

气相色谱内标法测定鱿鱼油中的胆固醇

李伟¹ 陈华勇^{1,*} 张凯¹ 王永华² 杨博¹

(1.华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州 510006;

2.华南理工大学食品科学与工程学院,广东广州 510641)

摘要:目的:以正三十二烷为内标物,建立了鱿鱼油中胆固醇含量测定的气相色谱(GC)分析方法。方法:采用0.5mol/L的氢氧化钾乙醇溶液在65℃水浴锅中对油样皂化30min,乙醚萃取,毛细管气相色谱法测定鱿鱼油中胆固醇,讨论并确定了样品皂化的最佳条件。结果:利用该方法,胆固醇与杂质可以得到较好的分离和准确的定量。内标法制定标准曲线相关系数大于0.999,测得胆固醇含量为 29.01 ± 0.56 mg/g。胆固醇的最低检出限为2.21ng,加标回收率在92.14%~102.45%之间,其RSD<5%(n=3)。结论:该法灵敏度高,分离效果好,定量准确,适用于鱿鱼油中胆固醇的含量测定。

关键词:气相色谱法,胆固醇,内标法,鱿鱼油

Determination of cholesterol in liquid oil by gas chromatography

LI Wei¹, CHENG Hua-yong^{1,*}, ZHANG Kai¹, WANG Yong-hua², YANG Bo¹

(1.School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Objective: Using dotriacontane as the internal standard, to establish an internal standard method for cholesterol determination in squid oil by gas chromatography(GC). Method: The oil sample was saponified with 0.5mol/L alcoholic KOH, 65℃ water bath heating, 30min, then extracted with ether. The impact caused by the different saponification conditions on the determination of cholesterol was studied. In addition, the best saponification conditions were chosen by orthogonal experiments. Results: The experimental results showed a good linear relation($R=0.9992$), the total cholesterol content of squid oil was 29.01 ± 0.56 mg/g. The detection limit of the method was 2.21ng, The recoveries of cholesterol were 92.14%~102.45%, RSD<5%(n=3). Conclusion: The method of determination of cholesterol in squid oil by GC had high sensitivity, good separation and quantitative accuracy.

Key words: GC, cholesterol, internal standard, squid oil

中图分类号:TS225.2⁺4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2011)01-0284-04

胆固醇是一种具脂类性质的环戊烷多氢菲衍生物,不溶于水,易溶于乙醚、石油醚、氯仿等溶剂。它广泛存在于动物体内,是动物组织细胞不可缺少的重要物质,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。虾蟹类养殖中,由于虾蟹类不能自身合成胆固醇,必须通过添加富含胆固醇的饵料来提高虾蟹养殖的品质和产量^[1-2]。富含天然胆固醇的鱿鱼油是虾蟹养殖的一种重要的饲料添加剂。鱿鱼油中胆固醇的准确测定,对饲料添加剂的工业化生产有着重要的指导意义。目前,胆固醇的测定已有诸多报道,采用的方法有比色法、酶法、气相色谱法(GC)、液相色谱法和薄层层析法

等,涉及的基体有鸡蛋、奶茶、饼干、食用油等^[3-6]。通常,基体组成及其复杂程度对目标物的准确定量影响较大。油样中胆固醇总量的准确测定取决于皂化处理条件^[7]。因此,本文详细探讨了皂化液浓度、皂化时间、皂化温度及不同萃取剂对鱿鱼油中胆固醇测定的影响,并采用正交实验确定了最优的皂化处理条件,以三十二烷为内标物建立了胆固醇的气相色谱分析法,该法快速、灵敏、准确,测试结果令人满意。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

胆固醇标准品 纯度>96%,上海博奥生物科技有限公司;正三十二烷内标标准品 纯度>97%,美国Acros Organics公司;无水乙醇、正己烷、石油醚(重蒸馏,馏分为30~60℃)、氢氧化钾、氯化钠 均为分析纯。

