

GPC – UPLC – MS/MS 测定食用油脂中 5 种辣椒素类物质

张居舟^{1,2}, 李 静^{1,2}, 邓小芳³

(1. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051; 2. 安徽国家农副加工食品质量监督检验中心, 合肥 230051;
3. 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要:建立了凝胶渗透色谱-超高效液相色谱-串联质谱法(GPC-UPLC-MS/MS)测定食用油脂中天然辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、降二氢辣椒素、高二氢辣椒素含量的方法。样品经凝胶渗透色谱在线净化后,采用超高效液相色谱-串联质谱法分析,动态多反应监测模式(dMRM),同位素内标法定量。结果表明:方法在 0.05~10 μg/L 范围内线性良好,线性相关系数均大于等于 0.998;检出限为 0.02~0.05 μg/kg,定量限为 0.10 μg/kg;在 0.20、1.00、5.00 μg/kg 添加水平下,平均加标回收率为 90.6%~101.5%,相对标准偏差(RSD)为 2.5%~9.7%。该方法前处理过程简便快捷,定量准确,可满足实验室准确测定食用油脂中 5 种辣椒素类物质的需求。

关键词:凝胶渗透色谱(GPC);超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS);辣椒素;食用油脂

中图分类号:TS225; TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)09-0082-05

Determination of five kinds of capsaicins in edible oil by GPC – UPLC – MS/MS

ZHANG Juzhou^{1,2}, LI Jing^{1,2}, DENG Xiaofang³

(1. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 2. China National Center for Quality Supervision and Test of Agricultural – Avocation Processed Food, Hefei 230051, China;
3. School of Tea and Food Science & Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: A new analytical method was developed for the simultaneous determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nonivamide, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in edible oil by gel permeation chromatography (GPC) coupled with ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS). The sample was cleaned by GPC online, then analyzed by UPLC – MS/MS based on dynamic multiple reaction monitoring (dMRM) mode, and quantified using isotope internal standard technique. The results showed that the method was linear in the range of 0.05 – 10 μg/L with linear correlation coefficients not less than 0.998, and the limits of detection and quantitation were 0.02 – 0.05 μg/kg and 0.10 μg/kg respectively. The average recoveries were in the range of 90.6% – 101.5% at 0.20, 1.00, 5.00 μg/kg spiked levels with relative standards deviation (RSD) between 2.5% and 9.7%. The method had the items of simple, rapidness, and accuracy, and could be used to accurately quantify the five kinds of capsaicins in edible oil.

Key words: gel permeation chromatography (GPC); ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); capsaicin; edible oil

收稿日期:2020-11-16;修回日期:2021-05-27

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(2017YFC1601705);安徽省重点研究与开发计划项目(202004a07020024)

作者简介:张居舟(1979),男,正高级工程师,博士,研究方向为食品安全分析检测与标准研究(E-mail) juzhouzhang@163.com。

我国是全球三大食用油脂消费国之一,近 5 年食用油脂的消费量呈刚性持续增长趋势,且我国植物油总产量的复合增长率高于全球水平^[1]。但食用油脂作为高风险食品一直是食品安全监管的重点和难点,特别是“泔水油”“反复煎炸老油”是我国严重的食品安全问题,也是食品加工用油安全防控的

重点。据统计,全球每年约有1 000万t的餐厨废油产生。正常情况下,这些餐厨废油可以作为生物能源加以开发利用。然而,在暴利的驱使下,一些不法之徒将餐厨废油回收后进行非法加工,直接销售或添加到正常的食用油脂中销售,使其再次流向餐桌^[2-4]。目前,我国还没有相关标准检测食用油脂中是否添加了劣质油脂。因此,如何有效地控制食用油脂产品的质量,确保人民群众餐桌用油的安全成了目前亟需解决的重大民生问题。

