

气相色谱-质谱联用法检测乙烯-乙丙醇活性 食品包装膜中的香叶醇和 α -松油醇

王海丽¹, 李立¹, 陈默², 杨春香¹, 王婧^{1,*}, 余晨¹

(1.上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2.曲阜师范大学工学院, 山东 日照 371100)

摘要: 建立乙烯-乙丙醇包装膜中活性物质香叶醇和 α -松油醇的气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 联用检测方法。实验首先讨论了样品前处理条件和GC-MS测定条件, 对迁移至模拟液中的活性物质采用所建方法检测, 外标法定量分析。结果表明香叶醇和 α -松油醇在0.02~2.0 mg/L范围内均线性关系良好, 相关系数分别为0.999 2和0.999 0。该方法的检出限分别为0.003 mg/kg和0.007 mg/kg, 定量限分别为0.010 mg/kg和0.020 mg/kg。以0.1、0.2 mg/kg和1.0 mg/kg添加水平进行方法学验证, 回收率为82.5%~98.5%, 相对标准偏差为3.6%~10.4%。本方法快速、简便、灵敏度高, 可为进一步研究活性物质在食品包装材料中的释放机理及活性食品包装膜的应用安全性方面提供有效的检测方法。

关键词: 气相色谱-质谱联用; 香叶醇; α -松油醇; 乙烯-乙丙醇; 活性食品包装膜

Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Rapid Detection of Geraniol and α -Terpinenol in Ethylene-Vinyl Alcohol Copolymer Active Food Packaging Film

WANG Haili¹, LI Li¹, CHEN Mo², YANG Chunxiang¹, WANG Jing^{1,*}, YU Chen¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Engineering, Qufu Normal University, Rizhao 371100, China)

Abstract: A method for detecting geraniol and α -terpinenol incorporated into ethylene-vinyl alcohol (EVOH) active food packaging film was established by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The extraction and detection conditions were optimized. The external standard method was used to conduct quantitative analysis. The results showed that the GC-MS method had a good linearity over the concentration range of 0.02–2.0 mg/L for geraniol and α -terpinenol with correlation coefficients of 0.999 2 and 0.999 0, respectively. The limits of detection (LOD) for the analytes were 0.003 and 0.007 mg/kg and limits of quantification (LOQ) were 0.010 and 0.020 mg/kg, respectively. The recoveries of the preservatives were in the range of 82.5%–98.5% at spiked levels of 0.1, 0.2 and 1.0 mg/kg with relative standard deviations (RSDs) ranging from 3.6% to 10.4%. The method is rapid, simple and highly sensitive. It can provide a foundation for further insight into the release mechanism of active substances from active food packaging materials and offer a detection method for ensuring the safety of active food packaging film for application.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); geraniol; α -terpinenol; ethylene-vinyl alcohol (EVOH); active packaging film

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201702048

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 02-0306-05

引文格式:

王海丽, 李立, 陈默, 等. 气相色谱-质谱联用法检测乙烯-乙丙醇活性食品包装膜中的香叶醇和 α -松油醇[J]. 食品科学, 2016, 38(2): 306-310. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201702048. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Haili, LI Li, CHEN Mo, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for rapid detection of geraniol and α -terpinenol in ethylene-vinyl alcohol copolymer active food packaging film[J]. Food Science, 2016, 38(2): 306-310. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201702048. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-06-28

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目 (14YZ120); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (21407090/B070702)

作者简介: 王海丽 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品包装技术。E-mail: 1430367410@qq.com

*通信作者: 王婧 (1970—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: j-wang@shou.edu.cn

香叶醇(geraniol, Ger), 又名“牻牛儿醇”是一种单萜烯醇, 沸点230 °C, 能溶于醇、醚。香叶醇天然存在于牻牛儿苗科天竺葵属天竺葵、禾本科香茅属等250种植物之中^[1]。该有机物主要从天然植物中提取, 也可利用 β -蒎烯为原料进行人工合成。目前, Ger主要应用于医药、烟草和食品添加剂等领域^[2-4]。 α -松油醇(α -terpinenol, Ter)属于萜类化合物, 是一种无色黏稠液体或低熔点透明结晶, 其广泛存在于松节油、茶树精油、柠檬油、油樟油等精油中^[5-6]。研究发现, Ter不仅具有广谱抑菌性^[7], 而且具有一定的药理作用, 如抗痉挛作用、抗炎作用等^[8-9]。

