

## 实验技术与方法

## 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定火锅油、泔水油及地沟油中胆固醇含量

陈红, 杨梅, 朱蓉, 张亿, 谯斌宗, 蒲旭峰  
(成都市食品药品检测中心, 四川 成都 610045)

**摘要:**目的 建立测定火锅油、泔水油及地沟油中胆固醇含量的超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS)方法。方法 火锅油、泔水油及地沟油经皂化后用石油醚+乙醚(1+1)提取后,以2,2,3,4,4,6-d<sub>6</sub>胆固醇为内标, Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱为分析柱,含0.1%甲酸的甲醇溶液为流动相,采用UPLC-MS/MS法,大气压化学电离源(APCI)正离子模式,多反应监测方式测定胆固醇浓度。胆固醇和内标检测离子对 $m/z$ 分别为369.2→146.9、369.2→160.9和375.2→166.5。结果 胆固醇在0.05~10 μg/ml范围内线性关系良好( $r=0.999$ ),最小检出量为0.1 ng,方法回收率为105.2%。结论 本方法具有良好的灵敏度、准确度及专属性,可通过检测油脂中的胆固醇含量,鉴别火锅油、泔水油或地沟油。

**关键词:**胆固醇;火锅油;泔水油;地沟油;超高效液相色谱-串联质谱;鉴别;食品安全

中图分类号:O657.43 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0429-04

### Ultra performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry in the determination of cholesterol in hotpot oil, hogwash oil and waste oil

Chen Hong, Yang Mei, Zhu Rong, Zhang Yi, Qiao Binzong, Pu Xufeng  
(Chengdu Center of Food and Drug Control, Sichuan Chengdu 610045, China)

**Abstract: Objective** To establish an ultraperformance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the determination of cholesterol in hotpot oil, hogwash oil and waste oil. **Methods** Oil samples were separated on a Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with a mobile phase of methanol + formic acid (999 + 1). Cholesterol and internal standard (2, 2, 3, 4, 4, 6-d<sub>6</sub> cholesterol) were detected by multi-reactions monitoring (MRM) technology on the transitions of precursor to products ( $m/z$ : 369.2→369.2, 369.2→160.9 and 375.2→166.5). Ion mode: APCI<sup>+</sup>. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.05-10 μg/ml ( $r=0.999$ ), the minimum detectable amount in sample was 0.1 ng, the recovery was 105.2%. **Conclusion** The method is sensitive, accurate and suitable for the determination of cholesterol in hotpot oil, hogwash oil and waste oil.

**Key words:** Cholesterol; hotpot oil; hogwash oil; waste oil; ultra performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry; distinguish; food safety

目前,火锅油、泔水油及地沟油中胆固醇的检测方法包括比色法、高效液相色谱法、气相色谱法等<sup>[1-4]</sup>。但这些方法选择性不强、检测灵敏度低,缺乏结构确认的详细信息,若检出含胆固醇的阳性样品还需进一步确认。梁中书等<sup>[5]</sup>利用液相色谱-质谱联用法测定细胞内胆固醇及胆固醇酯。盛灵慧等<sup>[6]</sup>建立液相色谱-大气压化学电离-同位素稀释质谱法测定蛋粉中胆固醇含量的方法。郭涛等<sup>[7]</sup>利用高效液相色谱法测定地沟油中胆固醇含量,用于

分析判定食用油中是否掺杂地沟油。本文参考文献[5-7],建立超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)测定油脂中胆固醇的方法,通过优化方法,较好地解决了火锅油、泔水油及地沟油中复杂基质成分干扰胆固醇测定的问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

美国 Waters-Xevo-TQ-MS 超高效液相色谱-三重四级杆质谱仪(UPLC-MS/MS); Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱。

### 1.2 试剂

胆固醇对照品(SIGMA™, Sigma-Aldrich™, 含量

收稿日期:2011-03-24

作者简介:陈红 女 副主任药师 研究方向为食品与药品质量检验 E-mail:redchen333@sohu.com

99%); 2,2,3,4,4,6-d<sub>6</sub> 胆固醇对照品 (ISOTEC™, Sigma-Aldrich™, 含量 98.8%); 色谱纯甲醇 (Fisher Chemicals); 甲酸 (Fluka); 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。

### 1.3 溶液的配制

#### 1.3.1 内标溶液的配制

精密称取 2,2,3,4,4,6-d<sub>6</sub> 胆固醇对照品 5 mg, 用无水乙醇溶解并稀释成浓度为 100 μg/ml 的贮备液, 临用时稀释成浓度为 5 μg/ml 的溶液, 作为内标溶液。

