

液相色谱/离子阱质谱法检测不同食用植物油中的叔丁基对苯二酚(TBHQ)

郝鹏鹏,倪晋仁*,孙卫玲,黄文

(北京大学环境工程系水沙科学教育部重点实验室,北京 100871)

摘要:本文采用液相色谱/离子阱质谱法(LC/ITMS)对食用植物油中的抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)进行定量检测。样品经萃取后,以甲醇-水(体积比 50:50)作为流动相,以 C₁₈ 作为分离柱,以电喷雾离子源作为接口,在负离子检测模式下进行一、二级质谱分析。二级质谱检测的线性范围为 61.8~4 542.5 μg/L ($R^2 = 0.9999$),最低检出限为 48 μg/L;10 种食用植物油中 TBHQ 的回收率为 (81.9 ± 1.9)% ~ (109.6 ± 4.6)%,RSD($n = 10$) 5.3%。该法能快速、简便、准确地检测食用植物油中的抗氧化剂 TBHQ。

关键词:质谱学;叔丁基对苯二酚;液相色谱-离子阱质谱法

中图分类号: O657.63; O625.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2005)04-222-06

Quantification of TBHQ in Edible Vegetable Oil by Liquid Chromatography/ Ion Trap Mass Spectrometry

HAO Peng-peng, NI Jin-ren*, SUN Wei-ling, HUANG Wen

(The Key Laboratory of Water and Sediment Sciences of Education Ministry,
Department of Environmental Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Liquid chromatography/ion trap mass spectrometry (LC/ITMS) was used to quantify the synthetic phenolic antioxidant tertiary butylhydroquinone (TBHQ) in edible vegetable oil. After extracted, samples were analyzed under MS and MS/MS negative ion detection modes, with the mobile phase of methanol/water (50:50, v/v), a column of C₁₈ and electrospray ionization interface. The liner calibration curves were obtained in the concentration range of 61.8-4 542.5 μg/L ($R^2 = 0.9999$), the detection limit was 48 μg/L, and the recoveries of TBHQ from ten samples were (81.9 ± 1.9)%-(109.6 ± 4.6)%, RSD for TBHQ in edible vegetable oil was less than 5.3% ($n = 10$). The method presented here-in could quantify TBHQ in vegetable oil quickly, conveniently and accurately.

Key words: mass spectrometry; tertiary butylhydroquinone; liquid chromatography/ion trap mass spectrometry (LC/ITMS)

收稿日期:2005-04-20;修回日期:2005-08-08

基金项目:“十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术”(2001BA804A21)

作者简介:郝鹏鹏(1979~),女(汉族),山东烟台人,博士研究生,环境工程。E-mail: haopengpeng@ee.pku.edu.cn

*通讯作者:倪晋仁(1962~),男(汉族),山西山阴人,博士,教授。E-mail: nijinren@ee.pku.edu.cn

油脂作为人类膳食中的基础营养素之一,在通常的环境条件下会自动发生氧化反应而逐渐变质。人为地添加合成酚类抗氧化剂是一种抑止油脂变质的有效手段。在各种合成酚类抗氧化剂中,叔丁基对苯二酚(tertiary butylhydroquinone, TBHQ)的抗氧化性能大大优于其它抗氧化剂^[1]。此外, TBHQ 还能有效地抑制细菌和霉菌的产生,并且在使用时不会因遇到铜、铁等金属离子而发生颜色和风味的变化。因此, TBHQ 被广泛用作食用植物油的抗氧化剂。然而 TBHQ 在动物试验中显示出一定的急性毒性和慢性致癌作用,很多国家都对其用量有所限制^[2]。在美国和我国, TBHQ 的最大允许使用量为 200 mg/kg;在日本, TBHQ 尚未批准作为油脂抗氧化剂,并以此作为技术壁垒手段,要求输日食品必须进行 TBHQ 检测。有关 TBHQ 的检测已引起社会各方广泛重视,但我国至今尚没有食用植物油中抗氧化剂 TBHQ 检测的国家标准方法。

