

市售橄榄油中铜-焦脱镁素 a 的 HPLC-MS/MS 快速测定

金馥瑞, 李莹, 李伟, 刘莹, 申雷, 王俏力

(天津市食品安全检测技术研究院, 天津 300308)

摘要:为了快速、准确检测市售橄榄油中非法添加的脂溶性色素,建立了一种测定橄榄油中铜-焦脱镁素 a 的高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)。使用 SPE 柱对样品进行净化前处理,随后通过 HPLC-MS/MS 进行定性和定量检测,色谱分析采用 C8 色谱柱,以甲醇-1 mol/L 乙酸铵水溶液(体积比 8:2)和甲醇-丙酮(体积比 6:4)作为流动相,进行梯度洗脱;质谱分析采用大气压化学电离,负离子扫描模式,多重反应监测模式,电子倍增电压 600 V,碎裂电压 260 V,用外标法进行定量。经过方法学验证,该方法的检出限和定量限分别为 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 91.0%~106.0%,相对标准偏差为 3.9%~5.7%。该方法具有较高的灵敏度和精密度,能够准确、快速地检测市售橄榄油中的铜-焦脱镁素 a。

关键词:高效液相色谱串联质谱法;铜-焦脱镁素 a;橄榄油;掺假

中图分类号:TS227;O657.63 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)09-0128-05

Rapid determination of copper pyropheophytin - a in commercial olive oil by HPLC-MS/MS

JIN Furui, LI Ying, LI Wei, LIU Ying, SHEN Lei, WANG Qiaoli

(Tianjin Institute for Food Safety Inspection Technology, Tianjin 300308, China)

Abstract:An analytical method for determining copper pyropheophytin - a in olive oil utilizing high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was established to accurately and quickly detect illegally added liposoluble pigments in commercial olive oil. Purification of the sample was performed using a SPE column for pre-treatment, followed by qualitative and quantitative detection using HPLC-MS/MS. The Chromatographic analysis was carried out on C8 column, with methanol-1 mol/L aqueous solution of ammonium acetate (volume ratio 8:2) and methanol-acetone (volume ratio 6:4) as mobile phases for gradient elution. Atmospheric pressure chemical ionization at negative ion mode and multi reaction monitoring scanning were used for mass spectrometry analysis under the conditions of electronic multiplication voltage 600 V and fragmentation voltage 260 V, and the analyte was quantified by external standard method. The results of the methodological validation showed that this method exhibited a limit of detection of 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and a limit of quantification of 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with spiked recovery rates ranging from 91.0% to 106.0%, with relative standard deviations varying from 3.9% to 5.7%. This method had advantages of high sensitivity and precision, and can detect of copper pyropheophytin - a in olive oil rapidly.

Key words: high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; copper pyropheophytin - a; olive oil; adulteration

收稿日期:2023-04-19;修回日期:2024-05-17

基金项目:天津市市场监督管理委员会科技计划项目(2022-W18);天津市食品安全检测技术研究院新羽计划项目(SJY2022S01)

作者简介:金馥瑞(1994),女,工程师,博士,研究方向为食品安全检测技术(E-mail)jinahu2011@hotmail.com。

橄榄油富含油酸、多酚和甾醇等营养物质,具有良好的感官特性和健康益处,其生产和消费在世界

范围内稳定增长^[1-3]。在我国,橄榄油的对外依赖水平较高^[4],根据国家粮油信息中心的数据,2020年我国橄榄油进口量为5.5万t,创历史新高^[5]。我国《食品安全国家标准 植物油》(GB 2716—2018)明确规定,食用植物油中不得添加任何香精、香料、色素,不得混有非食用油。我国粮油企业在验收橄榄油时,除了一般水平的控制指标外^[6],还增加了色泽检验。因此,个别商家在经济利益驱动下向低成本的其他油脂中添加铜叶绿素来伪造橄榄油,或者为了弥补因精炼而造成的橄榄油色泽损失而添加铜叶绿素^[7]。2013年,多家媒体报道了台湾某食品企业在其他食用油中添加铜叶绿素假冒橄榄油的事件^[8]。该假冒“橄榄油”是用少量橄榄油与葵花籽油、芥子油、大豆油混合,然后加入铜叶绿素调制颜色制成的。与天然叶绿素相比,铜叶绿素具有更高的光稳定性,其分光光度与天然叶绿素及其降解副产物相似,导致其吸收光谱重叠,难以区分^[9]。随着造假手段的不断提高,常规方法越来越难鉴定橄榄油的真实性。因此,准确可靠的检测方法对于确保橄榄油真实性至关重要。

