影响,并选择最佳条件在自制的水解植物蛋白调味液中进行试验,结果 3-MCPD 的含量降到 1.0 mg/kg 以下,达到我国食品安全允许的限量标准。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

毛细管电泳-电化学检测系统(CE-ED)为自组装^[8],包括 30 kV 高压电源(上海原子核研究所),BAS LC-3D 安培检测器(Bioanalytical Systems, USA),HW-2000 色谱软件(上海千谱软件有限公司)。熔融石英毛细管(50 cm × 25 μm i.d.,河北永年仪器厂)。超级恒温槽(上海实验仪器厂)。

3-MCPD 标准品购于天久高科技公司(天津),丙三醇、盐酸(HCl)的质量分数为 37%~38%、硼砂、磷酸二氢钠、柠檬酸和氢氧化钠试剂等均购于上海试剂公司。实验用试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。用二次蒸馏水配制 3-MCPD 和丙三醇的储备液,其浓度分别为 130 mg/L 和 120 mg/L。豆粕为市售品。

1.2 水解实验方法

用磷酸二氢钠配制一系列 pH 值分别为 5.0, 6.0, 6.8, 7.4, 8.0 的缓冲液(即 20 mmol/L 磷酸二氢钠和 10 mmol/L 柠檬酸缓冲体系)。取 3-MCPD 的储备液与该缓冲液混合(体积比为 1:1),在超级恒温槽中恒温加热水解并立即开始计时。分别在水解 1, 2, 3, 4, 5 h 时取 0.1 mL 试液置于装有 0.9 mL 30 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 9.24)的离心管中,混匀,直接电动进样进行电泳分析。

1.3 水解植物蛋白调味液的制备

根据文献^[9]报道的最佳工艺条件,用盐酸水解黄豆蛋白制备水解植物蛋白调味液。称取 30 g 豆粕加入 8 mL 盐酸于三颈瓶中,在 105 °C 条件下恒温水解 20 h,抽滤后得到未经中和处理的 HVP 前体。该试样稀释后可直接用于实验。

1.4 毛细管电泳分析方法

曾有报道^[10]运用 CE-电导检测法检测 3-MCPD,本实验中采用的是安培检测法。CE-ED 装

置为自组装,电化学检测为三电极体系:328 μm 直径的铜圆盘电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂丝为辅助电极。铜电极使用前先用砂纸打磨再超声清洗 2 min,通过三维定位调节器使之与毛细管出口在一条直线上,并尽可能靠近毛细管的末端。实验前,毛细管依次用 0.01 mol/L 的 NaOH、水、缓冲液分别冲洗 5, 2, 10 min。在分离电压为 10 kV 的条件下电动进样 8 s 进行电泳分析。检测池为阴极电泳槽,电解液为 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 电极电位对分离的影响

据文献^[11]报道,铜电极能在碱性溶液中氧化糖、多元醇、丙三醇等化合物。3-MCPD 是以一个氯原子取代了丙三醇中的一个端位羟基,其结构中仍含有邻位二羟基,因此推测 3-MCPD 能在铜电极上被氧化而得到检测。实验结果表明,在 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液中 3-MCPD 能够在铜电极上氧化,而 2,3-二氯-1-丙醇(2,3-DCP)、1,3-二氯-2-丙醇(1,3-DCP)及 2-氯-1,3-丙二醇(2-MCPD)只含有一个羟基或只含有非邻位的二羟基而无响应电流,从而不会对 3-MCPD 的测定产生干扰。实验研究了电极上施加的电极电位对峰电流的影响。从图 1 可以看出,当电极电位超过 +0.5 V (vs. SCE) 时,丙三醇和 3-MCPD 的氧化电流均随着电极电位的增加而增加。当电位超过 +0.68 V (vs. SCE) 时,基线噪声和背景电流的加大影响了检测的稳定性和灵敏度。因此在实验中采用 +0.65 V (vs. SCE) 为最佳检测电位。

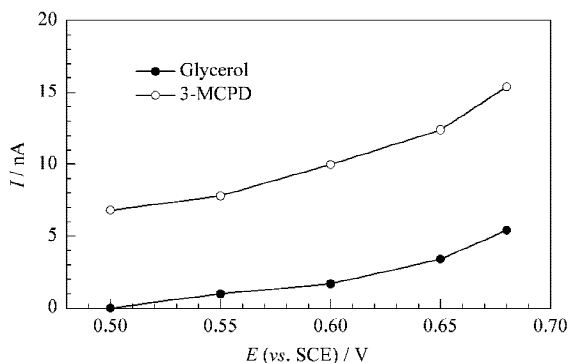


图 1 电极电位对峰电流的影响

Fig. 1 Effect of potential applied to the working electrode on the peak current

Working electrode: 328 μm copper electrode; running buffer: 30 mmol/L borax (pH 9.24); concentration of two analytes: 130 mg/L 3-MCPD and 120 mg/L glycerol; injection time: 8 s; separation voltage: 10 kV.

2.1.2 运行缓冲液浓度和 pH 值对分离的影响

鉴于 2,3-DCP、1,3-DCP 及 2-MCPD 等化合物对 3-MCPD 的测定没有影响,而丙三醇既存在于 HVP 中,又是 3-MCPD 的水解产物,且丙三醇的结构与 3-MCPD 的结构又很相似,故以丙三醇为共存物考察 3-MCPD 与 HVP 中基体的分离情况。

3-MCPD 在强碱性溶液中不稳定,因此不能以 0.05 mol/L 的氢氧化钠为运行缓冲液。硼砂能和含有邻位羟基的化合物配合形成阴离子从而加大质荷比的差异,因此本实验采用硼砂溶液作为运行缓冲液。

在实验中分别探讨了硼砂溶液的浓度和 pH 值对分离的影响。在低于 20 mmol/L 的硼砂缓冲液中,丙三醇和 3-MCPD 不能完全分离;而硼砂缓冲液浓度为 40 ~ 50 mmol/L 时,分析时间变长,峰电流亦明显下降。在 pH 值低于 8.98 时,铜电极上没有响应电流;在 pH 值高于 9.5 时,丙三醇和 3-MCPD 的峰电流下降,二者不能完全分离。故实验中以 30 mmol/L、pH 为 9.24 的硼砂溶液为毛细管电泳分析的最佳运行缓冲液。

2.1.3 分离电压和进样时间对分离的影响

分离电压直接影响电渗流的速度和迁移时间。在实验中考察了分离电压对迁移时间的影响,结果表明,加大分离电压能缩短迁移时间,但电压过大,由于存在焦耳热等问题,基线噪声会增大。当分离电压大于 12 kV 时,丙三醇和 3-MCPD 不能基线分离。故实验中选择分离电压为 10 kV。

在分离电压为 10 kV 时,试验了进样时间对峰

电流的影响。试验结果表明,进样时间超过 8 s,峰电流就不再明显增加,峰反而展宽,因此选用 8 s 为进样时间,此时峰形较好,分析灵敏度较高。

在上述优化的电泳条件下,3-MCPD 混合标准溶液的电泳图见图 2。

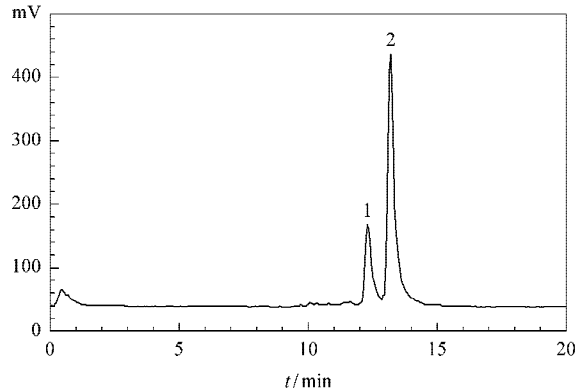


图 2 3-MCPD 混合标准溶液的电泳图谱
Fig.2 Electropherogram of the standard mixture solution of 3-MCPD

Working potential is 0.65 V (vs. SCE). Other conditions are the same as in Fig. 1.

Peak identifications : 1. 3-MCPD ; 2. glycerol.

2.2 线性、重复性及检测限

配制一系列不同浓度的混合标准溶液,在优化条件下进行各组分的线性范围和线性回归试验,以信噪比为 3 确定检测限,结果见表 1。

在优化的实验条件下,将丙三醇和 3-MCPD 标样混合进样 7 次,重复性较好。峰高的相对标准偏差分别为 2.45% 和 1.32%,保留时间的相对标准偏差分别为 1.56% 和 1.89%。

表 1 3-MCPD 和丙三醇的线性回归方程和检测限

Table 1 Results of regression analysis of 3-MCPD and glycerol

Compound	Regression equation ¹⁾	r	Linear range/(mg/L)	LOD ²⁾ /(mg/L)
3-MCPD	$y = 1.273 \times 10^{10}x + 1.211 \times 10^4$	0.9993	6.6 - 200	0.22
Glycerol	$y = 6.475 \times 10^{10}x + 9.219 \times 10^4$	0.9989	0.8 - 180	0.053

1) y : peak area ; x : concentration of analytes (kg/L). 2) LOD : limit of detection (S/N = 3).

2.3 3-MCPD 水解条件的确定

2.3.1 水解温度对水解反应的影响

3-MCPD 转化为丙三醇是一个可逆反应,其反应温度对反应速率的影响很大。本实验考察了在 pH 值为 6.8 时,水解温度对水解反应的影响。从表 2 可以看出,随着温度的升高,水解反应速率明显增大;不同水解温度下的反应过程中,3-MCPD 含量的对数与水解反应时间始终保持较好的线性关系。由此可见,3-MCPD 转化为丙三醇是遵循一级反应规律的,且反应温度越高、反应时间越长,3-MCPD 越容易转化为丙三醇。但在实际的样品水解试验中,水解温度越高,投入使用的能源就越多,经济效益也就越低。

表 2 不同温度下水解 3-MCPD 的回归分析

Table 2 Results of regression analysis of 3-MCPD hydrolysis at different temperatures

Temperature/ °C	Regression equation ¹⁾	r	Rate constant/ (10 ⁻³ /min)
80	$\ln c = -0.0038t - 9.6933$	0.9993	3.8
85	$\ln c = -0.0071t - 9.8197$	0.9982	7.1
90	$\ln c = -0.0115t - 9.9640$	0.9997	11.5

1) ln c : logarithm of concentration of 3-MCPD ; t : hydrolysis time. 2) Analysis conditions are the same as in Fig. 2.

2.3.2 水解缓冲液的 pH 值和水解时间对水解反应的影响

一般来说,3-MCPD 在碱性越强的条件下越容易转化为丙三醇。实验中研究了水解缓冲液的 pH

值对水解反应的影响,以及在同一温度下、不同 pH 的缓冲溶液中水解不同时间后 3-MCPD 的降解情况。由表 3 可见,pH 值越高,反应越容易进行,但中和需要的原料越多,经济效益越低。水解时间越长,

降解产物中 3-MCPD 的含量会越少,但能耗越大。从实际的经济效益考虑,采用水解温度 90 °C、pH 8.0、水解 1 h 作为水解条件较为合理,在此条件下能控制 3-MCPD 在限量要求的范围内。

表 3 不同温度下水解缓冲液的 pH 值和水解时间对水解反应的影响
Table 3 Effects of pH and reaction time on the concentration of 3-MCPD at 85 and 90 °C

Time/h	$\rho(3\text{-MCPD})/(\text{mg/L})$					
	85 °C			90 °C		
	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.8	pH 8.0	pH 7.4	pH 8.0
1	48.2	47.6	16.3	5.52	7.05	0.821
2	39.3	38.9	7.83	3.07	1.80	0.527
3	29.2	25.6	5.75	0.481	1.07	0.305
4	24.5	17.2	5.27	-	-	-
5	20.3	15.5	4.92	-	-	-
6	20.2	14.2	3.87	-	-	-

Analysis conditions are the same as in Fig. 2.

2.4 样品测试

在最佳电泳分析条件下,采用标准加入法进行 HVP 前体的电泳图谱解析(如图 3 所示)。常规 HVP 制作工艺会产生较多的 3-MCPD,因此对 HVP 进行后续处理很有必要。取自制 HVP 前体,用 pH

8.0 缓冲液稀释 200 倍,90 °C 恒温水解 1 h 后,测定 3-MCPD 的含量。结果表明:水解处理后,3-MCPD 的含量由 42 mg/L 降至 0.82 mg/L,低于国家允许的食品安全限量标准。因此,此项实验研究对 HVP 生产过程中有效控制 3-MCPD 含量具有实际意义。

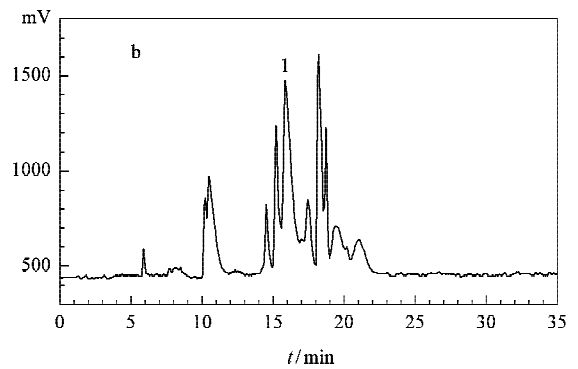
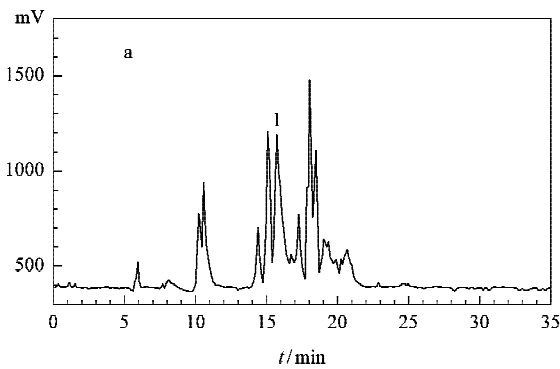


图 3 (a)HVP 样品和 (b)添加 260 mg/L 3-MCPD 的 HVP 样品的电泳图谱

Fig.3 Electropherograms of (a) an HVP sample and (b) the sample spiked with 260 mg/L of 3-MCPD

Analysis conditions are the same as in Fig. 2.

Peak identification : 1. 3-MCPD.

参考文献:

[1] Velisek J, Davidek T, Davidek J, Hamburg A. J Food Sci, 1991, 56(1): 136
 [2] Crews C, Hasnip S, Chapman S, Hough P, Potter N, Todd J, Brereton P, Matthews W. Food Addit Contam, 2003, 20(10): 916
 [3] Lynch B S, Bryant D W, Hook G J, Nestmann E R, Munro I C. Int Toxicol, 1998, 17(1): 47
 [4] Zhou Yuan, Luo Rencai, Zhang Zheng, Xiao Ying. Chinese Journal of Pharmacology Toxicology (周媛, 罗仁才, 张正, 肖颖. 中国药理学与毒理学杂志), 2003, 17(3): 232
 [5] Qin Hongmei, Jin Yihe, Huang Biao, Zhou Shuangqiao, Lin Xiubo, Wang Xutai. China Public Health (秦红梅, 金一和,

黄颺, 周双桥, 林岫柏, 王旭太. 中国公共卫生), 2002, 18(12): 1519
 [6] Luo Guilun. Food Science (罗贵伦. 食品科学), 2002, 23(5): 142
 [7] Qian Xindu, transl. Chinese Condiment (钱新度, 译. 中国调味品), 1997, (1): 31
 [8] Ye J N, Baldwin R P. Anal Chem, 1993, 65(23): 3525
 [9] Li Xiang, Li Yuntao, Wei Shangzhou. China Brewing (李祥, 李运涛, 魏尚洲. 中国酿造), 2004, (3): 11
 [10] Xie Tianyao, Li Na, Tang Yajun, Mo Jinyuan. Chinese Journal of Chromatography (谢天尧, 李娜, 唐亚军, 莫金垣. 色谱), 2003, 21(5): 513
 [11] Ye J N, Baldwin R P. J Chromatogr A, 1994, 687(1): 141