

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定食用油中的叔丁基对苯二酚

张朋杰, 张宪臣, 张 静, 王 勇*
(中山出入境检验检疫局, 广东 中山 528403)

摘要:目的: 建立一套稳定可靠的使用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定食用油中的抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)的方法。方法: 用乙腈振荡萃取样品中的 TBHQ, 以乙腈-水为流动相洗脱, 以反相 C₁₈ 柱作为分离柱, 以电喷雾离子源为接口, 负离子模式扫描, 选择监测(SRM)模式检测, 外标法定量。结果: 本方法的检出限为 0.10mg/kg, 在 0.05~2.5 μg/ml 浓度范围内呈良好线性, 相关系数大于 0.999, 回收率 83%~115%。结论: 实验结果表明该方法灵敏度高, 检出限低, 确证能力强, 分析时间短, 能够准确的测定食用油中的抗氧化剂 TBHQ 的含量。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 选择监测(SRM)模式; 叔丁基对苯二酚; 食用油

Determination of Tertiary Butylhydroquinone in Edible Oils by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Peng-jie, ZHANG Xian-chen, ZHANG Jing, WANG Yong*
(Zhongshan Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Zhongshan 528403, China)

Abstract: Objective: To develop a stable and reliable method of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-TMS) for determining tertiary butylhydroquinone (TBHQ) content in edible oils. Methods: TBHQ in samples was extracted with acetonitrile, eluted by the mobile phase of acetonitrile-water with reserved C₁₈ column as the separation column, scanned by negative ion detection mode with electrospray ionization as joint, detected by selected reaction monitoring (SRM) mode and calibrated by external standard. Result: The detection limit of TBHQ is 0.10 mg/kg, the correlation coefficient of linear calibration curve is over 0.999 in the range of 0.05 to 2.5 μg/ml, and the recovery rate is 83% to 115%. Conclusion: The method is of high sensitivity, low detection limit, good determination capacity and short analysis time, and can be used to accurately determine TBHQ content in edible oil.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-TMS); selected reaction monitoring (SRM) mode; tertiary butylhydroquinone (TBHQ); edible oil

中图分类号: TS207

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)06-0143-03

叔丁基对苯二酚(TBHQ)是一种比较新型的合成酚类抗氧化剂。由于其抗氧化性能大大优于其他抗氧化剂^[1], 对热相对稳定, 并且还能有效抑制细菌和霉菌的产生^[2], 因此被广泛用于食用油中。然而由于 TBHQ 对人体具有一定的毒性^[3], 所以各国对它都有严格的使用限量规定。例如, 我国食品添加剂使用卫生标准(GB 2760—2007)规定 TBHQ 容许使用的最大量为 200mg/kg; 日本则

禁止在食品中添加 TBHQ, 并以此作为技术贸易手段, 要求输入食品必须进行 TBHQ 检测。有关 TBHQ 的检测已引起人们的广泛关注, 但我国至今尚没有食用油中抗氧化剂 TBHQ 检测的标准方法。

目前分析 TBHQ 的方法主要包括气相色谱法和高效液相色谱法等^[3-9], 这些方法样品前处理步骤多, 导致被测组分在样品处理过程中损失较大, 回收率低, 检

收稿日期: 2008-05-21

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(7301741); 中山市科技计划资助项目(20073A155)

作者简介: 张朋杰(1979-), 男, 工程师, 学士, 主要从事兽药残留和食品安全检测研究。E-mail: zhangpj@zs.gdcic.gov.cn

* 通讯作者: 王勇(1977-), 男, 工程师, 博士, 主要从事食品安全检测研究。E-mail: wangy@zs.gdcic.gov.cn

测下限难于达到检验要求;另外,当样品成分比较复杂时,杂质干扰可能严重影响检测结果,容易出现假阳性或假阴性结果。本实验采用乙腈作为提取溶剂,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对食用油中的TBHQ进行分离定量检测,以期建立一套稳定可靠的UPLC-MS/MS测定食用油中TBHQ的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

花生油 中山市鹰麦食品有限公司。

乙腈、正己烷为色谱纯;实验室用水为Milipore超纯水(电导率 $18.2\text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$);TBHQ(纯度为98.0%) 德国Dr.Ehrenstorfer GmbH公司。

TBHQ标准储备液(1 mg/ml):称取TBHQ标准品 50 mg ,用乙腈溶解定容至 50 ml ,摇匀, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