气相色谱仪 7890A,带FID检测器和自动进样

收稿日期 2009-11-30 *通讯联系人

作者简介 李伟(1985-)男,硕士研究生,主要从事色谱分析和酶工程方面的研究。

基金项目 广东省省级科技计划项目(G02B2061700)资助。

器 美国 Agilent 公司 漩涡振荡器 广州正一科技公司 离心机 恒温水浴锅 氮吹仪 50mL 圆底烧瓶 容量瓶等玻璃仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 标准储备液的配制 分别准确称取 100mg 和 1000mg 正三十二烷内标物于 100mL 容量瓶中,用正己烷稀释至刻度,得到 1mg/mL 和 10mg/mL 的内标储备液。准确称取 50mg 胆固醇于 50mL 容量瓶中,用 1mg/mL 的内标储备液稀释至刻度,得到 1mg/mL 的胆固醇标准储备液。

1.2.2 样品处理 称取鲑鱼油样品约 200mg 于 50mL 圆底烧瓶中,加入 1mol/L 的 KOH 乙醇溶液 4.0mL 及 10mg/mL 的正三十二烷内标液 0.1mL,振荡混匀,接上冷凝管,置于 65℃ 水浴中皂化 30min(每隔 5min 振荡一次)后取出,经流水冷却后,加入 10mL 乙醚,旋涡混匀 1min,加入 3mL 饱和食盐水,旋涡混匀 1min。取上层乙醚萃取液 1.5mL 于 2mL 离心管中,加入少量无水硫酸钠,旋涡混匀 1min,离心分离。取上清约 1mL,按选定色谱条件进样分析,内标法定量。

1.2.3 分析方法 色谱柱:HP-5 毛细管色谱柱 30m × 0.32mm × 0.25 μ m;载气:氮气;柱流速:2mL/min(恒流);氢气 30mL/min;空气 350mL/min;尾吹气:20mL/min;柱温 200℃ 保持 1min,以 10℃/min 升到 300℃,保持 3min;进样口温度 250℃;检测器温度:300℃;分流比 20:1;进样量 1 μ L。

1.2.4 单因素实验 考察不同萃取剂、温度、时间、KOH 乙醇液浓度对鲑鱼油中胆固醇总量测定的影响。

1.2.5 正交实验 在单因素实验的基础上,设计了 $L_9(3^4)$ 正交实验,确定油样最优处理条件,实验设计见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 温度 (℃)	B 时间 (min)	C KOH 浓度 (mol/L)	D 萃取剂
1	50	30	0.1	乙醚
2	65	45	0.5	正己烷
3	80	60	1	石油醚

2 结果与讨论

2.1 GC 分离

取 1.2.1 中 1mg/mL 的胆固醇标准储存液 1mL,按 1.2.2 中样品处理方法处理,并用上述 GC 条件进行分析,胆固醇与内标正三十二烷的分离结果见图 1。由图 1 可以看出,胆固醇先于正三十二烷出峰,二者保留时间接近,且能达到基线分离。

2.2 样品前处理条件

2.2.1 萃取剂的选择 文献报道能有效萃取胆固醇的常见溶剂有正己烷、石油醚和乙醚^[3-4]。本文以鲑鱼油样品皂化后胆固醇的检出量作为指标,对以上三种萃取剂进行了对比。在 1.2.2 的处理条件下,测得的结果见表 2。从表 2 可以看出,对于鲑鱼油样品,3 种萃取剂对胆固醇的提取效果差异不大,其中乙醚的提取效果最佳,石油醚略大于正己烷。

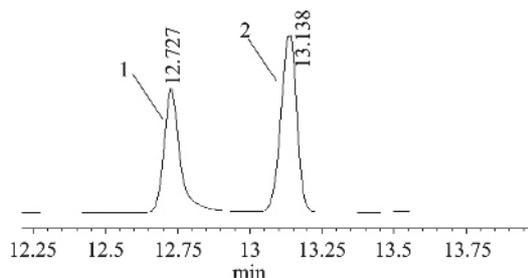


图 1 胆固醇标准品气相色谱图

注:1.胆固醇 2.正三十二烷。

表 2 胆固醇提取效率的比较

称样量(g)	萃取剂	胆固醇含量(mg/g)
200.12	正己烷	16.11
200.64	石油醚	16.70
201.10	乙醚	17.74

2.2.2 皂化条件的优化 鲑鱼油中胆固醇通常以游离态和胆固醇酯两种形式存在,油样皂化完全与否将直接影响胆固醇总量的测定^[7]。通常,皂化效果与碱液浓度、皂化时间和皂化温度有关。本文以乙醚为萃取剂,单因素实验考察了不同皂化温度、皂化时间以及 KOH 乙醇液浓度对胆固醇总量测定的影响。

