

## 实验技术与方法

## HPLC 和 LC-IT-TOF 测定“地沟油”中 DBS 方法的建立

殷果<sup>1</sup>, 鲁艺<sup>1</sup>, 谢普<sup>1,2</sup>, 李媛<sup>1,2</sup>, 王铁杰<sup>1</sup>

(1. 深圳市药品检验所, 广东 深圳 518057; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 100016)

**摘要:**目的 建立“地沟油”中十二烷基苯磺酸钠(DBS)的测定和验证。方法 样品经 50% 乙醇提取, 经固相萃取柱纯化, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定其中的 DBS 含量, 色谱柱为 Nucleodur C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm), 流动相为甲醇: 乙酸铵(10 mmol/L) = 80: 20, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 244 nm。并采用 LC-IT-TOF 进行验证, 质谱离子化模式 ESI<sup>-</sup>, 雾化气流速 1.5 L/min, 检测器电压 1.68 kV。结果 在 4.030 ~ 503.3 μg/ml 浓度范围内, DBS 可被准确测定, 回收率为 77% ~ 87%, 精密性 RSD% 均 < 2.0%。7 批“地沟油”样品和 23 批非“地沟油”样品验证结果与测定结果相同。结论 本研究建立的测定和验证方法均符合要求, 可应用于“地沟油”中 DBS 的测定和测定结果验证。

**关键词:** 地沟油; 十二烷基苯磺酸钠; 高效液相色谱法; LC-IT-TOF; 食品安全

**中图分类号:** 0657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2013)01-0037-04

## Development of HPLC determination and LC-IT-TOF verification of DBS in gutter oil

Yin Guo, Lu Yi, Xie Pu, Li Yuan, Wang Tiejie

(Shenzhen Institute For Drug Control, Guangdong Shenzhen 518057, China)

**Abstract: Objective** To develop a determination and verification method for DBS in gutter oil and its application. **Methods** After extracted by 50% ethanol and purified by SPE column, the DBS in gutter oil was detected by HPLC, separated by a Nucleodur C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) with mobile phase consisting of methanol (containing 20% 10mmol/L ammonium acetate). Verification was operated by LC-IT-TOF mass spectroscopy in ESI-ionization model, nebulizing gas was 1.5 ml/min and detector voltage was 1.68 kV. **Results** Quantity of DBS in gutter oil was accurately determined in the range of 4.030 – 503.3 μg/ml, the recoveries were 77% – 87% and RSD% of precision was less than 2%. All 7 batches of gutter oils and 23 batches of edible oils matched the results of verification. **Conclusion** The method was suitable for the detection of DBS in gutter oil.

**Key words:** Gutter oil; DBS; HPLC; LC-IT-TOF; food safety

“地沟油”根据来源大致分三类:从宾馆、酒楼的地沟隔油池中捞取的油腻漂浮物;直接将泔水收集;对上层浮油进行提炼和煎炸老油。徐中海等<sup>[1]</sup>对某市的泔水油进行调查,对样品的水分含量、酸价、过氧化值和羰基价 4 项理化指标进行了测定,用测定结果差异是否有统计学意义来判断泔水油和非泔水油,该方法仅检测了餐饮废油中的部分指标,未对“地沟油”的特征性成分进行寻找。全常春等<sup>[2]</sup>采用气质联用的静态顶空方法,发现了精炼“地沟油”中的 16 种挥发性有害成分,检测结果绝大部分为饱和脂肪烃,从 C<sub>9</sub>-C<sub>14</sub> 占大多数,但这部

