

Patrenò-Büchi 光化学反应与敞开式纳升电喷雾质谱联用鉴定食用花生油中不饱和甘油三酯

杨运云

(广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心), 广东省化学危害应急检测技术重点实验室,

广东省原位电离质谱分析工程技术中心, 广东 广州 510070)

摘要:建立了 Patrenò-Büchi 光化学反应与敞开式纳升电喷雾质谱(PB-nanoESI-MS)联用法鉴定食用花生油中不饱和甘油三酯的结构。以二苯甲酮为光化学反应试剂,将花生油溶解于含 0.4 mg/L 二苯甲酮的甲醇-氯仿(9:1, V/V)溶剂中,采用纳升电喷雾针吸取一定量的样品溶液,于 254 nm 紫外光照射下进行 PB 光化学反应约 1 min,使花生油中不饱和甘油三酯的 C=C 键与二苯甲酮的羰基发生特异性环加成反应;然后在常压敞开条件下进行纳升电喷雾质谱分析,利用高分辨质谱和串联质谱精确鉴定花生油中不饱和甘油三酯的种类、C=C 位置及其异构体。本文所建立的 PB-nanoESI-MS 方法简单、快速、准确、有效,在食用油的溯源分析及功能和质量安全评价方面具有较好的应用前景。

关键词: Patrenò-Büchi 光化学反应;敞开式纳升电喷雾质谱;不饱和甘油三酯;结构鉴定;花生油

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2021)04-0455-07

doi: 10.7538/zpxb.2021.0032

Coupling Paternò-Büchi Reaction with Ambient NanoESI-MS for Identification of Unsaturated Triacylglycerols in Peanut Oils

YANG Yun-yun

(Guangdong Provincial Engineering Research Center for Ambient Mass Spectrometry,

Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, Institute of Analysis,

Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Peanut oil is derived from *Arachis hypogaea* Linn., and it has great nutritional value due to its high contents of active unsaturated triacylglycerols. Structural identification of these active unsaturated triacylglycerols provides us the opportunities to understand the biological functions of peanut oil for human health. In this study, a method by coupling Patrenò-Büchi reaction with ambient nanoelectrospray ionization mass spectrometry (PB-nanoESI-MS) was established for the identification of unsaturated triacylglycerols in peanut oil, and benzophenone was used as photochemical reactant. The peanut oils were dissolved in methanol-chloroform (9:1, V/V) containing 0.4 mg/L benzophenone, and the sample solution was siphoned into a nanospray tip and then irradiated with 254 nm ultraviolet light for about 1 min, so that the C=C bond of the unsaturated triacylglycerols in peanut oil and the carbonyl group of benzophenone could undergo a specific ring addition reaction. Then, the sample solution was analyzed by nanoESI-MS under ambient conditions. The structure of the unsaturated triacylglycerols in peanut oil was identified by high-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry. The method established in this paper is simple, fast, accurate, and effective, and has a good application prospect in the source analysis and functional and quality safety evaluation of edible oil.

diated by a 254 nm UV for approximately 1 min. The cycloaddition reaction of $C=C$ in polyunsaturated triglycerides with carbonyl group in benzophenone was carried out. After that, nanoESI-MS analysis was performed under ambient and open-air conditions, and the structures of unsaturated triglycerides in peanut oil were identified by high-resolution and tandem mass spectrometry. The use of benzophenone as PB reagent resulted in 182 u mass increase for PB product ions, of which was easily discriminated from its original ions in the MS spectrum. When collision-induced dissociation (CID) experiment was performed to the PB product ion, $C=C$ diagnostic ion pairs were produced. Due to a mass difference of 150 u between O and $C_{13}H_{10}$, two fragment ions with 150 u mass difference were observed in the MS/MS spectrum, which were the diagnostic ions and applied to identify $C=C$ locations. As a result, a total of 29 major unsaturated triglycerides are successfully identified, and peanut oil is rich in the structure of FA[18:1($\Delta 9$)], FA[18:1($\Delta 12$)], and FA[18:2($\Delta 9, 12$)]. All the experiment results demonstrated that the developed PB-nanoESI-MS method is simple, fast, accurate, and effective, being a promising prospect in the traceability analysis as well as function and quality evaluation for edible oils.