TBHQ标准工作液($25\text{ }\mu\text{g/ml}$):取上述标准储备液 2.5 ml 转移到 100 ml 容量瓶中,定容。

乙腈饱和正己烷:将乙腈和正己烷混合,在分液漏斗中充分振摇,取下层为饱和正己烷,临用现配。

1.2 仪器

Accela型超高效液相色谱仪、TSQ Quantum Access三重四极杆质谱仪 Thermo公司;液相色谱-质谱工作站软件 Lcquan公司;涡旋振荡器 德国IKA公司;离心机。

1.3 分析条件

色谱条件:色谱柱:Thermo C_{18} 柱($100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$);柱温: $30\text{ }^\circ\text{C}$;样品室温度: $25\text{ }^\circ\text{C}$;进样体积: $10\text{ }\mu\text{l}$;流速: $250\text{ }\mu\text{l/min}$;流动相:乙腈(A)和水(B),梯度洗脱见表1。

表1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	0.00	3.00	5.00	5.01	6.00
乙腈(A)	20	100	100	20	20
水(B)	80	0	0	80	80
流速($\mu\text{l/min}$)	250	250	250	250	250

注:乙腈与水为体积比例。

质谱条件:电离方式:ESI(-);喷雾电压: 4000 V ;金属毛细管温度: $350\text{ }^\circ\text{C}$;鞘气压力: 20 psi ;辅助气压力: 10 psi ;扫描模式:选择反应监控(SRM); Q_1 半峰宽: 0.7 D ; Q_3 半峰宽: 0.7 D ;母离子 $m/z165$,以碎片离子 $m/z149$ 定量,以 $m/z108$ 、 135 、 149 及其丰度比定性。

1.4 样品前处理

称取 5.00 g 样品置于 50 ml 离心管中,用 25 ml 乙腈分3次(10 、 10 、 5 ml)萃取样品,每次萃取涡旋振摇 1 min ,

在 4000 r/min 下离心 5 min ,吸取上层乙腈溶液,合并到 25 ml 离心管中。加入 5 ml 乙腈饱和的正己烷,摇匀,在 4000 r/min 下离心 2 min ,吸去正己烷层,将乙腈层转移至 25.0 ml 容量瓶中,用乙腈定容至刻度。溶液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,上机分析。

2 结果与分析

2.1 萃取条件的选择

甲醇、乙腈都可作为油脂中抗氧化剂TBHQ的萃取液,而且回收率无显著差异。但通过考察在同一仪器条件下,以甲醇、乙腈分别作为稀释液,稀释相同浓度的标准品(50 ng/ml)上机,发现两者的响应值有所不同,见图1。乙腈作为稀释液的标准溶液的总离子流图(TIC)响应值(AA:9331)高于甲醇作为稀释液的标准溶液的总离子流图的响应值(AA:2071)。因此,本实验采用乙腈作萃取液,然后经乙腈饱和的正己烷萃取其中的微量油脂,过滤后即可用于定性定量分析。

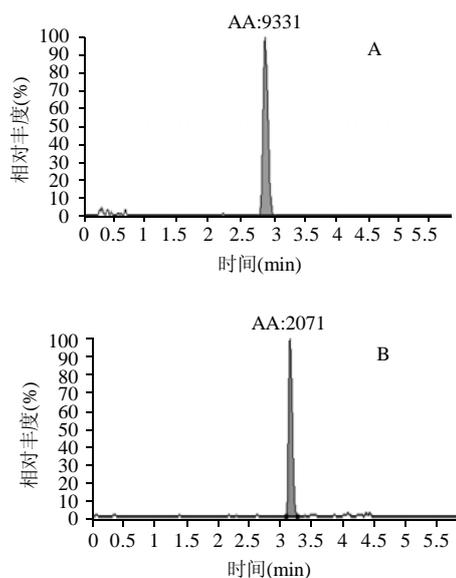


图1 乙腈(A)、甲醇(B)分别作为稀释液的色谱图

Fig.1 Chromatograms of TBHQ diluted with acetonitrile (A) or methanol (B)

2.2 色谱条件的优化

超高效液相色谱系统(UPLC)在分析速度、分离度、灵敏度和流动相消耗等方面相对常规高效液相色谱(HPLC)具有优势,并且由于采用MS/MS,通过选定目标化合物对应的离子对进行检测分析即可,所以不必过多考虑样品中共流物的影响。实验表明,采用超高效液相色谱系统,TBHQ总离子流图在 4 min 内就完全出峰,而且峰形尖锐,灵敏度很高(图2, AA: 9331; S/N: 487)。