目前,合成酚类抗氧化剂的检测方法主要包括比色法/分光光度法,伏安法/极谱法,色谱法等。国外最早从 20 世纪 60 年代起开始对食品中合成酚类抗氧化剂的检测方法进行研究^[3-8]。国内对食品中合成酚类抗氧化剂的分析检测研究较晚^[9-12],主要采用液相色谱法。对食品中 TBHQ 等合成酚类抗氧化剂的检测分析方法虽然随着分析化学技术的发展而不断更新进步,但是各类分析方法仍然存在着样品前处理过程复杂、耗时长,选择性不好,灵敏度不高,检出限偏高的问题,不能满足准确、快速、简便的检测要求。

本文建立了快速、准确、简便地检测食用植物油中 TBHQ 的液相色谱/离子阱质谱联用法,并对北京市场上常见的食用植物油进行了检测分析。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

液相色谱/离子阱质谱联用仪(HP 1100 LC/MSD Trap SL System):美国安捷伦公司产品,配有二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Rev. A. 09.03 LC 工作站和 MSD Trap Control Version 5.1 工作站;紫外-可见分光光度计(SPECORD200):德国耶拿公

司产品,配有 WinASPECT 1.4.0.1 工作站;WH-90A 型微型混合器:上海亚荣生化仪器厂产品;LD5-2A 型低速离心机:北京医用离心机厂产品;0.45 μm/Ø13 mm 一次性尼龙针式过滤头:北京北化黎明膜分离技术有限责任公司产品。

1.2 主要材料与试剂

甲醇、乙腈(HPLC 级, Fisher Scientific, 美国),无水乙醇(分析纯,北京北化精细化学品有限责任公司),氨水(分析纯,北京益利精细化学品有限公司),冰乙酸(分析纯,天津市化学试剂六厂),超纯水(MILLI-Q GRADIENT SYSTEM, MILLIPORE, 美国), TBHQ 标准样品(纯度 98.0%, J & Kchemica, 德国)。

1.3 LC/MS 分析条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (2.1 mm ×150 mm ×0.5 μm);柱温 35 °C;流动相为甲醇-水(50:50, 体积比),流速 0.4 mL/min;进样体积 5 μL;检测波长 280 nm。

1.3.2 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源;负离子模式;母离子 m/z 165;雾化气(氮气) 30.0 psi;干燥气(氮气) 10.0 L/min, 280 °C;破碎截止值 m/z 80;破碎电压 1.7 V;质量扫描范围 m/z 100~250。

1.4 样品前处理

移取 0.2 mL 食用植物油于 10 mL 玻璃离心管内,称重后加入 600 μL 环己烷振荡溶解均质化,加入 2 mL 萃取剂,于微型混合器上振荡萃取 5 min 后经 4 000 r/min 离心 5 min,移取上层萃取液至 10 mL 玻璃离心管内,重复萃取 3 次,合并萃取液,经 4 000 r/min 离心 5 min 后移取 0.8 mL 至 1.5 mL 进样小瓶进行检测分析。

1.5 紫外分光光度检测

移取 20 μL 食用植物油于 10 mL 玻璃试管内,称重后用 5 mL 环己烷振荡溶解,然后移取 20 μL 溶液于 5 mL 环己烷中振荡稀释,将最终稀释好的溶液以环己烷为空白作样品的紫外吸收扫描,扫描波长范围 190~400 nm。

2 结果与讨论

2.1 质谱解析

TBHQ 在甲醇-水溶液中离子化效果很好,母离子为 m/z 165。当流动相甲醇-水体积比为 50:50,流量为 0.4 mL/min 时, TBHQ 的保留

时间为 3.7 min(图 1)。

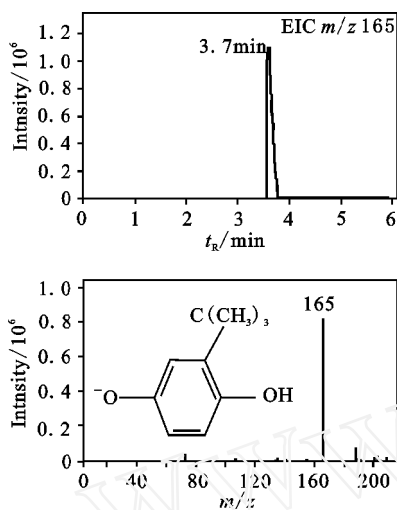


图 1 TBHQ 一级质谱萃取离子流图及其对应的质谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatogram and mass spectrum of TBHQ (MS)

