

气相色谱-串联质谱法测定动植物油中胆固醇的含量

陈彩云, 魏鲜娥*, 张喜金, 黎小兰, 潘拾朝

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立气相色谱-串联质谱法测定动植物油中胆固醇含量的分析方法。**方法** 样品经异辛烷超声提取, 经 HP-5ms 柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)分离, 采用气相色谱质谱联用仪检测, 外标法定量。**结果** 样品在胆固醇浓度 0.06061~0.6061 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 加标回收率为 90.0%~110.0%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.7%。**结论** 本方法具有快速、操作简便、环保, 并具有高效分离、高灵敏度、高精密度等的优点, 满足了现代分析方法的要求, 能够适用于动植物油中胆固醇含量的测定。

关键词: 胆固醇; 动植物油; 气相色谱-串联质谱法; 含量

Determination of cholesterol in animal and vegetable oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Cai-Yun, WEI Xian-E*, ZHANG Xi-Jin, LI Xiao-Lan, PAN Shi-Chao

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of cholesterol in animal and vegetable oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS). **Methods** The samples were extracted by ultrasound with isooctane, separated by HP-5ms column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), detected by GC-MS, and quantified by external standard method. **Results** The samples had good linear relationship between cholesterol concentration from 0.0606061 to 0.6061 mg/mL. The average recoveries were 90.0%-110.0%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.7%. **Conclusion** This method has the advantages of rapid, simple operation, environmental protection, high efficiency separation, high sensitivity, high precision, etc., meets the requirements of modern analytical methods, and can be applied to the determination of cholesterol content in animal and vegetable oil.

KEY WORDS: cholesterol; animal and vegetable oils; gas chromatography-tandem mass spectrometry; content

1 引言

胆固醇又称胆甾醇, 是一种环戊烷多氢菲的衍生物。胆固醇广泛存在于动物体内, 以脑及神经组织中最为丰富, 在肾、脾、皮肤、肝和胆汁中含量也高。其溶解性与脂肪类似, 不溶于水, 易溶于乙醚、氯仿等溶剂。胆固醇是动物组织细胞不可缺少的重要物质, 它不仅参与形成细胞膜,

而且是合成胆汁酸、维生素 D 以及甾体激素的原料。胆固醇经代谢能转化为胆汁酸、类固醇激素、7-脱氢胆固醇, 并且 7-脱氢胆固醇经紫外线照射会转变为维生素 D₃。胆固醇主要来自人体自身的合成, 食物中的胆固醇是次要补充。专家建议每天摄入 50~300 mg 胆固醇为佳。过分忌食含胆固醇的食物, 易造成贫血, 降低人体的抵抗力; 但长期大量摄入胆固醇, 不利于身体健康, 会使血清中的胆固醇含

*通讯作者: 魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 176019964@qq.com

*Corresponding author: WEI Xian-E, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 176019964@qq.com

量升高,增加患心血管疾病的风险。所以,科学的饮食方法提倡适量摄入胆固醇。

动物性食物(鱼、肉、蛋、奶等)普遍含有胆固醇,植物性食物则普遍不含胆固醇。日常食物如猪脑、动物内脏、蛋黄、鱿鱼、贝壳类、奶油、黄油、羊油、猪油、牛油等含有较多胆固醇。动物油脂中的饱和脂肪酸可以促进肝脏合成更多的胆固醇。虽然,饮食中胆固醇摄入并不是血液中胆固醇的主要来源,但控制饮食中胆固醇的摄入(避免摄入过多胆固醇)仍然是防治血脂异常、高血压、冠心病、动脉粥样硬化等疾病的重要措施。因此,检测食品,尤其是动物油脂等高胆固醇含量食品中胆固醇的含量是必不可少的。

目前,胆固醇的定量分析方法主要有气相色谱法^[1-3]、比色法^[4]和高效液相色谱法^[5-10]。传统的比色法由于操作繁杂,特别是样品的前处理和样品中脂肪的提取,且所需试剂多,造成了比色结果的偏差和计算结果的复杂化,且成本高,从而限制了该方法的广泛使用。气相色谱法和高效液相色谱法^[11-15]需使用多种有机试剂对样品进行皂化、提取、浓缩再进行测定,操作复杂,检测时间较长,同时由于样品中杂质较多,导致分离效果差,检测结果的准确率难以保证,同时该前处理使用多种有机试剂,有害人体健康^[16]。因此,需要一种可快速、准确检测动植物油中胆固醇含量的方法。本研究利用气相色谱-质谱联用仪替代气相色谱仪对胆固醇进行检测,前处理利用超声提取替代皂化提取,对基质复杂的动植物油进行含量测定,以期提高检测效率,保证检测结果的准确性,同时保障人员的身体健康。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

7890A 气相色谱仪、5975C 质谱仪(美国安捷伦公司); XP205 分析天平(梅特勒-托利多中国有限公司); 异辛烷(分析纯,广州化学试剂厂); 胆固醇(批号: 00219, 纯度: 95.0%, 美国 DR 公司)。

2.2 仪器参数

进样口: 240~260 °C; 进样量: 1 μL; 分流比: 20:1。色谱柱: 流速 1.5~2.0 mL/min; HP-5ms (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)。柱箱: 柱温 260~280 °C, 保持 13 min。载气: 氦气(99.999%); 接口温度: 280~300 °C; 电离模式: EI, 电离电压: 70 eV; 选择离子: 386(定量), 275, 105; 电子倍增器电压: 自动调谐值增加 150~200 V。

2.3 标准溶液的制备

2.3.1 对照储备液的配制

精密称取胆固醇对照品 20 mg, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入异辛烷溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 2 mg/mL 的对照品储备液。

2.3.2 标准工作曲线绘制

分别精密移取胆固醇储备液 200、500、1000、1500、2000 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 即得工作标准液。

2.4 样品前处理

精密称取样品 0.20~0.40 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 加异辛烷溶解并定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的水相滤膜过滤, 即得供试液。

2.5 皂化提取气相色谱测定方法

精密称取样品 0.30 g, 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 无水乙醇, 10 mL 60%氢氧化钾溶液, 摇匀。将试样在 100 °C 磁力搅拌加热电热套皂化回流 1 h, 不时振荡防止事业黏附在瓶壁上, 皂化结束后, 用 5 mL 无水乙醇自冷凝管顶端冲洗其内部, 取下圆底烧瓶, 用流水冷却至室温。定量转移全部皂化液于 250 mL 分液漏斗中, 用 30 mL 水分 2~3 次冲洗圆底烧瓶, 洗液并入分液漏斗, 再用 40 mL 石油醚-无水乙醚混合液(1:1, V:V)分 2~3 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗, 振摇 2 min, 静置, 分层, 转移水相, 合并 3 次有机相, 用水每次 100 mL 洗涤提取液至中性, 初次水洗时轻轻旋摇, 防止乳化, 提取液通过约 10 g 无水硫酸钠脱水转移到 150 mL 平底烧瓶中。将上述平底烧瓶中的提取液在真空条件下蒸发至近干, 用无水乙醇溶解并定容至 5 mL, 用气相色谱仪进行测定。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的确定

按试样制备方法处理空白溶液, 按其色谱条件测定空白溶液, 与胆固醇对照品溶液的出峰时间对比, 空白溶液在胆固醇的出峰时间处均无吸收峰, 表明空白对测定结果基本无干扰, 见图 1、图 2。

3.2 线性实验

线性实验结果如表 1 所示, 相关系数 r^2 为 0.999, 在浓度为 0.06061~0.6061 mg/mL 之间呈现良好的线性关系。

3.3 定量限和检出限

分析方法的检出限(limit of detection, LOD)定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析物浓度, 定量限(limit of quantitation, LOQ)定义为 $S/N=10$ 时对应的分析物浓度。当信噪比(S/N)为 3 时, 胆固醇检出限为 0.12 μg/mL, 得到方法的胆固醇检出限为 0.004 mg/g。当 $S/N=10$ 时, 方法的定量限为 0.43 μg/mL, 得到方法的胆固醇定量限为 0.014 mg/g。

3.4 稳定性实验

取胆固醇标准品溶液分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样, 其峰面积的 RSD 为 0.60%, 说明胆固醇标准溶液在 10 h 内较稳定, 结果见表 2。

