

高效液相色谱-紫外法检测酱油中的 3-氯-1,2-丙二醇

吴倩 江洪 马济美 曾贞

华中农业大学理学院, 武汉 430070

摘要 建立了一种新的高效液相色谱-紫外法(HPLC-UV)测定酱油中的有害物质 3-氯-1,2-丙二醇(3-chloro-1,2-propanediol, 3-MCPD)含量的方法。首先将 3-MCPD 与叠氮化钠反应,所得到的叠氮化产物进一步和苯乙炔发生 CuAAC 型点击反应,所得衍生物 3-(4-苯基-1,2,3-三氮唑基)-1,2-丙二醇最后采用 HPLC-UV 进行分析检测。本检测方法对 3-MCPD 的检出限和定量限分别为 0.1 和 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,且线性关系良好($r^2=0.999$)。对酱油样品进行加标回收实验,结果表明本方法的加标回收率为 98.63%~100.17%,相对标准偏差(RSD 值)为 1.95%~4.74%。将本检测方法与国家标准检测方法 GB 5009.191—2016 进行对比检测,结果显示 2 种方法所得到的结果是一致的。

关键词 酱油; 3-氯-1,2-丙二醇; 叠氮化; 点击反应; 高效液相色谱-紫外法

中图分类号 TS 212.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)03-0097-07

3-氯-1,2-丙二醇(3-chloro-1,2-propanediol, 3-MCPD)是酸水解植物蛋白(aHVP)加工酱油中的一种常见的污染物^[1-2],其主要是通过盐酸与油脂残基甘油发生反应形成的^[3]。3-MCPD 具有生殖毒性,甚至可以导致器官衰竭^[4-5]。国际癌症研究机构(IARC)将 3-MCPD 列为 2B 类致癌物。美国加州环境健康危害评估办公室(OEHHA)将 3-MCPD 列为加州 65 号提案(Prop. 65),这表明 3-MCPD 对新生儿出生缺陷以及癌症、生殖发育具有潜在的危害^[6-7]。

随着对 3-MCPD 毒性研究的不断深入和数据积累,一些国家和国际组织对食品中 3-MCPD 的限量作出了明确规定。如:欧盟监管委员会(EC)1881/2006 号文件规定 3-MCPD 每日耐受摄入量(TDI)为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体质量^[7];美国食品和药物管理局(FDA)也限定酱油中 3-MCPD 的含量在 1.0 mg/kg 以内^[9];联合国粮农组织/世卫组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)甚至将液体调味品中 3-MCPD 含量设定在 0.4 mg/kg 以下^[10]。相对于发酵酱油而言,由酸水解植物蛋白(aHVP)而形成的

非发酵酱油中 3-MCPD 含量更高^[11-12],因此,检查 3-MCPD 含量即可判断酱油的优劣,对保障食品安全具有重大意义。由于 3-MCPD 没有紫外吸收,同时 2 个羟基会产生氢键,使得 3-MCPD 分子极性大,难以挥发。因此,直接用 GC-MS 方法检测 3-MCPD 困难很大,主要缺点是特征离子少,而且峰形差,使得检测灵敏度较低^[13-14]。

目前,有关 3-MCPD 的检测方法首先必须对其进行衍生化反应,然后再采用气相色谱-质谱法(GC-MS)或高效液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)进行分析检测^[15-18],其中 GC-MS 法是各国最常使用的方法。对 3-MCPD 进行衍生化反应是进行分析检测的前提条件,目前,文献显示主要采用酮类、硼酸类、羧酸酐类、咪唑以及三氟乙酰胺等物质对 3-MCPD 进行衍生化反应^[19-24]。但 GC-MS 法在实际应用中仍存在不少问题,如仪器设备和氙代衍生试剂相对比较昂贵,以及衍生试剂稳定性较差等。因此,探寻新的检测方法是非常必要的。

本研究通过亚铜离子催化的 CuAAC 点击反应将 3-MCPD 转换成具有生色团的三氮唑化合物,在

收稿日期: 2018-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(21502058)