母离子 m/z 165 的二级质谱中除了极少量的母离子之外,主要的碎片离子为 m/z 149,来自于叔丁基上甲基的断裂丢失,其断裂方式如图 2(a)所示;另有次要的碎片离子为 m/z 108,主要由于苯环上叔丁基的断裂丢失而生成,其断裂方式如图 2(b)所示。

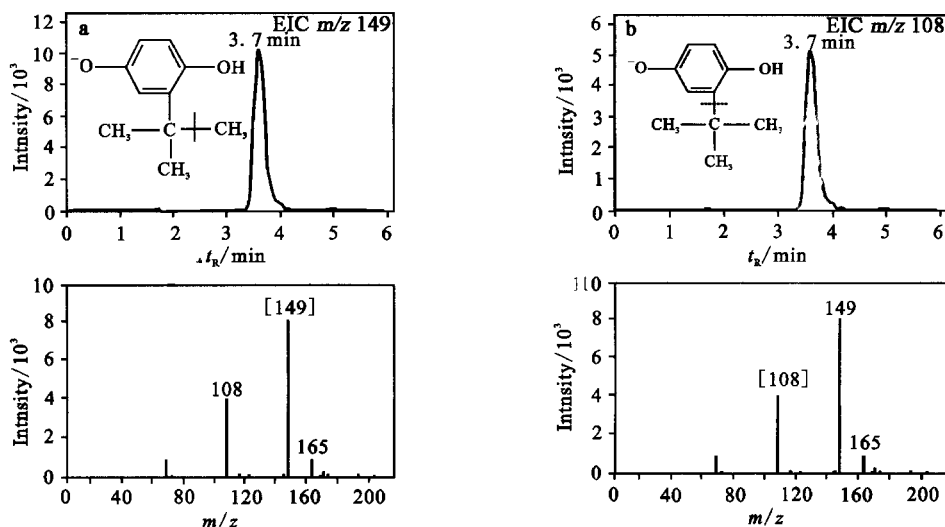


图 2 TBHQ 二级质谱萃取离子流图及其对应的质谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatogram and mass spectra of TBHQ (MS/MS)

2.2 标准曲线和检出限

本文利用主要碎片离子 m/z 149 对 TBHQ 进行定量检测。以甲醇为溶剂,配制 TBHQ 质量浓度系列为 61.8、225.2、757.1、1 297.9、2 477.7 和 4 542.5 $\mu\text{g/L}$,建立二级质谱的标准曲线。以待测物的质量浓度为横坐标,待测物的峰面积为纵坐标,用最小二乘法进行回归运算。标准曲线为 $y = 1\,227x$, $R^2 = 0.999\,9$,精确度为 97.1% ~ 116.2%,最低检出限为 48 $\mu\text{g/L}$ 。

目前常用的液相色谱法检出限为 g/L 级,远远高于上述检出限。液相色谱法采用梯度洗脱的程序将 TBHQ 峰与杂质峰分开,通常需要 20 min 以上,且杂质的存在往往会干扰其定性定量分析的准确性;而本文采用 TBHQ 二级质谱的主要碎片离子 m/z 149 进行定性定量分析,即使有杂质的情况下,也能准确地对其进行检测,5 min 内就可以完成。

2.3 萃取条件选择

食用植物油的主要成分脂肪酸甘油三酯在乙腈、甲醇、乙醇中溶解度较小,因此选取这三种有机溶剂为试验萃取剂,用加标的样品作为控制样来确定方法的回收率。另外,萃取剂的酸碱性可能会对 TBHQ 的萃取效率有影响,因此也对不同酸碱度的萃取剂进行了试验。

表 1 不同试剂对食用植物油中 TBHQ 的萃取检测结果

| 萃取剂 Solvent | TBHQ 检出含量/(mg · kg ⁻¹) | 回收率 Recovery/% |
|---|------------------------------------|----------------|
| 乙腈 acetonitrile | 38.5 ±2.2 | 94.6 ±10.8 |
| 甲醇 methanol | 34.3 ±1.9 | 90.8 ±9.7 |
| 乙醇 ethyl alcohol | 35.9 ±3.0 | 110.1 ±7.6 |
| 乙醇 + 5 % 氨水 ethyl alcohol-5 % ammonia | 0.0 ±0.0 | 0.0 ±0.0 |
| 乙醇 + 5 % 乙酸 ethyl alcohol-5 % acetic acid | 26.2 ±3.1 | <10.0 |

