

高效液相色谱-荧光检测法快速检测 植物油中的辣椒素和二氢辣椒素

吴娟¹, 汤见平², 薛元强¹, 严中和², 胡志雄^{1,3}, 齐玉堂^{1,3}, 张维农^{1,3}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 中粮新沙粮油工业(东莞)有限公司, 广东 东莞 523147;
3. 湖北省油脂精细化工工程技术研究中心, 武汉 430023)

摘要:以加标植物油为研究对象,通过优化前处理条件,用有机溶剂一步萃取植物油中的辣椒素和二氢辣椒素,再结合高效液相色谱和荧光检测器,建立了一种植物油中辣椒素、二氢辣椒素的快速检测方法。优化的前处理条件为:甲醇为萃取溶剂,萃取溶剂体积 30 mL(油样质量 30 g),萃取次数 2 次,每次萃取时间 10 min。优化条件下,辣椒素、二氢辣椒素的回收率为 81.08%~100.28%,日内、日间相对标准偏差分别在 0.18%~1.92%和 0.55%~5.14%范围内,两种目标物的检出限均为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法前处理较为简单,省时省力、检测成本较低、实用性强,为植物油中辣椒素、二氢辣椒素提供了一种新的检测方法。

关键词:辣椒素;二氢辣椒素;植物油;高效液相色谱-荧光检测

中图分类号:TS227;O657.63 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)12-0118-04

Rapid determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in vegetable oil by high performance liquid chromatography - fluorescence detection

WU Juan¹, TANG Jianping², XUE Yuanqiang¹, YAN Zhonghe²,
HU Zhixiong^{1,3}, QI Yutang^{1,3}, ZHANG Weinong^{1,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2. COFCO Xinsha Grain and Oil Industry (Dongguan) Co., Ltd., Dongguan 523147,
Guangdong, China; 3. Engineering Research Center of Lipid-based
Fine Chemicals of Hubei Province, Wuhan 430023, China)

Abstract: A rapid method for determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in vegetable oil by high performance liquid chromatography - fluorescence detection was established using organic solvent to extract capsaicin and dihydrocapsaicin from vegetable oil in one step through optimizing the pretreatment conditions. The pretreatment conditions of vegetable oil sample were optimized as follows: methanol used as extraction solvent, extraction solvent volume 30 mL (the oil sample mass 30 g), extraction times twice, and extraction time 10 min every time. Under the optimal conditions, the recovery rate of capsaicin and dihydrocapsaicin ranged from 81.08% to 100.28%, the intra-day and inter-day relative standard deviations ranged from 0.18% to 1.92% and from 0.55% to 5.14%, and the detection limit of the two targets was 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method was simple, time-saving, labor-saving, low-cost and practical, and could be used as a new method for determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in vegetable oil.

Key words: capsaicin; dihydrocapsaicin; vegetable oil; high performance liquid chromatography - fluorescence detection

收稿日期:2020-04-12;修回日期:2020-06-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31371783)

作者简介:吴娟(1992),女,在读硕士,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程(E-mail)1768048969@qq.com。

通信作者:张维农,教授(E-mail)zhangweinong@163.com;

汤见平(E-mail)tangjianping@cofco.com。

辣椒素和二氢辣椒素是辣椒中的活性成分,占总辣椒碱的 90% 以上,是辣椒中辣味的主要来

源^[1-2]。由于饮食习惯及口味爱好,辣椒在我国使用量较大,使用范围较广。正常食用植物油中不存在辣椒素或二氢辣椒素,然而接触过辣椒的餐厨废弃油脂难以避免地含有这类成分,因此辣椒碱类成分可作为鉴别餐厨废弃油脂的特征指标^[3],相关的检测方法亦受到广泛关注。

目前,对于植物油中辣椒素、二氢辣椒素的检测方法主要有高效液相色谱串联质谱法、免疫分析法和基于光谱技术的检测方法等。赵琴^[4]、赵灿方^[5]、梁桂娟^[6]、Wang^[7]等建立了固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱检测食用油和地沟油中的辣椒素和二氢辣椒素的方法,将样品预处理后,经过固相萃取柱富集辣椒碱,再用解吸液洗脱,然后用高效液相色谱分离目标物,并串联三重四级杆质谱进行定量分析。免疫分析法主要有时间分辨荧光免疫层析法、酶联免疫吸附法、胶体金法。杨青青^[8]建立了一种辣椒素物质时间免疫层析分析方法;李培武等^[9]提供了辣椒素人工半抗原、人工抗原的制备方法,由此得到的人工抗原可免疫获得亲和力高、灵敏度高、特异性强的辣椒素抗体,可用于食用植物油中辣椒素的免疫检测。Liu等^[10]建立了一种表面增强共振拉曼散射方法来检测辣椒素,并通过分子衍生化处理来识别非法食用油。

