

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼油软胶囊中的合成抗氧化剂

谢强胜, 张媛媛, 李启艳, 张中湖, 李 军\*

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

**摘要:** **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定鱼油软胶囊中叔丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, TBHQ)、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT)、丁羟基茴香醚(butyl hydroxyanisole, BHA)和没食子酸丙酯(propyl gallate, PG)4种合成抗氧化剂的含量。**方法** 采用乙腈为溶剂和涡旋方式对152批次鱼油软胶囊进行提取; UPLC以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用电喷雾离子源负离子模式(electrospray ionization, ESI-)及多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行测定。**结果** PG、TBHQ、BHA和BHT在0.50~20 µg/mL浓度范围内具有良好的线性关系( $r>0.997$ ), 在2、8和16 mg/kg 3个不同浓度加标水平下测得回收率为88.8%~94.2%, RSD为1.6%~4.2% ( $n=6$ ), 检出限为0.2 µg/kg。**结论** 该方法灵敏度高、抗干扰性强且准确性好, 可适用于鱼油软胶囊中PG、TBHQ、BHA和BHT合成抗氧化剂的检测。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 合成抗氧化剂; 鱼油软胶囊

## Determination of synthetic antioxidants in fish oil soft capsules by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIE Qiang-Sheng, ZHANG Yuan-Yuan, LI Qi-Yan, ZHANG Zhong-Hu, LI Jun\*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of tert-butylhydroquinone (TBHQ), butylated hydroxytoluene (BHT), butyl hydroxyanisole (BHA) and propyl gallate (PG) in fish oil soft capsules by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Method** Using acetonitrile as extraction solvent, 152 batches of fish oil soft capsules were handled with vortex mode. UPLC used acetonitrile and water as mobile phase for gradient elution, mass spectrometry used negative electrospray ionization mode (ESI-) and multiple reaction monitoring mode (MRM) for determination of PG, TBHQ, BHA and BHT. **Results** PG, TBHQ, BHA and BHT had good linear relationships in the range of 0.50~20 µg/mL with correlation coefficients more than 0.997. The recoveries spiked at 3 levels of 2, 8 and 16 mg/kg were 88.8%~94.2%, the relative standard deviations (RSD) were 1.6%~4.2% ( $n=6$ ), and the limits of detection (LODs) were 0.2 µg/kg. **Conclusions** The method is sensitive, specific and accurate, which is suitable for the determination of synthetic antioxidants in fish oil soft

基金项目: 国家重大科学仪器开发专项项目(2012YQ180132)

Fund: Supported by National Major Scientific Instrument Development Project (2012YQ180132)

\*通讯作者: 李军, 主任药师, 主要研究方向为食品药品质量控制。E-mail: 13573756821@163.com

\*Corresponding author: LI Jun, Chief Pharmacist, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China. E-mail: 13573756821@163.com

capsules.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; synthetic antioxidants; fish oil soft capsules

## 1 引言

抗氧化剂是可阻止氧气产生不良影响的物质, 用于防止聚合物材料因氧化降解而失去强度和韧性。作为食品包装材料的主要添加剂之一, 抗氧化剂广泛用于塑料、纸质材料和橡胶等行业, 用以抑制和延缓该类材料的氧化和降解从而延长材料的使用寿命<sup>[1]</sup>。食品中亦有使用, 过量食用含有化学合成抗氧化剂的食品对人体肝、脾、肾等均有不利影响<sup>[2]</sup>, 相关标准对抗氧化剂在食品中的应用有严格要求<sup>[3]</sup>。

目前, 食用油中多种抗氧化剂的检测方法主要包括液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法和气相色谱-质谱联用法<sup>[4-16]</sup>, 但较少采用液质联用法。液相色谱-质谱联用法抗干扰能力较强, 通过选择监测离子对可实现对成分复杂的样品进行准确的定性定量分析。本研究采用加入抗氧化剂的液液萃取法, 建立超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定鱼油类软胶囊中叔丁基对苯二酚 (tert-butylhydroquinone, TBHQ)、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (butylated hydroxytoluene, BHT)、丁羟基茴香醚 (butyl hydroxyanisole, BHA) 和没食子酸丙酯 (propyl gallate, PG) 4 种抗氧化的检测方法, 并对市售 152 批鱼油类软胶囊进行含量测定。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