液相色谱法常用于测定橄榄油中的铜叶绿素^[10],但其仅以保留时间作为定性依据,且灵敏度难以满足实际检测需求。相比于液相色谱法,液相色谱串联质谱法具有更高的灵敏性和更好的抗干扰能力。已有研究报道了使用高效液相色谱-三重四极杆质谱仪对橄榄油中的叶绿素铜钠进行测定,检出限和定量限分别为10 μg/kg和40 μg/kg^[11],该方法具有较高的准确性和灵敏度,适用于橄榄油中叶绿素铜钠的快速分析。但是,叶绿素铜钠是水溶性色素,亟需一种能够检测掺假橄榄油中脂溶性叶绿素铜的定性定量检测方法。

脂溶性着色剂 E141i 由叶绿素衍生物的铜配合物组成,是掺假橄榄油中的主要人工合成叶绿素。研究表明,在 E141i 掺假橄榄油中,铜-焦脱镁素 a 是所有报告样本中主要的叶绿素衍生物^[12]。因此,在分析橄榄油中是否存在用于着色的 E141i 时,应检测目标化合物铜-焦脱镁素 a 的含量。本文建立了一种快速检测橄榄油中铜-焦脱镁素 a 的高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS),并对 22 个市售橄榄油样品进行检测,快速发现有掺假嫌疑的样本,为进一步检测鉴定提供了重要线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

特级初榨橄榄油、混合橄榄油以及混合油橄榄果渣油,购自天津市内商超。铜-焦脱镁素 a 标准

品(CAS 登录号 105791-89-7), Frontier Scientific Inc. (美国犹他州); Sep-Pak Silica SPE 柱(规格为 55~105 μm, Vac 6 mL, 500 mg), Waters 公司; 乙醚、丙酮、无水乙醇,均为 HPLC 级,赛默飞世尔科技有限公司;石油醚、无水乙醚,均为 HPLC 级,天津市大茂化学试剂厂;乙酸铵,分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;去离子水,来自 Milli-Q 系统。

安捷伦 6410 三重串联四极杆液质联用仪。

1.2 实验方法

1.2.1 铜-焦脱镁素 a 标准溶液的配制

1 000 μg/mL 标准储备溶液配制:准确称取 5 mg 铜-焦脱镁素 a 标准品,加入丙酮充分溶解并转移到 5 mL 棕色容量瓶中定容,配制成质量浓度为 1 000 μg/mL 的标准储备溶液,在 -20℃ 避光条件下保存。将上述标准储备溶液用丙酮倍比稀释成质量浓度分别为 20、50、100、200、500、1 000 μg/mL 的铜-焦脱镁素 a 标准溶液。

1.2.2 样品前处理

SPE 柱填料是作为正相保留吸附剂的硅胶,其能够从非极性溶剂中吸附分析物以去除脂肪,从而得到不含脂肪的色素提取物。油样净化直接使用 SPE 柱进行快速前处理,详细步骤如下:在玻璃试管中将 1 000 mg 油样溶解在 3 mL 石油醚中,并将混合溶液加入活化后的 SPE 柱中。用 3 mL 石油醚清洗试管两次,并将其转移到 SPE 柱中。用 6 mL 石油醚-乙醚(体积比 9:1)洗脱 SPE 柱,丢弃洗脱液。用 6 mL 丙酮从硅胶填料中解吸分析物,收集馏分,室温下氮吹至干,用 1 mL 丙酮复溶,通过 0.22 μm 尼龙膜,待 HPLC-MS/MS 检测。