近年来, 通过直接或间接的方式将抗菌剂、抗氧化剂等物质加入到塑料树脂中来制备活性包装的研究越来越多。Ramos等^[10]在聚丙烯(polypropylene, PP)树脂中加入香芹酚和百里酚, 并研究了活性PP包装膜的物理机械性能和抗菌性能。乙烯-乙烯醇(ethylene-vinyl alcohol, EVOH)共聚物是一种具有链式分子结构的结晶性聚合物, 该高聚物将乙烯聚合物的加工性和乙烯醇聚合物的阻隔作用相结合, 具有高的机械强度、弹性、表面硬度、耐磨性、高度透明和耐气候性, 最显著特点是其对气体的阻隔作用^[11-13], 可以有效地阻止O₂等气体的渗透且具有很强的耐油性和耐有机溶剂性^[14-15]。它被用在包装结构中, 通过防止氧气的渗入来提高食品香味和质量的保留程度。但同时EVOH树脂在湿润情况下气体渗透性大为提高, 被称为活性包装的热点研究材料, 在包装领域得到了广泛使用^[16]。Calatayud等^[17]将可可粉提取物加入到EVOH共聚物中制备了新型的活性食品包装膜; 杨辉等^[18]用几种植物精油对EVOH共聚物进行改性, 制备成活性食品包装膜后并对草鱼进行保鲜包装, 有效延长了鱼肉的保质期, 该实验在EVOH共聚物中分别加入Ger和Ter两种天然有机物, 自主研发了EVOH活性食品包装膜, 获得的活性食品包装膜具备一定的抑菌功能, 可延长食品的保鲜时间。但此类活性包装主要是通过活性物质的释放或扩散^[19], 改善被包装食品的微环境, 抑制食品表面的微生物生长及脂质氧化酸败, 从而达到延长食品保质期的目的。

天然抑菌作用活性物质常见的检测方法主要有高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法^[11,20]、气相色谱法^[21-23]、气相色谱-质谱(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)法^[24-25]等。目前, 天然抑菌活性物质的研究主要集中在活性物质来源的中草药植物或精油, 而对天然活性物质应用于食品包装膜中, 进一步探讨检测方法以及其在食品包装膜中的释放机理和保鲜过程中的活性物质浓度改变的研究相对较少。本实验首先采用HPLC法同时测定Ger和Ter, 但由于Ger和Ter两种物质化学非极性大并且相似, 应用反

相色谱柱(C₁₈)和亲水色谱柱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)进行分离时, 均未实现分离和准确定量的要求。实验最终确立的GC-MS方法, 同时检测EVOH活性食品包装膜中的Ger和Ter两种物质时, 因沸点差异显著, 两物质达到完全分离, 取得了良好的定性和定量结果。该方法具有选择性强、检出限低、准确性高的优点, 可为今后研究EVOH活性食品包装膜中的活性物质提供有效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

EVOH塑料树脂 日本可乐丽公司; Ter(纯度≥99%) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 冰醋酸(分析纯), 正己烷、乙腈、甲醇(均为HPLC级), Ger(纯度≥99%) 国药集团化学试剂有限公司; 实验用水为Milli-Q超纯水。

1.2 仪器与设备

6890-5973A GC-MS联用仪 美国Agilent公司; 2695型HPLC仪(配有二极管阵列检测器) 美国Waters公司; LSSL-20双螺杆挤出机、LSC-20吹膜机、XSS-300转矩流变仪 上海科创橡塑机械设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 活性包装膜的制备

实验设计制备4种不同类型的包装膜: A: EVOH(空白); B: EVOH+6% Ger(E/Ger); C: EVOH+6% Ter(E/Ter); D: EVOH+3% Ger+3% Ter(E/Ger+Ter); 其中百分数为添加活性物质的质量分数。

保鲜膜样品制备过程: EVOH原料树脂+活性物质→双螺杆挤出→共混改性造粒→改性后母粒→单螺杆挤出吹膜→EVOH活性包装膜。其中, 改性造粒7个加热区温度分别设置为165、170、175、180、185、185、175 °C; 挤出吹膜4个区的加热温度分别为165、175、185、175 °C。包装膜样品制备好后, 分别装入铝箔自封袋内, 密封避光保存备用。

1.3.2 活性包装膜样品的前处理

准确称取1 g包装膜样品, 剪碎后置于50 mL离心管内, 避光处用正己烷对样品膜浸泡24 h, 将离心管振荡摇匀, 吸取提取液经0.45 μm微孔滤膜过滤至气相进样瓶中待测。