高效液相色谱串联质谱检测辣椒素有很高的灵敏度,但是仪器昂贵,需要专业的技术人员操作和维护,一般油脂企业和实验室无力装备。免疫分析法和基于光谱技术的检测方法效率较高,但是免疫分析法中辣椒素抗原的制备较为困难,基于光谱技术的检测方法灵敏度相对较低。因此,建立一种检出限低、操作简便且成本低的检测方法尤为重要。本文依据辣椒素和二氢辣椒素分子结构中均含有酚羟基,利用相似相溶原理,选择甲醇为萃取溶剂一步萃取植物油中的辣椒素和二氢辣椒素,并优化前处理条件,建立了一种高效液相色谱-荧光检测方法。该方法能在一定程度上降低检测成本。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

实验用植物油,购于当地超市;辣椒素(98%)、二氢辣椒素(98%),百灵威科技有限公司;色谱级甲醇、乙腈、乙醇,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;HJ-4型多头磁力加热搅拌器,金坛市荣华仪器制造有限公司;YRE2000E旋转蒸发仪,巩义市予华仪

器有限责任公司;SHZ-III型循环水泵,上海亚荣生化仪器厂;JHX280H旋涡混合仪,北京京辉凯业科技有限公司;SB3200型超声双频清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Cary Eclipse型荧光分光光度计,美国瓦里安仪器有限公司;1260型安捷伦高效液相色谱仪(配G1311C四元泵、G1321B荧光检测器、G1316A柱温箱),安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

取30 g油样(精确到0.01 g)于100 mL离心管中,加入一定量的萃取溶剂,在磁力搅拌器上萃取一定时间后,以3 000 r/min离心5 min。取上层澄清溶液(若非萃取1次,可将离心后的沉淀于上述相同条件下萃取、离心,合并上层澄清溶液)于圆底烧瓶中,在40℃下旋蒸浓缩至干。然后用2 mL萃取溶剂复溶,用0.22 μm有机滤膜过滤后进高效液相色谱仪检测。

1.2.2 高效液相色谱检测条件

VenusilASB C18色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-超纯水(体积比70:30),流速0.7 mL/min;柱温30℃;进样量10 μL;激发波长280 nm,发射波长312 nm。

1.2.3 方法学考察

1.2.3.1 标准曲线的绘制

以甲醇为溶剂,分别配制0.125、0.250、0.500、1.000、2.500 mg/L辣椒素、二氢辣椒素的标准溶液,按照1.2.2条件进行高效液相色谱-荧光检测。以标准溶液的质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得出辣椒素、二氢辣椒素的线性回归方程。

1.2.3.2 加标回收率实验

分别在空白油样中加入不同量的辣椒素与二氢辣椒素标准溶液,配制成12.5、25.0、50.0 μg/kg 3种不同含量的混标加标油样,按照优化的样品前处理方法萃取样品中的辣椒素和二氢辣椒素,然后采用高效液相色谱仪检测,根据测得的峰面积和标准曲线回归方程计算加标回收率。

1.2.3.3 精密度实验

分别配制80.0、50.0、12.5 μg/L 3种不同质量浓度的辣椒素与二氢辣椒素标准溶液,每种标准溶液分别在同一天采用高效液相色谱仪测定5次,连续测定5 d。根据测得的峰面积,经标准曲线回归方程计算后评价实验的精密度。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的优化

以辣椒素和二氢辣椒素加标后含量均为100

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 30 g 油样为样品,对其前处理条件进行优化,每组优化选择均进行两次平行实验。

2.1.1 萃取溶剂的选择

分别以甲醇、乙腈、乙醇为萃取溶剂,在萃取溶剂体积 30 mL、萃取次数 1 次、萃取时间 10 min 条件下,考察不同萃取溶剂对辣椒素、二氢辣椒素回收率的影响,结果见图 1。

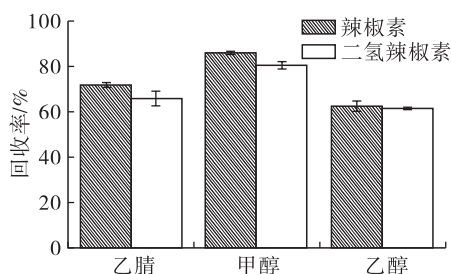


图 1 萃取溶剂种类对回收率的影响

由图 1 可知,甲醇作为萃取溶剂时,辣椒素和二氢辣椒素的回收率分别为 85.83%、80.52%,乙腈萃取时辣椒素和二氢辣椒素的回收率分别为 71.54% 和 65.97%,乙醇萃取时辣椒素和二氢辣椒素的回收率分别为 61.63% 和 61.59%,可见甲醇萃取回收率最高。因此,选择萃取溶剂为甲醇。