辣椒是餐饮食品中的常用佐料,在餐饮中使用范围很广。辣椒中辣椒碱的主要成分为天然辣椒素和二氢辣椒素,占总辣椒碱的90%以上^[3],降二氢辣椒素、高二氢辣椒素和高辣椒素约占9%。合成辣椒素是人工合成的具有类似天然辣椒素生物学功能的化合物^[5],其分子结构上的活性基团与天然辣椒素相似,但在辣度和市场价格方面,合成辣椒素更受青睐,因此也存在被非法使用的可能。正常生产加工过程中,食用油脂不接触辣椒,其成品中也不会含有辣椒素。如果食用油脂样品中检出辣椒素类物质或合成辣椒素,这些样品可能含有回收油脂,因此通过检测辣椒素含量可以为监管部门提供技术支持。

目前,食用油脂中辣椒素的检测方法主要有液相色谱法^[6-8]、气相色谱-质谱法^[9]和液相色谱-串联质谱法^[2-3,5,10-13]等。液相色谱法受油脂基质的干扰严重,难以定性,假阳性率高,且灵敏度较低;气相色谱-质谱法需增加衍生反应的步骤。以液相色谱-串联质谱法为代表的分析方法,具有定性准确和灵敏度高等优点,但普遍存在受油脂样品基质干扰,定量不准确的缺点。本文首次构建了凝胶渗透色谱(GPC)在线前处理-超高效液相色谱-串联质谱法(GPC-UPLC-MS/MS)准确测定食用油脂中的5种辣椒素类化合物含量的方法,以期为食用油脂中非法添加回收油脂行为的准确定性定量检测提供实验室解决方案。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

芝麻油、菜籽油、花生油、大豆油、调和油各15组样品,购自合肥市内各大型超市。天然辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素,纯度为99%,德国Dr. Ehrenstorfer公司;降二氢辣椒素、高二氢辣椒素,纯度为98%,美国CATO公司;天然辣椒素-d₃标准品、二氢辣椒素-d₃标准品,纯度为95%,加拿大TRC公司;甲醇、甲酸、乙酸乙酯、环己烷,色谱纯,美国Fisher公司;实验用水为去离子水。

Agilent 1290/6495型超高效液相色谱-串联质谱仪,美国Agilent公司;Milli-Q型去离子水发生器,美国Millipore公司;Freestyle型凝胶渗透色谱仪,德国LC-TECH公司;有机微孔滤膜(孔径为0.22 μm)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

混合标准储备液的配制(1 mg/mL):分别精确称取10 mg天然辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、降二氢辣椒素和高二氢辣椒素于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,于-20℃下保存。根据实际需要,用甲醇将混合标准储备液稀释成合适质量浓度的标准工作溶液,现配现用。

同位素内标储备液(100 μg/mL):分别将1 mg天然辣椒素-d₃标准品和二氢辣椒素-d₃标准品用甲醇溶解,转移至10 mL容量瓶,定容至刻度,于-20℃下保存。根据实际需要,用甲醇稀释成合适质量浓度混合同位素内标工作液,现配现用。

1.2.2 样品前处理

称取约1.0 g食用油脂样品(精确至0.001 g),加入50 μL 100 μg/L的混合同位素内标工作液,用乙酸乙酯-环己烷(体积比1:1)定容至10 mL,涡旋至完全溶解,提取液经凝胶渗透色谱仪净化并浓缩至干,精确量取1.0 mL甲醇溶解残渣,过有机微孔滤膜,待UPLC-MS/MS分析。

GPC净化条件:Bio-beads S-X3玻璃凝胶色谱柱(300 mm × 20 mm, 38~75 μm(200~400目));流动相为乙酸乙酯-环己烷(体积比1:1),流速5.0 mL/min;流出液收集时间6~13 min。

1.2.3 UPLC-MS/MS分析条件

1.2.3.1 UPLC条件

Eclipse Plus C₁₈ RRHD色谱柱(50 mm × 3.0 mm, 1.8 μm);流动相A为0.1%甲酸溶液,流动相B为乙腈,流速0.3 mL/min;柱温40℃;进样量2 μL;梯度洗脱程序见表1。

