

X500R在植物食用油中的真伪鉴别和产地溯源分析

杨总¹、龚蕊²、程海燕¹、李立军¹、郭立海¹

SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

引言

植物食用油是人体重要的营养来源之一,也是人体最重要的脂肪酸来源,在人体三大能量营养素中占有重要的地位^[1-3]。食用植物油不仅是人体细胞组织以及体内各种重要生理活性物质的构成成分,也是各种生物功能的载体。根据相关文献报道植物食用油中95%以上的成分为甘油三酯^[4]。由于甘油三酯的特殊的骨架结构决定了甘油三酯的营养价值,随甘油三酯骨架上脂肪酸种类的不同营养价值也各异。因此,对于植物食用油的真伪鉴别和溯源分析而言,甘油三酯的结构鉴定及组成分析可以提供更为准确、更直接的可靠依据。本文采用高效液相色谱串联新型高分辨质谱仪X500R(图2)建立了常见的植物食用油的真伪鉴别和溯源的分析方法,对于植物油领域的打假和食用油的品质保证提供了有力的依据。

甘油三酯的结构示意图(图1)

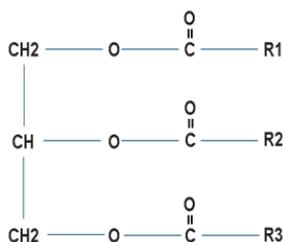


图1. 甘油三酯的骨架结构图, R1、R2、R3是三个脂肪酸链: Mono-Acyl-Glycerols 含有一个脂肪酸链(MAG), Di-Acyl-Glycerols 含有两个脂肪酸链(DAG), Tri-Acyl-Glycerols 含有三个脂肪酸链(TAG);

在食用植物油真伪鉴别和产地溯源分析遇到的困难和挑战

1. 取样很重要,样品必须要具有代表性,因此样品的类别和来源尤其重要;
2. 食用油样品基质复杂,共流出物多,对仪器设备的要求很高,质谱仪器必须具有超快的扫描速度,并且还需要同时兼顾分辨率、灵敏度、准确度等,才可以保证在分析过程中得到全面和有效的信息;

3. 由于该实验是针对食用油的真伪鉴别和产地溯源的研究,主要是体现在样品组与组之间的差异,即是食用油的食品组学研究。因此,对于组学的研究,样品数目往往会是几十个甚至几百个样品连续不断的进入质谱进行分析检测,样品采集需要数天,并且严格要求在采集过程中不能有任何的中断或间隔。于是组学研究对仪器设备的要求就势必越来越高,连续不断进样需要仪器拥有优异的稳定性和抗基质干扰的能力;
4. 由于食用油中主要是含有甘油酯类,诸多的脂质分子量一样,色谱行为一致,色谱分离差,对于脂质的研究,主要的困难和挑战是同重化合物和同分异构体;
5. 组学样品信息量庞大,需要专门的软件去快速发现样品组与组之间的规律,从而能够快速找出海量数据中的有意义的差异化合物;对于差异化合物的结构鉴定,需要更多的数据谱库,能够快速简便的进行谱库搜索进行鉴定分析;



图2. 新型高分辨质谱仪X500R;

本文实验方法的优势和特点

该实验采用高效液相色谱串联新型高分辨质谱X500R成功的应用于食用植物油的真伪鉴别和产地溯源分析,并且很好的解决了植物食用油的真伪鉴别和产地溯源分析过程中遇到的诸多困难和挑战。该方法的优势和特点如下:

1. 样品收集: 实验过程中得到常见7种植物食用油: 分别是橄榄油、花生油、玉米油、葵花籽油、菜籽油、芝麻油、大豆油(图3);