Key words: Patrenò-Büchi photochemical reaction; ambient nanoelectrospray ionization mass spectrometry; unsaturated triglyceride; structural identification; peanut oil

食用油是人们日常烹饪的必备食品,含有人体必不可少的营养成分,是人体能量的重要来源^[1]。食用油的主要成分是甘油三酯(TAGs),其甘油骨架上结合的脂肪酸不同,且数目庞大、种类繁多。通常,食用油的 TAGs 含有 1~3 个不饱和脂肪酸链,每个不饱和脂肪酸链上含有 1 个或多个 $C=C$ 双键,基于脂肪酸链和 $C=C$ 位置的不同,形成了一系列功能不同、营养价值差异明显的不饱和甘油三酯类化合物。因此,开展食用油中 TAGs 的快速分析和结构鉴定,对研究和评价食用油的功能和质量安全,进行食用油真伪鉴别等食品安全问题具有重要意义。

质谱具有灵敏度高、准确性好、分子结构信息丰富等优点^[2-3],是对食用油进行快速分析和结构鉴定的一种强有力工具。采用基于碰撞诱导解离(CID)的二级质谱技术易获得食用油中 TAG 的脂肪酸链组成信息,但常规的质谱技术无法鉴定不饱和 TAG 的 $C=C$ 位置,也无法对 $C=C$ 异构体进行区分。近年来,清华大学瑕瑜课题组^[4-6]将 Patrenò-Büchi (PB)光化学反应与质谱技术相结合,以丙酮-水为 PB 反应试剂,对 PB 反应产物离子进行 CID 实验,获得了一系列不饱和脂肪酸(FA)、

磷脂酰胆碱(PC)和胆固醇酯等的 $C=C$ 位置信息,并成功区分了 $C=C$ 异构体,为脂质结构的精确鉴定提供了一种简单而有效的方法。然而, TAGs 的水溶性较差,在丙酮-水溶液中很难溶解,采用丙酮-水为 PB 反应试剂进行 TAGs 的 $C=C$ 位置和异构体鉴定很难获得理想的结果。二苯甲酮可溶解于甲醇、氯仿等溶剂中,有文献^[7-8]报道二苯甲酮可作为 PB 反应试剂进行光化学反应,这使得 PB 反应无需在含水的体系下进行,扩大了 PB 反应的适用性,为 TAG 的 $C=C$ 位置和异构体鉴定提供了新途径。

鉴于此,本文拟以食用花生油为研究对象,建立 PB 光化学反应与敞开式纳升电喷雾质谱(PB-nanoESI-MS)联用法精确鉴定食用油中 TAGs 结构。以二苯甲酮为 PB 光化学反应试剂,将食用油样品溶解于含有二苯甲酮的甲醇-氯仿溶剂中,并吸入纳升电喷雾针中,于 254 nm 紫外光的照射下进行 PB 光化学反应,使不饱和 TAGs 中的 $C=C$ 键和二苯甲酮中的羰基发生特异性环加成反应,然后在常压敞开条件下进行 nanoESI-MS 分析,利用高分辨质谱和串联质谱对 TAGs 结构进行精确鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

LTQ-Orbitrap Elite 线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱仪:美国 Thermo Fisher 公司产品;BG12-94-4-N-20 纳升电喷雾针:美国 New objective 公司产品;三维移动平台、254 nm 紫外灯:美国 Burdick & Jackson 公司产品。

1.2 样品与试剂

甲醇、氯仿:色谱纯,美国 Burdick & Jackson 公司产品;二苯甲酮:美国 Sigma-Aldrich 公司产品;TAG[18:3(Δ 9,12,15)/18:3(Δ 9,12,15)/18:3(Δ 9,12,15)]:瑞典 Larodan AB 公司产品;花生油:购自广州某超市。

1.3 实验条件

将 1 μ L 花生油溶解于 1 mL 含有 0.4 mg/L 二苯甲酮的甲醇-氯仿溶液(9:1,V/V)中,用纳升电喷雾针吸取 2 μ L 样品溶液,置于 254 nm 紫外灯下照射 1 min,进行 PB 光化学反应。然后,将一根不锈钢丝插入纳升电喷雾针中,保持与样品溶液接触,并将不锈钢丝与纳升电喷雾针组装至三维移动平台上,使纳升电喷雾针的尖端对准质谱入口,距离质谱入口约 5 mm。随后,向不锈钢丝施加 +3.0 kV 高压电场,诱导纳升电喷雾针内部的溶液产生纳升电喷雾电离,在常压敞开条件下直接进行质谱分析。采用 LTQ-Orbitrap-MS 全扫描模式获得质谱图,质量扫描范围 m/z 100~1 500,质量分辨率 120 000,CID 模式进行多级质谱分析,Xcalibur 2.2 软件进行仪器控制和数据处理。

