

## 固相萃取-气相色谱-质谱联用检测地沟油中胆固醇

周永生<sup>1</sup>, 罗士平<sup>1</sup>, 孔泳<sup>1,2\*</sup>

(1. 常州大学石油化工学院, 江苏常州 213164; 2. 江苏省精细石油化工重点实验室, 江苏常州 213164)

**摘要:** 建立了固相萃取-气相色谱-质谱联用(SPE-GC-MS)检测地沟油样品中胆固醇的分析方法。样品用硅胶固相萃取小柱前处理净化,先用20 mL含0.6%乙醚的正己烷溶液淋洗,再用10 mL含15%乙醚的正己烷溶液洗脱,胆固醇萃取率达97%。净化后的样品用配备电子轰击离子源的气相色谱-质谱联用仪进行测定,以保留时间和特征碎片离子定性,在选择离子监测模式下用外标法定量,选择离子为 $m/z$  213、275、301、368、386,目标离子为 $m/z$  386,参考离子为 $m/z$  213和275。不同加标水平下的加标回收率为91.7%~101%,相对标准偏差(RSD)小于6%,检出限为0.01 mg/L。胆固醇质量浓度在0.24~6.0 mg/L范围内有良好的线性关系(相关系数为0.9996)。该法可精确检测油脂中胆固醇的含量,检测结果可作为判断其中是否掺有地沟油的依据之一。

**关键词:** 固相萃取; 气相色谱-质谱; 胆固醇; 地沟油

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)02-0207-04

## Determination of cholesterol in drainage oil by solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry

ZHOU Yongsheng<sup>1</sup>, LUO Shiping<sup>1</sup>, KONG Yong<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Petrochemical Technology, Changzhou University, Changzhou 213164, China;

2. Key Laboratory of Fine Petrochemicals of Jiangsu Province, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** An effective method was developed for the determination of cholesterol in drainage oil by solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPE-GC-MS). Firstly, the samples were purified by SPE on a column packed with silica. An extraction yield of 97% was obtained when a 20 mL of ethyl ether/*n*-hexane mixture (0.6:99.4, v/v) was used for washing the SPE column, and 10 mL of the same solvent mixture (15:85, v/v) for desorbing cholesterol from the SPE column. Then the final extract was determined by GC-MS with electron impact ion source. The cholesterol was characterized according to retention time and characteristic fragments ( $m/z$  213, 275, 301, 368, 386), and was quantitatively determined by external standard method in selected ion monitoring mode. The fragment of  $m/z$  386 was selected as the target ion, and  $m/z$  213 and  $m/z$  275 were used as the reference ions. The average recovery was from 91.7% to 101%, and the relative standard deviations (RSDs) were below 6%, and the detection limit was 0.01 mg/L. A good linearity was obtained in the cholesterol concentration range of 0.24 - 6.0 mg/L with the correlation coefficient of 0.9996. The proposed method can be used to determine the cholesterol content in oil accurately, and the detection result can be one of the criteria judging the existence of drainage oil in edible oil.

**Key words:** solid phase extraction (SPE); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); cholesterol; drainage oil

地沟油又叫餐厨废弃油脂,因其易被循环回收和反复利用,通常被用来生产工业用油或生物燃料。

但在利益驱使下,也常被不法分子勾兑到食用油中,误食后将伤害人体健康。胆固醇又称胆甾醇,是动

\* 通讯联系人: 孔泳, 博士, 副教授, 主要从事离子色谱及电化学研究。E-mail: yzkongyong@yahoo.com.cn.

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD)。

收稿日期: 2011-12-19

物油脂的特征性甾醇,食用植物油中一般不含或含量极低<sup>[1]</sup>。餐厨废弃油脂中不可避免地混有动物油脂,故其必定含胆固醇。胆固醇具有良好的脂溶性,因此从外观上无法识别食用植物油中是否勾兑了地沟油,但通过检测其中的胆固醇含量可达到识别的目的。

目前国内关于不同食品中胆固醇的测定方法主要有比色法<sup>[2]</sup>、气相色谱法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[11]</sup>、薄层色谱法<sup>[4]</sup>等。上述方法的样品前处理均采用皂化法,但该方法存在试剂用量大、操作步骤繁琐、净化效果不理想以及回收率低等缺陷。采用固相萃取(SPE)技术可弥补上述诸多缺点<sup>[5-8]</sup>,在食品中药物残留、添加剂及有害成分的检测中通常采用该技术对样品进行前处理<sup>[9-13]</sup>。

张蕊等<sup>[14]</sup>在采用气相色谱法对植物油中的胆固醇进行测定时,仅以保留时间对胆固醇进行定性。而王绪卿等<sup>[15]</sup>认为气相色谱-质谱联用(GC-MS)是确证一个化合物的最实用和最有效的方法,有良好的灵敏度和稳定性。采用选择离子模式检测,具有检出限低、回收率高和重现性好等优点,且能对目标化合物进行准确定性,排除基质干扰。因此,GC-MS技术正被越来越多地应用于食品安全检测和环境监测等领域<sup>[16,17]</sup>。

采用SPE技术对地沟油进行净化,在选择离子监测(SIM)模式下采用GC-MS测定胆固醇,与国家标准及同类文献<sup>[1-4]</sup>中胆固醇的检测方法相比,具有操作简单、方法快捷、净化效果优异、定性准确、回收率稳定等优点。在针对地沟油的国家检测标准出台之前,该方法可作为判断食用植物油中是否掺有地沟油的依据之一。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪(GC-MS-QP2010Ultra,日本岛津公司);硅胶固相萃取小柱(SampliQ Silica-Box 500 mg/6 mL, Agilent公司);旋转蒸发器(RE-5210型,上海亚荣生化仪器厂);石英亚沸高纯水蒸馏器(SYZ-550型,金坛文华科教实验仪器厂)。胆固醇标准品(纯度>99.0%,Sigma公司);乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);乙醚、正己烷(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。地沟油(江苏卡特新能源有限公司);菜籽油、大豆油、橄榄油和茶油均购自超市。

### 1.2 标准贮备液及标准样品的配制

精密称取适量胆固醇标准品于25 mL容量瓶

中,用正己烷溶解并定容,配制成质量浓度为12 mg/L的标准贮备液。

精密称取适量胆固醇标准品于500 mL容量瓶中,用市售某品牌食用油溶解并定容,配制成质量浓度为85.8 mg/L的标准油样,用于考察SPE的萃取率。

### 1.3 样品前处理

精密称取5.010 g地沟油试样置于50 mL容量瓶中,用正己烷溶解并稀释至刻度,作为待净化液。硅胶固相萃取小柱依次用5 mL乙腈/水溶液、5 mL正己烷活化;精密移取5 mL待净化液上样,弃去流出液;用20 mL含0.6%乙醚的正己烷溶液淋洗;用10 mL含15%乙醚的正己烷溶液洗脱,收集流出液,于50 °C下旋转蒸发至干,用正己烷定容至1 mL,过0.22 μm滤膜,滤液供GC-MS检测。

### 1.4 气相色谱条件

色谱柱:DB-5MS石英毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent公司);载气:高纯氦气(纯度99.999%);柱流速:0.70 mL/min;不分流进样,进样体积1.0 μL;进样口温度:280 °C;柱温升温程序:100 °C保持1 min,以25 °C/min速率升至200 °C,保持1 min,再以15 °C/min速率升至300 °C,保持10 min。

### 1.5 质谱条件

离子源:电子轰击(EI)源;电子能量:70 eV;离子源温度:280 °C;传输线温度:280 °C;倍增器电压:1 000 V;数据采集模式:SIM;选择离子: $m/z$  213、275、301、368、386;NIST08谱库。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固相萃取条件的选择