表2 TBHQ加标回收率(n=6)
Table 2 Spike recovery of TBHQ at three addition levels (n=6)

测定值	0.10mg/kg						0.50mg/kg						1.00mg/kg					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
添加后(ng/kg)	143.8	146.3	146.4	144.1	142.5	147.0	207.0	216.6	223.0	226.0	224.5	207.7	309.1	324.4	316.5	329.0	324.9	313.8
回收率(%)	98.9	111.4	111.9	100.4	92.4	114.9	83.0	92.6	99.0	102.0	100.5	83.7	92.5	100.2	96.2	102.5	100.4	94.9
RSD(%)	8.6						9.1						3.9					

注: TBHQ添加前花生油测出其含量为124ng/ml; 0.10、0.50、1.00mg/ml为加标量。

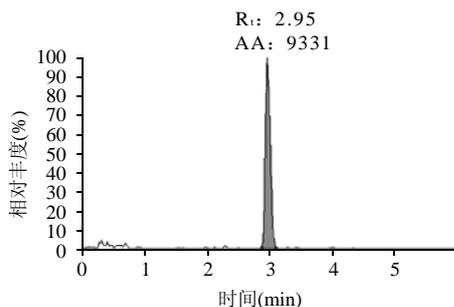


图2 TBHQ的总离子流图
Fig.2 Total ion chromatogram of TBHQ

2.3 质谱条件的优化

取25 μg/ml TBHQ标准溶液,以10 μl/min的速度注入离子源,在ESI(-)模式下,对母离子m/z165进行二级谱参数优化。通过扫描分析,m/z165的主要特征碎片离子为m/z149、135、108,对应的碰撞能量分别为27、26、21V,以m/z149定量,以m/z149、135、108及其丰度比定性(图3)。

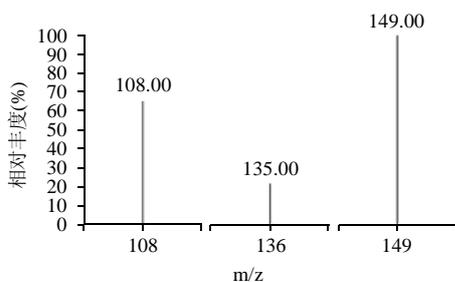


图3 TBHQ的质谱图
Fig.3 Mass spectrum of TBHQ

2.4 标准曲线和检出限

用碎片离子m/z149作为定量离子对TBHQ进行定量。以乙腈/水(体积比50:50)作为稀释液,配置TBHQ标准溶液系列为50、100、250、500、1000、2500ng/ml,上

机进行测定。以待测物的浓度(ng/ml)为横坐标(x),以峰面积为纵坐标(y),进行线性回归。标准曲线为 $y = -6581.39 + 234.016x$, $r = 0.9997$,检出限0.10mg/kg。

2.5 方法回收率

以花生油为研究对象,准确称取5.00g,进行三个水平的添加回收实验,每个水平做6个平行样品,按1.4前处理。方法的回收率数据见表2。

3 结论

本方法通过乙腈萃取,经超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS-MS)分析定量,检出限为0.10mg/kg,前处理方法简单,分析速度快,回收率高,对食用油中的TBHQ可一次实现定性和定量分析。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 林庆,覃逢强.食用植物油中叔丁基对苯二酚含量的测定[J].中国油脂,2005,30(9):48-49.
- [3] 岳振峰,谢丽琪,吉彩霓.油脂及其制品中BHA、BHT、PG和TBHQ快速测定方法研究[J].食品与发酵工业,2002,28(10):49-52.
- [4] YANG M H, LIN H J, CHOONG Y M. 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.
- [5] KAROVICOVA J, SIMKO P. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2000, 882(1/2): 271-281.
- [6] 陈毓芳,奚星林,李宪华,等.高效液相色谱法同时测定食用油中叔丁基对苯二酚和叔丁基对羟基茴香醚[J].中国卫生检验杂志,2007,17(7):1163-1164.
- [7] 余涛,叶坚.高效液相色谱同时测定食品中BHA、BHT、TBHQ方法的研究[J].中国卫生检验杂志,17(12):2136-2137.
- [8] 刘年丰,涂一名,夏虹,等.高效液相色谱法测油脂中抗氧化剂BHA、TBHQ[J].分析科学学报,2003,19(6):549-551.
- [9] 游飞明,翁其香.气相色谱法快速测定油脂及加工食品中的BHA、BHT、TBHQ[J].福建分析测试,2005,4(4):2290-2292.