吴倩, 硕士, 研究方向: 食品分析方法, E-mail: 1044580584@qq.com

通信作者: 曾贞, 硕士, 实验师, 研究方向: 食品化学, E-mail: zengzhen@mail.hzau.edu.cn

此基础上建立一种新的采用 HPLC-UV 检测酱油中 3-MCPD 的方法。同时由于点击反应具有高效率、高产率、定量进行等特点^[25-26],是非常适用于分析检测的。本研究方法的建立可为快速检测酱油中的有害物质 3-MCPD 提供一种简单易行的选择,为该类食品的安全监测提供了有效手段。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

酱油样品购买于武汉市某中百超市。3-MCPD、N-七氟丁酰基咪唑(分析纯),阿拉丁试剂有限公司; d_5 -3-氯-1,2-丙二醇(97%),多伦多研究化学品公司;抗坏血酸(98%)、苯乙炔(98%)、叠氮化钠(99%)、碘化钾(99%)、无水硫酸铜、四氢呋喃、甲醇、乙醇、乙腈(色谱纯),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱(DAD),美国安捷伦科技有限公司;ZORBAX Eclipse Plus C18,广州研创生物技术发展有限公司;Trace 1300-ISQLT 气相色谱-质谱联用仪、TG-SQC 毛细管柱,美国赛默飞科技有限公司。

1.3 溶液的配制

氯化钠溶液,20%(m/m);正己烷-无水乙醚溶液,9:1(V/V);苯乙炔溶液,140 mmol/L(甲醇);叠氮化钠溶液,200 mmol/L;碘化钾溶液,150 mmol/L;硫酸铜溶液,140 mmol/L;抗坏血酸钠溶液,140 mmol/L;3-MCPD 标准工作溶液(水):0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.4 标准品 3-(4-苯基-1,2,3-三氮唑基)-1,2-丙二醇(3-PTPD)的合成

在 100 mL 单口烧瓶中分别加入 20 mL 水、1.10 g(10.0 mmol)3-MCPD、0.98 g(15.0 mmol)叠氮化钠和 1.66 g(10.0 mmol)碘化钾,控制水浴温度 100 $^{\circ}\text{C}$,回流反应 2 h 后,停止反应。自然冷至室温后,用乙酸乙酯萃取反应液,每次 20 mL,共 5 次。合并有机相,旋转蒸发除去溶剂,残留物中再分别加入 20 mL 水,5 mL THF,0.20 g(1.0 mmol)抗坏血酸钠,1.53 g(15.0 mmol)苯乙炔和 0.25 g(1.0 mmol)硫酸铜,室温电磁搅拌反应 2 h。然后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发除去易挥发溶剂 THF,所得残留物再抽滤后真空干燥,获得产物为白色粉末,产率约为

97.3%,产物熔点 105 ~ 106 $^{\circ}\text{C}$,分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (摩尔质量为 219.24 g/mol); ^1H NMR (600 MHz, d_6 -DMSO) δ :8.49 (s,1H),7.89~7.82 (m,2H),7.48~7.41 (m,2H),7.33 (dd, $J=10.5$ Hz,1H),5.19 (d, $J=5.5$ Hz,1H),4.87 (t, $J=5.6$ Hz,1H),4.54 (dd, $J=13.9,3.5$ Hz,1H),4.27 (dd, $J=13.9,8.2$ Hz,1H),3.91~3.85 (m,1H),3.43 (dd, $J=10.8,5.4$ Hz,1H),3.35 (dd, $J=8.6,3.7$ Hz,1H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, d_6 -DMSO):146.45, 131.42, 129.35, 128.18, 125.57, 122.73, 70.92, 63.79, 53.56。MS-ESI (m/z):220 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 。