表1 UPLC梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	90	10
3.50	40	60
3.51	10	90
5.00	1	99
5.10	90	10
7.00	90	10

1.2.3.2 MS条件

质谱部分由Agilent公司的MassHunter软件控

制。离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;动态多反应监测(dMRM);毛细管电压 3 000 V;干燥气温度 220 °C,干燥气流速 17 L/min;

雾化气压力 2.1×10^5 Pa;鞘气温度 340 °C,鞘气流速 11 L/min;喷嘴电压 400 V。动态多反应监测模式参数见表 2。

表 2 动态多反应监测模式(dMRM)参数

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV	保留时间/min	时间窗口/ms	加速电压/V	碎裂电压/V
天然辣椒素	306.3	137.0*, 182.1, 122.0	8, 25, 45	4.19	1.45	5	380
二氢辣椒素	308.3	137.0*, 184.2, 122.0	8, 12, 45	4.33	1.44	5	380
合成辣椒素	294.3	137.0*, 170.2, 122.0	7, 15, 42	4.18	1.40	5	380
降二氢辣椒素	294.1	137.0*, 94.0, 122.0	12, 55, 48	4.08	0.99	3	380
高二氢辣椒素	322.1	137.0*, 94.0, 122.0	13, 55, 50	4.45	0.92	3	380
天然辣椒素-d ₃	309.3	140.1*, 122.2	20, 15	4.19	1.42	5	380
二氢辣椒素-d ₃	311.1	140.0*, 122.0	15, 45	4.32	1.41	5	380

注: * 为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 净化方式的优化

辣椒素类物质极性很弱,易溶于脂溶性溶剂。本实验研究了乙酸乙酯-环己烷(体积比 1:1)提取,GPC 在线净化。GPC 是基于分子的空间排阻效应大小将不同体积的物质分离,可以从高相对分子质量的基体油、色素、脂肪等杂质中分离出低相对分子质量的目标物。食用油中的甘油三酯等高分子化合物在 GPC 柱上保留较弱或不被保留,优先流出色谱柱,而小分子有机物(辣椒素类物质)则被保留在柱缝隙里,这需要优化收集小分子有机物流出液的时间。为了确定辣椒素类物质的收集时间,用乙酸乙酯-环己烷(体积比 1:1)配制 10 μg/L 的 5 种辣椒素的混合标准溶液,通过凝胶色谱后分段收集,氮吹干后用甲醇定容并进行 UPLC-MS/MS 分析。图 1 为不同收集时间段 5 种辣椒素的响应值变化。

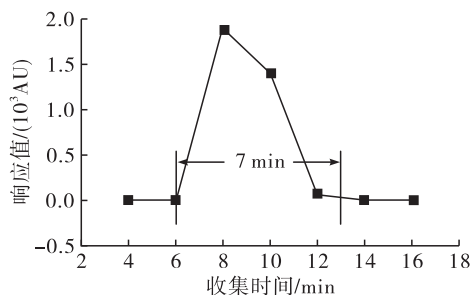
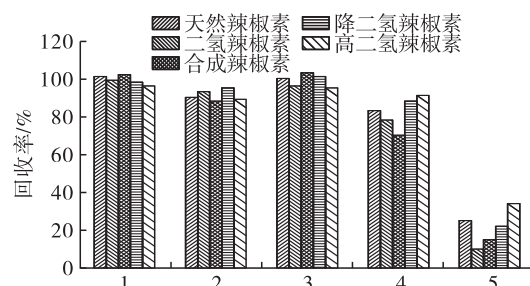


图 1 GPC 分段收集 UPLC-MS/MS 分析结果

从图 1 可以看出:在前 6 min 响应值与空白基质相似,表明无目标物流出;6~12 min 响应值最高,表明收集液中目标物含量较高;12~14 min 有少量目标物洗脱出来。因此,只收集 6~13 min 的流出物,其他时间段不收集。