1.2.3 HPLC-MS/MS 定性定量分析

HPLC 条件:安捷伦 XDB-C8 反相色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);样品室温度 4℃;进样量 20 μL;流速(25℃)0.6 mL/min;流动相 A 为甲醇-1 mol/L 乙酸铵水溶液(体积比 8:2),流动相 B 为甲醇-丙酮(体积比 6:4);梯度洗脱程序为 0~10 min 100%~0% A, 10~16 min 100% B, 16~16.1 min 100% A, 16.1~18 min 100% A。

MS 条件:负离子模式的大气压化学电离(APCI)源,停留时间 200 ms,多重反应监测(MRM)模式,电子倍增电压 600 V,碎裂电压 260 V。获得铜-焦脱镁素 a 的最大丰度(m/z)为 594。

通过外标法和基质匹配校准进行定量。最强烈的跃迁(873 > 594, 45 eV)用于定量,而第二个跃迁(873 > 522, 60 eV)用于定性。

2 结果与讨论

2.1 分析条件优化

2.1.1 色谱条件优化

为了优化色谱分离性能,以不含铜-焦脱镁素 a 的特级初榨橄榄油为基质。对色谱柱的类型、洗脱方法和流动相进行优化。

尽管 C18 色谱柱被广泛用于叶绿素铜的 HPLC-MS/MS 分析,但测试发现其对铜-焦脱镁素 a 具有过度的保留。因此,采用保留力相对较弱的 C8 色谱柱。

比较了 3 种不同的洗脱条件对铜-焦脱镁素 a 分离效率、色谱峰峰形以及响应值的影响。第一种洗脱条件为使用由流动相 A[甲醇-1 mol/L 乙酸铵水溶液(体积比 8:2)]和流动相 B[甲醇-丙酮(体积比 6:4)]组成的二元流动相体系,梯度洗脱程序为 0~10 min 100%~0% A,10~16 min 100% B,16~16.1 min 100% A,16.1~18 min 100% A。在该条件下,以质量浓度为 1 mg/mL 铜-焦脱镁素 a 标准溶液得到的液相色谱图如图 1 所示。

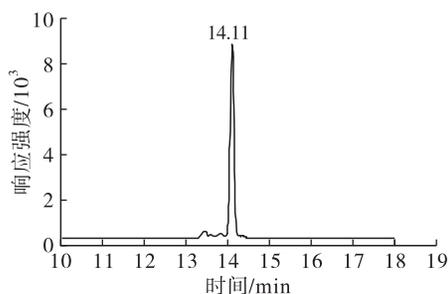


图 1 1 mg/mL 铜-焦脱镁素 a 标准溶液的液相色谱图

由图 1 可知,使用该条件确认了目标分析物铜-焦脱镁素 a 的保留时间为 14.11 min。第二种洗脱条件为使用甲醇-丙酮(体积比 3:2)等度洗脱,结果发现,铜-焦脱镁素 a 的保留时间缩短至 8 min。然而,在此条件下色谱出现多重分叉和信号减弱的现象,导致灵敏度降低。第三种洗脱条件为采用由甲醇(A1)和乙醇(B1)组成的流动相,梯度洗脱程序为 0~3 min 100%~70% A1,3~6 min 70%~40% A1,6~10 min 100% B1,10~10.5 min 100% A1,10.5~12 min 100% A1。虽然这种洗脱条件提高了色谱分离速度,但与第一种洗脱条件获得的色谱图相比,响应值仅为之前的 1/3,且色谱峰不对称。因此,第一种洗脱条件为最佳选择。

在 HPLC-MS/MS 中,可通过添加乙酸铵作为流动相来提高色谱分离效率^[13]。本研究使用由甲醇与 1 mol/L 乙酸铵水溶液混合组成的流动相,提高了分离效率并增强了质谱响应。为了进一步增强

目标化合物的电离,考察了甲醇与 1 mol/L 乙酸铵水溶液的体积比对分离效率的影响,结果发现,随着 1 mol/L 乙酸铵水溶液体积分数下降,分离效率降低,而较高比例的乙酸铵在一定程度上也减弱了分离效率,最佳甲醇与 1 mol/L 乙酸铵水溶液体积比为 8:2。因此,选择由流动相 A[甲醇-1 mol/L 乙酸铵水溶液(体积比 8:2)]和流动相 B[甲醇-丙酮(体积比 6:4)]组成的梯度洗脱程序进行检测。