1.5 样品前处理及衍生化

取 10.0 mL 酱油样品(或者标准工作溶液)于 100 mL 烧杯中,然后逐渐加入固体磷酸氢二钠至溶液饱和(约 1.0 g 左右),再加入 10 mL 20% 的 NaCl 溶液,超声混匀(约 5 min),然后再加入 12.5 g 硅藻土并混匀。在玻璃层析柱(3.0 cm \times 40 cm)中先加入 12.5 g 硅藻土。再将前述混匀后的硅藻土样品溶液填入。用 100 mL 的正己烷/无水乙醚溶液(二者体积比为 9:1)淋洗,该部分洗脱液弃用。然后再用无水乙醚洗脱,共计 375 mL 乙醚,所得洗脱液旋转蒸发,残留物再用 10 mL 超纯水溶解,再加入 200 mmol/L 的 NaN_3 溶液 150 μL (30 μmol)和 150 mmol/L 的 KI 溶液 200 μL (30 μmol),100 $^{\circ}\text{C}$ 回流 2 h 后停止反应,自然冷至室温,向瓶中加入 140 mmol/L 的 CuSO_4 溶液 500 μL 、70 μmol 抗坏血酸钠溶液、70 μmol 苯乙炔溶液以及 2 mL THF,混合物在室温条件下搅拌反应 2 h,溶剂旋转蒸发后得残留物,向残留物中加入 10 mL 甲醇,抽滤,旋干,向残留物中再准确加入 2.0 mL 甲醇,溶液用 0.22 μm 有机系滤头过滤后的样品即可用于 HPLC 分析。

1.6 HPLC-UV 分析条件

检测器:Agilent G1315D DAD,检测波长:242 nm,色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C18(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,流动相为水(0.1%甲酸):乙腈=80:20(V/V),流速 0.8 mL/min。

1.7 GB 5009.191 — 2016 GC-MS 检测方法

酱油样品的净化及衍生化参照 GB 5009.191 — 2016^[27]。本研究使用 ISQLT 四级杆质谱仪,Trace1300 气相色谱仪和 AI1300 自动进样器,均为

美国赛默飞科技有限公司产品, TG-SQC 毛细管柱(柱长 15 m, 内径 0.25 μm , 膜厚 0.25 μm)。GC 条件为: 载气为 He, 流速 1 mL/min; 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 1 μL , 采用不分流进样模式, 不分流时间为 0.5 min, 溶剂延迟时间为 5 min; 升温程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 然后以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升至 90 $^{\circ}\text{C}$ 后, 再以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 270 $^{\circ}\text{C}$, 并保持 5 min。MS 条件为: 离子源为电子轰击源(EI); 电离能量 70 eV; 离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。扫描方式采用离子监测模式(SIM); 监测离子分别为: 3-MCPD 衍生物的定量离子为 m/z 253; d_5 -3-MCPD 衍生物的定量离子为 m/z 257。

1.8 统计分析

数据以平均值 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 统计

软件进行数据分析, 配对 F 检验方法进行组间差异显著性比较, $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P < 0.01$ 表示具有显著统计学差异。

2 结果与分析

2.1 实验原理

本实验 3-MCPD 的检测原理如图 1 所示。首先, 3-MCPD 与 NaN_3/KI 反应, 氯原子被叠氮基取代, 所得叠氮基中间体与苯乙炔发生点击反应得到 3-PTPD。3-PTPD 在 242 nm 处具有强的紫外吸收, 因此, 通过 HPLC-UV 方法可以分离检测 3-PTPD 含量, 也即间接测定了复杂体系中 3-MCPD 的含量。

