

火焰光度检测器-气相色谱法测定食品中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的含量

陈克云, 田其燕, 李海霞, 王艳丽, 张 卉, 刘艳明*, 祝建华

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: **目的** 建立火焰光度检测器-气相色谱法检测食品中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩(3-acetyl-2,5-dimethylthiophene, ADP)的分析方法。**方法** 含油脂食品经甲醇提取后冷冻过滤、不含油脂食品经正己烷提取后离心,以气相色谱仪-火焰光度检测器为检测手段,外标法定量。**结果** ADP 在 0.005~1.000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内二次曲线线性良好,相关系数为 0.9999; ADP 在不同基质中的检出限均可达到 0.015 mg/kg,定量限达到 0.05 mg/kg;在不同基质及不同加标浓度下,平均加标回收率为 86.3%~108.7%,相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 4.50%~6.97%($n=6$)。**结论** 该方法前处理操作简便、技术难度低,准确度和灵敏度高,抗干扰能力强,适用于定量准确并快速地测定食品中 ADP 的含量。

关键词: 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩; 气相色谱法; 火焰光度检测器

Determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene in food by gas chromatography with flame photometric detector method

CHEN Ke-Yun, TIAN Qi-Yan, LI Hai-Xia, WANG Yan-Li, ZHANG Hui, LIU Yan-Ming*, ZHU Jian-Hua

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene (ADP) in food by gas chromatography with flame photometric detector. **Methods** The foods containing fatty were extracted by methanol, frozen and filtered and the foods without fatty were extracted by n-hexane, then centrifuged. Quantitative analysis was carried out by external standard method and the gas chromatograph flame photometric detector was used for detection. **Results** The linear relationship quadratic curve of ADP in the concentration range of 0.005-1.000 $\mu\text{g/mL}$ was good, with correlation coefficient 0.9999. The detection limit of ADP in different substrates was 0.015 mg/kg, and the quantitative limit was 0.05 mg/kg. Under different substrates and different concentrations, the average recovery rate was 86.3%-108.7%, and the relative standard deviations (RSDs) was 4.50%-6.97% ($n=6$). **Conclusion** This method has the advantages of simple operation, low technical difficulty, high accuracy and sensitivity, strong anti-interference ability, which is suitable for quantitative and accurate determination of ADP in food.

KEY WORDS: 3-acetyl-2,5-dimethyl thiophene; gas chromatography; flame photometric detector

基金项目: 2019年度山东省重点研发计划项目(医用食品)(2019YYSP020)、国家重点研发计划项目(2017YFC1601600)

Fund: Supported by Shandong Keyjoint Research and Invention Program (Food for Special Medical Purpose, FSMP)(2019YYSP020)and the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1601600)

*通讯作者: 刘艳明, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测与科研。E-mail: msymliu@163.com

*Corresponding author: LIU Yan-Ming, Professor, Shandong Institute of Food and Drug Control, No.99, Tianluo Road, Gaoxin District, Jinan 250101, China. E-mail: msymliu@163.com

1 引言

3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩(3-acetyl-2,5-dimethylthiophene, ADP), 分子结构式如图 1 所示, 是一种合成的咸味香精, 具有烧烤、坚果气味, 作为食品添加剂, 常用于肉类食品加工中^[1]。其不溶于水, 易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂。2002 年, ADP 开始被用作食品用香料。目前, ADP 作为允许使用的食品用合成香料收录在 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[2]附录 B 中。2013 年, 欧洲食品安全管理局(European Food Safety Authority, EFSA)对 ADP 进行安全评估, 发现该物质在体内和体外实验中均表现出致基因突变性, 作为食用香精存在安全隐患, 因此严禁 ADP 作为食用香料投放市场或用于食品^[3]。2013 年 6 月 14 日, 欧盟委员会通过法规 Regulation(EC)No 545/2013^[4], 禁止该物质作为食品用香料使用。同年 8 月 14 日, 中国香精香料化妆品工业协会发布自律文件(香化协字[2013]62 号), 要求香料生产企业不得生产用作食品用香料的 ADP, 食用香精中不得使用该物质^[5]。

