

分散液液微萃取-气相色谱-串联质谱快速分析 食用油中的酚类抗氧化剂

邢寒竹^{1,2} 王霞² 陈相峰² 王明林^{*1} 赵汝松^{*2}

¹(山东农业大学食品科学与工程学院, 泰安 271018) ²(山东省分析测试中心, 济南 250014)

摘 要 基于分散液液微萃取技术和气相色谱-串联质谱, 建立了一种快速分析食用油中酚类抗氧化剂的新方法。对影响萃取效果的重要因素, 如萃取剂种类及体积、分散剂种类及体积和萃取时间等进行了详细优化。优化条件为: 500 μ L 甲醇-乙腈(1:1, V/V) 快速注射进 3.0 mL 正己烷与 1.0 g 食用油的混合物中, 并振荡萃取 10 s。在优化条件下, 方法的线性范围为 10 ~ 2000 ng/g, 检出限为 1.5 ~ 2.4 ng/g, 相对标准偏差为 4.0% ~ 8.3%。将本方法应用于 4 种不同食用油样品的分析, 其中 3 种有酚类抗氧化剂检出, 样品加标回收率为 81.9% ~ 118%。结果满意。

关键词 分散液液微萃取; 气相色谱-串联质谱; 食用油; 抗氧化剂

1 引 言

酚类抗氧化剂, 如丁基羟基茴香醚(Butylated hydroxyanisole, BHA)、二叔丁基对甲酚(Butylated hydroxytoluene, BHT) 和叔丁基对苯二酚(Tert-Butylhydroquinone, TBHQ), 常被用来延缓食用油中油脂的氧化反应。但研究表明, 这些物质被人体摄入会对人体健康具有潜在威胁^[1-3]。因此, 该类化合物在食品中的使用限值有严格的规定^[4], 例如, 在美国, BHA, BHT 和 TBHQ 允许单独或者混合使用, 但添加量应不超过 200 mg/kg^[5,6]; 而在欧盟国家, BHA 的最大使用量为 200 mg/kg, BHT 和 TBHQ 则被禁止使用。因此, 建立一种快速灵敏的分析食用油中抗氧化剂的方法是十分必要的。

在分析食用油样品之前, 通常需要对食用油进行样品预处理。已有的液液萃取^[7,8]和固相萃取^[9]等样品预处理方法具有费时、费力、需要大量有毒有机溶剂等缺点^[10]。为了克服这些缺点, 简化预处理步骤, 分散液液微萃取技术(Dispersive liquid-liquid micro extraction, DLLME) 正逐渐被学者关注^[11]。DLLME 基于三相溶剂平衡体系, 是在分散剂存在的条件下, 将萃取剂以微小液滴的形式分散在水溶液样品中, 并形成稳定的乳液^[12]。在这种情况下, 萃取剂与样品间存在着极大的接触面积, 使目标分析物可以快速的转移至萃取体系中, 经过离心后, 萃取剂液滴聚集, 萃取和浓缩步骤得以同时完成。通常, DLLME 主要应用于分析环境水样当中的污染物, 而针对食品样品进行的应用研究相对较少。目前, 只有少数研究将 DLLME 应用于食品中污染物的分析^[13-15], 而将 DLLME 与 GC-MS/MS 结合, 分析食用油中酚类抗氧化剂的研究尚未见报道。

基于 DLLME 和 GC-MS/MS, 本研究建立了一种快速灵敏的分析食用油中酚类抗氧化剂的新方法。对影响萃取效率的重要因素, 如萃取剂种类及体积、分散剂种类及体积和萃取时间等进行了优化。并将本方法应用于多种食用油样品的分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

气相色谱-三重四级杆质谱联用仪(7890A GC-7000B MS, 美国安捷伦公司) AB-5MS 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.5 μ m, 美国热电公司)。BHA(>99%)、BHT(>98.5%) 和 TBHQ(>96%) 的标准品购自北京百灵威化学科技有限公司; 乙腈、丙酮和正己烷(瑞典欧森巴克环境化学有限公司); 甲醇(美国天地

2014-09-19 收稿; 2014-10-30 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(Nos. 21477068, 21007035)