2 结果与讨论

2.1 PB-nanoESI-MS 对甘油三酯标准品的结构鉴定

PB 光化学反应是一种经典的[2+2]环加成反应^[9]。以二苯甲酮为 PB 光化学反应试剂,在 254 nm 紫外光照射下,不饱和脂质的 C=C 键与二苯甲酮的羰基 C=O 键发生特异性的环加成反应,生成四元环的氧杂丁烷,产生质量数增加 182 u($C_{13}H_{10}O$)的 PB 反应产物,对产物离子进行 CID 模式检测,会产生质量差为 150 u 的诊断离子对,对应 $C_{13}H_{10}$ 与 O 之间的质量差,这些诊断离子对可提供不饱和脂质的 C=C 位置信息,示于图 1。另外,通过 PB 产物中中性丢失的脂肪酸和[FA+PB]离子信息,可以鉴定脂肪链的长度和种类。本研究将利用这些性质精确鉴定食用油中 TAG 的结构。

首先,以 TAG 标样为例进行 PB-nanoESI-MS 实验。在 PB 反应前,先对该 TAG 标样进行 nanoESI-MS 质谱分析,可观察到 $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 的质谱信号,且 $[M+Na]^+$ 峰强度最高,示于图 2a。然后,经紫外光照射进行 PB 反应 1 min 后,再进行 nanoESI-MS 分析,产生了该 TAG 与二苯甲酮(BP)的反应产物离子 $[M+BP+H]^+$ 、 $[M+BP+NH_4]^+$ 、 $[M+BP+Na]^+$ 、 $[M+BP+K]^+$ 信号,示于图 2b,其中 $[M+BP+Na]^+$ 的峰强度最高,约为其原始离子峰强度的 30%~40%。对 $[M+BP+Na]^+$ (m/z 1 077.754 9) 离子进行 CID 实验,所得

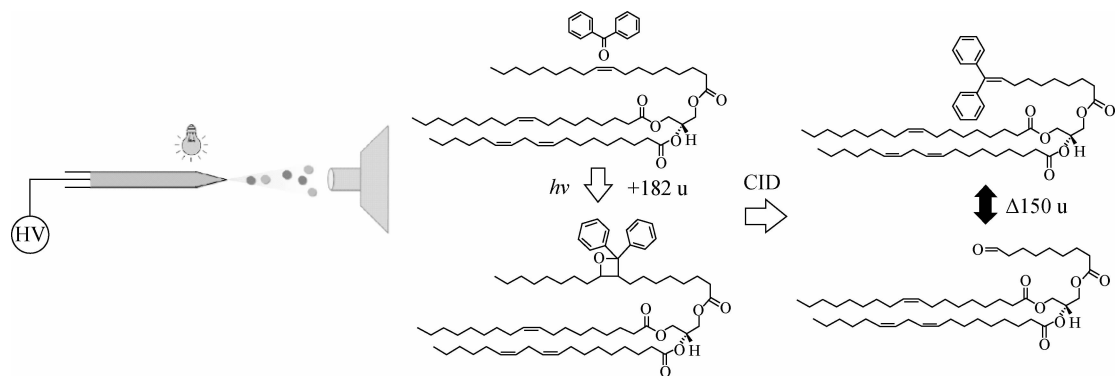


图 1 PB-nanoESI-MS 鉴定不饱和甘油三酯 C=C 双键的过程示意图

Fig. 1 Schematic illustration for the identification of C=C locations in unsaturated triglycerides by PB-nanoESI-MS

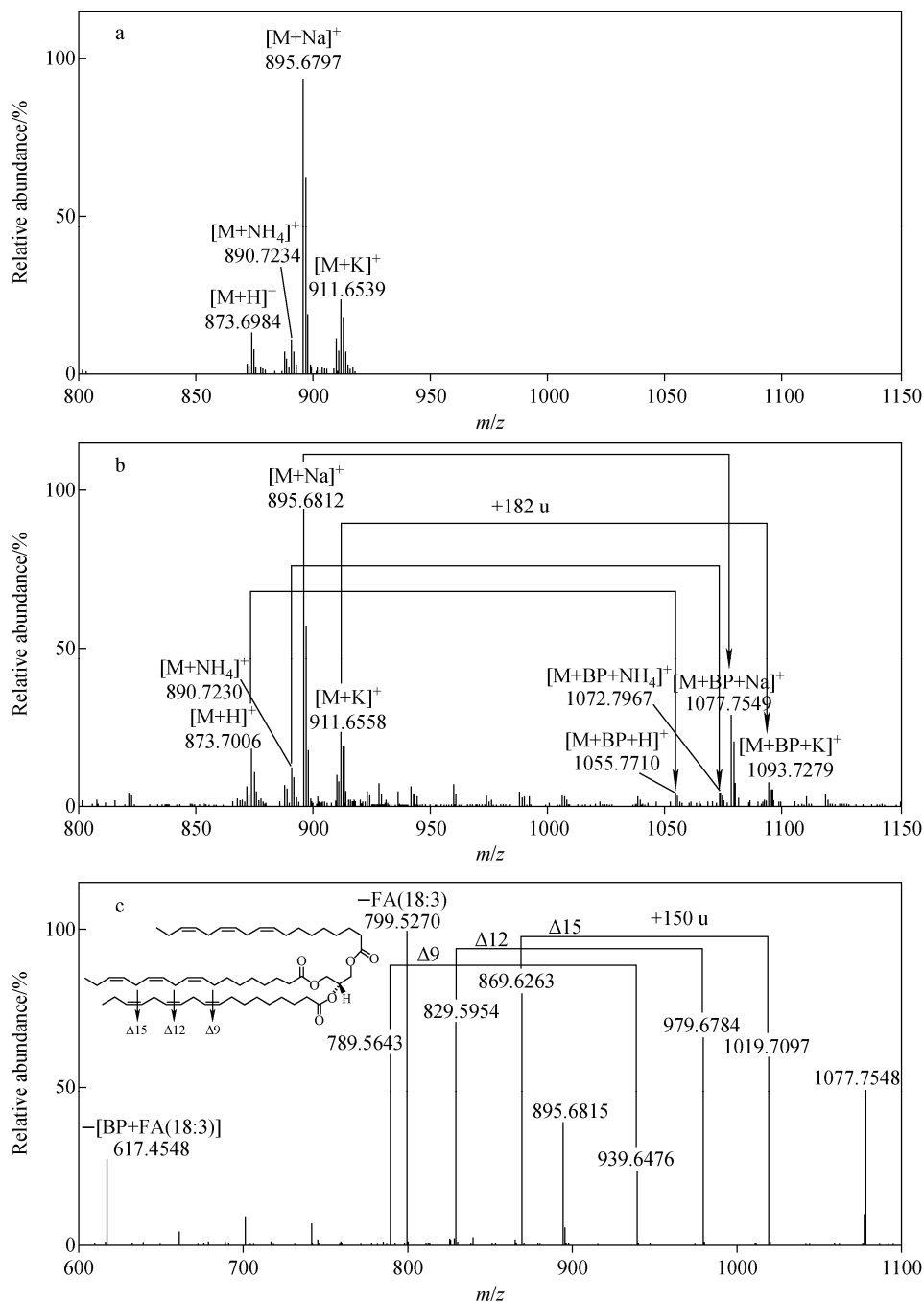


图2 TAG 标样的 nanoESI-MS(a), PB-nanoESI-MS(b) 和 $[M+BP+Na]^+$ 离子 CID(c) 质谱图

Fig. 2 Mass spectra of nanoESI-MS (a), PB-nanoESI-MS (b) and CID of $[M+BP+Na]^+$ (c) of a TAG standard

MS/MS 谱图示于图 2c。CID 二级质谱图中， m/z 799.527 0 处的高丰度碎片离子为 $[M+BP+Na]^+$ 的 FA(18:3) ($C_{18}H_{30}O_2$, 278.226 4 u) 中性丢失， m/z 617.454 8 处可观察到 1 个具有一定强度的 $[BP+FA(18:3)]$ 中性丢失，由此鉴定该 TAG 含有 FA(18:3) 的脂肪酸链。由

于在 m/z 799.527 0 和 m/z 617.454 8 处仅观察到 FA(18:3) 和 $[BP+FA(18:3)]$ 的中性丢失，表明该 TAG 的 3 条脂肪链均为 FA(18:3)。此外，在 MS/MS 谱图中还可以观察到 3 对质量差为 150 u 的诊断离子，即 m/z 789.564 3/939.647 6、 m/z 829.595 4/979.678 4 和 m/z

869.626 3/1 019.709 7,表明C=C分别位于FA(18:3)的 $\Delta 9$ 位、 $\Delta 12$ 位、 $\Delta 15$ 位。由此鉴定该TAG标样为TAG[18:3($\Delta 9,12,15$)/18:3($\Delta 9,12,15$)/18:3($\Delta 9,12,15$)]。

2.2 PB-nanoESI-MS对花生油中甘油三酯的结构鉴定

采用所建立的PB-nanoESI-MS方法分析食用花生油,在进行PB光化学反应前,先对花生油样品进行nanoESI-MS分析,所得质谱图示于图3a,在 m/z 800~1 000质量范围内可观察到一系列丰度较高的TAGs信号。通过高分辨质谱的精确质量数测定和脂质数据库LIPID MAPS检索,可推导出这些TAG可能的分子式。例如,强度较高的信号 m/z 853.724 7、855.740 7、877.726 1、879.741 0、881.756 5、883.772 0、901.725 2、903.741 0、905.755 9、907.771 1、909.787 6和911.802 9经LIPID MAPS检索分别为[TAG(50:2)+Na]⁺、[TAG(50:1)+Na]⁺、[TAG(52:4)+Na]⁺、[TAG(52:3)+Na]⁺、[TAG(52:2)+Na]⁺、[TAG(52:1)+Na]⁺、[TAG(54:6)+Na]⁺、[TAG(54:5)+Na]⁺、[TAG(54:4)+Na]⁺、[TAG(54:3)+Na]⁺、[TAG(54:2)+Na]⁺和[TAG(54:1)+Na]⁺。

PB光化学反应后,可在 m/z 1 000~1 200质量范围内观察到一系列不饱和TAGs的PB反应产物离子信号,示于图3b。这些产物离子与原来的不饱和脂质在质谱图上得到了较好区分,并以[M+BP+Na]⁺的信号强度最高,约为其原离子信号强度的30%。在此基础上,分别对每个[M+BP+Na]⁺离子进行CID实验,以鉴定每个TAG的结构。选择信号强度较高的TAG离子峰 m/z 881.756 5进行详细说明。首先,通过高分辨质谱的一级精确质量数和LIPID MAPS数据库检索,可将 m/z 881.756 5鉴定为[TAG(52:2)+Na]⁺,经PB反应后,其产物离子 m/z 1 063.829 5为[TAG(52:2)+BP+Na]⁺。随后对 m/z 1 063.829 5离子进行CID实验,所得谱图示于图3c,可观察到2对质量差为182 u的碎片离子,即 m/z 807.589 4/625.516 3和 m/z 781.574 2/599.501 8。其中 m/z 807.589 4和 m/z 781.574 2分别对应FA(16:0)和FA(18:1)的中性丢失, m/z

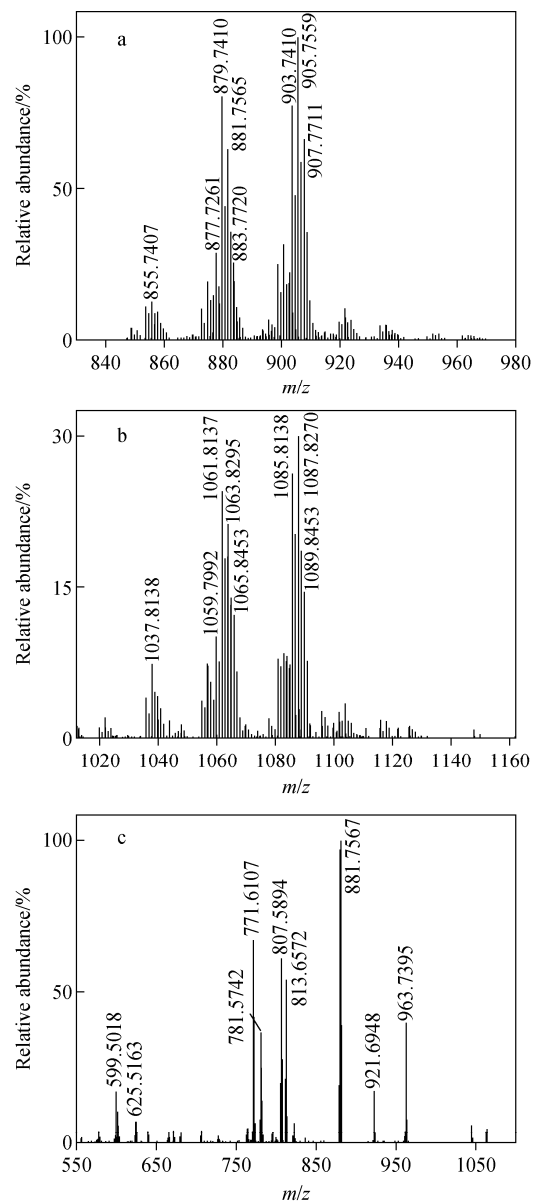


图3 花生油的 nanoESI-MS(a), PB-nanoESI-MS(b), m/z 1 063.829 5离子CID(c)质谱图

Fig. 3 Mass spectra of nanoESI-MS (a), PB-nanoESI-MS (b) and CID of 1 063.829 5 (c) from peanut oil

625.516 3和 m/z 599.501 8分别对应[BP+FA(16:0)]和[BP+FA(18:1)]的中性丢失,由此推断,该TAG(52:2)含有FA(16:0)和(18:1)两种脂肪酸链。此外,在CID谱图中可观察到2对质量差为150 u的诊断碎片离子,即 m/z 921.694 8/771.610 7和 m/z 963.739 5/813.657 2,其中 m/z 921.694 8/771.610 7诊断离子对表明C=C位于FA(18:2)的 $\Delta 9$ 位, m/z

963.739 5/813.657 2诊断离子对表明C=C位于FA(18:2)的Δ12位,进一步推断该TAG(52:2)含有FA(16:0)、FA[18:1(Δ9)]和FA[18:1(Δ12)]3种脂肪链。综上,可推断 m/z 881.756 5离子为TAG[16:0/18:1(Δ9)/18:1(Δ9)]、TAG[16:0/18:1(Δ12)/18:1(Δ12)]和

TAG[16:0/18:1(Δ9)/18:1(Δ12)]这3种异构体的混合物。花生油中其他TAG均可采用同样的方法鉴定,所得结果列于表1。由图3和表1可知,花生油不饱和TAGs中含有丰富的不饱和脂肪酸链FA[18:1(Δ9)]、FA[18:1(Δ12)]和FA[18:2(Δ9,12)]。

表 1 PB-nanoESI-MS 鉴定花生油中不饱和甘油三酯化合物
Table 1 Identified unsaturated triacylglycerols from peanut oil by PB-nanoESI-MS

分子式 Formula	离子 Ion	脂质离子 Original ion (m/z)	产物离子 Product ion (m/z)	鉴定的不饱和甘油三酯 Identified unsaturated triacylglycerols
C ₅₃ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	853.7247	1035.7979	TAG[16:0/16:0/18:2(Δ9,12)]
C ₅₃ H ₁₀₀ O ₆	[M+Na] ⁺	855.7407	1037.8138	TAG[16:0/16:0/18:1(Δ9)] TAG[16:0/16:0/18:1(Δ12)]
C ₅₅ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	877.7261	1059.7992	TAG[16:0/18:2(Δ9,12)/18:2(Δ9,12)]
C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆	[M+Na] ⁺	879.7410	1061.8137	TAG[16:0/18:1(Δ9)/18:2(Δ9,12)] TAG[16:0/18:1(Δ12)/18:2(Δ9,12)]
C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	881.7565	1063.8295	TAG[16:0/18:1(Δ9)/18:1(Δ9)] TAG[16:0/18:1(Δ12)/18:1(Δ12)] TAG[16:0/18:1(Δ9)/18:1(Δ12)]
C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆	[M+Na] ⁺	883.7720	1065.8453	TAG[16:0/18:0/18:1(Δ9)] TAG[16:0/18:0/18:1(Δ12)]
C ₅₇ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	901.7252	1083.7984	TAG[18:2(Δ9,12)/18:2(Δ9,12)/18:2(Δ9,12)]
C ₅₇ H ₁₀₀ O ₆	[M+Na] ⁺	903.7410	1085.8138	TAG[18:1(Δ9)/18:2(Δ9,12)/18:2(Δ9,12)] TAG[18:1(Δ12)/18:2(Δ9,12)/18:2(Δ9,12)]
C ₅₇ H ₁₀₂ O ₆	[M+Na] ⁺	905.7599	1087.8270	TAG[18:1(Δ9)/18:1(Δ9)/18:2(Δ9,12)] TAG[18:1(Δ9)/18:1(Δ12)/18:2(Δ9,12)] TAG[18:1(Δ12)/18:1(Δ12)/18:2(Δ9,12)] TAG[18:0/18:2(Δ9,12)/18:2(Δ9,12)]
C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	[M+Na] ⁺	907.7711	1089.8453	TAG[18:1(Δ9)/18:1(Δ9)/18:1(Δ9)] TAG[18:1(Δ9)/18:1(Δ9)/18:1(Δ12)] TAG[18:1(Δ9)/18:1(Δ12)/18:1(Δ12)] TAG[18:1(Δ12)/18:1(Δ12)/18:1(Δ12)] TAG[18:0/18:1(Δ9)/18:2(Δ9,12)] TAG[18:0/18:1(Δ12)/18:2(Δ9,12)]
C ₅₇ H ₁₀₆ O ₆	[M+Na] ⁺	909.7876	1091.8610	TAG[18:0/18:1(Δ9)/18:1(Δ9)] TAG[18:0/18:1(Δ9)/18:1(Δ12)] TAG[18:0/18:1(Δ12)/18:1(Δ12)]
C ₅₇ H ₁₀₈ O ₆	[M+Na] ⁺	911.8029	1093.8768	TAG[18:0/18:0/18:1(Δ9)] TAG[18:0/18:0/18:1(Δ12)]