2.1.2 质谱条件优化

电喷雾电离(ESI)和 APCI 是液相色谱串联质谱法中常用的两种离子源。因此,比较了这两种离子源检测橄榄油中铜-焦脱镁素 a 的效果。结果表明,使用 ESI 分析铜-焦脱镁素 a 的质谱图中背景噪声较高,造成信噪比低,难以进行准确检测。初步分析原因是铜-焦脱镁素 a 分子含有平面型的卟啉环结构,且支链为脂肪链、脂基、醚等非极性结构,导致其难以被 ESI 有效电离。而 APCI 适合中等极性化合物的电离,更利于铜-焦脱镁素 a 的检测。因此,选用 APCI 检测橄榄油中铜-焦脱镁素 a。另外,对电离模式进行选择时发现,铜-焦脱镁素 a 在正离子模式与负离子模式下均有响应,但负离子模式下响应更好,信噪比较高,因而选用负离子模式。

为了提高质谱响应,对参数进行进一步优化。将电子倍增器电压调整为 600 V,提高了灵敏度和信噪比。碎裂电压是指施加到毛细管出口端的电压,通过增加溶剂化离子的动能,实现其在高压环境下发生诱导碰撞。在温和的条件下,溶剂簇离子可以被打掉从而完成去溶剂过程,如果动能持续增加,就会产生碎片离子。通常相对分子质量越大,碎裂电压越高。为了防止目标化合物在离子源内碎裂,碎裂电压不宜过高,因此设置碎裂电压为 260 V。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性范围及检出限、定量限

首先使用优化的方法分析 1 $\mu\text{g/mL}$ 铜-焦脱镁素 a 标准溶液和添加 1 mg/kg 铜-焦脱镁素 a 的特级初榨橄榄油样品来评估该方法的定性检测性能。质谱分析结果表明,两种样品的定性离子和定量离子的相对离子丰度偏差仅为 0.1%,表明该方法在定性检测中具有较高的准确性。

通过构建溶剂校准曲线和基质匹配校准曲线,对该方法的检出限和定量限进行了评价。使用含量分别为 20、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{g/kg}$ 铜-焦脱镁素 a 标准溶液构建溶剂校准曲线,结果见图 2。

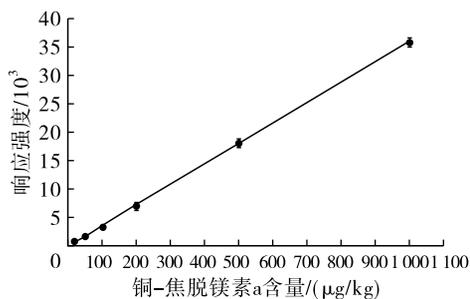


图2 铜-焦脱镁素a的溶剂校准曲线

由图2可知,铜-焦脱镁素a溶剂校准曲线的线性回归方程为 $y = 36.2x - 183.1$ (x 为铜-焦脱镁素a含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$; y 为响应强度),相关系数(R^2)为0.999 8,显示出良好的线性。以3倍信噪比(S/N)和10倍 S/N 计算出铜-焦脱镁素a的检出限和定量限分别为12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

为了最大限度地减少样品基质对检测的影响,使用不含添加剂的特级初榨橄榄油作为空白样品,制备了基质匹配标准品。基质中铜-焦脱镁素a含量分别为20、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。通过构建基质匹配校准曲线来评估质谱响应与铜-焦脱镁素a含量之间的关系,结果见图3。

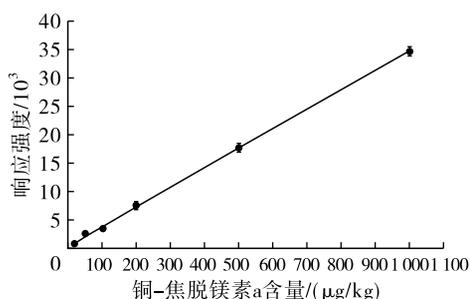


图3 特级初榨橄榄油中铜-焦脱镁素a的基质匹配校准曲线

由图3可知,特级初榨橄榄油中铜-焦脱镁素a的基质匹配校准曲线的线性回归方程为 $y = 34.5x + 339.0$ (x 为铜-焦脱镁素a含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$; y 为响应强度),相关系数(R^2)为0.999 5。这表明在20~1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的铜-焦脱镁素a含量范围内,质谱响应与铜-焦脱镁素a含量之间存在良好的线性关系。以3倍 S/N 和10倍 S/N 计算出橄榄油中铜-焦脱镁素a的检出限和定量限分别为12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2.2 基质效应