澳天力牌金枪鱼油软胶囊、纽斯康牌倍爱鱼油软胶囊及海晶牌深海鱼油软胶囊等, 均为市售。

### 2.2 仪器与试剂

乙腈 (液质专用, 德国 Merck 公司); 环己烷 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); *L*-抗坏血酸棕榈酸酯 (AP, Dr.Ehrenstorfer 公司, 纯度 ≥ 95%); TBHQ (Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司, 批号为 40422, 纯度为 99.4%, 0.25 g/瓶); BHA (Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司, 批号为 40709, 纯度为 98.8%, 0.1 g/瓶); BHT (Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司, 批号为 31119, 纯度为 99.5%, 0.25 g/瓶); PG (Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司, 批号为 31031, 纯度为 99.0%, 0.25 g/瓶)。

Agilent1290-6490 超高效液相质谱联用仪 (美国安捷伦公司); MettlerToledo MS 电子天平 (梅特勒公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公

司); QL-866 涡旋振荡器 (海门市其林贝尔仪器有限公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 标准溶液的配制

取 BHA、TBHQ、BHT、PG 标准品各约 50 mg, 精密称定, 分别置 100 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 作为标准储备液。

取上述标准储备液适量, 置 10 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 分别配制成浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 mg/mL 溶液, 作为标准系列溶液。

#### 2.3.2 样品前处理

取供试品 2 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞比色管中, 加入 5 mL 含 AP (0.1 g/L) 环己烷溶液, 振摇使溶解分散完全, 精密加入 5 mL 乙腈, 涡旋提取 3 min, 静置至下层溶液澄清, 取乙腈层提取液, 经 0.22 μm 有机膜过滤后, 供 UPLC-MS/MS 进行分析检测。

#### 2.3.3 色谱条件

##### (1) 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相为水, B 相为乙腈; 梯度洗脱程序如表 1 所示; 进样量 1 μL; 柱温 35 °C。

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

| 时间 (min)  | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|-----------|---------|---------|
| 0~3.0     | 70      | 30      |
| 3.0~8.0   | 70→10   | 30→90   |
| 8.0~9.1   | 10      | 90      |
| 9.1~9.2   | 10→0    | 90→100  |
| 9.2~10.0  | 0       | 100     |
| 10.0~10.1 | 0→70    | 100→30  |
| 10.1~12.5 | 70      | 30      |

##### (2) 质谱条件

离子源: 电喷雾负离子模式 (electrospray ionization, ESI), 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 雾化器压力 20 psi; 雾化气温度为 200 °C; 雾化气流速为 14 L/min; 鞘气温度为 250 °C; 鞘气流速为 11 L/min; 毛细管电压为 3000 V, 采用 MRM 模式监测。详细质谱分析参数见表 2~3。

表 2 抗氧化剂的质谱分析参数  
Table 2 Mass spectrum parameters for the analysis of antioxidants

| 组分   | 离子对类型 | 母离子( $m/z$ ) | 子离子( $m/z$ ) | 碰撞能量(eV) | 离子模式 |
|------|-------|--------------|--------------|----------|------|
| PG   | 定量    | 211          | 168.9        | 15       | 负离子  |
|      | 定性    | 211          | 123.9        | 20       | 负离子  |
| TBHQ | 定量    | 165          | 148.7        | 20       | 负离子  |
|      | 定性    | 165          | 107.9        | 25       | 负离子  |
| BHA  | 定量    | 179          | 164          | 15       | 负离子  |
|      | 定性    | 179          | 148.7        | 25       | 负离子  |
| BHT  | 定量    | 219          | 219          | 2        | 负离子  |
|      | 定性    | 219          | 202.9        | 35       | 负离子  |