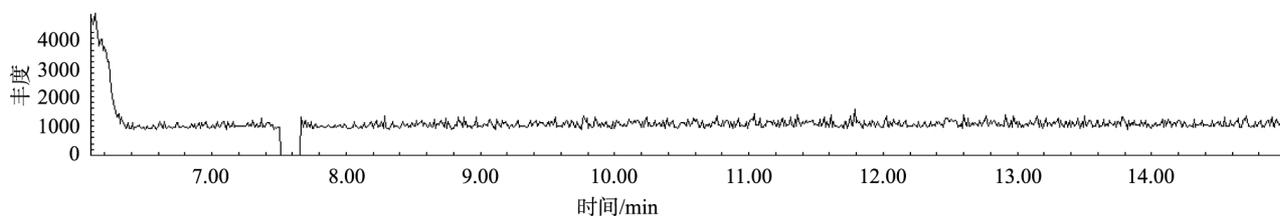


图 1 空白溶液的色谱图

Fig.1 Chromatogram map of blank solution

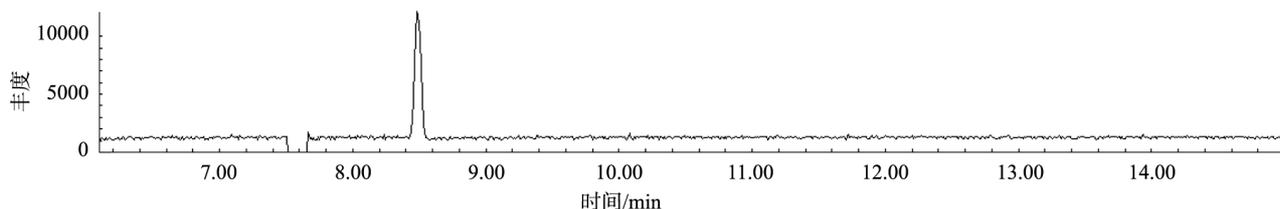


图 2 样品的色谱图

Fig.2 Chromatogram map of the sample

表 1 线性实验结果
Table 1 Linear experimental results

序号	浓度/(mg/mL)	胆固醇峰面积
STD1	0.060610	3175
STD2	0.151525	8798
STD3	0.303050	18877
STD4	0.454575	29861
STD5	0.606100	40994
线性方程	$Y=68965X-1326$	
相关系数(r^2)	0.999	

3.5 精密度实验

精密称取样品 6 份, 按 2.3.2 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 RSD。6 个样品的 RSD 为 1.40%, 具有良好的精密度, 结果见表 3。

3.6 加标回收率实验

精密称取 0.3 g 样品 9 份, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入胆固醇标

准品(0.39805 mg/mL)4.0、5.0、6.0 mL, 加入适量异辛烷溶解定容, 取上清液经 0.45 μ m 的滤膜过滤, 作为加标样品溶液, 按色谱条件进行检测, 结果见表 4。在不同添加水平下, 动植物油中胆固醇方法的回收率范围为 90.0%~110.0%, 平均回收率为 99.2%, 相对标准偏差为 0.7%。

3.7 本方法测定结果与皂化提取 GC 测定方法测定结果比较

取 3 批样品, 采用本方法与皂化提取 GC 测定法结果进行比较, 结果见表 5。从表 5 中可以看出, 2 种方法的检测结果基本一致。对比样品的前处理, 皂化提取操作复杂, 耗时长, 且具有一定的危险性, 有害人体健康, 且动植物油的杂质更多, 使用气质联用仪能更好地识别杂质峰, 使检测结果更加准确。

表 2 稳定性的实验结果
Table 2 Experimental results of stability

时间/h	0	2	4	6	8	10	RSD/%
胆固醇峰面积	65300	66139	66152	66111	66351	66151	0.6

表 3 精密度实验结果
Table 3 Experimental results of precision

序号	称样量/g	浓度/(mg/mL)	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	0.26312	0.1500	5.700	5.70	1.40
2	0.30312	0.1686	5.562		
3	0.30312	0.1733	5.717		
4	0.33312	0.1893	5.682		
5	0.32333	0.1871	5.786		
6	0.32512	0.1870	5.751		

