

固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定食用油脂中的合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素

阳 曦¹, 向世杰²

(1. 绵阳市食品药品检验所, 四川 绵阳 621000; 2. 四川省农产品质量安全中心, 成都 610000)

摘要:建立了食用油脂中天然辣椒素、合成辣椒素和二氢辣椒素的固相萃取-液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测方法。样品经2%氢氧化钠溶液提取, C₁₈固相萃取小柱净化后, 进高效液相色谱-串联质谱仪, 采用乙腈和0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 多反应监测(MRM)在正离子模式下进行质谱扫描, 对3种辣椒素进行定量测定。结果表明, 合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素在0.5~50 ng/mL质量浓度范围线性关系良好, 相关系数大于0.999 0, 三者检出限分别为0.05、0.03、0.03 μg/kg, 回收率在71.2%~87.5%之间, 相对标准偏差小于4.0%。该方法快速、准确, 灵敏度高, 能有效满足实验室对食用油脂中非法添加餐厨废油的定量检测。

关键词:固相萃取; 液相色谱-串联质谱法; 辣椒素; 食用油脂; 餐厨废油

中图分类号: TS207.3; O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)05-0130-05

Determination of synthetic capsaicin, natural capsaicin and dihydrocapsaicin in edible oil by solid phase extraction - liquid chromatography - tandem mass spectrometry

YANG Xi¹, XIANG Shijie²

(1. Mianyang Institute for Food and Drug Control, Mianyang 621000, Sichuan, China;

2. Sichuan Agricultural Product Quality and Safety Center, Chengdu 610000, China)

Abstract: A rapid determination method of synthetic capsaicin, natural capsaicin and dihydrocapsaicin in edible oil by solid phase extraction - liquid chromatography - tandem mass spectrometry (SPE - HPLC - MS/MS) was established. The samples were extracted by 2% sodium hydroxide solution, purified with C₁₈ solid phase extraction column, then injected into high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry for quantitative determination of three capsaicinoids using acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution as the mobile phase for gradient elution and multiple reaction monitoring (MRM) to scan mass spectrometry in positive ion mode. The results showed that the linear relationships of synthetic capsaicin, natural capsaicin and dihydrocapsaicin were good in the range of 0.5 - 50 ng/mL, and the correlation coefficients were all greater than 0.999 0, the detection limits were 0.05, 0.03 μg/kg and 0.03 μg/kg respectively, the recoveries were 71.2% - 87.5%, and the relative standard deviations were less than 4.0%. The method was rapid, accurate and sensitive, and could effectively meet the laboratory quantitative determination of illegal addition of kitchen waste oil in edible oil.

Key words: solid phase extraction; liquid chromatography - tandem mass spectrometry; capsaicinoids; edible oil; kitchen waste oil

收稿日期: 2020-08-14; 修回日期: 2021-02-24

作者简介: 阳 曦(1987), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品质量安全检测(E-mail) 381830470@qq.com。

通信作者: 向世杰, 高级农艺师, 硕士(E-mail) 191741623@qq.com。

餐厨废油主要是指餐厨反复用油或从剩菜中收集的上层浮油^[1]。近年来, 常有报道在餐饮环节中使用餐厨废油的违法行为, 严重危害了消费者的健

康。辣椒在我国的餐饮习惯中使用范围广泛,特别是在川菜、火锅中是必备调味剂。辣椒中含有辣椒素类物质,其中天然辣椒素和二氢辣椒素的含量达到其总量的90%^[2]。目前违法分子通过不断提高餐厨废油的精炼工艺,使得常规的检测手段难以对其进行鉴别。但辣椒素类物质性质非常稳定,具有较强脂溶性,且常规的餐厨废油处理工艺并不能将其完全去除^[3],而正常食用油脂中基本不含辣椒素类物质,因此目前已有将食用油脂中是否有辣椒素类物质作为是否使用餐厨废油的判定依据的相关报道^[4-5]。