表 3 质谱时间分段采集参数  
Table 3 Acquisition parameters of time subsection for mass spectrometry

| 时间(min) | 模式  | 分流阀      | 保存与否 |
|---------|-----|----------|------|
| 0       | MRM | To MS    | 是    |
| 1.7     | MRM | To MS    | 是    |
| 3.0     | MRM | To waste | 否    |
| 5.4     | MRM | To MS    | 是    |
| 6.5     | MRM | To waste | 否    |
| 7.8     | MRM | To MS    | 是    |
| 8.8     | MRM | To waste | 否    |

### 3 结果与分析

#### 3.1 质谱条件与色谱条件的选择

##### 3.1.1 质谱条件的优化

采用三重四级杆串联质谱的 MRM 模式能够减小基质干扰,具有特异性强、灵敏度高、准确度高、重现性好、线性范围宽的特点,进而提供高灵敏度和选择性的化合物分析模式。综合考察所测定抗氧化剂的理化性质、样品溶液的特点以及流动相组成,选择最佳离子化效率的质谱条件,因此选择鞘气温度为 250 °C,鞘气流速为 11 L/min,雾化气温度为 200 °C,雾化器流速为 14 L/min。根据色谱保留时间及峰宽带,采用分时间段进行采集见表 3。通过在 ESI 正负离子源模式下对 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 进行一级质谱分析,根据其相应强度和分子质量数,确定为 ESI 负离子模式进行检测;设定不同碰撞电压,对选择的分子离子进行碰撞,根据所获得的质谱图中离子丰度,确

定 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 质谱条件见表 2, PG、TBHQ、BHA 和 BHT 的 MRM 色谱图见图 1~2。

##### 3.1.2 色谱条件的选择

根据 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 的理化性质,对色谱柱和流动相进行条件优化。比较了 Agilent zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱、Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> 柱和 Cortecs UPLC C<sub>18</sub> 柱,结果表明所检测抗氧化剂对使用色谱柱无明显选择性。分别采用甲醇、乙腈作为有机相,水、0.1%甲酸和 10 mmol/L 醋酸铵为水相,进行组合条件优化,结果表明甲醇、乙腈无明显差异,水为水相时 BHT 的响应有明显提高,其他组分离离效果、峰型最佳。因此,采用乙腈和水作为超高效液相色谱流动相。

#### 3.2 提取方式的选择

为了保证 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 在供试品中提取完全以及比较好的回收率,对提取方式进行了考察。分别考察了直接提取、溶散后提取以及超声和涡旋等方式辅助提取对供试品进行处理的效果。结果表明,采用环己烷溶散后涡旋提取方式提取效果最佳,杂质干扰小,回收率高。

#### 3.3 线性范围和检出限

将 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 的标准储备溶液进行逐级稀释,配制混合标准系列溶液,浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.00 mg/mL,在优化后的仪器参数条件下进行测定,以标准品的浓度为横坐标( $X$ )、峰面积为纵坐标( $Y$ )做标准曲线。结果见表 4。

结果表明,PG、TBHQ、BHA 和 BHT 在 0.50~20 mg/mL 质量浓度范围内具有良好的线性关系, $r$  值均高于 0.997,结果见表 4。对空白样品添加 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 标准溶液,以 3 倍信噪比计算 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 的检出限为 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