#### 1.3.2 胆固醇对照品溶液的配制

精密称取胆固醇对照品 10 mg, 用无水乙醇溶解并稀释成浓度为 50 μg/ml 的贮备液; 精密量取对照品贮备液 0.01、0.05、0.2、0.5、1、2 ml 置 10 ml 容量瓶中, 精密加入内标贮备液 0.125 ml, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 浓度为 0.050 0、0.250 0、1.00 0、2.50 0、5.00 0、10.0 0 μg/ml。

#### 1.3.3 供试品溶液的制备

准确称取待测样品 0.2 g (精确至 0.1 mg), 置于 250 ml 平底烧瓶中, 加入内标溶液 5 ml, 加入无水乙醇 30 ml, 60% 氢氧化钾溶液 10 ml, 在水浴中加热 (100 ℃) 回流 1 h。冷却至室温, 定量转移至 250 ml 分液漏斗中, 用水 30 ml 分 3 次冲洗平底烧瓶, 洗液并入分液漏斗, 再用 40 ml 石油醚 + 乙醚 (1 + 1) 溶液分 3 次冲洗平底烧瓶, 洗液并入分液漏斗, 充分振荡, 静置分层。分取水相再用 30 ml 石油醚 + 乙醚 (1 + 1) 溶液重复提取 2 次, 弃去水相, 合并有机相。有机相用 100 ml 水重复洗涤 4 次, 使洗液呈中性。有机相通过约 10 g 无水硫酸钠脱水, 水浴减压蒸干。用无水乙醇溶解残留物并定容至 20 ml, 溶液过 0.22 μm 滤膜待测。

### 1.4 UPLC-MS/MS 分析条件

#### 1.4.1 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱为分析柱, 含 0.1% 甲酸的甲醇溶液为流动相, 等度洗脱, 流速 0.3 ml/min, 柱温 40 ℃, 样品溶液进样温度 15 ℃, 进样量 2 μl。

#### 1.4.2 质谱条件

大气压化学电离源 (APCI); 正离子扫描; 多反应监测 (MRM) 模式; 毛细管电流 5 μA; 离子源温度 150 ℃; 脱溶剂温度 550 ℃; 锥孔气流 50 L/h; 脱溶剂气流 800 L/h; 碰撞气流 0.10 ml/min。三重四级杆离子对及相关电压参数设定见表 1。

#### 1.4.3 色谱、质谱行为分析

胆固醇对照品、内标及样品的色谱图见图 1, 3 种物质保留时间均为 1.35 min。采用 APCI 源, 采用正

表 1 胆固醇的 UPLC-MS/MS 分析参数

物质名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
胆固醇	369.2	146.9	26	20
胆固醇	369.2	160.9	26	20
2,2,3,4,4,6-d <sub>6</sub> 胆固醇	375.2	166.5	26	22

离子模式, 胆固醇 3 位上的羟基易脱去形成 m/z 369.2 的准分子离子峰; 对 m/z 369.2 进行二级扫描质谱分析, 产生的主要碎片离子有 m/z 为 160.9, m/z 146.9, 其裂解方式见图 2。

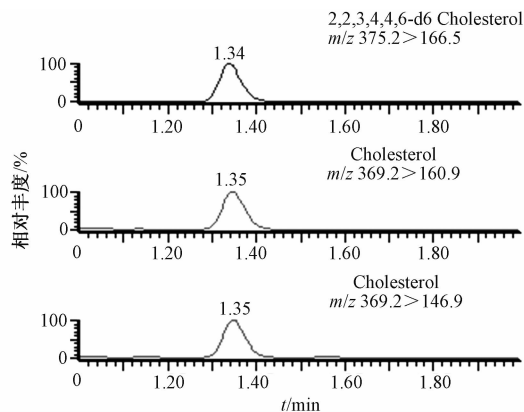


图 1 胆固醇与内标的 MRM 谱图

Figure 1 MRM chromatograms of cholesterol and 2,2,3,4,4,6-d<sub>6</sub> cholesterol

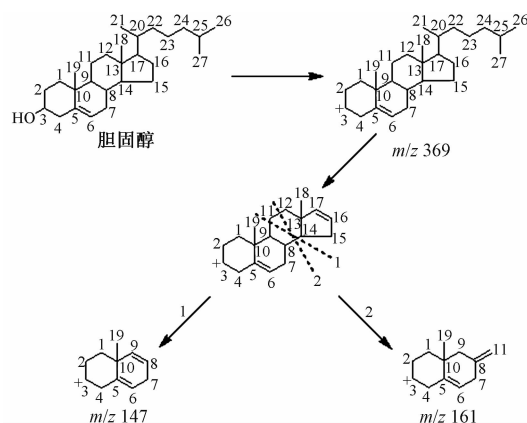


图 2 胆固醇的 MS/MS 裂解方式分析

Figure 2 Proposed fragmentation scheme for cholesterol in MS/MS analysis

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系及范围

取对照品溶液, 进样测定, 以胆固醇与内标峰面积的比值作为纵坐标, 以胆固醇浓度为横坐标, 胆固醇浓度在 0.05 ~ 10 μg/ml 范围内线性关系良好 ( $r = 0.999$ )。取胆固醇对照品溶液 (50 ng/ml) 进样 2 μl, 对应最小检出量为 0.1 ng。