* E-mail: mlwang@sdau.edu.cn, zhaors1976@126.com

公司)。所有实验过程中所使用到的有机试剂均为色谱纯级别。使用标准品配制 3 种目标物的标准混合储备液,浓度均为 1.0 g/L,保存在 4 °C 避光环境中。

2.2 气相色谱-质谱条件

色谱柱初温 60 °C,以 20 °C/min 升至 220 °C,保持 1 min,再以 40 °C/min 升至 280 °C,总运行时间为 10.5 min。离子源温度 230 °C;进样口温度 280 °C;载气(高纯氮)流速为 1.2 mL/min,碰撞气(高纯氮)流速为 1.5 mL/min;溶剂延迟时间 7 min。用全扫描(Full-scan)模式对 BHA, BHT 和 TBHQ 进行定性分析,定量分析则采用多反应监测(MRM)模式,优化参数如表 1 所示。

表 1 BHT, BHA 和 TBHQ 的 MRM 参数

Table 1 Multiple reaction monitoring (MRM) conditions for butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ)

化合物 Targets	保留时间 Retention time (min)	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	子离子, P1/P2 Product ion, P1/P2 (<i>m/z</i>)	停留时间 Dwell (ms)	碰撞能 Collision energy (eV)
BHT	7.9	180	165/137	100	10/20
BHA	8.1	220	205/137	100	15/20
TBHQ	8.3	166	151/123	100	30/20

2.3 实验步骤

称取 1.0 g 食用油样品,置于 15 mL 配有螺旋盖的 PE 离心试管中。由于食用油粘度较大,在注射萃取剂之前,先加入 3 mL 正己烷分散剂稀释,增加样品流动性,使目标物更快的由样品转移到萃取剂中。充分混匀后,将 500 μL 甲醇/乙腈(1:1, V/V) 混合溶液作为萃取剂快速注射进样品中,振荡萃取 10 s,然后 6000 r/min 离心 5 min。离心后,萃取相沉积在试管底部,沉积相体积约为(150±10) μL,用 250 μL 微量注射器将萃取相转移入 400 μL 玻璃内插管中待测。

3 结果与讨论

3.1 萃取剂种类和体积

在分散液液微萃取中,合适的萃取剂对于提高目标化合物的萃取效率是至关重要的^[16]。萃取剂的性质决定了三相平衡体系的形成:(1)萃取溶剂必须不与样品互溶;(2)目标物在萃取剂中具有一定的溶解度;(3)萃取剂的密度应大于油与分散剂的混合溶液。基于以上条件,本研究选择了甲醇、乙腈及乙醇 3 种有机溶剂作为萃取剂考察其萃取效果。实验结果表明,当乙醇作为萃取剂时,离心后没有沉积相产生,因此只选择甲醇和乙腈作为萃取剂进行优化。由图 1 可见,使用甲醇-乙腈(1:1, V/V) 混合溶液作为萃取剂的萃取效率比单独使用任何一种溶剂更好,这可能是由于混合后溶剂极性的改变和溶剂诱导的选择性的变化共同导致的。因此,最终以甲醇-乙腈(1:1, V/V) 混合溶液作为萃取剂。

为评价萃取剂体积对萃取效率的影响,在其它实验条件不变的情况下,改变甲醇-乙腈(1:1, V/V)

混合溶液的体积进行实验。结果表明,当萃取剂体积小于 400 μL 时,得到的沉积相液滴过小,这将导致移取萃取相的操作困难。当萃取剂体积在 400~800 μL 时,3 种目标化合物的峰面积随萃取剂体积增加而逐渐增大;在萃取剂体积为 500 μL 时,峰面积达到最大;萃取剂体积为 500~800 μL 时,3 种目标化合物的峰面积随萃取剂体积增大而降低(图 2)。最终,甲醇-乙腈(1:1, V/V) 萃取剂体积选择为 500 μL。

3.2 分散剂种类和体积

分散剂同样是 DLLME 中影响三相平衡体系形成的一个重要因素。为了得到相对稳定的乳浊液,使得目标物可以被快速提取到萃取剂中,分散剂必须同时与食用油和萃取剂混溶。所以,溶混性是选择

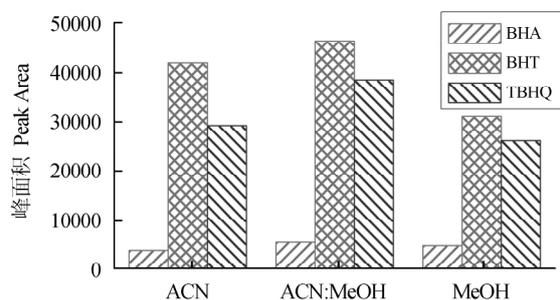


图 1 萃取剂种类对萃取效率的影响

Fig. 1 Influence of extractant on extraction efficiency

分散剂的主要标准。本研究选择了正己烷,丙酮和异丙醇3种同时与食用油和萃取剂互溶的有机溶剂进行实验。结果表明,只有当正己烷作为分散剂时,离心后才能得到便于移取的萃取沉积相。因此,选择正己烷作为分散剂。