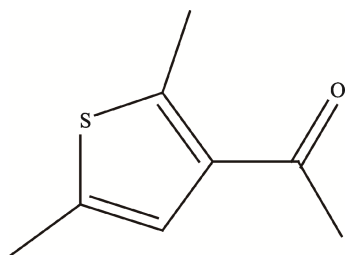


图 1 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的分子结构式

Fig.1 The molecular structure of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene

迄今为止对 ADP 的检测尚未列入国家标准, 针对该物质的定量分析研究开展的也不多。现有的文献方法有气相色谱质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[6-8]、气相色谱串联质谱法(GC-MS/MS)^[9]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[10]。其中气相色谱-质谱法定性效果较好, 但在复杂基质样品中, 背景响应较高, 导致检测灵敏度降低。气相色谱串联质谱法抗干扰能力强、灵敏度高, 但其操作较为复杂, 成本高, 技术难度较高, 使用普及性较差; 而高效液相色谱法分离效率高、检测灵敏度高, 但定性效果差, 容易受到杂质、基质等因素的干扰。此外, 现有技术中 ADP 的检测基质一般为香精香料类食品添加剂^[7-10], 文献报道常用正庚烷、正己烷、无水乙醇直接提取^[6-9], 而由于食品基质复杂, 目标物镶嵌其中, 基质干扰会对 ADP 含量的测定产生影响。

本研究结合国内外 ADP 分析方法的研究进展, 针对含油脂食品、不含油脂食品分别采用不同的前处理方法, 利用火焰光度检测器(lame photometric detector, FPD) (配有硫滤光片)对含硫化合物具有特异性响应的特性, 采用气相色谱法检测食品中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的含量, 为日后的检测提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

2.1.1 实验仪器

GC2010-Plus 气相色谱仪(配有火焰光度检测器, 硫滤光片, 日本岛津公司); SQP 电子分析天平(北京赛多利斯公司); Mili-Q IQ7000 超纯水机(美国密理博公司); UMV-2 涡旋混合器(山东青云实验耗材有限公司); KQ-800DE 超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司); 3-18KS 高速离心机(德国 Sigma 公司)。

2.1.2 试剂与样品

甲醇、正己烷、异辛烷、正庚烷、二氯甲烷(色谱纯, 德国默克公司); 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩标准品(纯度 97.3%, 美国 CATO 公司)。

实验样所用品均来源于市售。

2.2 实验方法

2.2.1 前处理方法

(1)含油脂的试样(膨化食品、火锅底料或含油调味酱、肉制品等)

准确称取试样 5.0 g(精确至 0.01 g)于 15 mL 离心管中, 准确加入 10 mL 甲醇, 涡旋 2 min, 超声提取 15 min, 4000 r/min 离心 2 min, 收集上清液。-20 °C 冰箱冷冻 2h, 滤纸过滤后供 GC-SPD 分析。

(2)不含油脂的试样[调味料(酱)、香辛料、方便面调味包等]

准确称取试样 5.0 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 蒸馏水, 涡旋混匀, 再准确加入 10 mL 正己烷, 涡旋 2 min, 超声提取 15 min, 4000 r/min 离心 2 min, 取上清液, 供 GC-SPD 分析。

2.2.2 仪器条件

色谱柱: Agilent DB-1701 毛细管柱(0.25 mm×320 μm, 30 m); 柱温度程序: 50 °C 保持 1 min, 20 °C/min 升温至 280 °C 保持 10 min; 进样口温度: 250 °C; 进样模式: 不分流模式; 检测器(FPD)(含硫滤光片)温度: 300 °C; 载气: 氮气, 流速: 1.5 mL/min。

2.3 标准曲线的绘制

对系列质量浓度为 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 μg/mL 的 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩标准溶液进行 GC-SPD 分析。