胆固醇的化学结构如图1所示。取3支硅胶固相萃取柱,依次用5 mL乙腈/水溶液、5 mL正己烷活化,将1.2节制得的标准样品上柱,用20 mL含0.6%乙醚的正己烷溶液淋洗,弃去流出液,再分别用10 mL体积比为10:90的乙醚/正己烷、乙酸乙酯/正己烷和二氯甲烷/正己烷3种溶剂洗脱,收集流出液后处理方法见1.3节。3种洗脱剂对胆固醇

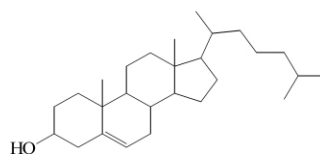


图1 胆固醇的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of cholesterol

的萃取率依次为 85%、83% 和 78%。结果表明,乙醚/正己烷体系的洗脱效果最好,这可能与该体系对胆固醇的选择性有关。

从图 2 可以看出,随着乙醚含量的增加,萃取率也不断增加,当乙醚含量为 15% 时达到最大值 97% 后保持不变。这是由于乙醚的极性远大于正己烷(乙醚 2.9,正己烷 0.00)<sup>[18]</sup>。随着乙醚含量的增加,洗脱剂的极性逐步增强,对胆固醇的洗脱能力也随之增强。目标化合物被完全洗脱后,回收率便保持恒定。但若洗脱剂极性过大,与萃取柱结合能力更强的杂质也被洗脱出来,因此在确保高回收率的前提下,应选择极性较低的洗脱剂。本实验采用含乙醚 15% 的正己烷溶液作为洗脱剂,用量为 10 mL。

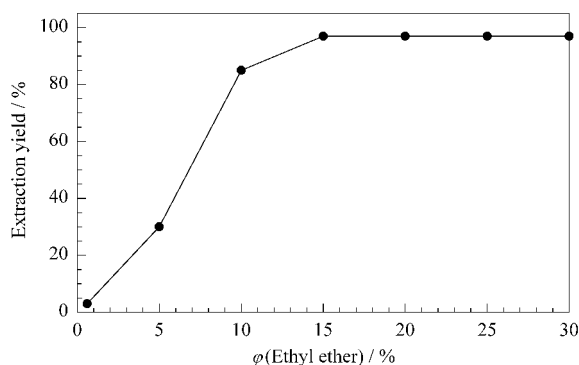


图 2 洗脱剂中乙醚含量对胆固醇萃取率的影响  
Fig. 2 Effect of the ethyl ether content in eluent on extraction yield of cholesterol

SPE column: SampliQ Silica-Box, 500 mg; elution volume: 10 mL; flow rate: 1.0 mL/min.

## 2.2 GC-MS 条件的优化

为了考察色谱条件对样品的分离效果,首先在全扫描模式下对未净化的地沟油样品进行检测。图 3 中曲线 a 和 b 分别为地沟油试样和胆固醇标准品的 GC-MS 总离子流图,与标准品比对,并结合计算机 NIST08 检索后确定,曲线 a 中保留时间为 14.3 min 的峰对应为胆固醇。由图 3 可以看出,胆固醇与地沟油中其他组分的分离良好。

从图 4 可以看到  $m/z$  43、55、81、95、107 和 145 的碎片峰的相对丰度较强,其中  $m/z$  43 为基峰。由于胆固醇分子上有烷基侧链,经一级或二级分裂后形成  $C_nH_{2n+1}^+$  离子,这些离子多数具有稳定的支化的碳鎓离子结构,所以相对丰度较强<sup>[19]</sup>。但质荷比低的碎片离子作为选择离子的特异性不强。质谱作为一种确证方法,至少应检测 3 个以上的特征离子<sup>[20]</sup>,而  $m/z$  213、275 和 386 的相对丰度和质荷比均适中,可作为选择离子进行定量分析; $m/z$  386 作为目标离子, $m/z$  213 和 275 作为参考离子。