### 2.2 精密度试验

取同一样品, 测得胆固醇平均浓度为 717.6 mg/kg,

RSD 为 3.2% ( $n = 6$ )。

### 2.3 回收率试验

取同批已知胆固醇浓度的样品约 0.2 g, 共 9 份, 分别加入内标溶液 0.5 ml, 再分别加入胆固醇对照品溶液, 高、中、低浓度分别为 461.75、923.5、461.2 ng/ml, 回收率为 102.2% ~ 108.0%, 平均回收率为 105.2%, RSD 2.1%, 见表 2。

表 2 回收实验结果

Table 2 Recovery of results ( $n = 9$ )

样品含量 (ng/ml)	添加含量 (ng/ml)	测定值 (ng/ml)	回收率 (%)
222.8	461.75	717.2	107.1
192.8	461.75	677.6	105.0
201.8	461.75	679.3	103.4
265.4	923.5	1251.4	106.8
276.9	923.5	1268.2	107.3
251.8	923.5	1249.6	108.0
260.2	4617.5	4998.5	102.6
256.0	4617.5	4974.9	102.2
254.0	4617.5	5074.2	104.4

### 2.4 样品测定

从市场抽取 30 个火锅油、泔水油及地沟油样本进行测定, 结果见表 3。

表 3 胆固醇含量测定结果

Table 3 Cholesterol contents in oil samples (mg/kg)

样品号	名称	胆固醇含量
1	地沟油	717.6
2		485.4
3		709.0
4	炸废油	173.3
5		146.5
6	泔水油	667.9
7		859.5
8		841.3
9	火锅油	869.5
10		66.7
11		70.7
12		71.8
13		882.7
14		796.5
15		66.5
16		70.6
17		983.3
18		86.5
19		859.2
20		838.0
21		897.9
22		775.0
23		865.2
24		724.1
25	火锅底料	71.6
26		73.4
27		77.6
28		73.7
29		119.3
30		68.4

### 3 结论

目前我国现行食用植物油的国家标准主要有 GB 2716—2005 《食用植物油卫生标准》<sup>[8]</sup>、GB 1534—2003 《花生油》<sup>[9]</sup>、GB 1535—2003 《大豆油》<sup>[10]</sup>、GB 1536—2004 《菜籽油》<sup>[11]</sup>、GB 8233—2008 《芝麻油》<sup>[12]</sup>、GB 19111—2003 《玉米油》<sup>[13]</sup>。上述标准从色泽、不溶性杂质、酸价、过氧化值、重金属、溶剂残留等指标对各种食用植物油的质量进行了规定。就泔水油(或地沟油)而言, 经炼制后(特别是炼制后掺入食用植物油), 所有指标基本都能达到国家标准要求。各地也先后制定一些控制泔水油(或地沟油)的地方标准, 选择的控制指标如微生物(污染)、酸价(酸败)、过氧化值(氧化变质)、电导率或钠离子(洗涤剂污染)等, 也容易通过炼制使泔水油符合相应规定。

火锅油、泔水油及地沟油多是由餐饮行业产生的副产品, 因此食用植物油中非法添加泔水油及地沟油就难免会含有动物油脂在里面。动物油脂与植物油脂有两大区别, 一是脂肪酸构成不同, 二是甾醇类成分不同。但是动植物油脂的脂肪酸成分复杂, 虽有不同但还有交叉, 难以找到一个合适脂肪酸作为指标性成分来区别植物油脂与动物油脂。然而, 甾醇类成分在动植物油脂中区别很明确, 动物油脂中甾醇类成分主要为胆固醇, 而植物油脂中主要为植物甾醇(胆固醇含量非常低)。胆固醇极性很低, 在用火锅油、泔水油及地沟油为原料炼制油脂过程中很难去除, 特征性强。因此, 选择胆固醇作为特征性成分进行研究, 希望能给食用植物油的安全监管以及完善食用油国家安全标准提供参考。