2.1.2 萃取溶剂体积的确定

在甲醇为萃取溶剂、萃取次数 1 次、萃取时间 10 min 条件下,加入不同体积的萃取溶剂进行萃取,考察萃取溶剂体积对萃取效果的影响,结果见图 2。

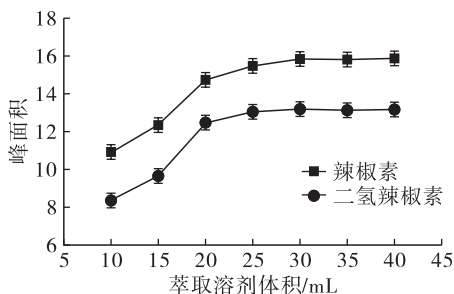


图 2 萃取溶剂体积对萃取效果的影响

由图 2 可知,随着萃取溶剂体积的增加,辣椒素和二氢辣椒素的峰面积也逐渐增加,当萃取溶剂体积增加到 30 mL 时,辣椒素和二氢辣椒素的峰面积趋于平稳。考虑到使用 100 mL 离心管的便捷性,以及样品检测时不必要的损耗,选择最佳萃取溶剂体积为 30 mL。

2.1.3 萃取次数的确定

在甲醇为萃取溶剂、萃取溶剂体积 30 mL、萃取时间 10 min 条件下,分别萃取不同次数,考察萃取次数对萃取效果的影响,结果见图 3。

由图 3 可知,萃取次数由 1 次增加到 2 次,辣椒素与二氢辣椒素的峰面积变化较为显著,约增加了

10%,而继续增加萃取次数,辣椒素与二氢辣椒素峰面积变化不大。考虑到检测效率,选择最佳萃取次数为 2 次。

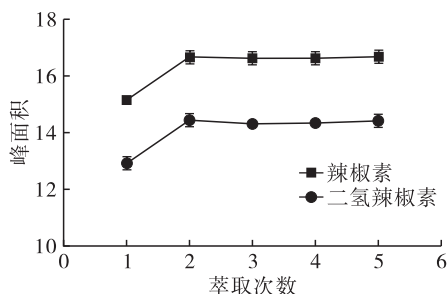


图 3 萃取次数对萃取效果的影响

2.1.4 萃取时间的确定

在甲醇为萃取溶剂、萃取溶剂体积 30 mL 条件下,萃取不同时间,再重复萃取 1 次,考察萃取时间对萃取效果的影响,结果见图 4。

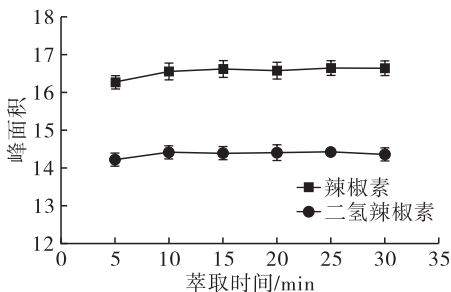


图 4 萃取时间对萃取效果的影响

由图 4 可知,萃取时间由 5 min 延长到 10 min,辣椒素与二氢辣椒素的峰面积稍有增加,约增加了 1.5%,随着萃取时间的继续延长,辣椒素与二氢辣椒素的峰面积变化不大。从尽可能提高样品中辣椒素、二氢辣椒素萃取率角度出发,选择 10 min 作为最佳萃取时间。

综上,样品前处理优化条件为:油样 30 g,甲醇为萃取溶剂,萃取溶剂体积 30 mL,萃取时间 10 min,萃取次数 2 次。

2.2 方法学考察结果

2.2.1 标准曲线

按 1.2.3.1 方法,以标准溶液的质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程,见表 1。

表 1 标准曲线回归方程

项目	回归方程	线性范围/(mg/L)	R^2
辣椒素	$Y = 11.230X + 0.353$	0.125 ~ 2.500	0.999 4
二氢辣椒素	$Y = 9.518X - 0.076$	0.125 ~ 2.500	0.999 7

由表 1 可知,在 0.125 ~ 2.500 mg/L 质量浓度范围内,辣椒素与二氢辣椒素的线性相关系数均大于 0.999,表明线性关系良好。此外,以 3 倍信噪比计算

得到辣椒素与二氢辣椒素的检出限均为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而地沟油中辣椒碱的含量一般高于 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11],因此该方法可以应用于地沟油的检测。

2.2.2 加标回收率

按 1.2.3.2 方法,考察样品加标回收率,结果见表 2。

表 2 加标回收率实验结果

加标量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	辣椒素		二氢辣椒素	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
12.5	95.54	2.52	100.13	7.72
25.0	96.80	11.00	99.27	0.26
50.0	81.08	2.02	100.28	0.61