表 4 加标回收率实验结果
Table 4 Experimental results standard addition recoveries

序号	样品称样量/g	测得加标量/(mg/100 g)	加标量/(mg/100 g)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.32161	1.5922	1.78704	99.15		
2	0.33111	1.5922	1.78704	98.96	99.2	0.4
3	0.32555	1.5922	1.78704	99.57		
4	0.29322	1.99025	2.2338	99.81		
5	0.31021	1.99025	2.2338	98.06	99.3	1.1
6	0.30021	1.99025	2.2338	99.92		
7	0.27112	2.3883	2.68056	98.75		
8	0.26852	2.3883	2.68056	98.74	99.1	0.7
9	0.26225	2.3883	2.68056	99.78		

表 5 不同方法的对比
Table 5 Comparison of different methods

样品批号	皂化提取 GC 测定结果/%	超声提取 GC-MS 测定结果/%	RSD/%
A	5.632	5.719	
B	5.721	5.697	0.7
C	5.669	5.732	

4 总 结

为了选择样品的最佳提取方式,对比了皂化提取与超声提取的方法,本研究改变了传统模式的皂化提取方式,改为直接超声溶解的方式,结果表明,超声提取效果更好,大大提高了人员操作的安全性及提高检测结果的准确性。使用气相色谱-质谱联用法检测具有高效分离、高灵敏度、高精密度等的优点,满足了现代分析方法的要求。同时气相色谱-质谱联用法主要用于多种组分组成的混合物分离及检测,在混合物分离分析方面具有十分重要的地位,对于动植物油中胆固醇含量的检测是可行的。气相色谱-质谱联用法在分析检测和研究中起着越来越重要的作用。

参考文献

- 董晓尉. 气相色谱-质谱法检测食品中胆固醇含量的研究[J]. 中国食品安全, 2016, 21(52): 69.
Dong XW. Determination of cholesterol in food by gas chromatography-mass spectrometry [J]. China Food Saf, 2016, 21(52): 69.
- 沈雅萍, 王凤玲, 关文强, 等. 气质联用法测定反复冻融畜禽肉中胆固醇及其氧化物含量[J]. 食品工业科技, 2019, 9: 78-90.
Shen YP, Wang FL, Guan WQ, et al. Effects of repeated freezing and thawing of livestock and poultry on cholesterol and its oxide contents [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 9: 78-90.
- 钱焯, 张雅玮, 王震, 等. 气相色谱-质谱法测定酱猪蹄和酱猪肘中 5 种胆固醇氧化物[J]. 色谱, 2019, 37(5): 539-546.
Qian Y, Zhang YW, Wang Z, et al. Determination of five cholesterol oxidation products in marinated pig feet and hocks by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(5): 539-546.
- 刘迪, 尚华. 基于铜钠米团簇的纳米探针比色法检测牛奶中胆固醇含量[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 143-147.
Liu D, Shang H. Detection of cholesterol in milk by nanoprobe colorimetry based on copper-sodium rice cluster [J]. Food Sci, 2014, 35(12): 143-147.
- 王庆国, 肖潇, 李菁, 等. 高效液相色谱法测定不同乳制品中胆固醇的含量[J]. 疾病预防控制通报, 2018, 33(5): 81-83.
Wang QG, Xiao X, Li J, et al. Determination of cholesterol content in various dairy products with high performance liquid chromatography [J]. Bull Dis Control Prev, 2018, 33(5): 81-83.
- 李丽萍, 赵榕, 赵海燕. 超高效液相色谱法测定食品中胆固醇的方法改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(17): 2893-2895.
Li LP, Zhao R, Zhao HY. Improvement of ultra high performance liquid chromatography for the determination of cholesterol in food [J]. Chin J Health Inspect, 2015, 25(17): 2893-2895.
- 葛军营, 宋从从, 郑颖. 胆固醇含量测定方法的研究进展[J]. 煤炭与化工, 2016, 39(9): 144-145.
Ge JY, Song CC, Zheng Y. Research progress of determination methods of cholesterol [J]. Coal Chem Ind, 2016, 39(9): 144-145.
- 郝鹏彬, 李响明, 王文鹏, 等. RP-HPLC 测定猪胆汁中胆固醇的含量[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(23): 39-41.
Hao PB, Li XM, Wang WP, et al. Determination of cholesterol in pig bile by RP-HPLC [J]. Asia Pacific Tradit Med, 2017, 13(23): 39-41.
- 张琪, 张昊, 关宏, 等. HPLC 法测定双歧杆菌培养液中胆固醇含量及评价[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(5): 705-706.
Zhang Q, Zhang H, Guan H, et al. Determination of the concentration of cholesterol in bifidobacterium culture medium by using HPLC and evaluation [J]. J Qiqihar Univ Med, 2015, 36(5): 705-706.
- 马春娟, 单柏宇, 路芳, 等. HPLC 法测定蚂蚁中胆固醇的含量[J]. 长春师范大学学报. 2018, 37(8): 73-76.
Ma CJ, Shan BY, Lu F, et al. Determination of cholesterol in ants by HPLC [J]. J Changchun Norm Univ, 2018, 37(8): 73-76.
- 王小妹, 刘春芳, 杨阳. HPLC 法测定蛋黄油中胆固醇含量[J]. 今日药, 2015, 25(5): 328-337.