图3. 7种常见的植物食用油。

- 前处理：样品前处理简便快捷，采用甲醇/异丙醇（1/1，5mM 乙酸铵）进行直接稀释进样；
- 样品采集：最新型高分辨质谱X500R性能优异，结合专利技术动态背景扣除（DBS）功能，在拥有超快的扫描速度下（100Hz）同时兼顾高分辨、高灵敏、高准确度，保证了仪器设备能采集到样品中所有的有用信息，同时也保证了采集数据的完整性和有效性；本次实验连续进样采集了290个样品，均进行正离子和负离子采集，连续采样超过7天。每6个样品之间插入一个质控样品QC，通过QC的数据表明尽管连续采集样品数天，重复性依然良好，表明该仪器具有超强的抗基质干扰能力和优异的稳定性；
- 数据处理：采用专门的脂质分析软件LipidView对样品中的脂质进行分析，该软件含有数据库60余类，约2.8万脂质物种，大于600多种脂类特征碎片离子，并且还不断的更新增加谱库的数据量，数据处理操作简便快捷，该软件完全满足脂质分析领域的需求；为了更快更高效的找到组与组之间的规律，本实验采用专门的组学分析软件MarkerView进行数据分析，进行PCA和T-test分析，快速找到具有代表性的脂类差异化合物，其中包含了39种甘油酯类，9种游离脂肪酸类；采用最新数据分析软件SCIEX OS进行定量分析，很快发现找到的标记物在各种油中量的变化规律；
- 实验结果表明：差异标记物39种甘油酯和9种游离脂肪酸能很好的鉴定常见7种植物食用油的真伪和溯源分析，并且成功应用于橄榄油中掺杂葵花籽油的打假分析，橄榄油和大豆油的产地溯源分析；该实验结果在一定程度上对于植物食用油的真伪鉴别和打假、产地溯源分析具有重要的参考意义；

实验方法

液相条件：

液相：SCIEX ExionLC™ AC；

色谱柱：Phenomenex C18, 2.6μm, 2.1 × 100mm；

流动相：A 相为水 / 甲醇 / 乙腈（3/1/1，含有 5 mM 乙酸铵）
B 相为异丙醇（含有 5 mM 乙酸铵）；

流速：0.35 mL/min；

色谱柱温度：60 °C；

进样量：2 μL；

进样器温度：15 °C；

洗脱程序：梯度洗脱；

质谱条件：

该实验采用最新型高分辨质谱 X500R 系统，采用 TOF MS-IDA-DBS-MS/MS 扫描方法，一针进样同时获得一级和二级信息；

离子源参数如表 1：

Table 1. Ion Source and MS Parameters.

Parameter	Setting
Curtain Gas (CUR)	35
Collision Gas	7
Ion Spray voltage (IS)	5500/-4500
Temperature (TEM)	600
Nebulizer Gas (GS1)	55
Heater Gas (GS2)	60
Declustering Potential (DP)	80
Collision energy (CE)	40
Spredd Collision energy (CES)	± 20
TOF MS Range (Da)	100 - 1000
TOF MS/MS (Da)	50 - 1000
DBS	On
Candidate TOF MS/MS Ions	12

结果与讨论

重复性和稳定性考察

本次实验总共运行了 290 个样品（正离子 145 个，负离子 145 个）；每个样本各取一定量进行混合，制成 QC 样品。在进样过程中，每相隔 6 个样本，运行一个 QC 样品。实验取连续间隔 24 个样本采集的 QC 样品，取样本中不同时间段的分子量有差异的离子比较重复性差异。如图 4 所示，尽管仪器采集样品数天，三个不同保留时间的不同质荷比的离子可以重合，表明仪器的具有超强的抗基质干扰能力和优异的稳定性，保证了整批样品的可靠性。

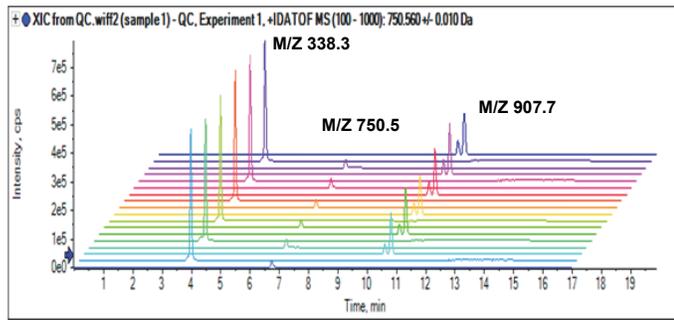


图4. QC样品的重复性考察；

X500R拥有最快的扫描速度下(100Hz)，同时兼顾高分辨、高灵敏度、高准确度

X500R 具有最快的扫描速度，一针进样同时获得高分辨的一级和高分辨的二级质谱图；色谱峰仅 0.2min，依然可以采集到 15 个点，保证了定量的准确性；并且不管一级质谱图还是二级质谱图在全质量端分辨率 (R) 均在 3000 左右 (图 5)；连续 12 小时进样，质量误差在 1PPM 以内，具有超高的准确度 (图 6)；