三种萃取剂乙腈、甲醇和乙醇对 TBHQ 的提取回收率都在 80 % ~ 120 % 的范围(表 1),能够满足定量检测分析的要求;而对于日常检测分析来说,乙醇毒性小,价格低廉,更适合用于食用植物油中 TBHQ 的常规检测分析。

乙醇 + 5 % 氨水和乙醇 + 5 % 乙酸对 TBHQ 的提取回收率都不理想。由于 TBHQ 是一种二元酚,所以乙酸对其萃取起抑制作用;而加入 5 % 氨水后对 TBHQ 的萃取结果与预想相反,可能是在一定的碱性条件下植物油中的 TBHQ 发生了某种反应而损失。

为减少杂质对 TBHQ 检测的干扰以及对色谱柱的污染,萃取后的样品用 0.45 μm 尼龙微孔滤膜过滤后再进行仪器分析。结果表明滤膜对 TBHQ 有吸附,经滤头过滤的样品 TBHQ 损失约 10 %,影响了检测分析的准确性。因此萃取后的样品直接进入液质联用仪进行分析。

2.4 方法的稳定性

通过实际样品分析检验方法的稳定性。每种植物油作 4 个平行样,并分别往植物油中加入浓度为 224 545.4 μg/L 的 TBHQ 标准溶液 20 μL,用回收率表征方法的准确性,用相对标准偏差(RSD)表征方法的重现性。

实际样品中的杂质往往会对检测分析产生干扰。对植物油的紫外分析(图 3)表明:虽然不同植物油中所含特殊组分不同,如芝麻油中含芝麻酚、芝麻素等,但是紫外吸收无特异性差别,在 190 ~ 250 nm 波长范围内都有较强吸收。因此,各植物油主要基质成分类似,只是饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比值不同,特殊组分的存在对 TBHQ 的检测分析不会产生干扰。

对方法稳定性的分析(表 2)表明:对于不同的植物油, TBHQ 的萃取回收率都能稳定在 80 % ~ 120 % 范围内, RSD 5.3 %,完全可以满足定性定量的检测分析要求。

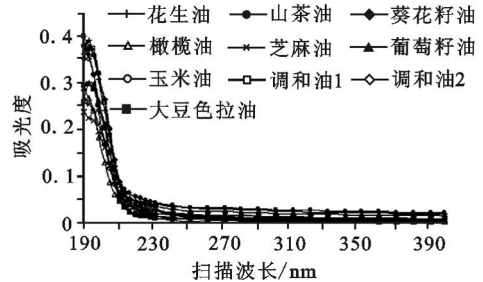


图 3 10 种食用植物油的紫外吸收光谱图
Fig. 3 UV absorption spectra of 10 kinds of edible vegetable oil

2.5 样品分析

于 2004 年 11 月对 10 种北京市售食用植物油中 TBHQ 的检测结果表明(表 2):两种调和油、大豆色拉油和山茶油中每千克检出了约几十毫克的 TBHQ,而其它 6 种植物油中则未检出,根据包装说明来看这 6 种植物油中也没有添加其它类别的抗氧化剂。

食用植物油中是否添加抗氧化剂以及添加量的多少主要与其自身的易氧化程度有关。

食用植物油的易氧化程度与其脂肪酸的不饱和程度直接相关,不饱和度越大越容易氧化。植物油的脂肪酸分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸两类。不饱和脂肪酸又分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸两种,前者主要是油酸,后者则主要是亚油酸、亚麻酸。调和油中不饱和脂肪酸高达 90 % 以上^[13],大豆色拉油的主要脂肪酸组成是亚油酸,其不饱和度远远大于花生油和芝麻油^[14],而山茶油不饱和脂肪酸含量也高达 90 %,所以这三种植物油极易发生氧化。而葵花籽油^[15]虽然也含有较高的不饱和脂肪酸,但其含有的不饱和脂肪酸大部分是较稳定的单不饱和和酸油酸,所以具有优异的氧化稳定性。