基质效应是指样品基质中分析物的响应与其在溶剂中的响应之间的偏差。如果基质效应为零,则意味着信号没有被增强或抑制。铜-焦脱镁素a的HPLC-MS/MS测定中的基质效应可以通过基质匹配校准曲线和溶剂校准曲线斜率之间的差异来表征^[11]。为了评估该方法中的基质效应,比较了基质

匹配校准曲线(图3)和溶剂校准曲线(见图2)的斜率。经计算,该方法的基质效应为-4.7%,可忽略不计,表明脂质共提取对分析物质谱响应的干扰得到了有效避免。

2.2.3 回收率和精密度

在不含铜-焦脱镁素a的特级初榨橄榄油中添加铜-焦脱镁素a,添加水平分别为100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,测定该方法的回收率和精密度,结果如表2所示。

表2 HPLC-MS/MS测定特级初榨橄榄油中铜-焦脱镁素a的回收率和精密度($n=6$)

添加量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	测量值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	RSD/%
100	98.5	98.5	5.1
200	212.0	106.0	5.7
1 000	910.0	91.0	3.9

由表2可知,HPLC-MS/MS测定特级初榨橄榄油中铜-焦脱镁素a的回收率在91.0%~106.0%,相对标准偏差(RSD)为3.9%~5.7%,精密度满足定量检测的要求。

2.3 市售橄榄油检测

为了验证橄榄油中铜-焦脱镁素a含量测定方法的有效性和适用性,对22个市售橄榄油产品中铜-焦脱镁素a含量进行了检测,结果如表3所示。

表3 市售橄榄油中铜-焦脱镁素a的含量

序号	橄榄油标称类别	原产地	铜-焦脱镁素a含量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
1	特级初榨橄榄油	西班牙	133.2 ± 26.3
2	特级初榨橄榄油	西班牙	68.3 ± 5.5
3	特级初榨橄榄油	西班牙	-
4	特级初榨橄榄油	西班牙	-
5	特级初榨橄榄油	西班牙	-
6	特级初榨橄榄油	西班牙	-
7	特级初榨橄榄油	意大利	-
8	特级初榨橄榄油	意大利	-
9	特级初榨橄榄油	西班牙	-
10	特级初榨橄榄油	西班牙	-
11	特级初榨橄榄油	西班牙	-
12	特级初榨橄榄油	西班牙	-
13	特级初榨橄榄油	西班牙	-
14	特级初榨橄榄油	西班牙	-
15	特级初榨橄榄油	中国	-
16	特级初榨橄榄油	中国	-
17	特级初榨橄榄油	西班牙	-
18	特级初榨橄榄油	西班牙	-
19	混合橄榄油	西班牙	-
20	混合橄榄油	西班牙	-
21	混合油橄榄果渣油	意大利	-
22	混合油橄榄果渣油	意大利	-

注:-为未检出

由表 3 可知,22 个样品中有 2 个品牌的特级初榨橄榄油中检出铜 - 焦脱镁素 a, 含量分别为 $(133.2 \pm 26.3) \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $(68.3 \pm 5.5) \mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前尚未有研究报道橄榄果实中有天然铜 - 焦脱镁素 a 存在,该可疑的特级初榨橄榄油中铜 - 焦脱镁素 a 的保留时间处有一个单一且无支链的色谱峰,证明该批特级初榨橄榄油中含有非法添加的铜 - 焦脱镁素 a。其余 20 个橄榄油产品的铜 - 焦脱镁素 a 检测值低于定量限,从而排除了掺杂铜 - 焦脱镁素 a 的可能性。实际样本检测结果说明,铜 - 焦脱镁素 a 的定性定量检测方法能够有效筛查出常规检测方法难以鉴别的橄榄油掺假问题。采用本方法检测出的阳性样品具有显著的掺假嫌疑,这对进一步的检测和鉴定具有重要意义。