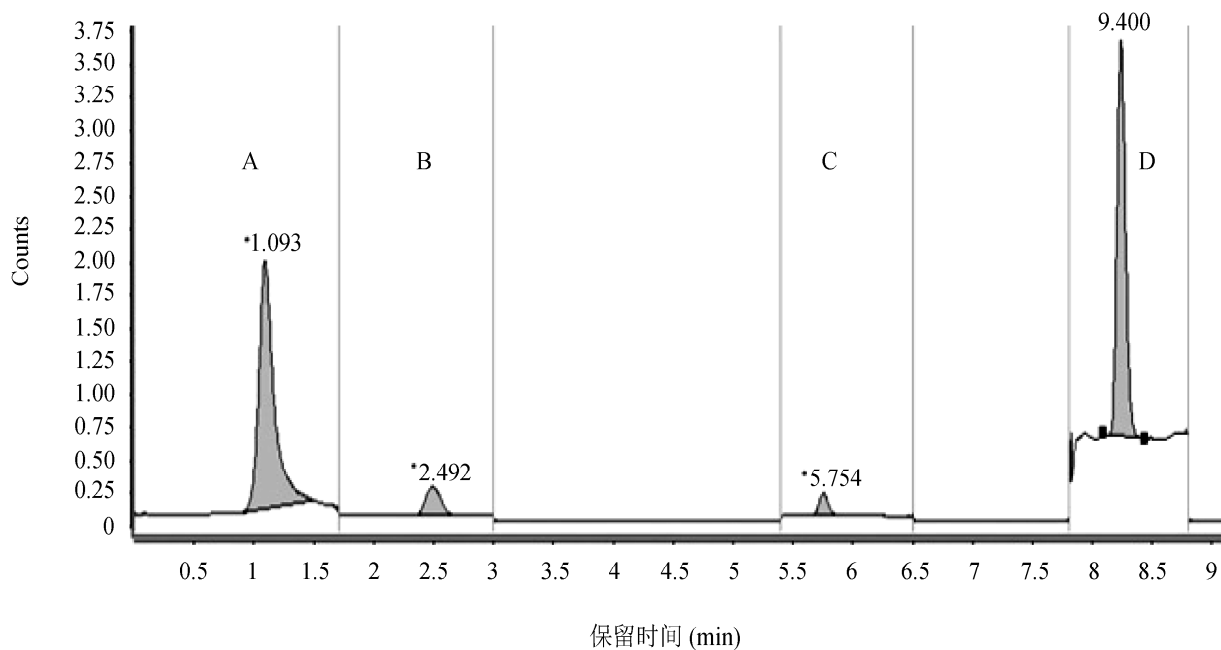


图 1 抗氧化剂混合对照品总离子流图

Fig. 1 TIC chromatogram of mixed standard of antioxidants

A: 没食子酸丙酯; B: 叔丁基对苯二酚; C: 丁羟基茴香醚; D: 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚  
 A: PG; B: TBHQ; C: BHA; D: BHT