表 2 不同食用植物油中 TBHQ 的检出含量

Table 2 Determination results of TBHQ in different edible vegetable oil

| 食用植物油 Edible vegetable oil | TBHQ 检出含量 / (mg · kg ⁻¹) | 回收率 Recovery/ % | 生产日期 Production date |
|-------------------------------|---|--------------------|-------------------------|
| 调和油 1 blend oil No. 1 | 87.7 ± 2.5 | 93.2 ± 5.3 | 2003-12-25 |
| 调和油 2 blend oil No. 2 | 43.8 ± 1.1 | 105.1 ± 4.5 | 2003-09-05 |
| 大豆色拉油 soybean salad oil | 38.5 ± 2.2 | 97.8 ± 4.0 | 2003-11-16 |
| 花生油 peanut oil | 0.0 ± 0.0 | 96.2 ± 3.5 | 2004-11-14 |
| 葡萄籽油 grape seed oil | 0.0 ± 0.0 | 88.5 ± 5.0 | 2004-07-17 |
| 山茶油 camellia oil | 41.3 ± 1.8 | 94.4 ± 3.4 | 2004-08-15 |
| 芝麻油 sesame oil | 0.0 ± 0.0 | 99.4 ± 4.2 | 2004-06-18 |
| 橄榄油 olive oil | 0.0 ± 0.0 | 81.9 ± 1.9 | 2003-09-30 |
| 玉米油 corn oil | 0.0 ± 0.0 | 98.6 ± 3.5 | 2004-09-03 |
| 葵花籽油 sunflower oil | 0.0 ± 0.0 | 109.6 ± 4.6 | 2003-12-06 |

另外,食用植物油的易氧化程度还与其所含有的不同天然抗氧化成分有关,所含有的天然抗氧化成分的抗氧化能力越强,含量越丰富,则植物油越不容易被氧化。其它 5 种植物油虽然不饱和脂肪酸含量也很高,但由于它们富含各种天然抗氧化剂而不易发生氧化。花生油^[16]富含维生素 E、磷脂等抗氧化组分;葡萄籽油^[17]含有的多酚类物质含量达 5%~8%;芝麻油^[18]富含芝麻酚、-生育酚、芝麻素及随焙炒温度提高而产生的褐变组分等多种抗氧化成分;橄榄油^[19]含有一些具有很强抗氧化作用的多酚类化合物对羟基苯乙醇、香草醛酸、咖啡酸等,含量约为 800 mg/kg;玉米油^[20]含有丰富的天然抗氧化剂维生素 E。因此这 5 种食用植物油中不需人为地添加抗氧化剂。

3 结论

液液萃取方法能够以稳定的回收率、较为快速地从食用植物油中萃取 TBHQ,萃取剂乙醇毒性小、价格低廉,适合常规检测分析。10 种常见食用植物油中,每千克调和油、大豆色拉油、山茶油中 TBHQ 检出含量约为几十毫克,其它植物油中则未检出 TBHQ。相对于气相色谱、液相色谱等其它检测方法,液相色谱/离子阱质谱联用法能更好地去除杂质对样品的干扰,能在极短的时间内完成对 TBHQ 的定性、定量检测。与单独的液相色谱法相比,液相色谱/离子阱质谱联用法对经液相色谱分离出的组分用 TBHQ

的二级质谱碎片离子进行检测,比目前常用的紫外和荧光检测器具有更高的灵敏度和更好的选择性,因而样品经萃取后不必经过繁琐、耗时的浓缩步骤就可检出,大大节省了样品前处理时间,并且能得到更多 TBHQ 的结构信息。

参考文献:

- [1] 万素英,赵亚军,李琳,等. 食品抗氧化剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998: 42~47.
- [2] 余以刚,黄伟,林华山,等. 特丁基对苯二酚(TBHQ)应用与检测[J]. 粮食与油脂,2003,(3):42~43.
- [3] Yang MH, Lin HJ, Choong YM. A Rapid Gas Chromatographic Method for Direct Determination of BHA, BHT and TBHQ in Edible Oils and Fats [J]. Food Res Int, 2002, 35 (7): 627-633.
- [4] Riber J, de la Fuente C, Vazquez MD, et al. Electrochemical Study of Antioxidants at a Polypyrrole Electrode Modified by a Nickel Phthalocyanine Complex. Application to Their HPLC Separation and to Their FIA System Detections [J]. Talanta, 2000, 52 (2): 241-252.
- [5] Pinho O, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP, et al. Quantification of Synthetic Phenolic Antioxidants in Liver Pat 6 [J]. Fd Chem, 2000, 68 (3): 353-357.
- [6] Perrin C, Meyer L. Quantification of Synthetic Phenolic Antioxidants in Dry Foods by Reversed-phase HPLC with Photodiode Array Detection [J]. Food Chem, 2002, 77 (1): 93-100.
- [7] Karovicova J, Simko P. Determination of Syn-