常见的辣椒素类物质检测方法有分光光度法^[6-7]、液相色谱法^[8-10]和液相色谱-质谱联用法^[11-13]。现行有效的国家标准测定辣椒素类物质的方法主要为液相色谱法^[14-15]和分光光度法^[16]。分光光度法只能测定辣椒素的总量,不能对某一组分进行定量。液相色谱法检测灵敏度低,检出限一般为微克级,且定性存在一定难度,易造成假阳性。液相色谱-质谱联用法具有灵敏度高且定性定量准确的特点,检出限能达到纳克级,且分析时间短,可应用于食用油脂中辣椒素类物质的分析。但现有报道的同时测定3种辣椒素的液相色谱-质谱联用法,或对仪器设备的要求高,如采用静电场轨道阱质谱仪^[17]、特定的前处理净化系统^[3],或试验方法有一定的局限,如液液萃取法净化效果不理想^[18]、同位素内标定量成本较高^[19]等问题。基于此,本试验建立了食用油脂中合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素的测定方法,采用固相萃取柱进行净化,液相色谱-串联质谱法测定目标物。该方法前处理操作简便、通用性强,测定结果稳定可靠,可为餐厨废油的判定提供有效的检测依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绵阳市城区经营类餐馆厨房食用油脂共10批以及从剩菜中收集的油脂共5批。

合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素标准物质,北京百灵威科技有限公司;乙腈、甲酸,色谱纯, Fisher公司;乙酸铵、氢氧化钠、二氯甲烷、硫酸,分析纯,成都科隆公司;C₁₈固相萃取(SPE)小柱(500 mg, 3 mL),天津博纳艾杰尔科技有限公司。

4000 Q TRAP 高效液相色谱-串联质谱仪,美国 AB SCIEX 公司;MS603S 电子天平、XSE205 电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司;Direct-Q 超纯水机,美国 Millipore 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制

精密称取合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素标准物质各 25 mg,置同一 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成各组分质量浓度分别为 1 mg/mL 的混合标准储备液。临用时,吸取该储备液适量用甲醇逐级稀释,配成质量浓度分别为 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL 的系列混合标准溶液。

1.2.2 标准曲线的绘制

分别精密吸取系列混合标准溶液各 5 μ L 注入仪器进行测定,以各组分质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 样品前处理

1.2.3.1 提取

精密称取 1.000 g 样品于 10 mL 离心管中,依次加入 1 mL 二氯甲烷、3 mL 2% 氢氧化钠溶液,涡旋 10 min,于 4 000 r/min 离心 10 min,取上层水相,剩余部分再加入 3 mL 2% 氢氧化钠溶液,按上述步骤重复提取 1 次,合并水相,再用稀硫酸溶液(1+15)调节 pH 至 2~3 之间后待净化。

1.2.3.2 净化

C₁₈固相萃取小柱预先用 3 mL 乙腈活化 3 次,再用 3 mL 超纯水活化 3 次后,将调节完 pH 的提取液移入已活化好的小柱内,控制流速至 1~2 滴/s,待全部液体通过固相萃取小柱后,用 3 mL 超纯水淋洗 2 次,弃去全部淋洗液,抽干小柱内液体,再用乙腈洗脱 2 次,每次 3 mL,收集洗脱液,于 50 $^{\circ}$ C 水浴中用氮气吹至近干,用 0.5 mL 甲醇复溶,过 0.22 μ m 微孔滤膜,待测定。

1.2.4 液相色谱条件

Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 3 μ m);流速 0.4 mL/min;进样量 5 μ L;色谱柱温度 35 $^{\circ}$ C;流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液;梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0	30	70
1.0	30	70
1.5	95	5
5.0	95	5
5.1	30	70
6.0	30	70

1.2.5 质谱条件

电喷雾电离源(ESI);正离子扫描,多反应监测

(MRM); 离子喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 550 °C; 碰撞室入口电压 10 V, 碰撞室出口电压 12 V; 气帘气压力 172 kPa; 喷雾器压力 379 kPa; 辅助加热器压力 345 kPa。具体质谱分析参数见表 2。

表 2 质谱分析参数

目标化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
合成辣椒素	294.1	137.6*	63	27
		170.6	69	13
天然辣椒素	306.2	137.6*	62	20
		182.7	66	15
二氢辣椒素	308.1	137.6*	67	20
		184.7	68	15

注: * 为定量离子对。

1.2.6 实际样品的测定

对 10 批取自经营类餐馆厨房的食用油脂及 5 批从剩菜中收集的油脂, 按照 1.2.3 方法进行前处理, 采用优化的液相色谱、质谱方法进行 3 种辣椒素含量的测定。

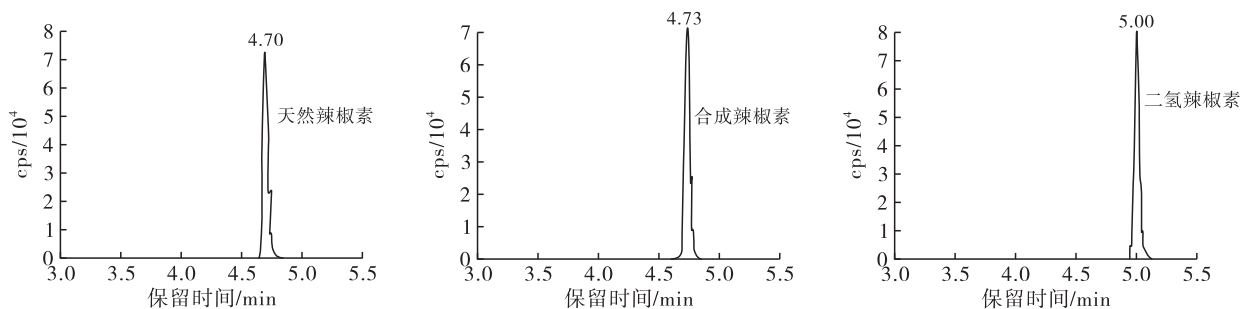


图 1 3 种辣椒素的 MRM 图

2.2 液相色谱条件的选择

3 种目标化合物均为弱极性, 在 C_{18} 色谱柱上能有较好的保留, 因此选用 Thermo Acclaim C_{18} 色谱柱作为分离柱。流动相采用梯度洗脱, 使 3 种目标化合物获得较好的保留时间, 在流动相中加入 0.1% 甲酸水溶液, 可以提高离子化效率^[20]。在此液相色谱条件下, 3 种辣椒素在 6 min 内完全分离, 且峰形良好。

2.3 样品前处理的选择

样品中辣椒素的测定一般为溶剂提取^[18,21-22]直接进样测定以及溶剂提取后再净化处理^[19,23-24]进样测定两种方式。提取溶剂一般有甲醇、甲醇-四氢呋喃、甲醇-丙酮、乙醇、正己烷及碱性溶液(2% 氢氧化钠溶液)等^[25-27], 净化方式主要有固相萃取^[3]和凝胶色谱^[17]。本试验比较了甲醇、乙腈、2% 氢氧化钠溶液作为目标物的提取溶剂。结果发现, 甲醇和乙腈虽然能够有效地提取辣椒素类物质, 但同时会带出较多的油脂, 特别是采用溶剂提取后直接进样测定, 待测液中残留的油脂及其他干扰物质较多, 容易造成基质效应及质谱仪污染。当采用

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

辣椒素类物质为碱性化合物, 当选择正离子模式进行扫描时, 用甲酸对样品进行酸化, 易得 H^+ 带正电荷。该类化合物结构中还带有酰胺基团, 在正离子模式下易得到质子, 形成 $[M + H]^+$ 准分子离子峰。将质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液使用针泵连续进样注入质谱仪, 找到母离子, 确定其质荷比 (m/z)。然后再进行子离子扫描, 3 种辣椒素类化合物母离子进一步裂解, 都产生了 m/z 137.6 的碎片离子峰, 该碎片离子为 C—N 键断裂后形成的香草基结构, 为辣椒素类化合物特征碎片, 可作为定量离子。在该裂解过程的同时, 还会产生其他的子离子碎片, 选择响应较强的碎片离子作为定性子离子。最后在 MRM 模式下优化碰撞能量和去簇电压, 得到本试验质谱分析条件(见表 2), 定量离子的 MRM 图见图 1。

2% 氢氧化钠溶液提取时, 辣椒素类物质的酚羟基在碱性环境下解离, 使其在水中的溶解性增强, 实现了与油脂的分离。不同提取溶剂对 3 种辣椒素回收率的影响见图 2。由图 2 可看出, 2% 氢氧化钠溶液为提取溶剂时 3 种辣椒素回收率均最高, 说明以 2% 氢氧化钠溶液作为提取溶剂, 提取液用 C_{18} 固相萃取小柱净化, 能够实现目标物的富集, 并能有效消除油脂以及其他杂质造成的干扰, 提高检测灵敏度。

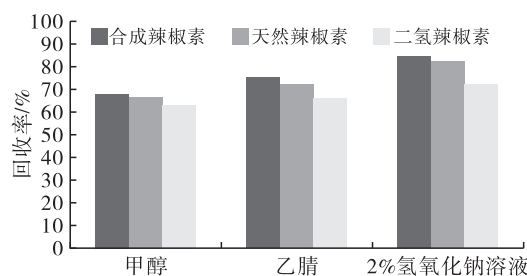


图 2 不同提取溶剂对 3 种辣椒素回收率的影响

2.4 基质效应

采用基质匹配标准品与溶剂标准品的信号相应之比(基质效应因子)来评价基质效应^[28-29]。当基

质效应因子小于100%时,表现为离子抑制;基质效应因子等于100%时,无基质效应;基质效应因子大于100%时,离子增强。考察的3个质量浓度样品的基质效应结果见表3。

表3 基质效应考察结果

质量浓度/ (ng/mL)	基质效应因子/%		
	合成辣椒素	天然辣椒素	二氢辣椒素
0.5	92.5	103.4	102.5
5.0	98.5	108.2	101.6
50.0	97.6	105.0	104.3

表4 3种辣椒素的线性范围、回归方程、相关系数及检出限

目标化合物	线性范围/(ng/mL)	回归方程	相关系数	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
合成辣椒素	0.5 ~ 50	$y = 4\ 110x + 5\ 060$	0.999 3	0.05
天然辣椒素	0.5 ~ 50	$y = 3\ 820x + 3\ 960$	0.999 4	0.03
二氢辣椒素	0.5 ~ 50	$y = 5\ 690x - 3\ 740$	0.999 2	0.03

2.6 回收率及精密度

按试验方法对某阳性样品(合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素测定值分别为未检出、18.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和5.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)进行3个水平的加标回收试验,平行测定6次,加标水平及结果见表5。由表5可看出,3种辣椒素回收率为71.2%~87.5%,相对标准偏差(RSD)均小于4.0%,说明该方法具有良好的准确度和重复性。

表5 回收试验结果($n=6$)

目标化合物	加标水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	RSD/%
合成辣椒素	1	76.5	2.8
	10	87.5	1.5
	20	86.8	1.1
天然辣椒素	1	87.1	3.2
	10	82.7	1.3
	20	75.5	1.2
二氢辣椒素	1	73.8	2.3
	10	71.7	1.6
	20	71.2	0.8

2.7 样品的测定

采用所建立的方法对取自餐馆厨房的食用油脂样品进行检测,所测10批餐馆厨房食用油脂样品中均未检出辣椒素类物质。5批从剩菜中收集的油脂中,有3批检出辣椒素类物质,3批阳性样品检测结果见表6。