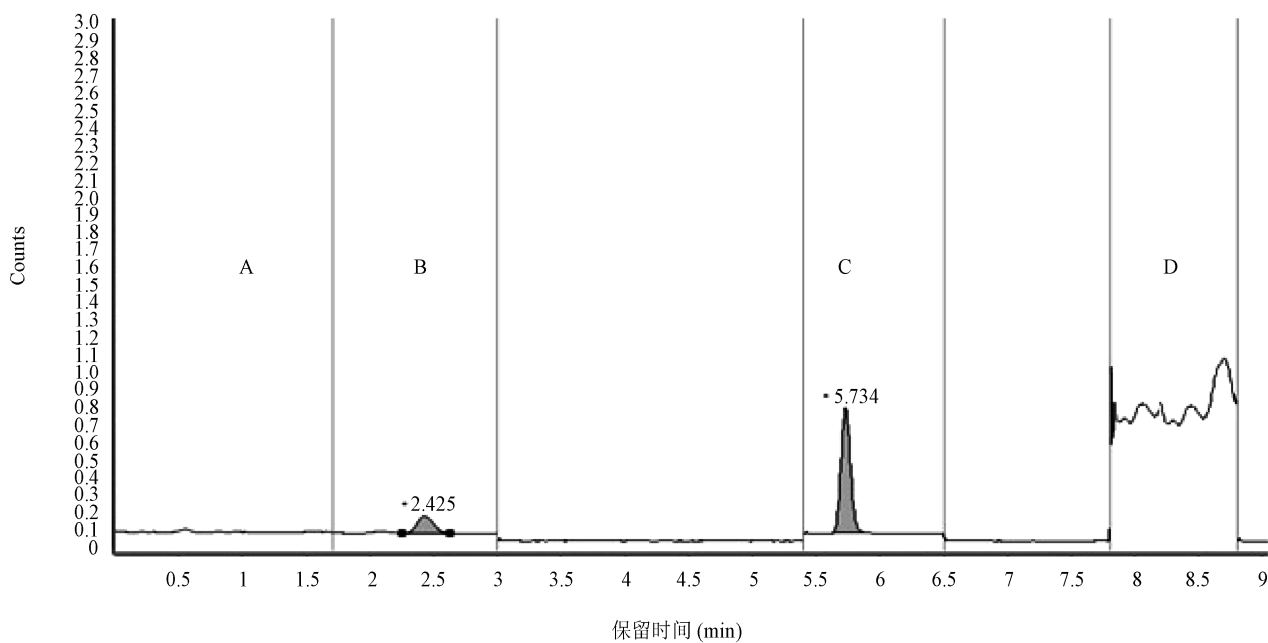


图 2 样品总离子流图

Fig. 2 TIC chromatogram of sample

A: 没食子酸丙酯; B: 叔丁基对苯二酚; C: 丁羟基茴香醚; D: 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚  
 A: PG; B: TBHQ; C: BHA; D: BHT

表4 抗氧化剂的回归方程和相关系数  
Table 4 Regression equations and correlation coefficients of antioxidants

| 组分   | 回归方程                           | 相关系数   |
|------|--------------------------------|--------|
| PG   | $Y=110867.295561X-6218.968077$ | 0.9999 |
| TBHQ | $Y=704.542184X-137.132852$     | 0.9999 |
| BHA  | $Y=6608.040995X-122.010273$    | 0.9997 |
| BHT  | $Y=1004.449370X+9623.711835$   | 0.9975 |

### 3.4 回收率及精密度实验

通过对空白样品进行 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 的添加回收率重复实验,所添加的低、中、高 3 个不同浓度水平分别为 2、8 和 16 mg/kg,对每个水平进行 6 次重复性实验,平均回收率和相对标准偏差见表 5。根据表 5 数据可知,实验中 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 在所测定样品中的回收率均大于 88%,RSD 均小于 5%。因此,该方法适用于鱼油软胶囊中 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 的测定。

表5 方法的回收率及精密度实验( $n=6$ )  
Table 5 Results of precisions and recoveries for antioxidants ( $n=6$ )

| 组分   | 添加水平(mg/kg) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
|------|-------------|----------|--------|
| PG   | 2           | 89.6     | 4.2    |
|      | 8           | 90.3     | 2.9    |
|      | 16          | 94.2     | 2.0    |
| TBHQ | 2           | 90.4     | 2.2    |
|      | 8           | 91.5     | 1.9    |
|      | 16          | 92.2     | 2.3    |
| BHA  | 2           | 92.3     | 3.5    |
|      | 8           | 91.6     | 2.6    |
|      | 16          | 92.7     | 1.8    |
| BHT  | 2           | 88.8     | 3.2    |
|      | 8           | 92.6     | 1.9    |
|      | 16          | 91.9     | 1.6    |

### 3.5 实际样品的检测

按所建立的方法对鱼油软胶囊中 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 进行测定,结果在 152 批次样品中,有 6 批次样品中检出 BHA,检出量为 4~6 mg/kg,11 批次检出 TBHQ,检出量为 6~52 mg/kg,其中有 3 个批次样品同时检出 BHA 和 TBHQ。经核实,抗氧化剂为原料棕榈油带入,但所检出抗氧化剂的含量均低于 GB 2760-2011《食品添加剂使用标准》<sup>[3]</sup>中规定的限值。因此,建议生产企业提高所使用原料的质量。

## 4 结论

本研究在现行国家标准基础上,通过优化提取方法将 4 中抗氧化剂同时进行检测,建立了 UPLC-MS/MS 测定鱼油软胶囊中 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 4 种抗氧化剂含量的方法。采用环己烷溶解分散供试品,以乙腈为萃取溶剂进行涡旋提取,采用 MRM 模式进行定量。该方法的检出限为 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,加标回收率为 88.8%~94.2%,RSD < 5%。该方法具有特异性强、基质干扰少、准确度高、检测灵敏度及前处理简单等特点,检测结果可靠,可适用于鱼油软胶囊中 PG、TBHQ、BHA 和 BHT 含量的测定,并为该类产品的质量控制在提供一定参考。