1.3.3 标准溶液的配制

分别准确称取0.050 0 g Ger和Ter标准品至50 mL棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 配制1 000 mg/L的标准储备溶液, -18 °C保存备用。使用时将储备液用甲醇稀释成1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 mg/L, 经0.45 μm微孔滤膜过滤后待GC仪进样测试。

1.3.4 GC-MS条件

GC条件: DB-1701毛细管柱($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$) ; 升温程序: 初始温度 $70\text{ }^\circ\text{C}$, 保持 5 min , 以 $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $140\text{ }^\circ\text{C}$, 保持 5 min , 以 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $250\text{ }^\circ\text{C}$, 保持 3 min , 分析时间 38 min ; 载气为高纯氮气, 恒流模式; 流速 $1\text{ mL}/\text{min}$; 不分流进样; 进样量 $1\text{ }\mu\text{L}$; 进样口温度 $280\text{ }^\circ\text{C}$ 。

MS条件: 电子电离源; 离子源温度 $230\text{ }^\circ\text{C}$; 传输线温度 $280\text{ }^\circ\text{C}$; 选择反应监测模式(全扫描模式和选择离子扫描模式); 定量离子: m/z 69、59。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

称取活性包装膜样品D: EVOH+3% Ger+3% Ter(E/Ger+Ter) 1 g, 将剪碎的样品膜浸泡在纯水、3%醋酸溶液、10%乙醇溶液、95%乙醇溶液、正己烷5种不同的食品模拟液中, 24 h后振荡摇匀, 提取样品溶液。按1.3.4节方法进行检测。实验结果显示用纯水、3%醋酸溶液、10%乙醇溶液、95%乙醇溶液4种极性溶剂提取的样品溶液中Ger和Ter均未检出, 而正己烷提取的样品溶液中Ger和Ter均有高含量检出。由于Ger和Ter两种活性物质疏水性极强, 5种提取溶剂中只有正己烷能够提取, 因此实验最终确定选用正己烷作为提取溶剂。

2.2 样品量与提取溶剂量比例的选择

按照样品量与提取溶剂量比例 $1:1\,000$ 、 $1:500$ 、 $1:50$ (g/mL)分别将2种活性包装膜浸泡在正己烷中。共计得到6个样品溶液, 其中 $1:50$ 的比例的样品溶液中Ger和Ter的色谱峰清晰, 两者分别在 14.152 min 和 16.276 min 处得到相应的色谱峰, 且能够准确定量。故样品和提取溶剂采用 $1:50$ 的比例提取样品中的活性物质。