3 结论

本文建立了采用 HPLC - MS/MS 技术测定橄榄油中铜 - 焦脱镁素 a 含量的方法。通过对流动相、洗脱程序以及质谱条件的优化,解决了橄榄油中脂溶性色素铜 - 焦脱镁素 a 难以分离分析的问题,所建立的方法检出限为 $12 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $64 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 91.0 ~ 106.0%,相对标准偏差为 3.9% ~ 5.7%。此外,在我国市售的 22 个标明为特级初榨橄榄油、混合橄榄油和混合油橄榄果渣油的橄榄油产品中进行了铜 - 焦脱镁素 a 含量检测,发现有 2 个橄榄油产品中铜 - 焦脱镁素 a 的含量分别为 $(133.2 \pm 26.3) \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $(68.3 \pm 5.5) \mu\text{g}/\text{kg}$,而其余 20 个橄榄油产品的铜 - 焦脱镁素 a 含量均低于定量限。综上,市场上存在特级初榨橄榄油掺假的风险。该方法的建立有助于完善打击橄榄油掺假的监管工作,为橄榄油掺假鉴别新技术的开发及食品安全监管提供理论参考与技术支持。

参考文献:

[1] MARTÍNEZ - GONZÁLEZ M A, SAYÓN - OREA C, BULLÓN - VELA V, et al. Effect of olive oil consumption on cardiovascular disease, cancer, type 2 diabetes, and all - cause mortality: A systematic review and meta - analysis[J]. *Clin Nutr*, 2022, 41(12): 2659 - 2682.

[2] JIMENEZ - LOPEZ C, CARPENA M, LOURENÇO - LOPES C, et al. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil[J/OL]. *Foods*, 2020, 9(8): 1014[2023 -

04 - 19]. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>.

[3] ATROUZ K, BOUSBA R, MARRA F P, et al. Algerian olive germplasm and its relationships with the central - western Mediterranean varieties contributes to clarify cultivated olive diversification[J/OL]. *Plants*, 2021, 10(4): 678[2023 - 04 - 19]. <https://doi.org/10.3390/plants10040678>.

[4] 宋海英,王靖. 地缘关系视角下的中国食物对外依赖风险[J]. *华南农业大学学报(社会科学版)*, 2023, 22(3): 1 - 9.

[5] 王瑞元. 2021 年我国粮油产销及进出口情况[J]. *中国油脂*, 2022, 47(6): 1 - 6.

[6] 王艳,方恩华. 特级初榨橄榄油基本质量指标及要求[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(6): 1995 - 2003.

[7] LU C, LI B, JING Q, et al. A classification and identification model of extra virgin olive oil adulterated with other edible oils based on pigment compositions and support vector machine[J/OL]. *Food Chem*, 2023, 420: 136161[2023 - 04 - 19]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136161>.

[8] 罗志. 染色橄榄油危害大吗[J]. *家庭医药*, 2014(2): 68.

[9] LIAN W N, SHIUE J, WANG H H, et al. Rapid detection of copper chlorophyll in vegetable oils based on surface - enhanced Raman spectroscopy[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015, 32(5): 627 - 634.

[10] 张晓莉,王波,刘阿静,等. 液液萃取 - UPLC 快速测定初榨橄榄油中叶绿素铜钠的含量[J]. *中国油脂*, 2021, 46(9): 149 - 152.

[11] 陈桐,周洪斌,王现平,等. 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法测定橄榄油中叶绿素铜钠[J]. *分析试验室*, 2019, 38(8): 921 - 924.

[12] PÉREZ - GÁLVEZ A, RÍOS J J, ROCA M. A new probe for tracking the presence of E141i food colorant[J]. *Food Control*, 2015, 51: 240 - 243.

[13] HOU J, XIE W, HONG D, et al. Simultaneous determination of ten neonicotinoid insecticides and two metabolites in honey and Royal - jelly by solid - phase extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2019, 270: 204 - 213.