分有可能是正常食用油氧化变质的二级产物,也有可能是食用油中非法渗入的矿物油。由于“地沟油”中挥发性成分过于复杂,且各成分并不能稳定存在,因此,该方法未能较好地地区分食用油和“地沟油”。尹平河、潘剑宇等<sup>[3-4]</sup>利用薄层色谱法鉴别泔水油,虽薄层色谱简单快速,但方法的特异性和灵敏度均不高。刘薇等<sup>[5]</sup>利用荧光法测定泔水油中含有的洗洁精主要成分十二烷基苯磺酸钠可以鉴别花生油是否掺兑了泔水油,并能进行定量检测。Vlachos 等<sup>[6]</sup>利用傅立叶转换红外光谱仪检测橄榄油掺伪低价植物油, Ewa Sikorska 等<sup>[7]</sup>用荧光光谱同步扫描法区分食用油,但傅立叶转换红外光谱法和荧光光谱法均只能区分食用油的低劣和品质,并不能准确地检测“地沟油”中的真实成分。本研究建立了“地沟油”中十二烷基苯磺酸钠(DBS)定量测定和测定结果验证的方法。

收稿日期:2012-07-11

作者简介:殷果 女 副主任药师 研究方向为药品质量标准研究

E-mail: ayinguo@126.com

通信作者:王铁杰 女 教授 博士 研究方向为药物分析

E-mail: wangtj88@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

仪器: Agilent 1100 系列高效液相色谱仪、Chemstation 色谱工作站(均为美国安捷伦公司)、LC-IT-TOF 质谱仪、LC-MS Solution 色谱工作站(均为日本岛津公司)、XS105D 电子天平、N-1100 旋转蒸发仪、TGL-16C 高速离心机、XW-80A 涡旋混合仪。试剂: 甲醇(色谱纯)、乙酸铵、乙酸(分析纯)、DBS(含量 > 95%)、C18 固相萃取柱(100 mg/ml)。

### 1.2 溶液的制备

①供试品溶液的制备: 取样品 10.0 ml, 加入 50% 乙醇 20 ml, 80 °C 水浴加热 20 min, 涡旋混合 5 min, 自“80 °C 水浴加热 20 min”重复 2 次, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去油层, 旋转蒸发至干, 加甲醇: 水(2% 乙酸) = 1: 1, 3 ml 复溶, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入到已活化的固相萃取柱(依次用甲醇 3 ml 和水 3 ml 活化), 用正己烷 3 ml 淋洗, 弃去淋洗液, 用甲醇: 乙酸铵(10 mmol/L) = 80: 20 溶液 3 ml 洗脱, 洗脱液用 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液 10 μl 进样分析。②DBS 对照品溶液的制备: 取 DBS 适量, 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 使 DBS 浓度为 1.0 mg/ml, 即得。③10 mmol/L 乙酸铵溶液制备: 称取乙酸铵 0.385 5 g, 加水 500 ml 溶解, 摇匀, 即得。

### 1.3 检测条件

①液相检测条件: 色谱柱 Nucleodur C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm × 5 μm); 流动相甲醇: 乙酸铵(10 mmol/L) = 80: 20; 流速 1.0 ml/min; 柱温 40 °C; 检测波长 244 nm。②质谱检测条件: 色谱柱 岛津 UFLC Shim-pack XR-ODS (2.0 mm × 50 mm × 2.2 μm); 流动相甲醇: 乙酸铵(10 mmol/L) = 80: 20; 流速 0.2 ml/min; 柱温 40 °C。③离子化模式 ESI<sup>-</sup>; 雾化气流速 1.5 L/min; 检测器电压 1.68 kV; CDL 温度 200 °C; 加热模块温度 200 °C。