取空白基质样品进行加标,同时加入内标,分别采用 1.2.2 的乙酸乙酯-环己烷提取 GPC 净化

(本方法)与文献报道的甲醇直接提取^[6]、碱液提取 C₁₈柱固相萃取^[11]、正己烷提取 NH₂柱固相萃取^[10]、甲醇提取基质分散固相萃取(QuEChERS)^[13]后,按 1.2.3 测定辣椒素类物质的含量,比较 5 种净化方式的辣椒素类物质的回收率,结果如图 2 所示。



注:1. 本方法;2. 正己烷提取 NH₂柱固相萃取;3. 碱液提取 C₁₈柱固相萃取;4. 甲醇提取 QuEChERS;5. 甲醇直接提取。

图 2 5 种不同净化方式回收率比较

从图 2 可以看出,不同净化方式处理样品后的基质效应差异很大,甲醇直接提取未净化,不能有效去除油脂基质,结果干扰最大,目标物的回收率最差,灵敏度最低。实验发现,使用 C₁₈柱固相萃取的绝对回收率最高,约 70%,GPC 与 NH₂柱次之,约 65%,QuEChERS 较低。选择内标定量后,GPC 与 C₁₈柱固相萃取回收率相当,接近 100%;NH₂柱次之;QuEChERS 最差,其基质效应仍未得到理想的改善。C₁₈柱固相萃取和 GPC 的检测结果均能满足实验要求,但前者步骤较多,过程烦琐,需要经历提取后调节 pH、淋洗、洗脱及氮吹等过程;GPC 在线净化浓缩至干,直接定容后即可进样分析,操作简单,可实现自动化前处理过程。因此,利用 GPC 测定食用油中辣椒素含量方便、快捷。

2.2 质谱及色谱条件的优化

辣椒碱类物质结构均含有酰胺基团,可以在正离子模式(ESI^+)下形成分子离子峰 $[M+H]^+$,在 m/z 100~400范围内对母离子进行全扫描(Scan),得到5种目标化合物的母离子,并依次优化干燥气温度、干燥气流速、雾化气压力、鞘气温度、鞘气流速、毛细管电压和喷嘴电压;再分别进行子离子扫描(Production),子离子主要为C-N断裂后形成的香草基部分 m/z 137.0,且响应强度优于其他碎片离子,可以作为定量离子。在优化各自的碰撞能量及碰撞池加速电压后,形成dMRM方法(见表2)。dMRM优于多反应监测(MRM)之处,在于自动进行扫描时间分配,驻留时间更长,改善信噪比,灵敏度更高。5种辣椒素结构相似,尤其是合成辣椒素与降二氢辣椒素互为同分异构体,它们具有相同的离子对,如果色谱保留时间相同,就难以准确定量,所以需要优化色谱分离条件,使二者的分离度达到检测要求。而天然辣椒素与合成辣椒素性质接近,但母离子不同,即使色谱保留时间相同,也不会影响UPLC-MS/MS进行定性和定量分析。

2.3 定量方法的选择

在UPLC-MS/MS分析中,基质效应普遍存在,使得待测物在样品处理液和纯溶剂中的灵敏度有较大差异。目前国家补充检验方法BJS 201801《食用油脂中辣椒素的测定》为外标法,也有文献使用二苯胺^[12]、氘代辣椒素^[13]作为内标物进行定量。由于油脂中基质复杂,干扰较多,且目标物经过净化处理后会有不同程度的损失。因此,本研究使用GPC