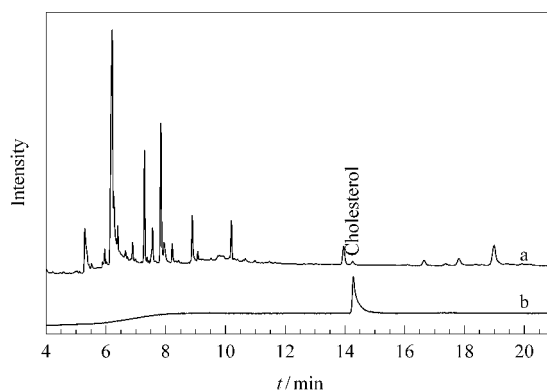


图 3 (a)地沟油试样及(b)胆固醇标准品的总离子流图  
Fig. 3 Total ion current chromatograms of (a) drainage oil and (b) cholesterol standard

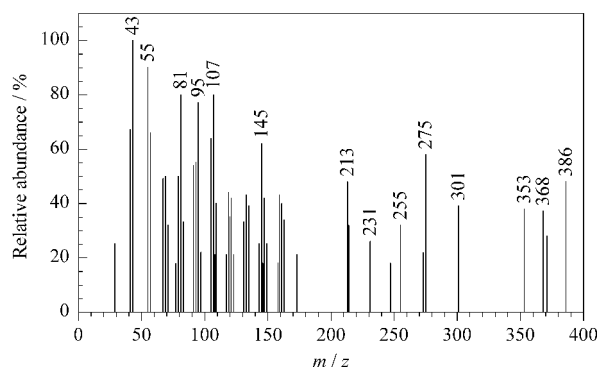


图 4 胆固醇标准溶液(2.4 mg/L)的质谱图  
Fig. 4 Mass spectrum of cholesterol standard solution (2.4 mg/L)

## 2.3 线性关系与检出限

分别准确移取 1.2 节中的标准贮备液 1.5、10、20 和 25 mL 置于 50 mL 容量瓶中,用正己烷定容,得到 0.24、1.2、2.4、4.8 和 6.0 mg/L 的系列标准溶液。以标准液的质量浓度  $X$  (mg/L) 对应峰面积  $Y$  进行线性回归分析,得到线性回归方程为  $Y = 9\,121.911X - 1\,977.970$ ,相关系数为 0.999 6。结果表明,胆固醇在 0.24 ~ 6.0 mg/L 范围内呈良好的线性关系。以信噪比( $S/N$ )为 3 计检出限(LOD),为 0.01 mg/L。

## 2.4 方法的回收率与精密度

对不同加标量的胆固醇回收率进行考察。分别移取 1 mL 某品牌食用植物油置于 5 只 100 mL 容量瓶中,再分别加入 1.2 节中的胆固醇标准贮备液 1、2、10、15 和 25 mL,用正己烷定容至刻度,依次标记为 1#、2#、3#、4# 和 5# 样品。按 1.3 节方法处理后测定,每个样品测定 10 次。计算回收率和相对标准偏差(RSD)结果见表 1。取 5# 样品,日内连续进样 10 次,进样体积 1.0  $\mu$ L,保留时间的 RSD 为 0.4%,峰面积的 RSD 为 3.1%;日间每隔一天进样,连续分

析 6 次,保留时间的 RSD 为 0.7%,峰面积的 RSD 为 5.0%。

表 1 食用植物油中胆固醇的加标回收率和相对标准偏差 (n=10)  
Table 1 Recovery and relative standard deviation (RSD) of cholesterol spiked in an edible vegetable oil sample (n=10)

Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
0.12	0.11	91.7	3.1
0.24	0.23	95.8	4.9
1.20	1.17	97.5	5.3
1.80	1.76	97.8	6.0
3.00	3.02	101	2.7