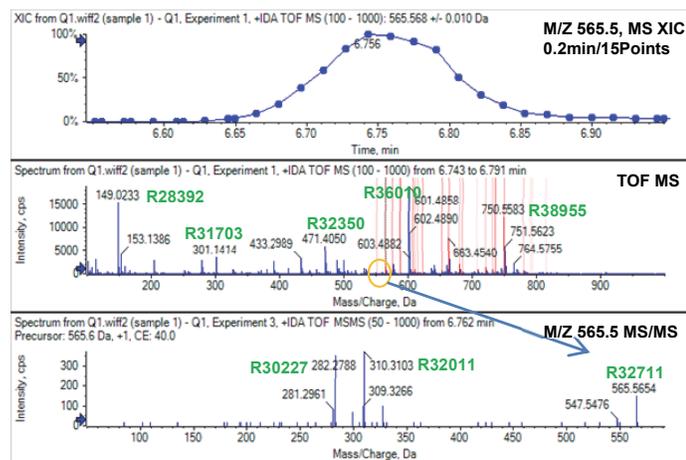


图5. 在超快的扫描速度下，兼顾分辨率、高灵敏度、高准确度；

Index	Sample Name	Component Name	Formula	Precursor Mass	Found At Mass	Expected RT	Mass Error...	Mass Error (pp...)
9	QC	TAG 52:1	C55H104O6	878.817	878.8179	10.40	✓	0.9
10	QC	TAG 52:2	C55H102O6	876.801	876.8008	10.39	✓	-0.8
11	QC	TAG 52:3	C55H100O6	874.786	874.7851	10.18	✓	-0.9
12	QC	TAG 52:4	C55H98O6	872.770	872.7698	9.95	✓	-0.4
13	QC	TAG 52:5	C55H96O6	870.755	870.7542	9.71	✓	-0.4
14	QC	TAG 52:6	C55H94O6	868.739	868.7394	9.48	✓	0.7

Index	Sample Name	Component Name	Formula	Precursor Mass	Found At Mass	Expected RT	Mass Error...	Mass Error (pp...)
1	QC	TAG 52:1	C55H104O6	878.817	878.8165	10.40	✓	-0.7
2	QC	TAG 52:2	C55H102O6	876.801	876.8014	10.39	✓	-0.1
3	QC	TAG 52:3	C55H100O6	874.786	874.7851	10.18	✓	-0.9
4	QC	TAG 52:4	C55H98O6	872.770	872.7694	9.95	✓	-0.9
5	QC	TAG 52:5	C55H96O6	870.755	870.7541	9.71	✓	-0.5
6	QC	TAG 52:6	C55H94O6	868.739	868.7393	9.48	✓	0.5

图6.连续12小时进样，质量误差在1PPM以内；

专利技术Dynamic Background Subtract (DBS)

通过 DBS 功能能很好的去除背景离子的干扰，保证了整个色谱梯度采集到的二级质谱图有效和高质量；如图 7.1 所示，质荷比 149、205、471、601 虽然响应值很高，但是提取离子色谱图没有明显的色谱峰，因此不会打二级质谱图；然而对于有些丰度较低的有意义的差异化合物，只要提取有明显的色谱峰，通过 DBS 功能依然可以采集高质量的二级质谱图 (图 7.2)，为化合物鉴定提供了很好的手段。