Wang XM, Liu CF, Yang Y. Determination of cholesterol in egg yolk oil by HPLC [J]. Pharm Today, 2015, 25(5): 328-337.

[12] GB/T 22220-2008 食品中胆固醇的测定-高效液相色谱法[S].
GB/T 22220-2008 Determination of cholesterol in food-High performance liquid chromatography [S].

[13] 吴立平, 曾辉, 孙咏梅, 等. 凝胶净化结合高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定食用油脂中胆固醇含量[J]. 中国油脂, 2018, 43(6): 9871-9873.
Wu LP, Zeng H, Sun YM, et al. Determination of cholesterol content in edible oils and fats by gel permeation chromatography combined with high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector [J]. China Oils Fats, 2018, 43(6): 9871-9873.

[14] 王潇, 穆迎春, 朱俊向. 超高效液相色谱法测定中华绒螯蟹的胆固醇含量[J]. 分析仪器, 2019, 1: 125-128.
Wang X, Mu YC, Zhu JX. Determination of cholesterol in eriocheir sinensis by ultra performance liquid chromatography [J]. Anal Instrum, 2019, 1: 125-128.

[15] 刘佳娣, 许书军, 徐春祥, 等. 双波长分光光度法测定废弃油脂中胆固醇的含量[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9871-9873.
Liu JD, Xu SJ, Xu CX, et al. Determination of cholesterol content in waste fat by dual-wavelength spectrophotometry [J]. J Anhui Agric Sci, 2012,

40(18): 9871-9873.
[16] GB 5009. 128-2016 食品安全国家标准 食品中胆固醇的测定[S].
GB 5009. 128-2016 National food safety standard-Determination of cholesterol in foods [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



陈彩云, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 504990659@qq.com

魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 176019964@qq.com



“生物毒素研究”专题征稿函

随着社会经济的发展, 人民越来越关注食品的安全问题。在日常生活中, 食物中毒事件时有发生。在食品安全事件中, 生物毒素中毒事件占一定比例。生物毒素是生物体内所产生的有毒代谢产物, 包括微生物毒素、植物毒素、动物毒素和海洋毒素。生物毒素不仅对消费者的健康造成危害, 还会对养殖业、种植业、畜牧水产业等行业造成巨大的经济损失。因此, 关注食品中生物毒素的安全, 是一项具有重大经济意义和科学意义的事情。

鉴于此, 本刊特别策划“生物毒素研究”专题。专题将围绕生物毒素的产生与调控机制、生物毒素的快速检测与筛查技术、生物毒素的脱毒方法与机制、生物毒素的毒理研究与风险评估、生物毒素的标准物质研发、生物毒素型药物的开发研究等问题展开讨论, 计划在 2021 年 1~2 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2020 年 12 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**生物毒素研究**):

网站: www.chinafoodj.com(备注投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **生物毒素研究**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **生物毒素研究**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部