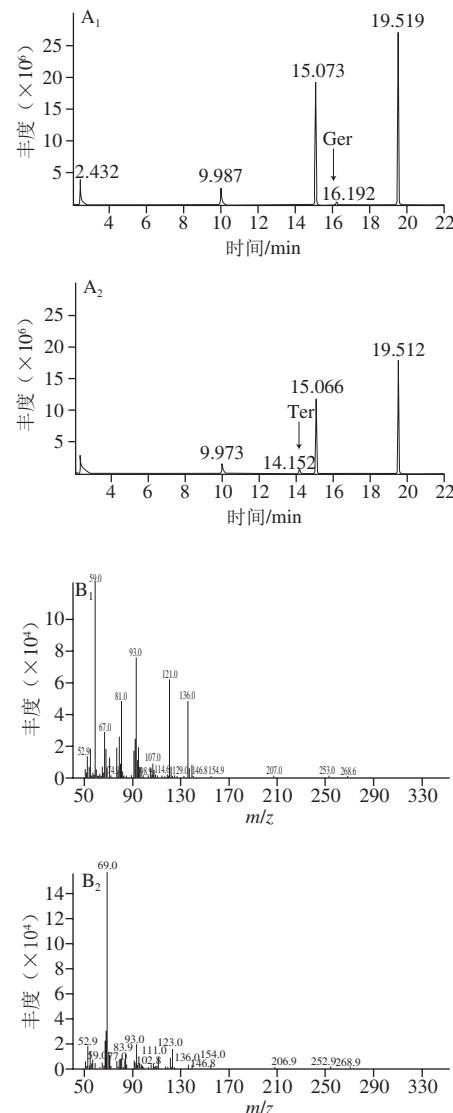
2.3 线性关系、标准曲线以及检出限

用甲醇分别将Ger和Ter的标准储备液稀释成质量浓度为 $0.02\sim 2.0\text{ mg/L}$ 系列标准工作溶液, 在设定的仪器条件下测定。以目标物定量离子的峰面积对相应的质量浓度(mg/L)绘制标准曲线, 如表1所示, Ger和Ter在 $0.02\sim 2.0\text{ mg/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数分别为0.999 2和0.999 0, 检出限($R_{SN}=3$)分别为 0.003 mg/kg 和 0.007 mg/kg , 定量限($R_{SN}=10$)分别为 0.010 mg/kg 和 0.020 mg/kg 。从图1可知, 用Ger及Ter的标准溶液做单级质谱全扫描, 得到总离子流图(图1A), 对Ger、Ter的色谱峰进行提取, 可以得到相应的MS图(图1B), Ger丰度最高的碎片离子为 m/z 59, Ter丰度最高的碎片离子为 m/z 69, 这2个碎片离子分别为Ger和Ter的特征离子, 并选择它们作为定量离子。

表1 Ger和Ter的保留时间、定量离子、定量限、标准曲线方程及相关系数

Table 1 Retention time, quantitation ion, limit of quantitation, equations of standard curves and RSD for Ger and Ter

化合物	保留时间/min	定量离子(m/z)	定量限/(mg/kg)	标准曲线方程	相关系数 R^2
Ger	16.192	59	0.010	$y=1.7\times 10^5x-3.6\times 10^4$	0.999 2
Ter	14.152	69	0.020	$y=2.1\times 10^6x-4.5\times 10^4$	0.999 0



下标: 1. Ger标准溶液; 2. Ter标准溶液。

图1 Ger、Ter标准溶液的总离子流图(A)和MS图(B)

Fig. 1 Total ion current chromatograms (A) and mass spectra (B) of mixed standard solutions of Ger and Ter

2.4 方法的回收率与精密度

分别向空白EVOH保鲜包装膜正己烷浸泡液中添加Ger和Ter标准溶液, 使最终添加含量分别为 0.1 、 0.2 、 1.0 mg/kg 。Ger和Ter的三水平加标平均回收率在 $82.5\%\sim 98.5\%$ 范围内, 相对标准偏差在 $3.6\%\sim 10.4\%$ 范围内, 见表2。

表2 不同添加水平的回收率和精密度($n=6$)Table 2 Recovery and precision of the method at different spiking levels ($n=6$)

化合物	添加量/(mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
Ger	0.1	82.5	10.2
	0.2	85.7	8.2
	1.0	91.3	3.6
Ter	0.1	84.6	10.4
	0.2	90.7	5.2
	1.0	98.5	3.9

2.5 实际样品测定

采用本研究选择的最优条件进行前处理, GC-MS检测方法。同时分析了E/Ger、E/Ter以及E/Ger+Ter三种食品包装膜样品中的活性物质Ger和Ter含量, 如图2所示。

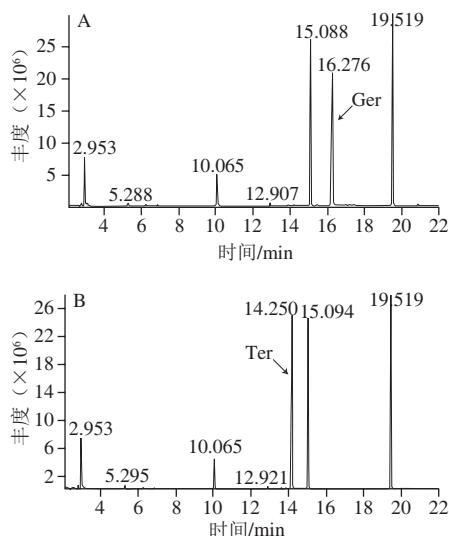


图2 样品膜E/Ger (A) 和E/Ter (B) 的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Ger (A) and Ter (B) in real samples

由图2可知, 食品包装膜样品中的Ger保留时间为16.276 min, Ter保留时间为14.250 min。相比于两者各自的标液出峰情况, Ger保留时间延长了0.084 min, Ter保留时间延长了0.098 min。E/Ger中Ger检出含量为245~268 mg/kg, E/Ter中检出量为223~247 mg/kg, E/Ger+Ter中Ger和Ter的检出含量分别为108~125 mg/kg和115~128 mg/kg。但两者峰形较好, 峰强度高, 定量准确度较高。

3 结论

本研究建立了有机溶剂萃取、外标法定量、GC-MS法直接测定食品包装膜E/Ger、E/Ter以及E/Ger+Ter中的活性物质Ger和Ter含量的方法。结果表明, 该方法具有操作简单、分析时间短、准确度高等优点, 可为活性食品包装膜等食品接触性材料的应用安全性检测以及Ger和Ter的迁移规律检测提供相关技术参考。

参考文献:

- [1] 孙立宏, 孙立明. 香叶醇的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(5): 428-430. DOI:10.3969/j.issn.1004-2407.2009.05.057.
- [2] KIM J M, MARSHALL M R, COMELL J A, et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(6): 1364-1368. DOI:10.1111/j.1365-2621.1995.tb04592.x.
- [3] LORENZI V, MUSSELLI A, BEMARDINI A F, et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(5): 2209-2211. DOI:10.1128/AAC.00919-08.
- [4] CAMESECCHI S, SCHNEIDER Y, CERALINE J, et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001, 298(1): 197-200.
- [5] UTAMI H, BUDIMAN A, SUTIJAN R, et al. Heterogeneous kinetics of hydration of α -pinene for α -terpineol production: non-ideal approach[J]. World Academy of Science, Engineering and Technology, 2011, 80: 916-919.
- [6] HAMMER K A, CARSON C F, RILEY T V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(4): 853-860. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x.
- [7] SAVITHIRY N, CHEONG T K, ORIEL P. Production of α -terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable limonene hydratase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 63/65(1): 213-220.
- [8] de SOUSA D P, QUINTANS L Jr., de ALMEIDA R N. Evolution of the anticonvulsant activity of α -terpineol[J]. Pharmaceutical Biology, 2007, 45(1): 69-70.
- [9] HELD S, SCHIEBERLE P, SOMOZA V. Characterization of α -terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by *in vitro* studies using oral buccal cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(20): 8040-8046. DOI:10.1021/jf071691m.
- [10] RAMOS M, JIMENEZ A, PELTZER M, et al. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(3): 513-519. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.031.
- [11] LOPEZ-DE-DICASTILLO C, NERIN C, ALFARO P, et al. Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7832-7840. DOI:10.1021/jf201246g.
- [12] 李婷, 李姜, 张玉清, 等. 微层共挤出(PP+EVOH)/PP阻隔材料的结构与性能研究[J]. 高分子学报, 2009(12): 1226-1231. DOI:10.3321/j.issn:1000-3304.2009.12.008.
- [13] 宋渊. 高阻隔性树脂EVOH在肉类包装中的应用[J]. 肉类工业, 2008(12): 20-23. DOI:10.3969/j.issn.1008-5467.2008.12.007.
- [14] LOPEZ-DE-DICASTILLOÓPEZ-DE-DICASTILLO C, ALONSO J M, CATALA R, et al. Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(20): 10958-10964. DOI:10.1021/jf1022324.
- [15] MURIEL-GALET V, LOPEZ-CARBALLO G, GAVARA R, et al. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(2): 239-244. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.009.

- [16] 梁晓红, 呼和, 王羽, 等. 高阻隔复合膜对冷鲜肉货架期的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(5): 150-153. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2015.05.030.
- [17] CALATAYUD M, LOPEZ-DE-DICASTILLO C, LOPEZ-CARBALLO G, et al. Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1): 51-58. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.01.097.
- [18] 杨辉, 杨福馨, 欧丽娟, 等. 植物精油-EVOH活性包装膜对草鱼鱼肉保鲜效果的研究[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 320-324. DOI:10.7506/spxx1002-6630-201422062.
- [19] 陈晨伟, 段恒, 杨福馨, 等. 释放型食品抗氧化活性包装膜研究进展[J]. 包装工程, 2014, 35(13): 36-42; 80.
- [20] BUONOCORE G G, CONTE A, CORBO M R, et al. Mono-and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2005, 6(4): 459-464. DOI:10.1016/j.ifset.2005.05.006.
- [21] 刘莉, 李清, 陈晓辉, 等. GC法同时测定粗壮女贞苦丁茶中4种挥发性成分[J]. 中成药, 2011, 33(6): 997-1000. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2011.06.024.
- [22] CERISUELO J P, ALONSO J, AUCEJO S, et al. Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging[J]. Journal of Membrane Science, 2012, 423: 247-256. DOI:10.1016/j.memsci.2012.08.021.
- [23] GRACIANO-VERDUGO A Z, SOTO-VALDEZ H, PERALTA E, et al. Migration of α -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability[J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1073-1078. DOI:10.1016/j.foodres.2010.01.019.
- [24] COSENTINO S, TUBEROSO C I G, PISANO B, et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 29(2): 130-135. DOI:10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x.
- [25] 樊二齐, 王云华, 郭叶, 等. 6种木兰科植物叶片精油的气质联用(GC-MS)分析[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(2): 307-312. DOI:10.3969/j.issn.2095-0756.2012.02.023.