3 结果与分析

3.1 方法的优化

3.1.1 提取溶剂的选择

(1) 含油脂试样

简德威^[6]、茅佩卿^[9]等用正庚烷做提取溶剂, 徐雪芹等^[11]用正己烷做提取溶剂, 但这些方法只适用于不含油脂的试样。对于含油脂的试样, 提取时油脂会溶解在正己烷、正庚烷中, 在色谱分析时大分子油脂的存在会造成基质干扰, 降低仪器灵敏度, 且油脂的存在会缩短色谱柱的使用寿命造成仪器污染。本研究采用甲醇作为提取溶剂, 利用 ADP 在甲醇中易溶而油脂难溶的特性, 将 ADP 从油脂中提取出来, 并采用冷冻过滤的方法去除提取过程中的油脂及各类杂质, 保证了组分的纯度和质量。此外, 甲醇提取法检测快速又节省试剂, 且在色谱分析中极少有杂质峰出现, 有利于保护色谱柱并延长其使用期限。

(2) 不含油脂试样

选择正己烷、异辛烷、正庚烷、二氯甲烷等 4 种不同极性且毒性较低的常见溶剂按 2.2.1 节所述方法进行提取, 以回收率考察不同溶剂的提取效果。实验结果表明: 正己烷、正庚烷提取效率相当, 回收率可达 95% 以上; 异辛烷作为提取溶剂时, 回收率在 80%~90% 之间; 而二氯甲烷提取效率最差, 回收率在 50%~60% 之间。正己烷价格低廉、正庚烷价格略高, 综合考虑提取效果及成本因素, 因此实验选择正己烷为提取溶剂。

3.1.2 超声提取时间的考察

在含油脂试样(卤牛肉)和不含油脂试样(水溶性香精)中添加 0.2 mg/kg 的 ADP 标准溶液, 含油脂试样以正己烷为萃取溶剂, 不含油脂试样以甲醇为萃取溶剂, 研究超声萃取 5、10、15、20、30 min 后的回收率, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 随着超声萃取时间的增加, 回收率结果呈

递增趋势, 但超声萃取时间超过 15 min 后回收率没有明显的变化, 考虑时间成本、检测效率因素, 本方法选择超声萃取时间为 15 min。

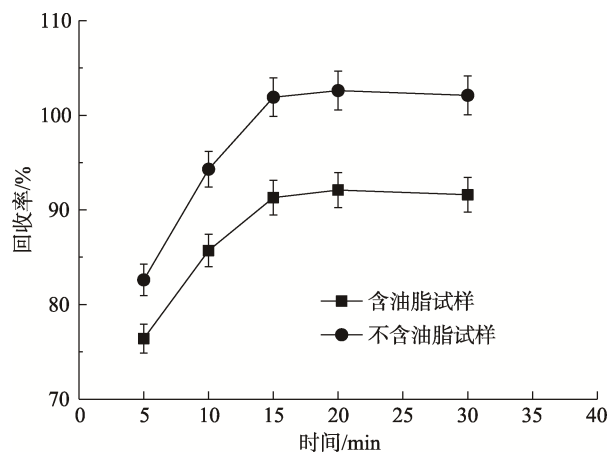


图 2 不同萃取时间对 ADP 回收率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different extraction times on the recoveries of ADP($n=3$)

3.1.3 仪器条件的优化

实验中发现色谱柱的升温速率对目标化合物 ADP 的响应有重要影响, 实验中比较了 5、10、20、30 °C/min 4 种升温速率, 结果表明: 升温速率越快, ADP 响应越高, 出峰时间越早; 升温速率越慢, ADP 响应越低, 出峰时间越晚。提高升温速率能缩短溶质在色谱柱中的停留时间, 从而缩短测试时间, 提高工作效率, 但是随着升温速率的升高基线也随之升高。而降低升温速率则能达到更好的分离效果, 但升温速率降低, ADP 的响应也随之降低, 且延长了测试时间。综合考虑以上因素, 最终确定升温速率为 20 °C/min。浓度为 0.2 μg/mL 的 ADP 标准溶液色谱图如图 3 所示, 由色谱图可知, 被测物质 ADP 的色谱峰峰形较好。