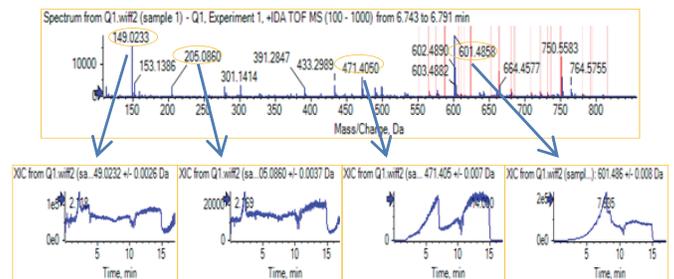


图7.1. 专利技术DBS功能；

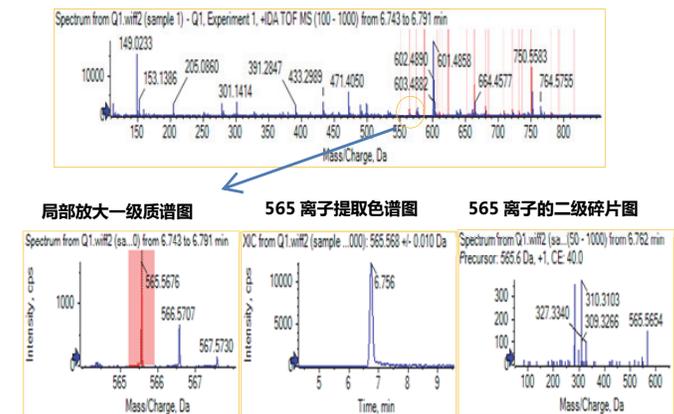


图7.2. 专利技术DBS功能；

样本中脂质的鉴定

根据国内外文献报道 [1-3] 植物食用油中 95% 以上的成分为甘油三酯，含有少量的游离脂肪酸、磷脂、维生素、植物甾醇类激素等成分。该实验采用专门的脂质鉴定软件 LipidView 进行分析。实验结果表明主要成分是甘油三酯、甘油二酯以及游离脂肪酸。

脂质鉴定过程主要是根据保留时间的规律和二级碎片的规律，如图 7 所示，以甘油三酯 TAG 为例，双键越多，保留时间越靠前，并且每差一个双键，保留时间间隔相等 (图 8)。甘油三酯的母离子加铵峰比加氢峰响应值高，主要的碎片信息是母离子丢掉不同的脂肪酸链之后形成的，例如 TAG 52:3 主要是甘油三酯的骨架和三种不同的脂肪酸链组成 (18:1/18:2/16:0) (图 9)。

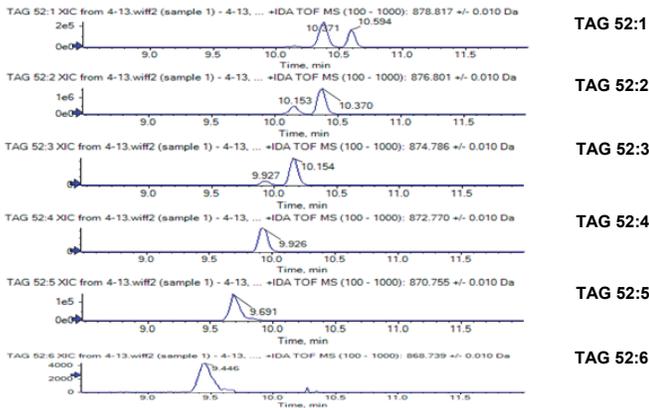


图8. 甘油三酯保留时间的规律;

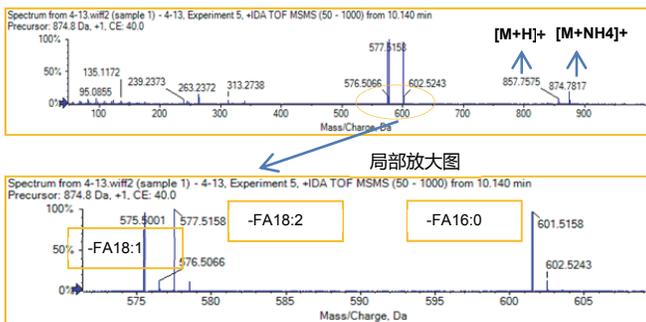


图9. TAG 52:3 (TAG 18:1/18:2/16:0) 甘油三酯碎片离子的规律;

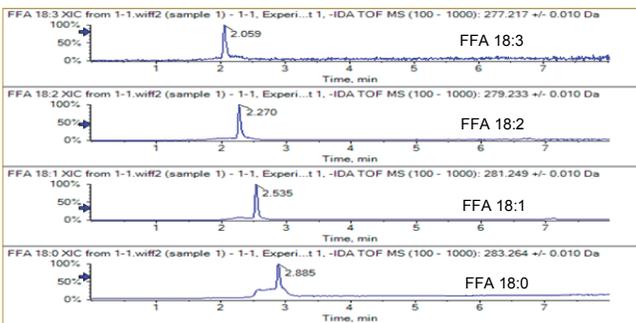


图10. 游离脂肪酸的保留规律;