### 参考文献

- [1] 丁卓平, 王明华, 刘振华, 等. 食品中胆固醇含量测定方法的研究与比较[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 130-135.
- [2] 陈初良, 张惠琴, 甘云娟, 等. 食用植物油掺入动物油脂鉴别方法的研究[J]. 粮油食品科技, 2009, 17(3): 41-42.
- [3] 陈永伟, 李杰, 邢秀英, 等. 油脂中胆固醇含量的快速测定法[J]. 理化检验化学分册, 2009, 45(2): 180-181.
- [4] 张蕊, 祖丽亚, 樊铁, 等. 测定胆固醇含量鉴别地沟油的研究[J]. 中国油脂, 2006, 31(5): 65-67.
- [5] 梁中书, 杨侃, 陈本美. 液相色谱-质谱联用法测定 U937 细胞内胆固醇[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(20): 51-56.
- [6] 盛灵慧, 王晶, 武利庆, 等. 液相色谱-质谱联用法测定蛋粉中胆固醇含量[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 632-634.
- [7] 郭涛, 杜蕾蕾, 万辉, 等. 高效液相色谱法测定胆固醇含量鉴别地沟油[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 286-289.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 2716—2005 食用植物油卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局. GB 1534—2003 花生油[S]. 北

- 京:中国标准出版社,2003.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局. GB 1535—2003 大豆油[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [11] 国家质量监督检验检疫总局. GB 1536—2004 菜籽油[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [12] 国家质量监督检验检疫总局. GB 8233—2008 芝麻油[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局. GB 19111—2003 玉米油[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

## 实验技术与方法

### 液相色谱-串联质谱法测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub>

林宏琳, 华永有, 黄宏南

(福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350001)

**摘要:**目的 建立测定保健食品中维生素 B<sub>12</sub>的液相色谱-串联质谱法。方法 样品添加内标人参皂苷 Re 溶液,固相萃取法(SPE)对试样进行富集、净化,以甲醇(A)和纯水(B)为流动相经 Bio Basic-18 PIONEER 柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm)梯度洗脱分离,串联离子阱质谱在电喷雾电离正离子(ESI+)-全扫描(full)-二级质谱(MS/MS)模式下按内标法测定。结果 维生素 B<sub>12</sub>在 50~500 ng/ml 范围内具有良好的线性,相关系数  $r=0.992$ ,回收率 75.2%~89.5%,精密度 3.6%~5.9%,检出限为 5 ng/g,定量限为 16 ng/g。结论 本法可应用于保健食品的检测或产品质量控制。

**关键词:**保健食品;维生素 B<sub>12</sub>;液相色谱-串联质谱法

中图分类号:Q563.4 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0432-03

### Determination of vitamin B<sub>12</sub> in function foods by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

Lin Honglin, Hua Yongyou, Huang Hongnan

(Fujian Center For Disease Control & Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China)

**Abstract: Objective** To establish a method of determining vitamin B<sub>12</sub> in health food products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** After mixing samples with internal standard solution of ginsenoside Re, the mixtures of samples were extracted by solid phase extraction, and separated on a Bio Basic-18 PIONEER column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) by a mobile phase of methanol (A) + water (B) with the gradient elution program. Detection was carried out by a liquid chromatography coupled electrospray ionization and ion trap mass spectrometry with ESI+, MS/MS and full scan mode. **Results** Calibration curve was linear within the range of 50-500ng/ml with a correlation coefficient of more than 0.99; the limit of detection (LOD) was 5 ng/g and the limit of quantification (LOQ) was 16 ng/g. The extraction recoveries were 75.2%-88.5%, RSDs were 3.6%-5.9%. **Conclusion** This method could meet the requirements of domestic and international laws and regulations, and could be used in the determination of VB<sub>12</sub> in health food products or for the quality control of the products.

**Key words:** Health foods; vitamin B<sub>12</sub>; liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

维生素 B<sub>12</sub> (vitamin B<sub>12</sub>, VB<sub>12</sub>), 即氰钴胺素 (cyanocobalamine), 是一种重要的生物活性物质, 主

要存在于动物食品中, 人体需要的 VB<sub>12</sub> 的量很少, 使用过量可能引起过敏反应, 严重过量可能造成神经中毒。VB<sub>12</sub> 在食品中含量很低, 为 10<sup>-9</sup> 级, 在强化食品中按标准要求也仅大于或等于 1.2 ng/g<sup>[1]</sup>, 要准确测定相当困难。目前许多保健食品中含有添加的 VB<sub>12</sub>, 为了规范保健食品中 VB<sub>12</sub> 的使用量, 需要建立灵敏度高、特异性强、简便易行的检测 VB<sub>12</sub> 的分析方法。

收稿日期:2011-02-21

作者简介:林宏琳 女 主管技师 研究方向为营养与食品安全

E-mail:erianlin@sina.com

通信作者:黄宏南 男 博士 主任技师 研究方向为营养与食品

安全 E-mail:hnh66666@163.com