不同的萃取剂和分散剂比例可以影响萃取效率,为得到最优的混合比例,考察了正己烷体积由2.0 mL增加至4.0 mL时(保持萃取剂体积为500 μ L),BHA,BHT和TBHQ萃取效果的变化。结果证明,3种目标物的峰面积并没有随分散剂体积的增大而产生明显变化。当正己烷体积小于2.0 mL时,分散效果会因样品粘度过大而受到影响。综合考虑,最佳的分散剂加入体积为3.0 mL。

3.3 萃取时间

在萃取时间10~300 s的范围内,考察了萃取效率随萃取时间的变化情况。实验结果表明,BHA,BHT和TBHQ的峰面积在萃取时间增加的过程中保持不变,萃取时间对萃取效率无明显影响。这是因为当食用油、萃取剂和分散剂三相混合形成稳定的乳浊液时,萃取剂与食用油样品之间会形成极大的接触面积,从而在极短的时间内完成萃取。所以,选择10 s作为萃取时间。

3.4 方法评价

利用所建立的方法,对添加浓度为100 ng/g的食用油平行测定5次,相对标准偏差(RSDs)为4.0%~8.3%。方法线性范围为10~2000 ng/kg,相关性系数(R^2)为0.9942~0.9990。将标准溶液逐级稀释,以信噪比 $S/N=3$ 计,检出限(LODs)为1.5~2.4 ng/g。

将DLLME-GC-MS/MS与现有的4种方法进行对比,结果见表2。首先,与液液萃取^[7,8]相比,本方法在节省有机溶剂和萃取时间方面具有明显的优势;其次,本方法不需要进行净化、蒸发浓缩和加热等繁琐的预处理步骤,大大简化了实验操作;此外,其检出限低于液液萃取^[7,8]和直接进样^[18]方法,与超声辅助液相微萃取方法^[17]相近,完全可以满足食用油中BHA,BHT和TBHQ的检测要求。

表2 DLLME-GC-MS/MS方法与其它分析方法比较

Table 2 Comparison of DLLME-GC-MS/MS with other methods

预处理方法 Pretreatment	样品用量 Sample mass (g)	检测方法 Detection method	萃取剂 Extractant	萃取时间 Extraction time (min)	检出限 LODs (ng/g)	参考文献 Ref.
液液萃取 Liquid-liquid extraction	5.00	HPLC-DAD	甲醇 Methanol (50 mL)	>10	2000	[7]
超声辅助液液萃取 Ultrasonic assistant liquid- liquid extraction	10.00	HPLC-UV	甲醇-乙腈 Methanol-acetonitrile (45 mL)	>85	500	[8]
超声辅助液相微萃取 Ultrasonic assistant liquid phase microextraction	0.05	GC-MS/MS	乙腈 Acetonitrile (1 mL)	>8	1~4	[17]
直接进样 Direct injection	0.06	GC-FID	乙醚 Ethyl ether (1 mL)	-	100	[18]
分散液-液微萃取 Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)	1.00	GC-MS/MS	甲醇-乙腈 Methanol-acetonitrile (500 μ L)	5	1.5~2.4	本方法 This method

3.5 实际样品检测

本实验选择了4种食用油样品(调和油、葵花籽油、芝麻油和橄榄油)对本方法的适用性进行评价。所有样品购自济南市超市,样品分析前均避光室温保存。应用DLLME-GC-MS/MS方法分析4种不同种类的食用油样品(结果见表3),3种合成酚类抗氧化剂在3个样品中分别有检出。向4种食用油中添加3个浓度水平的BHA,BHT和TBHQ(20,100和500 ng/g),回收率分别为83.7%~115%,85.0%~118%和81.9%~102%,具体结果见表3。结果表明,不同样品的基质效应对该方法没有显著的影响。