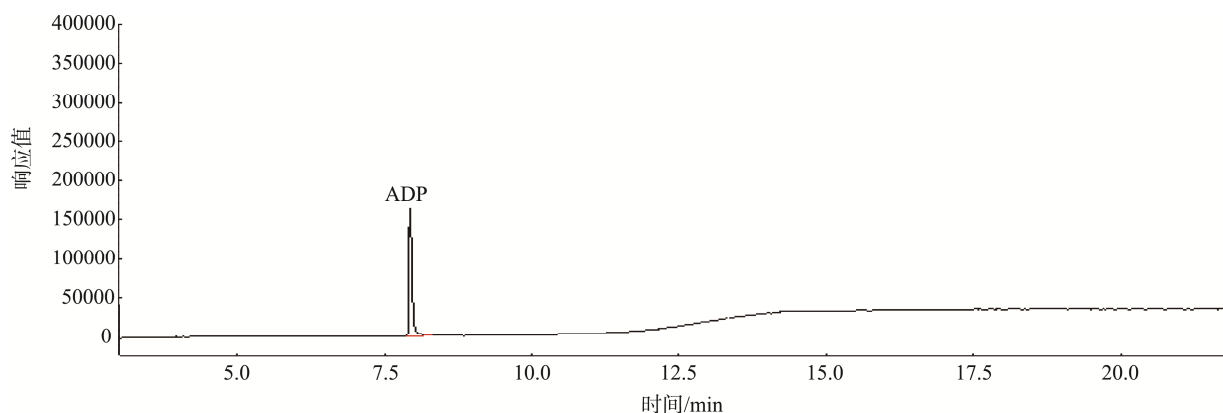


图 3 浓度为 0.2 μg/mL 的 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩标准溶液色谱图

Fig.3 Chromatogram of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene standard with the concentration of 0.2 μg/mL

3.2 方法学考察

3.2.1 线性关系

在 FPD 检测器上, 由于含硫化物在富氢火焰中燃烧时, 形成激发态的 S_2^* 分子, 此分子回到基态时发射出波长为 394 nm 的特征光, 属于二次响应^[12]。故采用二次线性拟合法将质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)与峰面积(Y)进行线性拟合, 绘制标准曲线。结果表明, 其线性方程为 $Y=1.24e^7X^2+19747X+25818$, 相关系数 r^2 为 0.9999, ADP 在线性范围为 0.005~1.000 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

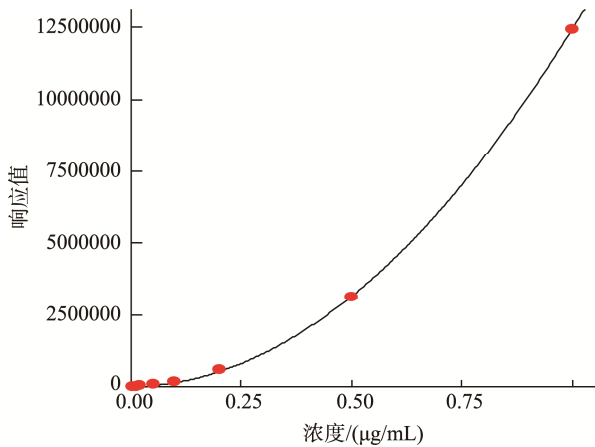


图 4 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩含量-峰面积的二次线性拟合结果
Fig.4 Quadratic linear fitting results of concentration-peak area of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene

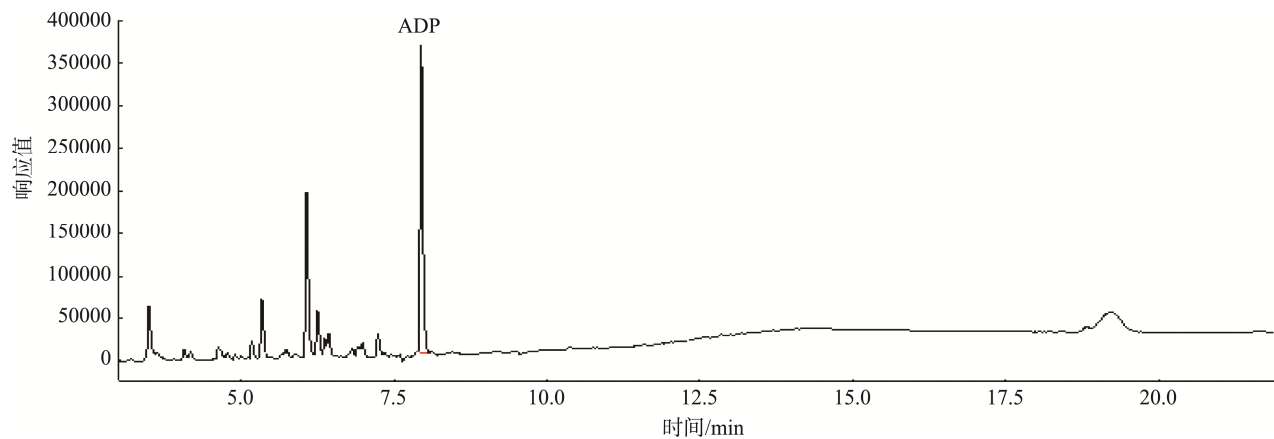


图 5 水溶性香精空白样品添加 0.5 mg/kg 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的色谱图
Fig.5 Chromatogram of water soluble essence blank sample spiked with 0.5 mg/kg 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene

表 1 食品中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的回收率和精密度($n=6$)
Table 1 Recovery and precision of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene in food ($n=6$)

样品名称	添加水平/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
水溶性香精	0.015	108.7	7.20
	0.05	104.1	5.53
	0.5	101.9	4.96
卤牛肉	0.015	105.0	6.97
	0.05	90.5	4.50
	0.5	86.3	4.69

3.2.2 方法检出限及定量限

在水溶性香精(山楂胡烟熏料)、卤牛肉的空白样品中分别添加 0.015 mg/kg 的 ADP 标准溶液, 采用 GC-SPD 测定, 以 3 倍信噪比计算, 得方法的检出限 (limit of detection, LOD) 为 0.015 mg/kg, 以 10 倍信噪比计算其定量限 (limit of quantity, LOQ) 为 0.05 mg/kg。欧洲食品安全管理局关于 ADP 在动物饲料中的限量为 0.05 mg/kg^[13], 该方法满足实际检测需求。典型色谱图见图 5。

3.2.3 精密度与回收率实验

以 ADP 阴性样品作为空白进行加标回收实验。称取空白样品, 分别添加 3 个水平的 ADP 标准溶液, 按照所建立的方法的分析条件进行测定。每份样品进行 6 次平行测定, 考察方法的回收率和精密度。结果表明, 该阴性样品中 ADP 的平均加标回收率在 86.3%~108.7% 之间, 满足国家标准要求^[14]。相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 在 4.50%~6.97% 之间, 说明本方法重复性好。

3.3 实际样品的测定

按实验方法对 5 种食品基质(香精、调味料、火锅底料、膨化食品、肉制品)总计 98 批次开展了 ADP 的检测, 结果均未检出 ADP, 从一定程度上说明该物质并未普遍用于食品中。

4 结论与讨论

本研究利用火焰光度检测器(配有硫滤光片)对含硫化物具有特异性响应的特征,建立了一种简便高效、高选择性、高灵敏性的检测食品中 ADP 的方法。该法中仪器信号响应与浓度呈二次线性关系,灵敏度高;且该法对含硫化物存在特异性响应,背景干扰少,选择性好,很好地解决食品中存在的基质干扰问题。欧洲食品安全管理局关于动物饲料中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的限量要求为 0.05 mg/kg,本方法检出限和定量限较低,灵敏度高,且易于操作、定量准确、快速、重复性好,能更准确、高效地监测食品中 ADP 的使用情况,为食品中 ADP 的风险监测和风险评估提供了技术支持,避免食品安全事件的发生。