### 2.5 样品分析

用建立的方法对菜籽油、大豆油、橄榄油、茶油和地沟油 5 种油样进行检测,前 4 种油样均未检出胆固醇,而地沟油试样含胆固醇 61.03 mg/kg。

### 3 结论

建立了固相萃取-气相色谱-质谱联用检测地沟油样品中胆固醇含量的方法。采用该方法测得地沟油试样中的胆固醇含量为 61.03 mg/kg,而菜籽油、大豆油、橄榄油和茶油中均未检出。本方法可以精确检测油脂中胆固醇含量,检测结果可作为判断其中是否掺有地沟油的依据之一。

#### 参考文献:

[1] Guo T, Du L L, Wan H, et al. Food Science (郭涛, 杜蕾蕾, 万辉, 等. 食品科学), 2009, 30(22): 286  
 [2] Huang H X, Zhang X B, Zhang S H. Hubei Agricultural Sciences (黄红霞, 张晓斌, 张声华. 湖北农业科学), 2009, 48(2): 455  
 [3] Xu Z H, Wang J Y, Li S F. Food Science (徐志红, 王金宇, 李淑芬. 食品科学), 2007, 28(6): 269  
 [4] Zhu Q Y, Qiu A Y, Tang Z Y, et al. China Oil (朱庆英, 裘爱泳, 汤志勇, 等. 中国油脂), 2002, 27(4): 72

[5] Mohammad S, Hamideh Y. J Hazard Mater, 2009, 167: 1152  
 [6] Hayati F, Duygu A, Resat A, et al. Sens Actuators B, 2009, 141(2): 491  
 [7] Damirchi S A, Dutta P C. J Chromatogr A, 2006, 1108(2): 183  
 [8] Gouri S, Yogesh K T, Rajinder K G. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1300  
 [9] Yan H Y, Yang G L. Chinese Journal of Chromatography (闫宏远, 杨更亮. 色谱), 2011, 29(7): 572  
 [10] Shi J W, Li J G, Wang Y F, et al. Chinese Journal of Chromatography (施家威, 李继革, 王玉飞, 等. 色谱), 2010, 28(12): 1137  
 [11] Liu M, Li X L, Bie W, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘敏, 李小林, 别玮, 等. 色谱), 2011, 29(2): 162  
 [12] Zhu X L, Ye F, Yang J, et al. Chinese Journal of Chromatography (朱晓玲, 叶飞, 杨洁, 等. 色谱), 2010, 28(10): 945  
 [13] Li G Q, Ma G H. Chinese Journal of Chromatography (李广庆, 马国辉. 色谱), 2011, 29(7): 606  
 [14] Zhang R, Zu L Y, Fan T. China Oil (张蕊, 祖丽亚, 樊铁. 中国油脂), 2006, 31(5): 65  
 [15] Wang X Q, Wu Y N. Application of Chromatography in Food Security Analysis. Beijing: Chemical Industry Press (王绪卿, 吴永宁. 色谱在食品安全分析中的应用. 北京: 化学工业出版社), 2005  
 [16] Han W, Yu Y J, Li N T, et al. Chinese Journal of Chromatography (韩伟, 于艳军, 李宁涛, 等. 色谱), 2011, 29(5): 417  
 [17] Wang X X, Liu Q Y, Liu Y J, et al. Chinese Journal of Chromatography (王欣欣, 刘庆阳, 刘艳菊, 等. 色谱), 2010, 28(9): 849  
 [18] Chen X H, Wang Q J. Solid Phase Extraction Technology and Its Application. Beijing: Science Press (陈小华, 汪群杰. 固相萃取技术与应用. 北京: 科学出版社), 2009  
 [19] McLafferty F W. Interpretation of Mass Spectra. 3rd ed. Wang G H, Jiang L F, Wang C H, transl. Beijing: Chemical Industry Press (McLafferty F W. 质谱解析. 3 版. 王光辉, 姜龙飞, 汪聪慧, 译. 北京: 化学工业出版社), 1987: 89  
 [20] Makovi C M. Pesticide Analytical Manual. 2nd ed. Washington DC: Food and Drug Administration, 1994