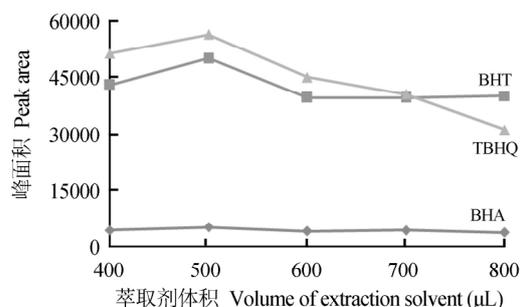


图2 萃取剂体积对萃取效率的影响

Fig. 2 Influence of volume of extractant on extraction efficiency

图 3 为检测芝麻油中 BHA ,BHT 和 TBHQ 的总离子流图。

表 3 4 种食用油样品中 BHT ,BHA 和 TBHQ 的检测结果

Table 3 Analytical results for BHT ,BHA and TBHQ in four oil samples

样品种类 Samples	添加浓度 Spiked (ng/g)	BHA		BHT		TBHQ	
		含量 Found (ng/g)	回收率 Recovery (% ,n=3)	含量 Found (ng/g)	回收率 Recovery (% ,n=3)	含量 Found (ng/g)	回收率 Recovery (% ,n=3)
调和油 Blend oil	0	ND	-	ND	-	93.1±5.5	-
	20	18.7±0.2	93.6±1.1	18.6±0.2	92.8±1.0	112 ±2	94.3±9.1
	100	97.9±1.4	97.9±1.4	105±4	105±4	175±5	81.9±6.6
	500	505±12	101.0±2.0	480±5	96.1±1.1	574±8	96.2±1.6
葵花籽油 Sunflower seed oil	0	ND	-	ND	-	ND	-
	20	16.7±0.2	83.7±1.0	17.9±0.3	89.3±1.7	19.7±0.6	98.7±2.8
	100	97.5±2.3	97.5±2.3	91.2±5.1	91.2±5.6	98.1±3.0	98.1±3.1
	500	491±18	98.2±3.6	479 ±5	95.9±1.0	482±4	96.4 ±0.8
芝麻油 Sesam oil	0	116±3	-	10.8±0.5	-	124±4	-
	20	134±2	92.7±7.6	29.9 ±1.1	95.5 ±5.6	144±2	102±9
	100	213±4	97.3±3.6	120 ±1	110±2.3	224±2	99.6±2.3
	500	626±13	102.0±3.0	494±12	96.6±2.5	635±13	102 ±3
橄榄油 Olive oil	0	9.9±0.7	-	ND	-	ND	-
	20	29.0±0.4	95.6±2.2	17.0±7.1	85.0 ±8.4	20.3±1.0	102±5
	100	115±5	115.0±5.0	118±2	118 ±2	92.6±3.5	92.6±3.8
	500	511±8	100.0±2.0	505±16	101 ±3	427±8	85.3±1.9

ND: 未检出(Not detected)。

4 结 论

基于 DLLME 和 GC-MS/MS 技术,建立了一种简单、快速、灵敏的用于分析食用油中痕量酚类抗氧化剂 BHA ,BHT 和 TBHQ 的方法。本方法所用的样品和有机溶剂消耗少,萃取时间短,环境污染小且成本低廉。与现有的 BHA ,BHT 和 TBHQ 检测方法相比,本方法线性范围宽(10 ~ 2000 ng/g),检出限低(1.5 ~ 2.4 ng/g)且重复性好(RSDs < 8.5%),能够很好地满足不同食用油中酚类抗氧化剂的分析要求。

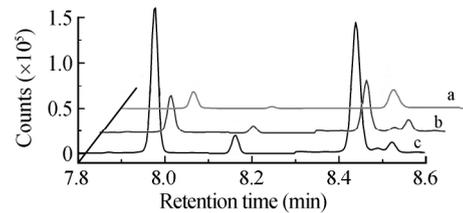


图 3 实际样品芝麻油的检测色谱图 (a) 和添加浓度为 100 ng/g (b) 和 500 ng/g (c) 的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of real sesame oil (a), and spiked with 100 ng/g (b) and 500 ng/g (c) each of three compounds