## 2 结果

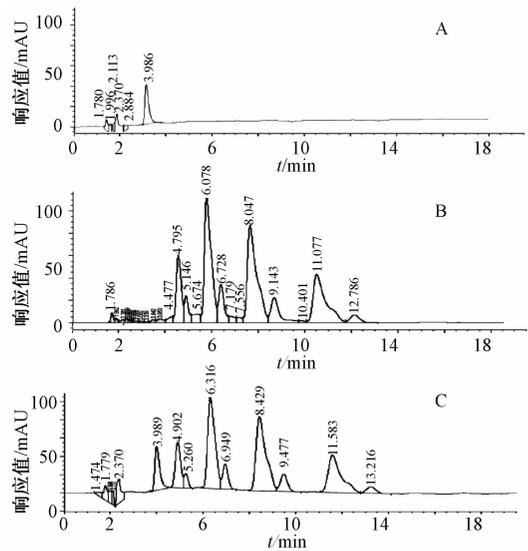
### 2.1 “地沟油”中 DBS 定量分析方法的建立

#### 2.1.1 方法特异性

以食用油(精炼一级大豆油)为空白, 加入 DBS, 作为模拟阳性样品, 按照“1.2 溶液的制备”及“1.3 检测条件”操作。结果模拟阳性样品与 DBS 对照品特征峰的保留时间一致, 空白对测定无干扰, 表明该方法专属性良好。结果见图 1。

#### 2.1.2 线性范围

分别取 DBS 标准储备液适量, 加 50% 乙醇稀释, 分别制得含 DBS 4、10、20、50、100、500 μg/ml 的



A: 空白样品色谱图; B: DBS 对照品色谱图;

C: 模拟阳性样品色谱图

图 1 方法专属性图谱

Figure 1 Chromatography of method specification

标准系列溶液。按“1.2 溶液的制备”项操作, 记录色谱图, 以 DBS 浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。计算的回归方程:  $Y = 18.894X - 44.004$ ,  $r = 0.9998$ 。结果表明, DBS 在 4.030 ~ 503.3 μg/ml 范围内线性良好。测得最低检测限 LOD 为 2.080 μg/ml,  $RSD < 5.0\%$ 。

#### 2.1.3 精密度、重复性试验

日内精密度: 取浓度为 50 μg/ml 的 DBS 标准系列溶液 10 μl, 在按“1.2 溶液的制备”及“1.3”的操作图 1 色谱条件下, 重复进样 6 次, 连续 3 d, 记录色谱峰面积, 计算得日内精密度  $RSD < 2.0\%$ 。日间精密度  $RSD$  均  $< 2.0\%$ , 精密度符合要求。取已知浓度样品(F5) 6 份, 分别按“2.1.1”项操作, 按照上述色谱条件测定, 记录色谱图, 峰面积  $RSD < 2.0\%$ , 表明重复性符合要求。

#### 2.1.4 回收率试验

取 DBS 约 5.0 mg, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 制得 DBS 高浓度对照储备液。取已知浓度样品(F5) 9 份, 5.0 ml/份, 分为高、中、低 3 组, 3 份/组。高、中、低组分别依次加入 DBS 高浓度对照储备液 1.2、1.0、0.8 ml, 涡旋混合 3 min, 按“1.2”供试品溶液的制备项操作, 按“1.3”项色谱条件测定, 计算高浓度回收率。取 DBS 高浓度对照储备液 1.0 ml, 置 25 ml 量瓶中加 50% 乙醇稀释至刻度, 制得 DBS 低浓度对照储备液。同法测得低浓度回收率。结果表明, 回收率在 77% ~ 87%, 结果见表 1。

#### 2.1.5 稳定性试验

取已知浓度样品(F5)溶液,于室温下放置,分别在0、2、4、8、16、24 h在上述色谱条件下分析,峰面积  $RSD < 0.82\%$ 。结果表明,样品在24 h内稳定。

表1 回收率试验结果  
Table 1 Result of recoveries

	加入量 (%)	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均值 (%)
低浓度回收率	80	7.4	6.9	89	87
		7.4	6.5	88	
		7.4	6.3	85	
	100	9.3	7.5	81	
		9.3	7.3	78	
		9.3	7.1	76	
120	11.2	9.0	80		
	11.2	8.4	75		
	11.2	8.7	78		
高浓度回收率	80	185.6	150.4	81	79
		185.6	143.0	77	
		185.6	145.9	79	
	100	232.0	178.1	77	
		232.0	182.0	78	
		232.0	176.0	76	
120	278.4	213.8	77		
	278.4	210.5	76		
		278.4	221.1	79	

## 2.1.6 样品测定结果

收集样品共30种,分为两类,一类为购自超市的各品牌食用油,共21种;另一类为非常规渠道购买的油样,经检测,其中部分样品为“地沟油”,共9种(见表3)。样品中F1和F2由相关能源公司提供。F3样品来源于当地一家火锅店使用的油品,F4和F9来自于同一个秘密的“地沟油”生产点,F6、F7和F8购自当地同一个蔬菜市场的不同摊位,其中F3、F5、F6、F7和F8均为精炼工艺处理的“地沟油”,与普通食用油外观无明显差别。

表3 “地沟油”样品收集信息和检测结果

Table 3 Information of gutter oil collection and detection results

编号	厂家或采集地点	检出量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
F1	深圳市金能科技有限公司生产	61.29
F2	深圳市金能科技有限公司生产	7.650
F3	新民路华侨一村购买	15.33
F4	蔬菜批发市场购买	350.7
F5	马王堆路芙蓉中学购买	32.31
F6	小区蔬菜市场购买	/
F7	小区蔬菜市场购买	/
F8	小区蔬菜市场购买	12.61
F9	蔬菜批发市场购买	34.45

## 2.2 “地沟油”阳性样品验证方法的建立

### 2.2.1 专属性试验

以食用油(精炼一级大豆油)为空白,加入DBS,作为模拟阳性样品,按照“1.2 供试品溶液的

制备”项操作,取待测溶液1.0ml,置10ml量瓶中,加50%乙醇稀释至刻度,按“1.3”项条件测定,结果模拟阳性样品与DBS特征峰的保留时间一致,空白对测定无干扰,表明该方法专属性良好,提取离子流图及质谱图,见图2。

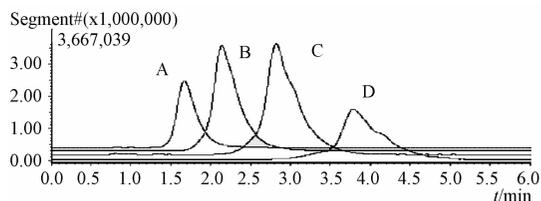
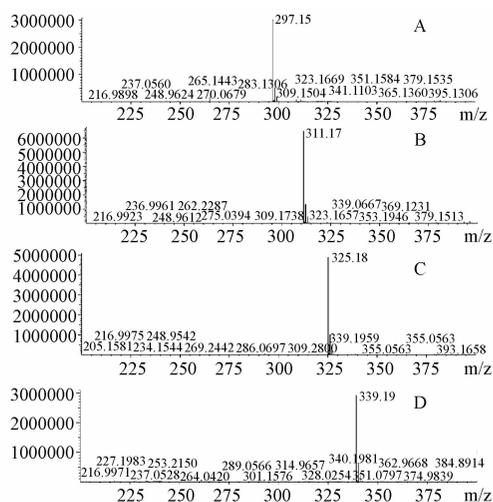


图2 DBS选择离子监测图

Figure 2 SIM chromatography of DBS



A: 十一烷基苯磺酸钠  $m/z = 297.15$ ; B: 十二烷基苯磺酸钠

$m/z = 311.17$ ; C: 十三烷基苯磺酸钠  $m/z = 325.18$ ;

D: 十四烷基苯磺酸钠  $m/z = 339.20$

图3 DBS成分质谱图

Figure 3 Mass spectrums of DBS contents

### 2.2.2 精密性试验

精密量取对照品溶液,按“1.3”项条件测定,重复进样6次,记录峰面积,计算精密性,精密性  $RSD < 2.0\%$ ,表明仪器精密性符合要求。

### 2.2.3 样品验证结果

将收集的30种样品按“1.2 供试品溶液的制备”项操作,取待测溶液1.0 ml,置10 ml量瓶中,加50%乙醇稀释至刻度,按“1.3”项条件测定。结果表明,定量分析方法中检测呈阳性的7个品种中均检出有DBS,其余23种样品中均未检出DBS,验证结果与HPLC定量分析方法的检测结果一致,表明本验证方法可对定量分析方法进行准确验证。

## 3 讨论

### 3.1 “地沟油”中检测成分的选择

本研究考察了DBS、抗生素、激素等“地沟油”