游离脂肪酸没有特别明显的碎片峰，主要是通过保留时间谱库来进行定性分析，如图 10 中所以，游离脂肪酸 FFA 18:0、FFA 18:1、FFA 18:2、FFA 18:3 保留时间均相隔 0.2min，双键越多保留越靠前。

7种植物食用油的真伪鉴别

数据处理思路 (图 11): 采用 Target 分析, 结合 LipidView 的鉴定结果, 主要是从植物油主要成分 TAG、DAG、FFA 进行有目标的分析; 采用 MarkerView 进行 PCA 和 T-test 快速准确找到差异标记物;

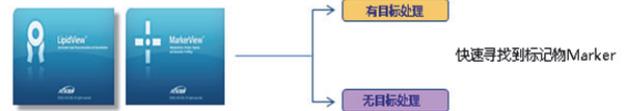


图11. 数据处理思路;

实验采用专门组学的分析软件 MarkerView 进行数据处理, 该软件操作简单快捷, 很快找到 7 种食用油之间的差异化合物。

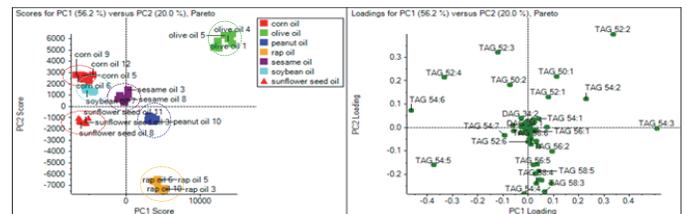


图12. 针对于甘油酯类化合物, 分组良好;

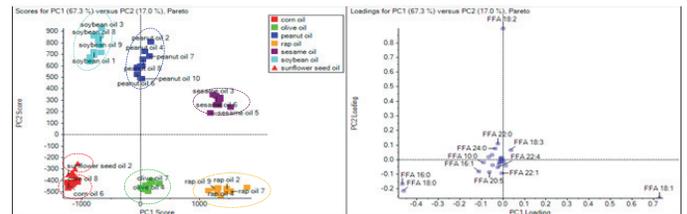


图13. 针对于游离脂肪酸类化合物, 分组良好;

针对甘油酯类, LipidView 软件鉴定出了 283 种甘油三酯和甘油二酯, 主要影响分组的两个维度因子 PC1 和 PC2 之和大于 75%, 并且为非监管的主成分分析 (PCA No-DA), 表明分组良好 (图 12); 针对于游离脂肪酸类, LipidView 软件鉴定出了 27 种游离脂肪酸, 主要影响分组的两个维度因子 PC1 和 PC2 之和大于 80%, 并且为非监管的主成分分析 (PCA No-DA), 表明分组良好 (图 13), 其中玉米油和葵花籽油差异不明显。

实验采用 T-Test 检验, 很快发现差异化合物在不同组样本间的变化规律, p-Value 值越小表明差异越明显 (图 14)。本次实验总共发现有意义的差异化合物为 39 种甘油酯类、9 种游离脂肪酸类。

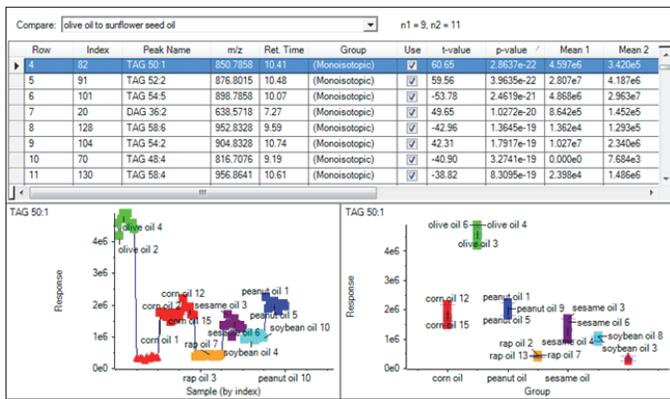


图14. 通过T-Test检验，发现差异化合物；

找到差异化合物之后，采用 SCIEX OS 进行定量分析，从量的层面进一步剖析差异标记物在 7 种植物油中含量的变化规律（图 15）。从实验结果可以看出，花生油和菜籽油与其他 5 种油的差异较为明显，主要表现在 TAG 56:3、TAG 56:4、TAG 56:5，TAG 58:3、TAG 58:4、TAG 58:5，TAG 60:3、TAG 60:4、TAG 60:5，表明这些甘油酯类可以作为鉴别这两类油的依据。