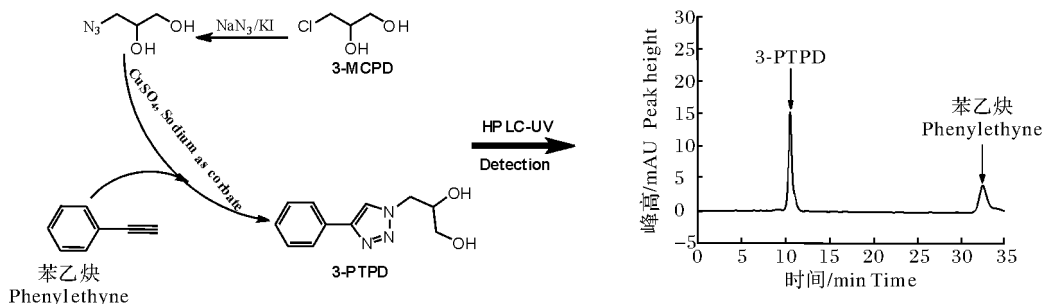


图 1 HPLC-UV 法检测 3-MCPD 的原理

Fig.1 The mechanism for the HPLC-UV determination of 3-MCPD

2.2 pH 对 3-MCPD 衍生的影响

由于酱油呈现酸性, 而在酸性条件下叠氮化反应不能进行, 因此, 必须加碱对酱油中的酸性物质进行中和, 但又不能使酱油的碱性太强, 否则 3-MCPD C-Cl 的化学键单键会被氢氧根离子进攻, 发生水解反应。研究发现用固体 Na_2HPO_4 调节酱油溶液碱性比较合适。当酱油中添加固体 Na_2HPO_4 至溶液饱和时, 酱油的 pH 会被调至 8.0 左右, 避免了对后续的叠氮化衍生产生干扰。

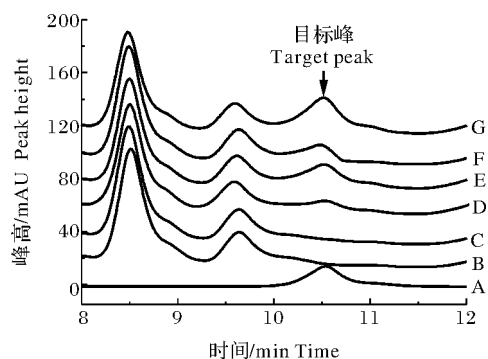
2.3 流动相对液相分离效果的影响

酱油样品成分非常复杂, 因此, 实现目标峰(3-PTPD)与其他组分峰的完全分离是完成 HPLC-UV 定量检测 3-MCPD 的关键。当以甲醇和水作为流动相时, 发现不论是改变流动相混合比例还是调节流动相的酸碱度以及进行梯度洗脱等均不能实现目标峰(3-PTPD)与其他组分峰的完全分离。但将有机相甲醇改为乙腈后, 不用梯度洗脱, 在乙腈和 0.1% 甲酸水溶液体积比为 20 : 80, 流速为 0.8

mL/min 就能够实现完美分离。图 2 是 7 种不同酱油样品在此条件下的 HPLC 图谱。图 2A 是含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 3-PTPD 标准溶液所对应的 HPLC-UV 图, 3-PTPD 的出峰时间为 10.535 min。图 2B 是酱油样品不加叠氮化钠, 加热回流反应 2 h 后, 再进行 CuAAC 点击反应, 目的是考察酱油基质对液相出峰时间的影响。图 2C 是酱油样品加叠氮化钠后进行回流, 然后再进行 CuAAC 点击反应, 得到的 HPLC-UV 图。图 2D 是向酱油样品中人为添加 3-MCPD 后, 再分别进行叠氮化反应和点击反应后所得到的 HPLC-UV 图, 即为加标回收实验, 用于考察实验方法的准确性。图 2E-G 则是图 2B-D 所对应的样品在进样前额外添加了 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 3-PTPD, 所得到的 HPLC-UV 图, 目的是便于观察出峰情况。

2.4 线性范围

将一系列不同质量浓度的 3-MCPD 标准工作溶液(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),



A: 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 3-PTPD 溶液 3-PTPD solution (5 $\mu\text{g/mL}$);
 B: 酱油样品在进行回流反应 2 h 后, 再进行点击反应衍生 Soy sauce sample treated with click reaction after 2 h refluxation;
 C: 酱油样品经叠氮化反应和点击反应衍生 Soy sauce sample treated with azidation and click reaction;
 D: 向酱油样品中添加 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 3-MCPD, 然后再进行叠氮化和点击反应衍生 Soy sauce sample spiked with 3-MCPD (0.8 $\mu\text{g/mL}$), then treated with azidation and click reaction;
 E-G: B-D 衍生后的产物, 再分别添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 3-PTPD The corresponding solutions of B-D are spiked with 5 $\mu\text{g/mL}$ 3-PTPD.

图 2 7 种不同处理方法所得到的酱油样品的 HPLC-UV 图

Fig.2 HPLC-UV of seven treated soy sauce samples

按照本文“材料与方法”部分“1.5 样品前处理及衍生化”中的方法进行前处理和衍生化反应, 即先用硅藻土吸附装柱, 然后洗脱, 洗脱物再进行叠氮化和 CuAAC 点击反应, 所得到的反应液经后处理和定容后, 再按本文“材料与方法”部分“1.6 HPLC-UV 分析条件”中介绍的方法进行 HPLC 分析。以 HPLC 图谱中衍生物 3-PTPD 的峰高与对应 3-MCPD 的浓度绘制曲线, 所得标准曲线为 $Y = 9.0688X - 0.1672$, 相关系数为 0.999, 说明 3-MCPD 在质量浓度 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5 检出限与定量限

检出限和定量限是根据 3-MCPD 衍生物的峰高与基线的信噪比计算出来的, 信噪比为 3 和 10 时, 所对应的最小浓度则分别为检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 所对应的质量浓度。目标峰的保留时间为 10.535 min, 选择其附近比较平滑的一段基线作为噪音 (7.5~8.5 min), 通过 ChemStation 软件导出信噪比报告, 即可得出 LOD 和 LOQ 分别为 0.1 和 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 。该检出限和定量限满足 FDA (1 $\mu\text{g/mL}$) 和 JECFA (0.4 $\mu\text{g/mL}$) 的限定要求^[8-9], 这意味着该检测方法能够满足酱油中 3-MCPD 的实际检测应用。

2.6 回收率

为验证本方法的准确性, 本研究通过向酱油样

品中添加 3-MCPD 溶液进行了回收率实验, 添加水平分别为 0.2、0.4、0.6 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 。由于酱油样品基质组成非常复杂, 同时其 3-MCPD 含量相对来说又非常低, 为便于观测目标峰所在位置, 向其中添加最终衍生物 3-PTPD 作内标。在加标回收实验中, 最终样品含量峰高计算方法如下: 添加 3-MCPD 的样品峰高 (在检测前添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 3-PTPD) 减去不添加 3-MCPD 的样品峰高 (在检测前添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 3-PTPD)。酱油加标回收结果如表 1 所示, 加标回收率为 98.63% ~ 100.17%, 相对标准偏差 (RSD 值) 为 1.95% ~ 4.74%, 由此可见, 本方法的准确度能够满足分析检测需要。

表 1 酱油样品的加标回收率和相对标准偏差

Table 1 The recoveries and RSD of a soy sauce samples

添加质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$) Fortified concentration	检出质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$) Concentration found	回收率/% Recovery	相对标准 偏差/% RSD
0.200	0.197 \pm 0.009	98.63	4.74
0.400	0.401 \pm 0.012	100.17	3.05
0.600	0.592 \pm 0.012	98.66	1.95
0.800	0.791 \pm 0.028	98.84	3.53

2.7 与 GB 5009.191 — 2016 方法对比分析

3-MCPD 系列标准工作液参照 GB 5009.191—2016 进行净化及衍生化后, 按浓度由低到高依次注入 GC-MS 中, 得到相应的 SIM 图 (图 3)。根据 MS 图确认 SIM 图中 3-MCPD 衍生物 (3-MCPD-HFB) 和 d_5 -3-MCPD 衍生物 (d_5 -3-MCPD-HFB) 所对应的峰 (图 4), 从而得到 3-MCPD-HFB 和 d_5 -3-MCPD-HFB 的定量离子峰强度, 标准曲线的制备中横坐标是标准工作溶液中 3-MCPD 和 d_5 -3-MCPD 的浓度比, 纵坐标为 3-MCPD-HFB 和 d_5 -3-MCPD-HFB 的定量离子峰强度之比, 由此所得曲线方程为 $Y = 1.30799X - 0.42296$, 相关系数为 0.999。采用 GC-MS 方法分析酱油样品, 测得其 3-MCPD 含量为 0.150 $\mu\text{g/mL}$ 。

采用 HPLC-UV 方法分析样品中 3-MCPD 的含量, 其质量浓度为 0.163 $\mu\text{g/mL}$ 。这与 GB 5009.191—2016^[27] 的 GC-MS 方法检测酱油里面的质量浓度 (0.150 $\mu\text{g/mL}$) 基本一致, 说明本方法能够满足实际酱油样品的检测需求, 且其具有准确性和可靠性。检测结果同时也表明, 该品牌酱油质量是符合相关规定的, 其 3-MCPD 的含量并未超标。