净化结合同位素内标对目标化合物进行补偿和校正。天然辣椒素有两个同位素内标:辣椒素- ^{13}C - d_3 和天然辣椒素- d_3 。辣椒素- ^{13}C - d_3 的绝对回收率更高,但价格异常昂贵,可排除。二氢辣椒素选择二氢辣椒素- d_3 作为内标。对于没有同位素内标的目标物,依据结构相似、保留时间相近、基质效应差异小的原则,合成辣椒素与降二氢辣椒素的内标均选择天然辣椒素- d_3 ,高二氢辣椒素的内标选择二氢辣椒素- d_3 。实验还进一步验证了阳性样品和空白加标样品的定量结果,分别按BJS 201801进行基质外标法和内标法定量(本方法)。结果表明,天然辣椒素的定量结果差别最大,其内标法比基质外标法的定量结果高3.4倍,内标法定量使得测定结果更接近真值。

2.4 线性范围、检出限与定量限

精密量取适量5种辣椒素混合标准储备液,用甲醇配制质量浓度分别为0.05、0.1、0.5、1、2、5、10 $\mu g/L$ 的系列标准工作溶液,同时加入2种同位素内标,内标质量浓度为5 $\mu g/L$,按1.2.3进行UPLC-MS/MS分析,以目标化合物定量离子与内标化合物离子的峰面积比为纵坐标(y),目标化合物与内标化合物的质量浓度比为横坐标(x),绘制标准工作曲线。使用标准曲线的最低点对空白食用油脂样品加标,以3倍信噪比(S/N)时的质量浓度为检出限(LOD),以10倍信噪比(S/N)时的质量浓度为定量限(LOQ)。食用油脂中5种辣椒素的线性关系、检出限和定量限如表3所示。

表3 食用油脂中5种辣椒素的线性关系、检出限及定量限

化合物	内标	线性方程	r^2	线性范围/ ($\mu g/L$)	LOD/ ($\mu g/kg$)	LOQ/ ($\mu g/kg$)
二氢辣椒素	二氢辣椒素- d_3	$y=0.48371x-0.00004$	0.999	0.05~10	0.02	0.10
天然辣椒素	天然辣椒素- d_3	$y=1.07500x+0.01015$	0.998	0.05~10	0.02	0.10
合成辣椒素	天然辣椒素- d_3	$y=0.95656x+0.02835$	0.999	0.05~10	0.05	0.10
降二氢辣椒素	天然辣椒素- d_3	$y=0.56628x-0.00074$	0.999	0.05~10	0.05	0.10
高二氢辣椒素	二氢辣椒素- d_3	$y=0.33400x-0.01390$	0.999	0.05~10	0.05	0.10

由表3可知,在各化合物的线性范围内,线性相关系数(r^2)大于等于0.998,线性关系良好,LOD为0.02~0.05 $\mu g/kg$,LOQ均为0.10 $\mu g/kg$ 。合成辣椒素的定量限比国抽风险监测文件指定检验方法(BJS 201801)的更低。

2.5 准确度与精密度

以空白食用油脂为基质,称取1.0 g基质样品,分别添加0.20、1.00、5.00 $\mu g/kg$ 3个质量浓

度水平的5种辣椒素混合标准工作溶液,同时加入50 μL 100 $\mu g/L$ 的混合同位素内标工作液,按1.2.2和1.2.3进行加标实验,每个加标量平行测定6次,计算回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表4。由表4可知,5种辣椒素的平均回收率为90.6%~101.5%,RSD为2.5%~9.7%。说明本方法的精密度和准确度均能满足痕量分析的要求。