由表 2 可知:3 种加标样品辣椒素的回收率在 81.08% ~ 96.80% 之间,相对标准偏差(RSD)在 2.02% ~ 11.00% 之间;二氢辣椒素的 3 种加标样品的回收率在 99.27% ~ 100.28% 之间,相对标准偏差在 0.26% ~ 7.72% 之间。

2.2.3 精密度

按 1.2.3.3 方法,考察检测方法的精密度,日内和日间精密度实验结果分别见表 3、表 4。

表 3 日内精密度实验结果($n=5$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	辣椒素			二氢辣椒素		
	测量值/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RSD/ %	回收 率/%	测量值/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RSD/ %	回收 率/%
12.5	11.86	0.18	94.87	12.08	0.67	96.65
50.0	45.56	1.92	91.12	48.13	0.78	96.25
80.0	78.13	0.78	97.66	76.59	0.69	95.74

表 4 日间精密度实验结果($n=5$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	辣椒素			二氢辣椒素		
	测量值/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RSD/ %	回收 率/%	测量值/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RSD/ %	回收 率/%
12.5	11.83	0.61	94.62	11.71	0.55	93.66
50.0	44.14	2.48	88.27	48.80	2.60	97.60
80.0	77.12	1.96	96.40	77.80	5.14	97.24

由表 3 可知,日内辣椒素重复测量的准确度在 91.12% ~ 97.66% 之间,相对标准偏差在 0.18% ~ 1.92% 之间,二氢辣椒素的准确度在 95.74% ~ 96.65% 之间,相对标准偏差在 0.67% ~ 0.78% 之间。由表 4 可知,连续 5 d 辣椒素重复测量的准确度在 88.27% ~ 96.40% 之间,相对标准偏差在 0.61% ~ 2.48% 范围内,二氢辣椒素的准确度在 93.66% ~ 97.60% 之间,相对标准偏差在 0.55% ~

5.14% 之间。通过对 3 种不同质量浓度辣椒素、二氢辣椒素标准溶液的日内、日间实验,样品的准确度均不低于 88.27%,相对标准偏差不高于 5.14%,综合说明该实验方法具有良好的重现性、准确度和精密度。

3 结论

本文结合高效液相色谱-荧光检测,建立了一种植物油中辣椒素和二氢辣椒素的检测方法。在甲醇为萃取溶剂、萃取溶剂体积 30 mL、萃取次数 2 次、每次萃取时间 10 min 条件下,加标样品回收率均在 81.08% 以上,辣椒素和二氢辣椒素的检出限均为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,可以应用于食用油或非食用油中辣椒素、二氢辣椒素的检测,为检测地沟油提供了一种新方法。

参考文献:

- [1] 李如华,韩振泰. 辣椒中辣椒素的高效液相色谱法测定[J]. 现代科学仪器, 2008(6): 77-79.
- [2] 韩超,叶丽如,蔡小军,等. 微波辅助萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定辣椒中 3 种辣椒素[J]. 药物分析杂志, 2012(8): 55-59.
- [3] 毛丽莎,仲岳桐,卢紫燕,等. 泔水油中辣椒素检测技术研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013(3): 544-546.
- [4] 赵琴,胡艺凡,许静,等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱快速检测食用油和地沟油中辣椒素和二氢辣椒素[J]. 分析科学学报, 2014(6): 13-18.
- [5] 赵灿方,邓志芬,李琳,等. 地沟油中辣椒素的检测方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(18): 2630-2633.
- [6] 梁桂娟,张琼,李红洲. LC-MS/MS 法测定食用油中的辣椒素和二氢辣椒素[J]. 中国酿造, 2016(7): 175-179.
- [7] 王龙星,金静,王淑秋,等. 非正常食用油鉴别新方法(一):三种辣椒碱残留量的液相色谱-质谱分析[J]. 色谱, 2012, 30(11): 1094-1099.
- [8] 杨青青. 食用植物油外源污染物辣椒素及黄曲霉毒素免疫检测技术研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2016.
- [9] 李培武,马飞,张奇,等. 一种辣椒素人工半抗原、人工抗原及其制备方法: CN103951577B [P]. 2015-07-22.
- [10] LIU Z, YU S, XU S, et al. Ultrasensitive detection of capsaicin in oil for fast identification of illegal cooking oil by SERRS[J]. ACS Omega, 2017, 2(11): 8401-8406.
- [11] 国振,李秀琴,高方圆,等. 液相色谱-同位素稀释质谱法检测食用油中辣椒碱类化合物[J]. 化学试剂, 2016, 38(6): 491-495.