### 参考文献

- 范赛,邹建宏,李丽萍,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测水系模拟物中 11 种工业用抗氧化剂 A[J].色谱,2014,32(9):999-1004.  
Fan S, Zou JH, Li LP, et al. Determination of 11 industrial antioxidants in the aqueous stimulants by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(9): 999-1004.
- 黄永忠.气相色谱法检测食品中抗氧化剂 BHA、BHT 和 TBHQ[J].广州化工,2015,43(3):130-132.  
Huang YZ. The detection of food antioxidants BHA, BHT and TBHQ by gas chromatography [J]. Guangzhou Chem Ind, 2015, 43(3): 130-132.
- GB2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].  
GB2760-2014 National Food Safety Standard-Standard for food additives [S].
- GB 23373-2009 食品中抗氧化剂丁羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)和特丁基对苯二酚(TBHQ)的测定[S].  
GB23373-2009 Determination of butylated hydroxyl anisole(BHA), dibutylated hydroxyl toluene(BHT) and tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) [S].
- Jaworska M, Szulinska Z, Wilk M. Application of capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations [J]. J Sep Sci, 2005, 28(2): 137-142.
- Guan YQ, Chu QC, Fu L, et al. Determination of antioxidants in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection [J]. J Chromatogr A, 2005, 1074(1-2): 201-204.
- Memon N, Bhanger M, Khuhawer MY. Determination of preservatives in cosmetics and food samples by micellar liquid chromatography [J]. J Sep Sci, 2005, 28(7): 635-641.
- Guo L, Xie MY, Yan AP, et al. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS [J]. Anal Bio Anal Chem, 2006, 386(6): 1881-1887.
- GB/T 5009.30-2003 食品中叔丁基羟基茴香醚(BHA)与 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的测定[S].  
GB/T 5009.30-2003 Determination of butylated hydroxyanisole and dibutylated hydroxyl toluene [S].
- Christian P, Liliane M. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection [J]. Food Chem, 2002, 77(1): 93-100.
- Li XQ, Ji C, Sun YY, et al. Analysis of synthetic antioxidants and

- preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS [J]. Food Chem, 2009, 113(2): 692-700.
- [12] 马启芳, 曾凡刚, 鲁杰. 超高效液相色谱法测定橄榄油中 8 种受阻酚类抗氧化剂及迁移研究[J]. 卫生研究, 2016, 45(1): 51-55.  
Ma QF, Zeng FG, Lu J. Determination of 8 hindered phenolic antioxidants in olive oil by ultra-performance liquid chromatography and its migration research [J]. J Hyg Res, 2016, 45(1): 51-55.
- [13] 李双琦, 周良春, 张晓飞, 等. GC-MS 法快速测定食品包装袋中 3 中抗氧化剂[J]. 现代化工, 2015, 35(2): 178-180.  
Li SQ, Zhou LC, Zhang XF, *et al.* Rapid determination of 3 antioxidants in food packaging bags by GC-MS [J]. Mod Chem Ind, 2015, 35(2): 178-180.
- [14] Davison P, Jesus S, Cristina N. Determination of the antioxidants capacity of active food packagings by situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection [J]. J Chromatogr A, 2008, 1178(18): 126-133.
- [15] 邢寒竹, 王霞, 陈相峰, 等. 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[J]. 分析化学研究简报, 2015, 43(3): 409-413.  
Xing HZ, Wang X, Chen XF, *et al.* Rapid and highly sensitive analysis of antioxidants in edible oils with dispersive liquid-liquid microextraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(3): 409-413.
- [16] NY/T 1602-2008 植物油中叔丁基羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)和特丁基对苯二酚(TBHQ)的测定 高效液相色谱法[S].  
NY/T 1602-2008 Determination of butylated hydroxyl anisole(BHA), butylated hydroxyl tolueneand tertiary butyl hydroquinone content in vegetable oil High performance liquid chromatography [S].

(责任编辑: 姚 菲)

## 作者简介



谢强胜, 副主任药师, 主要研究方向为食品药品安全检测。

E-mail: xie\_qsh@163.com



李 军, 主任药师, 主要研究方向为食品药品质量控制。

E-mail: 13573756821@163.com