表6 阳性样品检测结果 $\mu\text{g}/\text{kg}$

批次	合成辣椒素	天然辣椒素	二氢辣椒素
1	未检出	38.4	22.5
2	未检出	15.8	7.1
3	未检出	18.0	5.5

由表3可看出,3种目标化合物基质效应较小,因此本试验采用溶剂匹配标准溶液,外标法定量。

2.5 线性关系及检出限

按1.2.2方法绘制标准曲线,得到回归方程及相关系数,以信噪比(S/N)为3时对应的辣椒素的质量浓度计算目标化合物的检出限(LOD),结果见表4。由表4可看出,3种化合物在试验质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于0.999 0,合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素的方法检出限分别为0.05、0.03、0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结论

建立了食用油脂中合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素的固相萃取-液相色谱-串联质谱检测方法。样品经2%氢氧化钠溶液提取, C_{18} 固相萃取小柱净化后进高效液相色谱-串联质谱仪中,以 C_{18} 色谱柱为分离柱,采用乙腈和0.1%甲酸水溶液为流动相,采用MRM、正离子模式下进行扫描,对3种辣椒素进行定量测定。结果表明,合成辣椒素、天然辣椒素和二氢辣椒素在0.5~50 ng/mL质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于0.999 0,检出限分别为0.05、0.03、0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在71.2%~87.5%之间,相对标准偏差小于4.0%。该方法快速、准确、灵敏度高,能有效满足实验室对食用油脂中非法添加餐厨废油的定量检测。

参考文献:

- [1] 曹文明,孙禧华,陈凤香,等.“地沟油”鉴别技术研究展望[J].中国油脂,2012,37(5):1-5.
- [2] 贾洪峰,张森,梁爱华,等.食品中辣味物质的研究[J].中国调味品,2011,36(7):18-20,31.
- [3] 徐彦辉,刘燕,丁磊.GPC-HPLC-MS/MS法测定食用油中天然辣椒素、二氢辣椒素和合成辣椒素含量[J].化学分析计量,2016,25(5):72-76.
- [4] 梁婧婧,苏锡辉,史铁嘉,等.“地沟油”检测鉴别技术研究概况[J].食品工业,2013,34(10):196-199.
- [5] 管卓龙.“地沟油”鉴别技术[J].现代食品,2016(19):68-71.
- [6] 刘洪升,韩丙军.光度法测定辣椒碱生物农药中辣椒碱总量[J].现代农药,2008,7(1):24-26.
- [7] 刘敬兰,陈连文.减压层析柱-分光光度法分离和测定辣椒色素中的辣椒素[J].化学研究与应用,1995,7(3):318-320.