- thetic Phenolic Antioxidants in Food by High-Performance Liquid Chromatography[J]. J Chromatogr A, 2000, 882 (1-2): 271-281.
- [8] Tura D, Robards K. Sample Handling Strategies for the Determination of Biophenols in Food and Plants [J]. J Chromatogr A, 2002, 975 (1): 71-93.
- [9] 李桂凤,郝征红,董淑敏. 高效液相色谱法测定食品中抗氧化剂BHA, BHT, PG[J]. 色谱, 1998, 16(3): 276~277.
- [10] 蔡玉枝,苏文周. 高效液相色谱法快速测定食品中抗氧化剂BHA、BHT[J]. 分析测试学报, 1998, 17(4): 77~80.
- [11] 胡小钟,余建新,钱浩明,等. 油脂中九种抗氧化剂的反相高效液相色谱法分离和测定[J]. 分析科学学报, 2000, 16(1): 23~26.
- [12] 陈 铮. 液相色谱法测定食用油中抗氧化剂的方法研究[J]. 计量与测试技术, 2001, (2): 9.
- [13] 黄光华,陈惠岷,陈光耀. 食用调和油脂脂肪酸组成分析[J]. 粮油仓储科技通讯, 1999, (3): 39~40.
- [14] 江 琰,刘克武,刘晓雯. 几种植物芳香油对食用油脂抗氧化作用的研究[J]. 四川粮油科技, 2000, (2): 14~15.
- [15] 阿尔凯 DJ,卡明斯 M,德怀尔 K,等. 高度耐氧化的植物油[J]. 施萃善译. 日用化学品科学, 1999, (1): 23~26.
- [16] 高 郁. 浅评花生油[J]. 四川粮油科技, 2000, (3): 45~46.
- [17] 张 峻,吉伟之,齐 欣. 葡萄籽中多酚类物质的提取及其对油脂的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 43~45.
- [18] 唐传核,孟岳成. 芝麻油的成分及特有的生理活性功能[J]. 西部粮油科技, 1999, 24(2): 18~20.
- [19] 郭长江. 橄榄油营养成分及其保健作用[J]. 中国食物与营养, 2002, (6): 48~49.
- [20] 尤 新. 玉米油的营养功能和发展前景[J]. 粮油食品科技, 2004, 12(2): 21~22.

2005 年中国质谱学会 同位素质谱、无机质谱和质谱仪器学术交流会成功召开

2005年10月12—17日,由中国质谱学会同位素质谱、无机质谱、质谱仪器与教育三个专业委员会共同发起并组织的“2005年中国质谱学会同位素质谱、无机质谱和质谱仪器学术交流会”在美丽的丽江成功举办。会议由中国原子能科学研究院放射化学研究所承办,国土资源部同位素重点实验室协办。

大会开幕式由刘虎生教授主持,李金英秘书长致开幕词。在开幕词中,李秘书长简要介绍了一年来的学会的组织建设、学术交流及《质谱学报》的出版情况。

该学术交流会参会代表92人,交流报告53篇,涉及质谱学方法学研究及其在基础科学、地学、核科学、环境科学、农业、计量学、生命科学、化石燃料勘探、药物分析中的应用等,质谱设备关键器件的改进及新功能的开发也是其中的重要内容之一。报告内容基本反映了目前国内除有机质谱之外的质谱学研究及应用水平和现状。

大会报告人多数为中青年研究人员,他们思想活跃、勇于实践、大胆创新,在各自的科研岗位上作出了突出的成绩。每次报告后代表们提问踊跃,会场气氛热烈,达到了充分交流的目的。会议代表就共同关心的话题诸如同位素稀释剂的生产、国内网络分析实验室的建设等进行了有益的探讨。

五家国际知名的质谱仪器公司或代表处积极参会,为大会的成功举办提供资助。

闭幕式由张子斌副理事长致词,大会在轻松和谐的气氛中结束。