3 结论

本文建立了 Paternò-Büchi 光化学反应与敞开式纳升电喷雾质谱联用分析方法, 鉴定食用花生油中不饱和甘油三酯的结构。通过光化学反应, 使花生油中不饱和甘油三酯的 $C=C$ 键和二苯甲酮中的羰基发生特异性环加成反应, 然后利用高分辨质谱和串联质谱进行花生油中甘油三酯种类和结构鉴定。所得结果表明, 花生油中含有非常丰富的不饱和脂肪酸 $FA[18:1(\Delta 9)]$ 、 $FA[18:1(\Delta 12)]$ 和 $FA[18:2(\Delta 9, 12)]$ 。本方法简单、快速、准确、有效, 可推广至其他不同种类食用油中不饱和甘油三酯的结构鉴定, 也可将该方法进行拓展, 用于建立食用油的指纹图谱, 进行食用油的快速鉴定、质量评价和真伪鉴别, 在食用油的溯源分析及功能和质量安全评价方面具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] NG T T, SO P K, ZHENG B, YAO Z P. Rapid screening of mixed edible oils and gutter oils by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 884: 70-76.
- [2] CATHARINO R R, HADDAD R, CABRINI L G, CUNHA I B S, SAWAYA A C H F, EBERLIN M N. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration, and aging[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(22): 7 429-7 433.
- [3] VACLAVIK L, CAJKA T, HRBEK V, HAJŠLOVA J. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 645(1/2):

56-63.

- [4] MA X X, XIA Y. Pinpointing double bonds in lipids by Paternò-Büchi reactions and mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(10): 2 592-2 597.
- [5] MA X X, CHONG L, TIAN R, SHI R Y, HU T Y, OUYANG Z, XIA Y. Identification and quantitation of lipid $C=C$ location isomers: a shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(10): 2 573-2 578.
- [6] MA X X, ZHAO X, LI J J, ZHANG W P, CHENG J X, OUYANG Z, XIA Y. Photochemical tagging for quantitation of unsaturated fatty acids by mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(18): 8 931-8 935.
- [7] XU T F, PI Z F, SONG F R, LIU S, LIU Z Q. Benzophenone used as the photochemical reagent for pinpointing $C=C$ locations in unsaturated lipids through shotgun and liquid chromatography-mass spectrometry approaches[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1 028: 32-44.
- [8] DENG J W, YANG Y Y, LIU Y H, FANG L, LIN L, LUAN T G. Coupling Paternò-Büchi reaction with surface-coated probe nanoelectrospray ionization mass spectrometry for in vivo and microscale profiling of lipid $C=C$ location isomers in complex biological tissues[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(7): 4 592-4 599.
- [9] ADAM W, PETERS K, PETERS E M, STEGMANN V R. Hydroxy-directed regio- and diastereoselective $[2+2]$ photocycloaddition (Paternò-Büchi reaction) of benzophenone to chiral allylic alcohols[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(12): 2 958-2 959.

(收稿日期: 2021-03-10; 修回日期: 2021-03-25)