表4 5种辣椒素的回收率及相对标准偏差

化合物	加标量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)						平均 回收率/%	RSD/%
		1	2	3	4	5	6		
天然辣椒素	0.20	0.192	0.186	0.165	0.199	0.218	0.211	97.6	9.7
	1.00	1.090	1.010	1.000	0.910	0.980	1.100	101.5	7.0
	5.00	4.870	4.950	4.690	5.200	5.170	5.040	99.7	3.9
二氢辣椒素	0.20	0.221	0.204	0.194	0.188	0.178	0.193	98.2	7.5
	1.00	1.030	1.010	0.981	0.889	0.966	0.962	97.3	5.0
	5.00	4.830	4.990	5.030	5.180	4.880	4.950	99.5	2.5
合成辣椒素	0.20	0.198	0.206	0.175	0.189	0.168	0.161	91.4	9.7
	1.00	0.971	0.962	1.030	0.902	0.877	0.915	94.3	5.9
	5.00	4.770	4.990	5.070	4.930	5.140	4.890	99.3	2.7
降二氢辣椒素	0.20	0.184	0.174	0.189	0.153	0.197	0.191	90.6	8.8
	1.00	0.833	0.929	0.883	0.912	0.988	0.950	91.6	5.9
	5.00	4.960	5.180	4.990	4.730	4.890	4.210	96.5	7.0
高二氢辣椒素	0.20	0.164	0.179	0.199	0.173	0.189	0.205	92.4	8.5
	1.00	0.937	1.040	0.890	0.853	0.968	0.910	93.3	7.0
	5.00	4.640	5.080	4.890	4.910	4.390	4.720	95.4	5.1

2.6 方法适用性与实际样品测定

选取不同品牌的芝麻油、菜籽油、花生油、大豆油、调和油各15组,共75组样品。按本文建立的检测方法进行验证,同时进行空白实验。结果表明,17组样品检出天然辣椒素,含量在 $0.15 \sim 18.0 \mu\text{g}/\text{kg}$; 12组样品检出二氢辣椒素,含量在 $0.22 \sim 7.0 \mu\text{g}/\text{kg}$; 2组样品检出合成辣椒素,含量分别为 0.81 、 $10.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。芝麻油中辣椒素总量的检出率最高,这可能是因为芝麻油存在本底的概率较大。在考察的目标化合物中,天然辣椒素的检出率最高,二氢辣椒素次之,合成辣椒素检出较少,降二氢辣椒素与高二氢辣椒素均未检出。

3 结论

本文首次建立了凝胶渗透色谱-超高效液相色谱-串联质谱法测定食用油脂中的天然辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素、降二氢辣椒素和高二氢辣椒素含量的方法。GPC在线前处理,操作便捷,可实现人机分离,提高了结果的精密度,同时结合同位素内标法定量,确保了结果的准确度和灵敏度。方法的检出限为 $0.02 \sim 0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}$,线性范围为 $0.05 \sim 10 \mu\text{g}/\text{L}$,线性关系良好,平均回收率为 $90.6\% \sim 101.5\%$,RSD为 $2.5\% \sim 9.7\%$,能够满足食用油脂中辣椒素类物质定性定量检测的需要,可为地沟油样品结果判定值的准确性提供技术支持。

参考文献:

- [1] 孟桂元,涂洲溢,詹兴国,等. 我国植物油料油脂生产、消费需求分析及发展对策[J]. 中国油脂, 2020, 45(10): 1-4, 27.
- [2] 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.

- [3] 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.
- [4] 余晓琴,何绍志,钟慈平,等. 普通食用油检验关键点分析[J]. 中国油脂, 2020, 45(10): 127-131.
- [5] 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.
- [6] 王月华,房涛,刘红,等. 食用植物油中外源性物质辣椒素的检测技术研究[J]. 粮食与食品工业, 2017, 24(2): 56-58.
- [7] 杨莉,贾洪峰,宋璐杉,等. 烫煮后麻辣火锅底料汤底及食材中辣椒素类物质的迁移变化[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 304-309.
- [8] 方林明,陶唐平,朱自德,等. 高效液相色谱法测定食品中辣椒素类化合物[J]. 食品科技, 2020, 45(6): 361-365.
- [9] 郭凌燕,蔡玉刚,黄海涛. GC-MS法检验辣椒制品中的合成辣椒素[J]. 广东公安科技, 2019, 27(2): 45-46, 58.
- [10] 梁桂娟,寻思颖,张琼,等. LC-MS/MS法测定食用油脂中的辣椒素和二氢辣椒素[J]. 中国酿造, 2016, 35(7): 175-179.
- [11] 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.
- [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] 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.