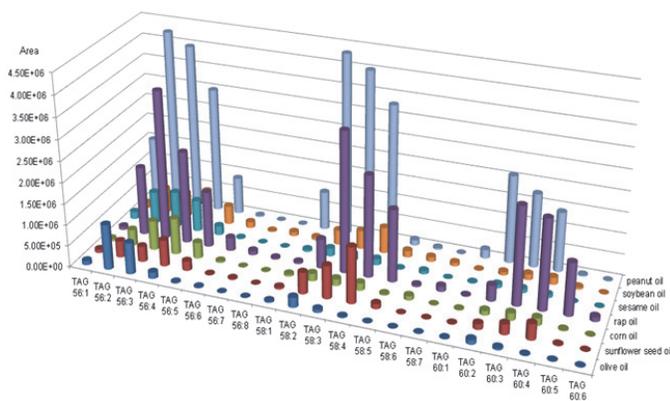


图15. 部分差异标记物在7种油中变化规律（n=10）；

某些不法商为了谋取利益，会在较为昂贵的油品中掺杂一些便宜的油。该实验为了进一步验证找到的差异标记物是否能应用于日常食用油的真伪鉴别，实验采用了考核盲样进行测试。盲样来源于某植物油品牌生产制造商调制的调和油，其中主要是含有不同比例葵花籽油和橄榄油。实验结果显示：橄榄油和葵花籽油中标记物的响应值之和与调和油中标记物的响应值的比值接近 1（图 16），实验结果表明，找到的标记物可以作为鉴定葵花籽油和橄榄油配置的调和油，为保证消费者的利益提供了可靠的保证。

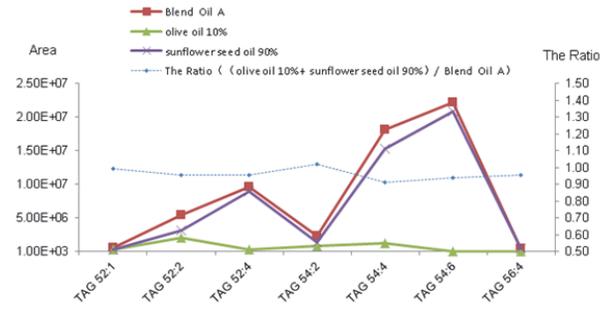


图16. 调和油鉴定结果，该调和油为90%葵花籽油和10%的橄榄油组成（红色的线为调和油中标记物的响应值，绿色的线是橄榄油中标记物的响应值，紫色的线为葵花籽油中标记物的响应值；虚线为标记物在橄榄油和葵花籽油的响应值之和与调和油中标记物的响应值的比值）；

橄榄油和大豆油的产地溯源分析

搜集来自于不同国家和地区的橄榄油和大豆油。橄榄油的来源主要是意大利、希腊、西班牙；大豆油的来源主要是中国、巴西、美国。该实验对于产地溯源分析总共找到 34 个差异标记物。

由于地域和气候的差异，导致三个国家的橄榄油在甘油酯类和游离脂肪酸类有着很大差异。由图 17 显示，采用 No-DA 的主成分分析发现，甘油酯类的 PC1 与 PC2 之和大于 90%，游离脂肪酸的 PC1 与 PC2 之和大于 80%，表明分组良好。

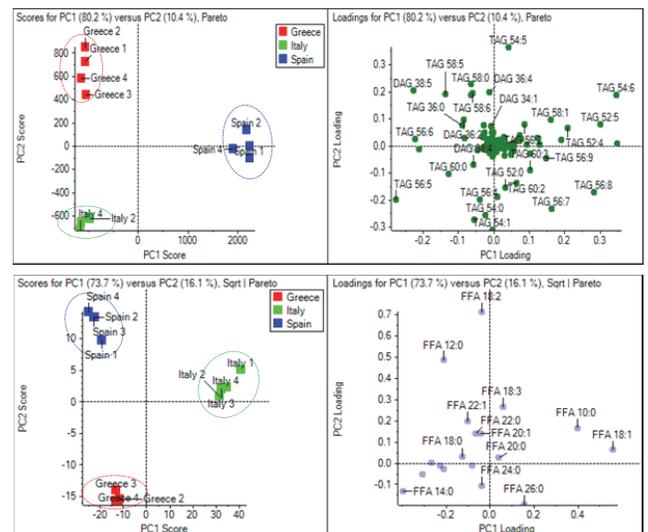


图17. 针对橄榄油，甘油酯类和游离脂肪酸，三个国家的分组；

对于大豆油而言，来自中国、巴西、美国三个国家的甘油三酯类分组较为明显，游离脂肪酸的分组不明显，通过 T-Test 检验确实发现游离脂肪酸在不同国家地区的浓度差异在同一个水平（图 18 和图 19）。