- [8] 贾洪锋,彭德川,梁爱华,等. 高效液相色谱法测定豆瓣中辣椒素类物质含量[J]. 中国调味品,2012,37(2):104-108.
- [9] 王旭,王富华,钟红舰,等. 高效液相色谱法测定食品中的辣椒素、二氢辣椒素[J]. 食品科学,2008,29(7):378-381.
- [10] 廖妍俨,龙四红,寻思颖,等. 液相色谱-荧光检测法测定辣椒制品中的辣椒素和二氢辣椒素[J]. 中国调味品,2016,41(9):123-125.
- [11] 罗辉泰,黄晓兰,吴惠勤,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时快速测定食用油中9种外源性杂质成分[J]. 分析测试学报,2019,38(5):532-538.
- [12] 国振,李秀琴,高方园,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.
- [13] 梁桂娟,寻思颖,张琼,等. 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,2016,35(7):175-179.
- [14] 辣椒及辣椒制品中辣椒素类物质的测定及辣度表示方法:GB/T 21266—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [15] 辣椒及其油树脂 总辣椒碱含量的测定 高效液相色谱法:GB/T 30388—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [16] 辣椒及其油树脂 总辣椒碱含量的测定 分光光度法:GB/T 30389—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [17] 刘诗瑶,吴文林,肖全伟,等. 超高效液相色谱四极杆/静电场轨道阱质谱快速筛查和定量检测食用油脂中的天然辣椒素、合成辣椒素和二氢辣椒素[J]. 食品工业科技,2020,41(13):259-263.
- [18] 张忠,任飞,张盼. 液-液萃取-液相色谱-串联质谱法测定“地沟油”中辣椒碱类化合物及丁香酚[J]. 色谱,2012,30(11):1108-1112.
- [19] 徐旭文,李双,陈树兵,等. 食用油中三种辣椒素类物质的快速筛查[J]. 分析实验室,2019,38(2):191-195.
- [20] 季荣荣,韩明星,田坤,等. 液质联用法鉴定辣椒素类物质成分[J]. 信息记录材料,2020,21(3):25-28.
- [21] 刘立业,钟方丽,娄大伟,等. HPLC法测定辣椒红色素中辣椒素及二氢辣椒素含量[J]. 吉林化工学院学报,2015,32(8):1-3.
- [22] 尼海峰,但晓容,李炼钢. 高效液相色谱法测定火锅底料中辣椒素类物质[J]. 中国调味品,2014,39(11):115-119.
- [23] 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.
- [24] 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,2014,30(6):777-782.
- [25] 任玉洁. 川菜中辣椒素类物质检测方法的建立及辣味特征分析[J]. 保鲜与加工,2019,19(6):191-196.
- [26] 张海利,李焕秀,刘为国,等. 高效液相色谱法测定不同品种辣椒中的辣椒素[J]. 四川农业大学学报,2008,26(2):131-134.
- [27] 李卓,陈冬,舒蕊华,等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中辣椒素的不确定度评定[J]. 中国调味品,2017,42(5):135-137.
- [28] 左英芳. 液质联用仪的基质效应研究[J]. 新农民,2019(5):20-21.
- [29] 余晓琴,李澍才. 超高效液相色谱-质谱联用法定量测定奶茶中的3种毒品成分[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(16):5517-5522.
- (上接第124页)
- [10] 汤富彬,莫润宏,钟冬莲,等. 皂化提取-高效液相色谱法测定油茶籽油中苯并(a)芘残留[J]. 中国油脂,2012,37(2):62-64.
- [11] 黄坤,王幸平,尹佳,等. 高效液相色谱法测定大米和小麦粉中的苯并(a)芘[J]. 粮食与油脂,2018,31(10):86-88.
- [12] 李永新,张宏,毛丽莎,等. 气相色谱/质谱法测定熏肉中的多环芳烃[J]. 色谱,2003,21(5):476-479.
- [13] 马素换,汪学德,刘兵戈. 植物油中苯并(a)芘的检测方法比较研究[J]. 中国油脂,2014,39(8):91-94.
- [14] 程威威,汪学德,刘兵戈,等. HPLC-FLD和GC-MS测定芝麻油中苯并芘的方法比较[J]. 现代食品科技,2015,31(10):282-286,306.
- [15] 熊秋芳,张效明,文静,等. 菜籽油与不同食用植物油营养品质的比较:兼论油菜品质的遗传改良[J]. 中国粮油学报,2014,29(6):122-128.
- [16] 杨占南,彭全材,罗世琼,等. 贵阳市油炸食品中苯并芘的测定及其安全评价[J]. 食品科学,2008,29(10):449-452.
- [17] 食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定:GB 5009.27—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [18] 郑睿行,祝华明,龚鸿萍,等. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱联用测定食用植物油中苯并(a)芘[J]. 食品科学,2011,32(22):209-212.
- [19] 刘艳琴,王浩,杨红梅. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱法测定植物油中苯并芘[J]. 食品科技,2013,38(1):327-329.