非正常食用油鉴别新方法(一):
三种辣椒碱残留量的液相色谱-质谱分析

王龙星, 金 静, 王淑秋, 王幸福, 田玉增, 陈吉平*
(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要:非正常食用油(俗称地沟油)是我国食品安全领域亟须解决的问题。准确可行的地沟油检测方法被分析工作者广泛关注。由于国人的饮食习惯,辣味调料在餐饮业应用广泛,而辣椒碱是引起辣味的主要化学物质,因此可作为鉴别地沟油的潜在指标。本文采用固相萃取-液相色谱-串联质谱技术,建立了食用油中 3 种微量辣椒碱(辣椒素、二氢辣椒素及壬酸香草酰胺)的检测方法。首先用 20 g/L 氢氧化钠水溶液提取油样中的辣椒碱,再将提取液用 C18 小柱富集净化后进行液相色谱-质谱检测。用该法对国家食品安全风险评估中心提供的 67 个盲样进行了分析,结果表明辣椒碱是一个良好的地沟油特征指示物。凭借这 3 种辣椒碱指标,阳性样品正确识别率达到 75%,阴性样品正确识别率达到 100%。目前本方法已经成为国家卫生部最新公布的 4 种地沟油仪器检测方法之一。

关键词:液相色谱-质谱;辣椒碱;地沟油;食品安全

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2012)11-1094-06

A novel method for the identification of illegal cooking oil (1):
detection of three capsaicinoids with liquid
chromatography-mass spectrometry

WANG Longxing, JIN Jing, WANG Shuqiu, WANG Xingfu, TIAN Yuzeng, CHEN Jiping*
(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Illegal cooking oil (ICO, also named swill-cooked dirty oil) has recently become a serious food safety problem in China. Now, the identification method of ICO is also a hot research area. Owing to the special eating habits of Chinese people, cayenne is widely used in catering business. Capsaicinoids are main spicy compounds in cayenne. So, they are potential evaluation indices for the identification of ICO. In this study, a solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry (SPE-LC-MS) method has been developed to detect the trace residues of three capsaicinoids (capsaicin, dihydrocapsaicin and nonylic acid vanillylamide) in cooking oil. The oil sample was first extracted with 20 g/L sodium hydroxide, the C18 SPE cartridge was then used to clean-up the sample and enrich the analytes before the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) detection. With this method, sixty seven blind samples provided by China National Center for Food Safety Risk Assessment were analyzed. The results showed that the capsaicinoids are good evaluation indices for the identification of ICO. In all the 48 ICO samples, 36 samples were successfully recognized. All the 19 normal oil samples were accurately identified. This method has been chosen and authorized as one of the four standard instrumental identification methods for ICO by the National Ministry of Health of China.

Key words: liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); capsaicinoids; illegal cooking oil; food safety

* 通讯联系人:陈吉平,研究员,主要从事分析化学与环境化学及其相关的基础与应用研究。Tel: (0411)84379686, E-mail: chenjp@dicp.ac.cn.
基金项目:国家自然科学基金项目(20977091).
收稿日期:2012-08-29

近年来,把非正常食用油(俗称地沟油)掺入合格食用油中以获取利益的行为屡禁不止,严重威胁着消费者的健康,成为当前我国食品安全领域亟须解决的问题。地沟油的鉴别方法及指标也被国人广泛关注。国内学者已提出多种鉴别指标(如多环芳烃、胆固醇、电导率等)^[1-5],也在实践中取得了一定效果。但“道高一尺,魔高一丈”,不法分子的地沟油精制工艺也在不断发展。他们不但通过白土吸附脱色、水洗、真空高温除臭等步骤去除了地沟油中存在的大部分常规杂质,而且将其掺入正常的食用油中进行出售,进一步降低所含指标物质的含量,因此更给地沟油的检测增加了难度。这种情况导致刚提出的多种鉴别指标又失效了^[6],新的地沟油检测方法仍是国内当前的研究热点。近来又出现了通过测定脂肪酸组成及微量杂质鉴别地沟油的报道^[7,8]。

地沟油是一个泛指概念,是对各类劣质油的统称,一般包括泔水油、煎炸废油、食品及相关企业产生的废弃油脂,而来自餐饮业的泔水油是地沟油的主要原料来源之一。由于国人的饮食习惯及口味爱好,辣椒是各种调料中用量较大,使用范围较广的一种。辣椒碱(也称辣椒素)是引起辣味的主要化学成分,主要存在于辣椒属植物的果实及种子中。辣椒碱具有脂溶性强、稳定性好、沸点高等特点。目前的地沟油加工工艺很难完全去除具有这样特点的物质。正常食用油基本不含辣椒碱,而接触过辣椒的餐厨废弃油脂难以避免地含有这类成分。因此辣椒碱类成分可作为鉴别餐厨废弃油脂的特征指标。目前餐饮业辣味调料基于两种原料:天然辣椒及由人工合成的壬酸香草酰胺^[9],而天然辣椒中以辣椒素及二氢辣椒素含量最大。基于上述情况可以推断餐饮泔水油中检出这 3 种物质的可能性最大,因此将它们确定为检测目标。这 3 种物质的分子结构见图 1。

对辣椒碱类物质的定量检测以分光光度法及液相色谱法为主^[10,11],测定对象主要是辣椒及与辣椒有关的提取物及调味品。国内已有研究者用液相色谱-质谱(LC-MS)进行辣椒碱定性分析^[12],但采用 LC-MS 技术测定食用油中辣椒碱残留量的工作国内还未见报道。

本文采用固相萃取-液相色谱-串联质谱技术,建立了食用油中 3 种微量辣椒碱(辣椒素、二氢辣椒素及壬酸香草酰胺)的检测方法,并对国家食品安全风险评估中心提供的 67 个正常及地沟油样本进行了分析,结果表明辣椒碱是一个良好的地沟油鉴别指标。

图 1 3 种辣椒碱的分子结构

Fig. 1 Structures of the three capsaicinoids

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

TSQ Quantum Access 液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo 公司); GENIUS3 涡旋混合仪(德国 IKA 公司); Milli-Q 高纯水发生器(美国 Millipore 公司);水浴氮气吹干仪。

甲醇、乙腈、甲酸均为高效液相色谱纯(美国 TEDIA 公司);分析纯二氯甲烷购自美国 J. T. Baker 公司;实验用水均为自制 Milli-Q 超纯水;硫酸及氢氧化钠为分析纯(沈阳化学试剂厂);C18 固相萃取小柱(1 000 mg/6 mL)由大连申谱科技有限公司提供。

标准品:辣椒素(capsaicin)、二氢辣椒素(dihydrocapsaicin)、壬酸香草酰胺(nonylic acid vanillylamide)及二苯胺(diphenylamine,内标)购自阿拉丁试剂公司,所有标准品纯度>99%。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:UF-ODS 柱(150 mm × 2.1 mm, 3.0 μm,大连中谱科技有限公司);进样量:10 μL;柱温:25 ℃;流动相 A:乙腈,B:水,C:0.1% 甲酸。梯度洗脱程序:起始 30% A-60% B-10% C;10 min 内线性改变为 70% A-20% B-10% C;保持 2 min;12~20 min 100% 乙腈冲洗色谱柱;20~30 min 按照起始比例进行平衡,流速为 0.25 mL/min。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源,正离子电离模式,电离电压:3.5 kV。鞘气压力:2.8 × 10⁵ Pa,辅助气压力:7 × 10⁴ Pa,传输毛细管温度:300 ℃,鞘气温度 340 ℃。碰撞气压力:0.2 Pa。采集数据方式:多反应监测(MRM)。其他质谱检测参数见表 1。

表 1 3 种目标物和内标的质谱检测参数
Table 1 MS parameters of the three target compounds and internal standard (IS)

Compound	Parent ion (<i>m/z</i>)	Tube lens voltage/V	Daughter ion (<i>m/z</i>)	Collision energy/eV	Scan time/ms
Nonylic acid vanillylamide	294.1	85	137.0	17	150
Capsaicin	306.1	85	137.0	17	150
Dihydrocapsaicin	308.1	85	137.0	17	150
Diphenylamine (IS)	169.9	85	93.0	17	150

1.3 标准溶液的配制

3 种辣椒碱标准品各称取 10.0 mg,用乙腈定容至 10 mL,配制成 1.00 g/L 的储备液;二苯胺标准品称取 10.0 mg,用甲醇定容至 10 mL,配制成 1.00 g/L 的储备液,置于 -20 ℃ 冰箱中保存。使用时根据需要配制成相应浓度的标准品溶液。

1.4 样品前处理

取 500 μL 食用油样品于 10 mL Peek 管中,加入 500 μL 二氯甲烷,再加入 3 mL 20 g/L 氢氧化钠,涡旋提取 10 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,取上层水相;残留油相再用 3 mL 20 g/L 氢氧化钠重复提取一次,合并水相,用 1:15 稀硫酸(1 份浓硫酸+15 份水)调节 pH 在 2~3 之间后进行固相萃取(SPE)操作。C18 固相萃取小柱预先用 3 mL×3 次乙腈及 3 mL×2 次纯水淋洗进行活化;然后将调完 pH 值的水相提取液加入,调节 SPE 装置的流速至 1~2 滴/s,待全部溶液通过 SPE 小柱后,以 3 mL×2 次超纯水淋洗,弃去流出液;最终以 3 mL×2 次乙腈洗脱 3 种目标化合物。用氮吹装置于 50 ℃ 缓缓吹干后,加入 200 μL 100 μg/L 二苯胺甲醇溶液溶解残渣,再转入液相色谱样品瓶中进行 LC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的选择

辣椒碱在中性条件下的脂溶性强,而在强碱性条件下其结构中的酚羟基解离,水溶性强,借助这个特点可实现辣椒碱与主体油脂的分离。首先通过碱性水溶液进行提取,然后再通过固相萃取技术,实现辣椒碱的富集,并除去无机酸、无机碱及残留的油脂。经过这样的分离富集步骤,不仅提高了灵敏度,减小了基体干扰,同时也避免了残留油脂对色谱柱及质谱仪器的污染和损伤。通过对比乙腈直接萃取和本提取方法的提取效果,发现本方法的提取率更高,且基本没有油脂残留,不会对色谱柱及质谱仪器造成残留污染。图 2 显示了本方法对一地沟油样品(4-21-24)的实际分析效果。

2.2 内标的选择

图 2 地沟油样品(No. 4-21-24)的 MRM 谱图
Fig. 2 MRM chromatograms of an illegal cooking oil sample (No. 4-21-24)

色谱-质谱联用分析中一般使用两种内标^[13]:
①提取内标:用于跟踪补偿样品前处理过程的损失;
②进样内标:用于校准分析仪器波动造成的测定误差。针对本文的情况,提取内标须选择与辣椒碱化学性质非常近似(同时含有酚羟基及酰胺、碳链长度合适)且地沟油、食用油中都不存在的物质。除使用同位素内标外,其他合适的提取内标不易获得。而同位素内标过于昂贵,不利于方法的普及。在此情况下本文仅用二苯胺作为进样内标,其出峰时间与待测辣椒碱较接近可较好地校准仪器波动引起的误差。实际回收率及精密度结果表明,这种方法是可行的。

2.3 线性关系、方法精密度、检出限及回收率

用 3 种辣椒碱标准品及二苯胺的储备液配制 40、20、10、5、2、0.5、0.2 μg/L 的系列标准溶液,每个标准溶液中均加入 100 μg/L 的二苯胺。对系列标准品进行 LC-MS 分析,以目标化合物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标,以目标化合物的质量浓度为横坐标做标准曲线。结果表明在上述浓度范围内 3 种化合物的线性回归系数均大于 0.994。

在空白大豆油中按照 2.00 μg/L 及 0.200 μg/L 两个质量浓度水平定量添加 3 种辣椒碱标准品,并按照本法重复提取分析 5 次,测定回收率及精密度(以相对标准偏差(RSD)表示)。检出限(LOD)使用 0.200 μg/L 添加水平的数据按 3 倍信噪比推算。结果如表 2 所示,3 种辣椒碱的回收率在 85%~93% 之间;包括前处理在内的整体方法精密度小于 10%;检出限在 0.02~0.05 μg/L 之间。

表 2 3 种辣椒碱的回收率、精密度及检出限
Table 2 Recoveries, precisions and limits of detection (LOD, S/N=3) of the three capsaicinoids

Compound	2 μg/L		0.2 μg/L		LOD/(μg/L)
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	
Nonylic acid vanillylamide	85	6.5	87	10	0.05
Capsaicin	90	3.6	93	8	0.03
Dihydrocapsaicin	88	6.5	85	10	0.02

2.4 67 个食用油样本分析

采用本文方法对国家食品安全风险评估中心提供的第四批 37 个盲样及第五批 30 个盲样进行了分析,结果分别列于表 3 和表 4。表中同时列出了地沟油(ICO)样本的来源及掺杂比例。从结果看正常食用油中基本不含有辣椒碱成分,3 种辣椒碱含量之和最大不超过 0.15 μg/L。而大部分地沟油中 3 种辣椒碱含量之和均超过 1 μg/L,最大达到 6 000 μg/L。如果设定 3 种辣椒碱含量之和超过 0.2 μg/L 为判断指标,则 48 个地沟油中 36 个样本可以

得到正确地鉴别。与此同时,所有正常食用油样品也获得正确的判断结果,没有错判的情况。其中,第 4 批 6 个漏检的地沟油样品中,除来自深圳宝安的 2 个样品外,其余都是地沟油掺杂比例比较小的样品(3 个样本掺杂 10%,一个样本掺杂 20%)。从这个角度看,本方法对大多数种类的地沟油是有一定的鉴定能力。此外对大部分同一来源的地沟油样品,掺杂的比例越大,辣椒碱的测定结果越高,其数值与地沟油的掺杂比例大体成线性关系,因此本方法在一定程度上也可以判断地沟油的掺杂比例。

表 3 国家食品安全风险评估中心提供的第四批 37 个盲样的分析结果
Table 3 Detection results of the 37 blind oil samples (the 4th batch) provided by China National Center for Food Safety Risk Assessment

Sample No.	Oil description *	Nonylic acid vanillylamide	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Sum
4-21-1	20% ICO(Guangzhou 2) + blend	ND	0.15	0.10	0.25
4-21-2	blend + peanut + soybean	ND	0.04	0.02	0.07
4-21-3	50% ICO(Chongqing 1) + blend	2.69	31.41	57.99	92.09
4-21-4	20% ICO(Taixin 3) + blend	ND	0.09	0.07	0.16
4-21-5	50% ICO(Qianmen 4) + blend	2.34	14.87	5.88	23.09
4-21-6	normal KFC palm oil	ND	0.02	ND	0.02
4-21-7	50% ICO(Chongqing 1) + blend	3.56	45.86	85.68	135.1
4-21-8	10% ICO(Qianmen 4) + blend	0.11	3.95	1.39	5.45
4-21-9	corn oil	ND	ND	ND	ND
4-21-10	ICO(Chongqing 2)	5.72	125.4	145.18	276.3
4-21-11	blend	ND	0.02	ND	0.02
4-21-12	corn + soybean + peanut + blend	ND	0.03	0.02	0.05
4-21-13	ICO(Baoan 6)	ND	ND	ND	ND
4-21-14	ICO(Boluo 7)	0.28	1.97	0.21	2.46
4-21-15	ICO(Guangzhou 8)	ND	0.15	0.06	0.21
4-21-16	ICO(Changchun 9)	6146	16.76	6.76	6169
4-21-17	corn + blend	ND	ND	ND	ND
4-21-18	peanut + blend	ND	0.05	0.04	0.08
4-21-19	peanut + blend	ND	0.09	0.06	0.15
4-21-20	ICO(filtered KFC palm)	32.48	1307	470.33	1810
4-21-21	ICO(KFC palm)	27.53	1162	421.35	1611
4-21-22	ICO(double filtered KFC palm)	27.60	1196	424.59	1648

表 3 (续)
Table 3 (Continued)

Sample No.	Oil description *	Nonylic acid vanillylamide	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Sum μg/L
4-21-23	soybean	ND	ND	ND	ND
4-21-24	ICO(Liaoning 10)	4487	4. 01	3. 00	4494
4-21-25	ICO(Xinjiang 11)	4136	0. 03	ND	4136
4-21-26	50% ICO(Taixin 3) + blend	ND	0. 10	0. 20	0. 30
4-21-27	20% ICO(Qianmen 4) + blend	1. 05	6. 35	2. 44	9. 84
4-21-28	10% ICO(Taixin 3) + blend	ND	0. 07	0. 04	0. 11
4-21-29	10% ICO(Taixin 3) + blend	ND	0. 05	0. 04	0. 09
4-21-30	10% ICO(Chongqing 1) + blend	0. 65	8. 09	13. 26	21. 99
4-21-31	20% ICO(Chongqing 1) + blend	1. 17	14. 48	23. 88	39. 53
4-21-32	10% ICO(Guangzhou 2) + blend	ND	0. 11	0. 07	0. 17
4-21-33	50% ICO(Guangzhou 2) + blend	0. 07	0. 33	0. 21	0. 60
4-21-34	10% ICO(Chongqing 1) + blend	0. 71	8. 11	14. 83	23. 65
4-21-35	50% ICO(Taixin 3) + blend	ND	0. 23	0. 41	0. 64
4-21-36	ICO(Baoan 6)	0. 04	ND	ND	0. 04
4-21-37	ICO(Boluo 7)	0. 32	2. 03	0. 25	2. 60

* In description, ICO means illegal cooking oil, the words in bracket show the origin of this sample, the percentage numbers show the proportion of ICO in this sample. ND: not found.

表 4 国家食品安全风险评估中心提供的第五批 30 个盲样的分析结果
Table 4 Detection results of the 30 blind oil samples (the 5th batch) provided by
China National Center for Food Safety Risk Assessment

Sample No.	Oil description *	Nonylic acid vanillylamide	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Sum μg/L
5-21-1	20% ICO(Qianmen 3) + rapeseed	0. 13	0. 36	0. 28	0. 77
5-21-2	ICO(Chongqing)	3. 61	84. 40	65. 66	153. 7
5-21-3	50% ICO(Qianmen 3) + rapeseed	0. 52	1. 65	1. 21	3. 38
5-21-4	blend	ND	ND	ND	ND
5-21-5	50% ICO(Chongqing) + rapeseed	2. 40	31. 21	44. 51	78. 12
5-21-6	10% ICO(Chongqing) + rapeseed	0. 64	7. 50	10. 23	18. 37
5-21-7	corn	ND	ND	ND	ND
5-21-8	10% ICO(Qianmen 3) + rapeseed	0. 10	0. 27	0. 18	0. 54
5-21-9	50% ICO(Taixin 4) + sunflower	ND	0. 02	ND	0. 02
5-21-10	sunflower	ND	ND	ND	ND
5-21-11	20% ICO(Guizhou 2) + blend	ND	0. 02	ND	0. 02
5-21-12	ICO(Shandong 2)	0. 13	2. 99	1. 38	4. 49
5-21-13	rap	ND	ND	ND	ND
5-21-14	peanut	ND	0. 08	0. 03	0. 11
5-21-15	soybean	ND	ND	ND	ND
5-21-16	ICO(Liaoning)	6. 47	0. 03	0. 03	6. 53
5-21-17	ICO(Xinjiang)	0. 19	0. 98	3. 91	5. 08
5-21-18	blend	ND	0. 02	ND	0. 02
5-21-20	palm + soybean	ND	ND	ND	ND
5-21-21	10% ICO(Taixin 4) + sunflower	ND	0. 02	ND	0. 02
5-21-22	ICO(Xinjiang 3)	0. 25	1. 45	5. 39	7. 09
5-21-23	nuf	ND	0. 02	ND	0. 02
5-21-24	ICO(Xinjiang 4)	9. 73	ND	ND	9. 73
5-21-25	ICO(Guangzhou)	ND	0. 18	0. 05	0. 23
5-21-26	ICO(Guizhou)	ND	0. 05	0. 04	0. 09
5-21-27	20% ICO(Taixin 4) + sunflower	ND	0. 01	0. 03	0. 05
5-21-28	palm	ND	0. 05	0. 04	0. 08
5-21-29	20% ICO(Chongqing 1) + rapeseed	1. 59	20. 36	33. 62	55. 57
5-21-30	ICO(Xinjiang 1)	1. 50	27. 02	33. 65	62. 16
5-21-31	10% ICO(Guizhou 2) + blend	ND	0. 02	0. 03	0. 05

* In description, ICO means illegal cooking oil, the words in bracket show the origin of this sample, and the percentage numbers show the proportion of ICO in this sample. ND: not found.

3 结论

本文建立了食用油中 3 种微量辣椒碱残留量的液相色谱-质谱联用分析方法,并将其用于地沟油的鉴别分析,取得了良好的效果。本方法识别出 48 个地沟油中的 36 个,正判率达到 75%。而且,本方法还有一个显著特点:假阳性率为零,即不会将正常的食用油误判为地沟油,这对避免执法过程中出现冤假案例有帮助。但同时,本法也存在一定的漏检现象。由于地沟油来源复杂,用单一指标鉴定所有的地沟油是困难的。因此,开发混合指标体系,探索其他特征指示物,实现对地沟油的综合判别是提高鉴定准确性和特异性的合理方式。关于用内源性特征奇数碳脂肪酸鉴别地沟油的研究将在另一篇文章^[14]中详细阐述。将两套指标整合,不仅能进一步提高地沟油的识别率,也可以保障测定结果的可靠性。

参考文献:

- [1] Zhang Q, Shen Q. Food Science and Technology (张清, 沈群. 食品科技), 2010, 35(10): 311
- [2] Cao W M, Xue B, Yang B T, et al. Grain Science and Technology and Economy (曹文明, 薛斌, 杨波涛, 等. 粮食科技与经济), 2011, 36(1): 41
- [3] Liu B, Yang J G, Zhang X M. Occupation and Health (刘

波, 杨建国, 张雪梅. 职业与健康), 2011, 27(10): 1167

- [4] Chen H, Yang M, Zhu R, et al. Chinese Journal of Food Hygiene (陈红, 杨梅, 朱蓉, 等. 中国食品卫生杂志), 2011, 23(5): 429
- [5] Li Y G, Shan Y, Li G Y, et al. Food and Machinery (李沂光, 单杨, 李高阳, 等. 食品与机械), 2012, 28(3): 262
- [6] Editorial Office of Life Science Instruments. Life Science Instruments (《生命科学仪器》编辑部. 生命科学仪器), 2011, 9(10): 38
- [7] Wu H Q, Huang X L, Lin X S, et al. Journal of Instrumental Analysis (吴惠勤, 黄晓兰, 林晓珊, 等. 分析测试学报), 2012, 31(4): 365
- [8] Xu X L, Li N, Ren H L, et al. Journal of Inspection and Quarantine (许秀丽, 李娜, 任荷玲, 等. 检验检疫学刊), 2012, 22(2): 6
- [9] Zhan J R, Shi X F, An G C, et al. Chemical Reagents (詹家荣, 施险峰, 安国成, 等. 化学试剂), 2010, 32(5): 417
- [10] Xu A P, Wang F H, Wang X R, et al. Journal of Huazhong Agricultural University (徐爱平, 王富华, 王晓容, 等. 华中农业大学学报), 2005, 24(6): 592
- [11] Wang S P, Xia Y B. China Food Additives (王穗萍, 夏延斌. 中国食品添加剂), 2005(2): 110
- [12] Wang Y, Xia Y B, Wang J, et al. Science and Technology of Food Industry (王燕, 夏延斌, 王健, 等. 食品工业科技), 2009, 30(1): 301
- [13] Zhang M W, Zhang S K, Li Y J, et al. Environmental Chemistry (张漫雯, 张素坤, 李艳静, 等. 环境化学), 2011, 30(3): 723
- [14] Jin J, Wang L X, Chen J P, et al. Chinese Journal of Chromatography (金静, 王龙星, 陈吉平, 等. 色谱), 2012, 30(11): 1100