参考文献

- [1] 张华. 几个杂环类香料新产品在香精中的应用 [C]. 第二届全国香料香精化妆品洗涤用品食品添加剂专题学术论坛会议, 上海: 2011, 70-72.
Zhang H. The application of several new heterocyclic fragrance products in flavors [C]. The 2nd National Symposium on Spice Additives, Cosmetics, Washing Products and Food Additives, Shanghai: 2011, 70-72.
- [2] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Uses of food additives [S].
- [3] Anonymous. Scientific opinion on re-evaluation of one flavouring substance 3-acetyl-2, 5-dimethylthiophene [FL-no 15.024] from FGE.19 subgroup 5.2 [J]. EFSA J, 2013, 11(5): 3227.
- [4] 佚名. 欧盟禁止 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩作为食用香料[J]. 国内外香化信息, 2013, (8): 20-21.
Anonymous. The EU bans 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene as a food flavor [J]. Domestic Oversea Flavor Frag Cosmet Inform, 2013, (8): 20-21.
- [5] 佚名. 中国香化协会发布“香料香精行业自律文件”(编号 CAFFCI-ZL001)关于 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的限制要求[J]. 国内外香化信息, 2013, (9): 21.
Anonymous. China Fragrance Association issued the *Self-discipline Document of the Spice and Flavor Industry*, (No. CAFFCI-ZL001) restriction requirements on 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene [J]. Domestic Oversea Flavor Frag Cosmet Inform, 2013, (9): 21.
- [6] 简德威, 熊含鸿, 郑悦珊, 等. 气相色谱-质谱法测定食品中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的含量[J]. 食品安全导刊, 2019, (22): 67-71.
Jian DW, Xiong HH, Zheng YS, et al. Determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene in food by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin Food Saf Magaz, 2019, (22): 67-71.
- [7] Zhao J, Zhang Y, Ge D, et al. Extraction of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene and purification the fast food noodle samples using a novel acid-base-induced cloud point extraction and magnetic solid-phase extraction prior to HPLC [J]. Sep Sci Technol, 2020, 55(6): 1-10.
- [8] 孟冬玲, 徐雪芹, 李小兰, 等. 一种磁性固相萃取结合高效液相色谱检

测 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的方法: 中国, CN107064358[P]. 2017-04-14.

- Meng DL, Xu XQ, Li XL, et al. A method for the determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene by magnetic solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography: China, CN107064358 [P]. 2017-04-14.
- [9] 茅佩卿, 金绍强, 王展华, 等. 气相色谱-三重四极杆质谱法测定食用香精中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(3): 86-90.
Mao PQ, Jin SQ, Wang ZH, et al. Determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene in food flavor by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2019, 55(3): 86-90.
- [10] 刘瑞琦. 食品添加剂 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩分析方法的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2018.
Liu RQ. Research on the Determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene for food additive [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2018.
- [11] 徐雪芹, 田兆福, 李小兰, 等. 一种食用香精香料中 3-乙酰基-2,5-二甲基噻吩的测定方法: 中国, CN104655775[P]. 2015-02-10.
Xu XQ, Tian ZF, Li XL, et al. A method for determination of 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene in food flavors and fragrances: China, CN104655775 [P]. 2015-02-10.
- [12] 李洁, 李霞, 刘艳明, 等. 芝麻香型白酒中 3-甲硫基丙醇的 GC-FPD 检测方法研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(1): 177-180.
Li J, Li X, Liu YM. Detection of 3-methylthio propanol in sesame-flavor Baijiu by GC-FPD method [J]. China Brew, 2018, 37(1): 177-180.
- [13] Anonymous. Scientific Opinion on the safety and efficacy of thiazoles, thiophene, thiazoline and thienyl derivatives (chemical group 29): 3-acetyl-2,5-dimethylthiophen when used as a flavouring for all animal species [J]. EFSA J, 2013, 11(8): 3323.
- [14] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范食品理化检测规程[S].
GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介

陈克云, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测与科研。
E-mail: keyun2000@163.com

刘艳明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测与科研。
E-mail: msymlu@163.com