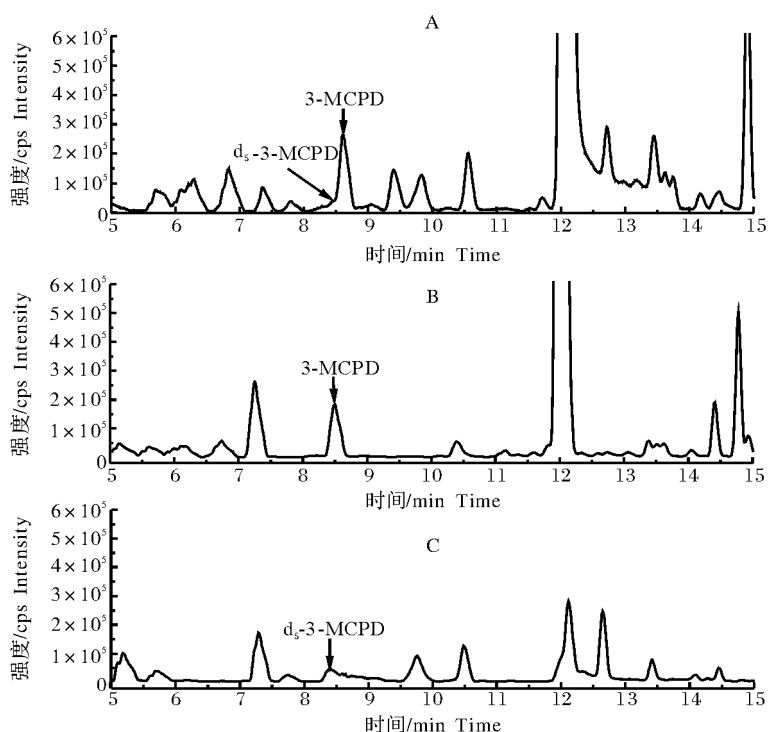


图3 酱油经衍生化后所得SIM图
A: 监测离子 m/z 253 和 257 的图谱 The characteristic ions are m/z 253 and 257; B: 监测离子 m/z 253, 275, 289, 291 的图谱 The characteristic ions are m/z 253, 275, 289, 291; C: 监测离子 m/z 257, 278, 294, 296 的图谱 The characteristic ions are m/z 257, 278, 294, 296.

图3 酱油经衍生化后所得SIM图

Fig.3 Selected ion monitoring (SIM) chromatogram of 3-MCPD after derivatization with HFBI in soy sauce sample

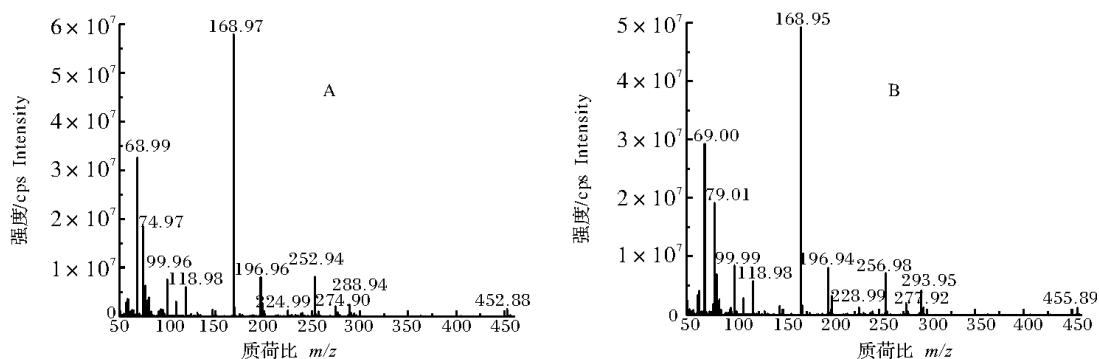


图4 3-MCPD 衍生物(A)和 d_5 -3-MCPD 衍生物(B)的MS图

Fig.4 The corresponding mass spectrum of 3-MCPD (A) and d_5 -3-MCPD (B) after derivatisation