1. BHT; 2. BHA; 3. TBHQ.

References

- 1 Kubow S. *Trends Food Sci. Tech.*, **1990**, 1: 677-770
- 2 Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. *Food Chem. Toxicol.*, **2003**, 41: 679-688
- 3 Namiki M. *Sci. Nutr.*, **1990**, 29: 273-300
- 4 B D Page. *AOAC Int.*, **1993**, 76: 765
- 5 Burdock G A. *Encyclopedia Food Color Addit.* Boca. Raton.: CRC Press, **1997**
- 6 Noguera O, Villanueva C, R M, Ramis R. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 387: 127-134
- 7 Christian P, Liliane M. *Food Chem.*, **2002**, 77: 93-100
- 8 Bahruddin S, Yong Y S, Mohd A N. *Food Chem.*, **2007**, 105: 389-394
- 9 Carrasco P, Cerretani L, Bendini, Segura C, Gallina T, Fernández G. *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28(9-10): 837-858
- 10 Wang W X, Yang T J, Li Z G, Jong T T, Lee M R. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 690: 221-227
- 11 Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M R M, Aghaee E, Ahmadi F. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1116(1-2): 1-9
- 12 Luca C, Anna L P, Rita C, Luca R. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 75: 461-466
- 13 Zhou Q X, Pang L, Xiao J P. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216: 6680-6684

- 14 ZANG Xiao-Huan , WANG Chun , GAO Shu-Tao , ZHOU Xin , WANG Zhi. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2008** , 36(6) : 765-769
臧晓欢,王春,高书涛,周欣,王志. *分析化学* , **2008** , 36(6) : 765-769
- 15 Liu S H , Xie Q L , Chen J , Sun J Z , He H , Zhang X K. *J. Chromatogr. A* , **2013** , 1295: 16-23
- 16 Chang J S , Huang S D. *Talanta* , **2007** , 71: 882-886
- 17 Ding M Z , Zou J K. *Food Chem.* , **2012** , 131: 1051-1055
- 18 Yang M H , Lin H J , Choong Y M. *Food Res. Int.* , **2002** , 35: 627-633

Rapid and Highly Sensitive Analysis of Antioxidants in Edible Oils with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Prior to Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

XING Han-Zhu^{1,2} , WANG Xia² , CHEN Xiang-Feng² , WANG Ming-Lin^{*1} , ZHAO Ru-Song^{*2}

¹(College of Food Science and Engineering , Shandong Agricultural University , Taian 271018 , China)

²(Analysis and Test Center , Shandong Academy of Sciences , Jinan 250014 , China)

Abstract A novel , simple and highly sensitive method was developed for the rapid analysis of phenolic antioxidants at trace level in edible oils. It was based on dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and gas chromatography-mass/mass spectrometry (GC-MS/MS) . Related important factors that may influence enrichment efficiency , such as type and volume of extraction solvent , type and volume of dispersive solvent , and extraction time were investigated and optimized in detail. The optimum conditions were as follows: a quick injection of 500 μ L mixed solution (methanol: acetonitrile = 1:1 , V/V) into 1.0 g oil sample with 3 mL *n*-hexane for 10 s of extraction time. Under the optimal conditions , the linearity (10-2000 ng/g) , limits of detection (1.5-2.4 ng/g) and relative standard deviations (4.0% -8.3%) was obtained. The proposed method was applied for the analysis of 4 edible oil samples. Some of phenolic antioxidants were detected in three of them , and the recoveries of spiked samples were in the range of 81.9% -118% .

Keywords Dispersive liquid-liquid microextraction; Gas chromatography-tandem mass spectrometry; Edible oils; Antioxidants

(Received 19 September 2014; accepted 30 October 2014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21477068 , 21007035)

第一届中国青年分析化学家奖

为促进我国分析化学研究的发展,特别是鼓励和支持青年分析化学研究者的进步与成长,在英国皇家化学会 Analyst 期刊的支持下,中国化学会分析化学学科委员会决定,自 2015 年起设立中国青年分析化学家奖(Chinese Young Analyst Award) ,以表彰优秀青年科学家在分析化学的基础研究和应用领域做出的突出成果。

该项奖励采取自由申请方式,全国范围内各大学、研究机构内具有中国国籍的,年龄在 40 周岁(包括 40 周岁)以下的分析化学研究人员(不含博士后)均有资格申请。每三年评选一次,每次评出两位在分析化学领域取得突出创新性研究成果的青年学者,在当年的分析化学年会开幕式上颁发证书和奖金。

中国化学会分析化学委员会将于 2015 年 1 月 5 日至 2015 年 4 月 15 日受理第一届中国青年分析化学家奖的申请。申请材料包括:(1)个人简历(含联系方式、教育和工作经历、研究领域,以及对主要研究成果的概述);(2)近三年发表主要文章目录(不超过 10 篇)。申请材料纸版(一式三份)请寄至:长春市人民大街 5625 号长春应化所电分析化学实验室 杨帆 收,邮编 130022;电子版请发送至 fyang@ciac.ac.cn