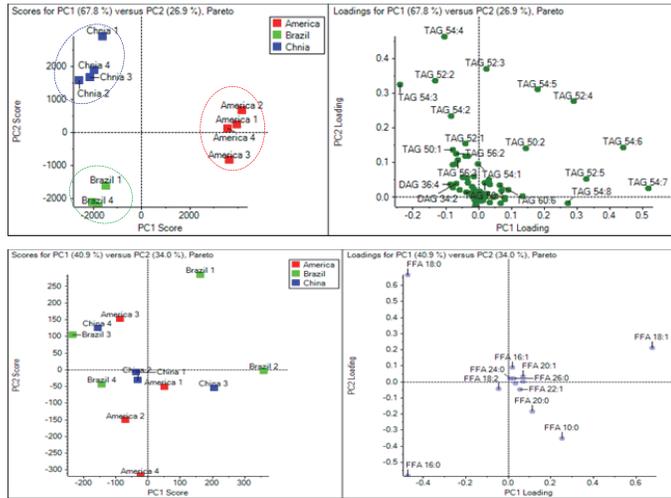


图18. 针对大豆油，甘油酯类和游离脂肪酸，三个国家的分组；



图19. 针对大豆油，T-Test检验发现游离脂肪酸在三个国家没有明显的差异；

总结

1. 本文通过高效液相色谱串联新型高分辨质谱X500R成功的应用于食用植物油的真伪鉴别和产地溯源分析；本实验找到的39种脂类标记物和9种游离脂肪酸类化合物能成功的应用于植物食用油中的真伪鉴别和产地溯源分析；
2. 尽管植物油食用油基质复杂，共流出物多，X500R能够很好的解决该问题。X500R性能优异，结合专利技术动态背景扣除（DBS）功能，在拥有超快的扫描速度下（100Hz）同时兼顾高分辨、高灵敏、高准确度，保证了仪器设备能采集到样品中所有的有用信息，同时也保证了采集数据的完整性和有效性；
3. 通过质控样品QC的数据显示，尽管连续采集植物油样品数天，重复性依然良好，表明该仪器具有超强的抗基质干扰能力和优异的稳定性；
4. 专业的脂质分析数据库软件LipidView，包含了几万种脂质种类，只需要搜索谱库就可以轻松完成脂质鉴定；专门的组学分析软件MarkView高效的完成主成分分析（PCA）和T-Test检验，快速的找到标记物；将找到的标记物采用SCIEX OS软件可以简便快捷的进行定量分析，从量的水平进一步评估了差异化合物的在不同种类食用油中的变化规律；

参考文献

1. P. Georgios, S. Aristidis, F. Camin et al, Food authentication: techniques, trends & emerging approaches. Trends in Analytical Chemistry, 15, 2 - 41, 2016;
2. Fang Wei, Na Hu, Xin Lv, Hong Chen et al, Quantitation of triacylglycerols in edible oil by off-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using a single column. J. Chromatography A 1401, 60 - 71, 2015;
3. Serena Indelicato, David Bongiorno, Rosa Pitonzo, Vita Di Stefano, Valentina Calabrese, Sergio Indelicato, Giuseppe Avellone et al, Triacylglycerols in edible oil: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. J. Chromatography A 1515, 1 - 16, 2017;
4. Wahid Herchi, Faouzi Sakouhi, Sebei Khaled, Yeping Xiong, Sadok Boukhchina, Hbib Kallel, Jonathan M. Curtis et al, Characterisation of the glycerophospholipid fraction in flaxseed oil using liquid chromatography-mass spectrometry. J. Food Chemistry 129, 437 - 442, 2011;

Answers for Science. Knowledge for Life.™

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2018 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8425-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX