

表 5 样品测定结果

Table 5 Determination of choline in real samples		
样品序号	标示值/(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)
1	96	140.76
2	96	129.80
3	80	126.93
4	135.1	148.70
5	80	142.83
6	85	114.17
7	85	116.64
8	105	139.84

3 小结

本文针对现有的高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用测定婴幼儿配方乳粉中胆碱含量的方法进行优化,选用 ZORBAX 300 SCX 阳离子交换柱,并对流动相以及水相和有机相的比例进行改善,考察了蒸发光散射检测器的使用条件,结果显示胆碱的检测限为 4 μg/ml,线性相关系数(*r*)为 0.998 1,加标回收率在 94.98%~100.9%之间,且 *RSD*_{日内}和 *RSD*_{日间}精密度良好,分别为 2.75%和 3.12%。本文建立的高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用测定胆碱含量的方法操作简单、快速、样品分析时间短,且目标峰峰形窄而对称,适用于对婴幼儿配方乳粉中胆碱的测定。

实验技术与方法

超高效液相色谱法同时测定食用植物油中的 4 种植物甾醇

赵海燕,詹未,李兵,吴国华,赵榕
(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

摘要:**目的** 建立超高效液相色谱(UPLC)法测定食用植物油中 4 种植物甾醇(菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇)的方法。**方法** 食用植物油样品经皂化后,用冰醋酸调节 pH=6.0~7.5,乙醇定容后冷冻离心,取上清液测定。采用 Endoavorsil C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,以甲醇作为流动相等度洗脱,使用二极管阵列检测器在波长 205 nm 下进行检测。**结果** 方法的线性范围:β-谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇为 20~200 μg/ml;菜油甾醇为 10~100 μg/ml,相关系数 *r* 均大于 0.999 9。方法检出限(*S/N*=3):菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇分别为 23.2、18.8、18.6、23.8 μg/g;定量限(*S/N*=10)分别为 77.5、62.8、62.2、79.4 μg/g;4 种组分按高、中、低 3 个浓度水平加标回收率为 84.7%~100.7%,相对标准偏差 *RSD*(*n*=6)均<3%。**结论** 本方法简便稳定,准确灵敏,适用于食用植物油中 4 种主要植物甾醇的同时测定。

关键词:植物甾醇;食用植物油;超高效液相色谱法;食品

中图分类号:R155.5 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0223-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.017

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. GB 14880—2012 食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

[2] 常碧颖,郭吉原,宋荣. 氯化胆碱市场的掺假新动向及应对措施[J]. 饲料广场,2002(16):3-4.

[3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5413.20—2013 婴幼儿乳粉和乳品中胆碱的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2013.

[4] Sanz-Vicente I, Romero J J, Marcos S D, et al. Simultaneous determination of glucose and choline based on the intrinsic fluorescence of the enzymes [J]. J Fluoresc, 2009, 4 (19): 583-591.

[5] 黄芳. 液相色谱-质谱技术在配方乳粉营养成分分析中的应用研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.

[6] 武中平,高巍,卢剑. 离子色谱法测定婴幼儿配方奶粉中胆碱的含量[J]. 乳业科学与技术,2011,34(5):232-233.

[7] 刘美霞,胡彩霞,任丽,等. 离子色谱法测定奶粉中胆碱含量方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(6):1008-1883.

[8] 黄丽,刘京平,容晓文. 在线渗析-离子色谱法直接测定奶粉中胆碱[J]. 中国卫生检验杂志,2008,118(3):444-445,457.

[9] 李媛媛,薛静,李莹倩,等. 离子色谱法测定婴幼儿乳粉中的胆碱含量[J]. 食品科技,2008,33(12):267-270.

[10] 薛静. 离子色谱法和高效液相色谱法测定乳粉中胆碱含量的研究[D]. 吉林:东北师范大学,2008.

[11] 冯埃生,邹汉法,汪海洋,等. 影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J]. 药物分析杂志,1996,16(6):414.

Simultaneous determination of 4 kinds of phytosterols in edible vegetable oil by UPLC

ZHAO Hai-yan, ZHAN Wei, LI Bing, WU Guo-hua, ZHAO Rong

(Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective This paper reports an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for determination of 4 kinds of phytosterols (brassicasterol, stigmasterol, campesterol and β -sitosterol) in edible vegetable oil. **Methods** Edible vegetable oil samples were completely saponificated by glacial acetic acid, pH was adjusted to 6.0-7.5, then used ethanol to constant volume and freezing centrifuged to harvest supernatant. The analytical separation was performed on an Endoavorsil C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m) chromatographic column with the isocratic elution using methyl alcohol and detected by photo-diode array detector at 205 nm. **Results** The linearity ranges were 20-200 μ g/ml for β -sitosterol, stigmasterol and brassicasterol and 10-100 μ g/ml for campesterol. The limits of detection were 23.2 μ g/g for brassicasterol, 18.8 μ g/g for stigmasterol, 18.6 μ g/g for campesterol, and 23.8 μ g/g for β -sitosterol. The quantitation limits were 77.5 μ g/g for brassicasterol, 62.8 μ g/g for stigmasterol, 62.2 μ g/g for campesterol, and 79.4 μ g/g for β -sitosterol. The average recoveries of spiked samples were 84.7% -100.7% and the RSD of method ($n = 6$) was less than 3%. **Conclusion** The method was steady, simple, accurate and sensitive. It could be used to simultaneous detect 4 kinds of phytosterols in edible vegetable oil.

Key words: Phytosterol; edible vegetable oil; ultra performance liquid chromatography; food

植物甾醇广泛存在于天然植物中,如蔬菜、水果、坚果^[1]。植物油是人类植物甾醇的食源性来源之一,其中菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇是植物油中4种最主要的植物甾醇。植物甾醇具有广泛的生理活性,已被应用于食品、医药、化妆品等相关领域^[2]。因其与胆固醇相似的化学结构,可与胆固醇在人体小肠内的吸收形成竞争^[3]。研究表明^[4-6],植物甾醇摄入量2~3 g/天,可明显降低人体血清中10%左右的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)浓度,从而减小患冠心病的风险,阻止动脉粥样硬化的发展,对人体健康有着积极作用;植物甾醇几乎对人体无毒副作用,安全性好。1999年美国食品药品监督管理局批准植物甾醇及其酯使用“有益健康”标签,2004年欧盟允许其在特定食品中使用,2010年我国正式批准植物甾醇及其酯在食品中添加。植物甾醇作为食品中一种有益健康的功效成分,建立一种方便快捷,灵敏准确的检测方法,以此对相关产品做出合理评价是十分必要的。

目前植物甾醇的测定方法主要有分光光度法^[7]、液相色谱法^[8]、气相色谱法^[9]。其中分光光度法只能测定总甾醇含量,无法对不同种类的植物甾醇进行分离鉴定,且灵敏度相对较差;普通高效液相色谱法对4种主要植物甾醇(菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇)分离效果欠佳,特别是无法分离豆甾醇和菜油甾醇这两种组分,影响准确的定性及定量分析,同时采用传统液相色谱法对实际样品测定的文献报道不多且背景干扰均较严重;气相色谱法可以同时实现多种植物甾醇的分离和测定。国标 GB/T 25223—2010《动植物油脂 甾醇组

成和甾醇总量的测定 气相色谱法》^[10]即采用气相色谱法分析测定动植物油脂中的甾醇组成,但该方法需进行硅烷化衍生,样品预处理过程繁琐,需经加热回流皂化,固相萃取,浓缩定容,薄层色谱分离等步骤。

本研究采用超高效液相色谱(UPLC)法,利用UPLC高柱效、高灵敏度、低检出限等优势,针对市售的各种食用植物油,建立一种便捷可靠的分析方法,同时测定样品中的菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇,取得良好效果;而且本方法将采用60℃恒温摇床对食用植物油样品进行皂化,同时放弃使用固液萃取、液液萃取等净化浓缩手段,直接将已皂化样品加酸定容后冷冻离心,取上清液UPLC测定。方法可批量完成样品,重现性好,灵敏度高,减少有机溶剂的使用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Waters超高效液相色谱仪(配有PDA检测器,美国Waters)、离心机、台式恒温振荡器。

豆甾醇标准品(ASB-00019357-100)、菜籽甾醇标准品(ASB-00002359-025)、菜油甾醇标准品(ASB-00003072-025)、 β -谷甾醇标准品(ASB-00019285-025)均购自美国Chromadex,甲醇、乙醇均为色谱纯,冰醋酸为分析纯,50%(W/V)氢氧化钾溶液,试验用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备液的配制:准确称量菜籽甾醇、豆甾

醇和 β -谷甾醇标准品各0.010 0 g,菜油甾醇0.005 0 g,分别置于10.0 ml的容量瓶中,均使用乙醇溶解定容。菜籽甾醇、豆甾醇和 β -谷甾醇浓度1.0 mg/ml,菜油甾醇浓度0.5 mg/ml。

标准系列:准确吸取4种植物甾醇标准储备液各1.0 ml混合,乙醇定容至5.0 ml,以此作为混合标准储备液。准确吸取混合标准储备液100、250、500、750 μ l分别于10.0 ml容量瓶中,乙醇定容至刻线。得到菜籽甾醇、豆甾醇和 β -谷甾醇标准系列浓度为2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μ g/ml;菜油甾醇标准系列浓度为1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 μ g/ml。

1.2.2 样品前处理

准确称量0.500 ~ 3.000 g左右食用植物油样品于50 ml塑料离心管中,加入15 ml乙醇混匀,再加入5.0 ml 50%氢氧化钾溶液,置于恒温振荡器中60 $^{\circ}$ C振荡1 h使其完全皂化,取出后放置室温,加入冰醋酸调节pH = 6 ~ 8,待其冷却后用乙醇定容至50.0 ml刻度。再放入冰箱冷藏室2 h后取出,10 000 r/min离心10 min,将上清液转移至50.0 ml离心管中乙醇定容至刻度,混匀后上机测定。

1.2.3 定性及定量

分别取标准和样品溶液各2 μ l进样,UPLC测定,以保留时间和扫描光谱图定性,外标法定量。

1.2.4 液相色谱条件

色谱柱:Endoavorsil C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相为甲醇;检测波长205 nm;流速0.3 ml/min;柱温35 $^{\circ}$ C;进样体积2 μ l。

2 结果与分析

2.1 样品制备方法的优化

目前文献报道大多采用加热回流的方法对样品进行皂化,装置相对繁琐,在实际工作中不利于大批量样品的处理。皂化后样品多采用溶剂(正己烷、乙醚、石油醚等)萃取、固相(中性氧化铝)萃取、薄层色谱法等方法进行净化、浓缩。样品制备过程费时耗力,操作复杂。本研究重点针对样品皂化方法和提取方法进行探究优化,极大地简化了试验操作,缩短分析时间,大幅提高效率的同时减少有机试剂的使用,绿色环保。

2.1.1 皂化条件的优化

植物甾醇通常以游离型和酯化型两种形式存在,油性样品中各种脂肪酸干扰样品测定,损伤色谱柱,因此样品制备过程中需对样品进行皂化。考虑到加热回流皂化装置繁琐,本方法采用恒温振荡器皂化。缩短室温皂化所需时间,简化试验操作,皂化效果良好、稳定。分别对比室温过夜皂

化、恒温振荡器60 $^{\circ}$ C皂化1、2、4 h样品测定结果,室温过夜皂化样品测定含量偏低,恒温振荡器60 $^{\circ}$ C皂化1、2、4 h样品测定含量无明显差异,据此确定本方法采用恒温振荡器60 $^{\circ}$ C振荡皂化1 h,见表1。

表1 不同皂化条件样品测定结果($n=6$,mg/g)
Table 1 Results of sample determination with different saponification conditions

皂化条件	菜籽甾醇	豆甾醇	菜油甾醇	β -谷甾醇
室温过夜	0.291	0.103	1.03	1.89
60 $^{\circ}$ C,1 h	0.461	0.121	1.25	2.48
60 $^{\circ}$ C,2 h	0.459	0.123	1.24	2.46
60 $^{\circ}$ C,4 h	0.463	0.120	1.25	2.48

2.1.2 样品提取方法的优化

对比溶剂萃取法和本研究使用的样品制备方法,用溶剂萃取需反复多次提取,需要大量溶剂,对环境造成污染,操作比较繁琐。而本研究采用恒温摇床60 $^{\circ}$ C皂化1 h,冰醋酸调pH近中性,乙醇定容,冰箱冷藏2 h待皂化液沉淀完全,10 000 r/min离心10 min后将上清液转出至50.0 ml离心管中用乙醇定容,然后上机测定。

2.2 液相色谱条件的优化

本方法通过试验最终选择Endoavorsil C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm,1.8 μ m)色谱柱作为分析柱。以甲醇-水作为流动相体系,再分别以甲醇-水(96:4,V/V)、甲醇-水(98:2,V/V)、甲醇作为流动相进行试验,确定以甲醇作为流动相,在此条件下菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇分离情况良好,满足定量分析要求,见图1、2。相比于传统液相色谱法,本方法改善豆甾醇与菜油甾醇分离效果的同时,大大缩短了样品的分析时间,快速有效。

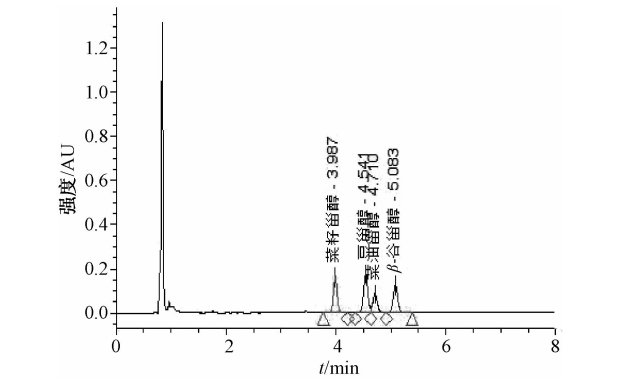


图1 标准色谱图
Figure 1 Chromatogram of standard

2.3 回归方程及检出限结果

取1.2.1配制的标准系列上机测定,分别以4种组分的浓度为横坐标,响应值为纵坐标绘制标准曲线,结果表明4种植物甾醇在浓度范围内与响应值呈良好的线性关系,结果见表2。

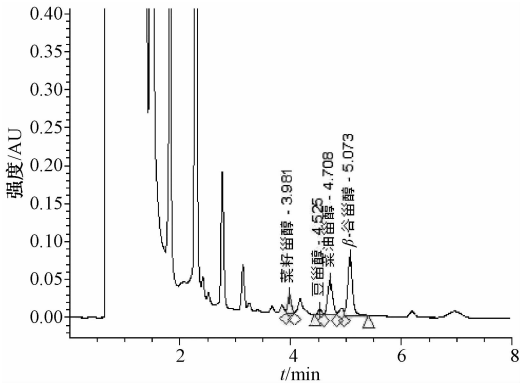


图2 样品色谱图
Figure 2 Chromatogram of sample

表2 方法的线性范围、回归方程及检出限

Table 2 Linear range, linear equations and limits of detection of the method					
组分	线性范围 /(μg/ml)	回归方程	相关系数 <i>r</i>	定性检出限 /(μg/g)	定量检出限 /(μg/g)
菜籽甾醇	2.0~20.0	$y=4.67e+003x+1.20e+003$	0.999 9	23.2	77.5
豆甾醇	2.0~20.0	$y=5.68e+003x+5.35e+003$	0.999 9	15.8	47.4
菜油甾醇	1.0~10.0	$y=5.65e+003x+3.42e+003$	0.999 9	15.6	46.8
β-谷甾醇	2.0~20.0	$y=4.40e+003x+6.49e+003$	0.999 9	23.8	79.4

表3 方法的回收率(*n* = 6)

Table 3 Recovery of the method					
组分	本底值 /(mg/g)	加标量 /(mg/g)	测定均值 /(mg/g)	平均回收率/%	RSD /%
菜籽甾醇	—	0.250	0.236	94.4	2.1
	—	0.500	0.483	96.6	3.7
	—	1.000	0.995	99.5	1.9
豆甾醇	0.480	0.250	0.254	101.6	1.4
	0.480	0.500	0.497	99.4	0.8
	0.480	1.000	0.922	92.2	1.7
菜油甾醇	0.558	0.250	0.229	91.6	2.4
	0.558	0.500	0.477	95.4	3.5
	0.558	1.000	0.922	92.2	2.3
β-谷甾醇	1.248	0.600	0.543	90.5	1.2
	1.248	1.200	1.149	95.8	0.7
	1.248	2.400	2.337	97.4	0.9

注:—表示未检出

表4 方法的精密度(*n* = 6)

Table 4 Precision of the method							
组分	测定值/(mg/g)						RSD /%
	1	2	3	4	5	6	
菜籽甾醇	0.466	0.472	0.470	0.463	0.457	0.450	1.7
豆甾醇	0.122	0.120	0.121	0.124	0.117	0.114	3.0
菜油甾醇	1.242	1.253	1.244	1.238	1.230	1.282	1.4
β -谷甾醇	2.462	2.476	2.482	2.486	2.470	2.478	0.3

表5 实际样品的测定结果(mg/g)

Table 5 Results of sample determination for phytosterols content				
样品	菜籽甾醇	豆甾醇	菜油甾醇	β-谷甾醇
玉米胚芽油	—	0.461	1.216	4.082
葵花籽油	—	0.370	0.873	1.892
玉米胚芽油	—	0.618	1.368	3.968
大豆油	—	0.421	0.878	2.476
香油	—	0.480	0.558	1.248
玉米胚芽油	—	0.557	1.482	4.916
橄榄油	—	0.130	0.552	0.930
菜籽油	0.463	0.120	1.248	2.476

注:—表示未检出

2.4 回收率和精密度试验

准确称取植物甾醇含量相对较低的大豆油样品 1.000 g 左右作为本底,分别按高、中、低 3 个浓度水平,平行加标试验(*n* = 6),试验方法如上所述,方法的回收率见表 3。

对同一样品平行取样 6 份,按本方法进行测定,结果显示该方法重现性良好,*RSD* 均小于 3%。结果见表 4。

2.5 实际样品的测定

选取 8 种市售食用植物油样品进行测定,其中玉米胚芽油 3 份,大豆油 1 份,菜籽油 1 份,橄榄油 1 份,香油 1 份,葵花籽油 1 份。结果见表 5。

3 小结

本方法便捷稳定,灵敏可靠,极大地简化了样品前处理的方法,样品测定获得良好效果。适用于同时测定食用植物油中 4 种植物甾醇(菜籽甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇)的含量。

参考文献

[1] Quílez J, García-Lorda P, Salas-Salvadó J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions[J]. Clin Nutr,2003,22(4) :343-351.

[2] Piironen V, Lindsay D G, Miettinen T A, et al. Plant sterols: biosynthesis, biological functions and their importance to human nutrition[J]. J Sci Food Agric,2000,80(7) :939-966.

[3] Michael I, Uwe G, Dieter L, et al. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice[J]. J Lipid Res,2003,44(3) :533-538.

[4] Brufau G, Canela M M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties[J]. Nutrition Research,2008,28(4) :217-225.

[5] 左玉. 植物甾醇研究与应用[J]. 粮食与油脂,2012,25(7):1-4.

[6] Moreau R A, Whitaker B D, Hicks K B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses[J]. Progress in Lipid Research,2002,41(6) :457-500.

[7] 梁博,郭璇华. 分光光度法测定火龙果茎中的植物甾醇[J]. 分析试验室,2008,27(12) :279-281.

[8] 牟德华,赵玉华,朱艳丽,等. 高效液相色谱法测定植物甾醇的研究[J]. 食品工程,2007(1) :62-64.

[9] 杨春英,刘学铭,陈智毅,等. 气相色谱-质谱联用法测定 14 种食用植物油中的植物甾醇[J]. 中国粮油学报,2013,28(2) :123-128.

[10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 25223—2010 动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.