3 讨论

3-氯-1,2-丙二醇(3-MCPD)被IARC列为2B类致癌物,人们对其在酱油中的存在非常关注。由于3-MCPD结构中不存在生色基团,且含2个羟基,使其难以直接通过GC或HPLC方法进行检测。同时由于酱油中的食品基质成分非常复杂,使得对3-MCPD的检测就更为困难。目前有关食品

中的3-MCPD的检测方法中,一般先必须将食品中的3-MCPD进行衍生化,降低其沸点后再通过GC-MS进行检测,但该方法需要用氘代3-MCPD试剂作为内标,同时衍生剂稳定性也不够,且需使用昂贵的设备,一般实验室不具备上述条件。点击化学具有化学反应按计量进行的特点,同时反应条件非常温和、快速,特别适合用于定量检测。本研究通过点击反应将3-MCPD衍生化后,得到具有强紫外吸收

的物质,从而通过 HPLC-UV 实现对其进行间接分离与检测。研究表明,该方法线性良好($r^2 = 0.999$),定量限和检出限分别为 0.1 和 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对实际酱油中的 3-MCPD 的检测方法与 GC-MS 法是一致的,能满足国际上对 3-MCPD 的限量要求。本研究的检测方法克服了 GC-MS 法仪器设备昂贵及氘代试剂昂贵且不易获得的缺点,因此,HPLC-UV 检测方法对大多数实验室都具有可行性,使得该方法具有潜在的推广价值。

参 考 文 献

- [1] VELISEK J, DAVIDEK J, HAJŠLOVA J, et al. Chlorohydrins in protein hydrolysates[J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung*, 1978, 167(4): 241-244.
- [2] 吴倩, 黄酒中 EC/Urea/3-MCPD 的检测及 EC/Urea 的去除[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [3] 李祥, 杨百勤, 丁红梅. 水解蛋白质调味液中氯丙醇的形成及其控制[J]. *中国酿造*, 2003, 1(3): 1-4.
- [4] BUHRKE T, VOSS L, BRIESE A, et al. Oxidative inactivation of the endogenous antioxidant protein DJ-1 by the food contaminants 3-MCPD and 2-MCPD[J]. *Archives of toxicology*, 2017, 92(4): 1-11.
- [5] BUHRKE T, SCHULTRICH K, BRAEUNING A, et al. Comparative analysis of transcriptomic responses to repeated-dose exposure to 2-MCPD and 3-MCPD in rat kidney, liver and testis[J]. *Food and chemical toxicology*, 2017, 106(Part A): 36-46.
- [6] RAJPAL S T, FENG C T, MARTHA S S. Evidence on the carcinogenicity of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD; α -chlorohydrin) [G/OL]. [S.l.: s.n.], California Environmental Protection Agency, 2010. <https://oehha.ca.gov/media/downloads/crnrr/123mcpd.pdf>.
- [7] IARC (International Agency for Research on Cancer). Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water, volumes 101[G/OL]. [S.l.: s.n.], 2013. <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-15/>. Published online 11 December 2012.
- [8] European-Commission (EC). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs[G]. *Official Journal of the European Union*, L364, 2006; 5-24.
- [9] GENUALDI S, NYMAN P, DEJAGER L. Simultaneous analysis of 3-MCPD and 1, 3-DCP in Asian style sauces using QuEChERS extraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017, 65(4): 981-985.
- [10] HAILE B, SATHEESH N. Review on 3-chloro-1, 2-propanediol: a chloropropanol formed during food processing[J]. *Der pharma chemica*, 2017, 9(7): 84-90.
- [11] LEE B Q, KHOR S M. 3-Chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in soy sauce: a review on the formation, reduction, and detection of this potential carcinogen[J]. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2015, 14(1): 48-66.
- [12] LI Y, ZHENG C, SUN X, et al. Identification of 3-chloro-1, 2-propanediol using molecularly imprinted composite solid-phase extraction materials[J]. *Analytical & bioanalytical chemistry*, 2014, 406(25): 6319-6327.
- [13] XU X M, WU H W, HE H L, et al. Study of chloropropanols in soy sauce by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with coupled column separation without derivatisation [J]. *Food additives and contaminants-part A*, 2013, 30(3): 421-429.
- [14] BAER I, CALLE B D L, TAYLOR P. 3-MCPD in food other than soy sauce or hydrolysed vegetable protein (HVP)[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 396(1): 443-456.
- [15] BERGER-PREISS E, GERLING S, APEL E, et al. Development and validation of an analytical method for determination of 3-chloropropane-1, 2-diol in rat blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical ionization mode[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 398(1): 313-318.
- [16] HU Z, CHENG P, GUO M, et al. A novel approach of periodate oxidation coupled with HPLC-FLD for the quantitative determination of 3-chloro-1, 2-propanediol in water and vegetable oil [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2013, 61(27): 6614-6621.
- [17] 徐小民, 何华丽, 阮宇迪, 等. 气相色谱-三重四极杆串联质谱法同时测定调味品中的氨基甲酸酯和氯丙醇[J]. *色谱*, 2013, 31(11): 1129-1133.
- [18] 易青, 苗虹, 吴永宁. 在线凝胶渗透色谱-气相色谱-串联质谱非衍生化法测定食品中氯丙醇[J]. *分析化学*, 2016, 44(5): 678-684.
- [19] CAO X J, SONG G X, GAO Y H, et al. A novel derivatization method coupled with GC-MS for the simultaneous determination of chloropropanols[J]. *Chromatographia*, 2009, 70(3/4): 661-664.
- [20] PESSELMAN R L, FEIT M J. Determination of residual epichlorohydrin and 3-chloropropanediol in water by gas chromatography with electron-capture detection[J]. *Journal of chromatography A*, 1988, 439(2): 448-452.
- [21] MEIERHANS D C, BRUEHLMANN S, MEILI J, et al. Sensitive method for the determination of 3-chloropropane-1, 2-diol and 2-chloropropane-1, 3-diol by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection[J]. *Journal of chromatography A*, 1998, 802(2): 325-333.
- [22] FABIAN M D, MILADY R N. Development of an analytical method for 3-monochloropropane-1, 2-diol in soy sauce using 4-heptanone as derivatizing agent[J]. *Food additives and contaminants*, 2004, 21(3): 204-209.

- [23] KUSTERS M, BIMBER U, OSSENBRUGGEN A, et al. Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3-MCPD and 3-MCPD esters in different foodstuffs[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2010, 58(11): 6570-6577.
- [24] XU X, REN Y, WU P, et al. The simultaneous separation and determination of chloropropanols in soy sauce and other flavoring with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical and electron impact ionization modes[J]. Food additives and contaminants, 2006, 23(2): 110-119.
- [25] KOLB H C, FINN M G, SHARPLESS K B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions[J]. Angewandte chemie international edition, 2001, 40(11): 2004-2021.
- [26] TIWARI V K, MISHRA B B, MISHRA B, et al. Cu-catalyzed click reaction in carbohydrate chemistry[J]. Chemical reviews, 2016, 116(5): 3086-3240.
- [27] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中氯丙醇及其脂肪酸酯含量的测定: GB 5009.191—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

Quantitatively determining hazardous 3-chloro-1,2-propanediol in soy sauce with high performance liquid chromatography-ultraviolet method

WU Qian JIANG Hong MA Jimei ZENG Zhen

College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A novel high performance liquid chromatography-ultraviolet method (HPLC-UV) was developed for quantitatively determining the content of hazardous 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in soy sauce. 3-MCPD was first azidated with sodium azide, and the obtained azide product was further subjected to a CuAAC type click reaction with phenylacetylene, and the resulting derivative 3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl) propane-1,2-diol (3-PTPD) was obtained and analyzed with HPLC-UV finally. The detection limits and quantitation limits of 3-MCPD were 0.1 and 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, and the linear relationship was good ($r^2=0.999$). The results of spiked recovery test of soy sauce samples showed that the recoveries of the method were from 98.63% to 100.17%, and the relative standard deviation (RSD value) was from 1.95% to 4.74%. This method is compared with the national standard test method GB 5009.191—2016 as well, and the results obtained by the two methods are consistent.

Keywords soy sauce; 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD); azidation; click reaction; high performance liquid chromatography-ultraviolet detector (HPLC-UV)

(责任编辑:陆文昌)