在 1mol/L 的 KOH 乙醇液,皂化时间 60min 时,考察了不同温度(50、65、80、95℃)对胆固醇总量测定的影响,结果见图 2。从图 2 可以看出,不同温度对胆固醇测定值影响较大,65℃ 时测定的胆固醇含量最高。皂化本身为水解反应,从化学热力学的角度来看,该反应为放热反应,温度太高将不利于反应的进行,温度太低则会降低反应速率。

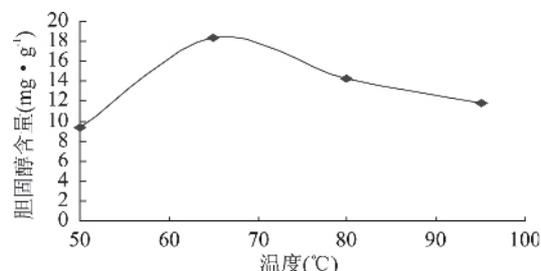


图 2 不同温度对皂化的影响

在 1mol/L 的 KOH 乙醇液,皂化温度为 65℃ 时,考察了不同时间(5、15、30、45、60min)对胆固醇总量测定的影响,结果见图 3,从图 3 可以看出,皂化时间在 30~45min 左右,胆固醇测定值可达到最高。

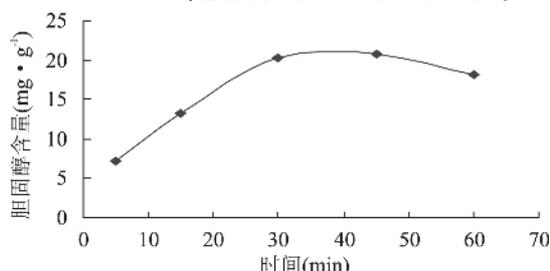


图 3 不同时间对皂化的影响

在皂化温度 65℃,时间 30min 时,考察了不同 KOH 乙醇液浓度(0、0.1、0.5、1、2mol/L)对胆固醇总量测定的影响,结果见图 4。从图 4 可以看出,KOH 乙醇液浓度在 0.1~0.5mol/L 时,胆固醇测定值较高,

表5 方法添加回收率实验结果

标准添加量(mg)	2.0				3.0			4.0		
称样量(mg)	200.12	200.35	200.41	200.65	200.22	200.47	200.28	200.52	200.71	
本底含量(mg/g)	28.93	29.21	29.34	29.41	28.97	29.32	28.92	29.38	29.44	
加标测定值(mg/g)	37.89	38.82	38.39	45.48	43.99	44.23	48.48	49.28	49.85	
回收率(%)	89.64	96.19	90.59	107.49	100.27	99.60	97.90	99.75	102.41	
平均回收率(%)	92.14 ± 3.54				102.45 ± 4.37			100.02 ± 2.27		

KOH 浓度增大,胆固醇测定值降低。这可能是由于高浓度的 KOH 乙醇液时生成的钾皂较多,并形成胶束包裹了一定含量的胆固醇。

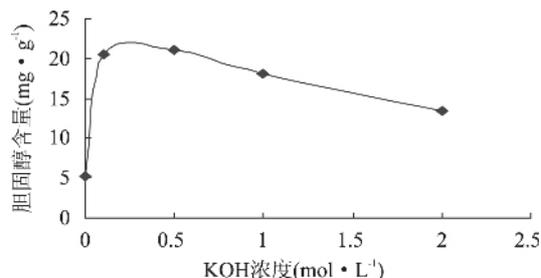


图4 不同 KOH 浓度对皂化的影响

2.2.3 正交实验结果 结果表明 $R_A > R_D > R_C > R_B$, 皂化温度对油样中胆固醇得率影响最大,其次是萃取剂和 KOH 乙醇液浓度,皂化时间对油样中胆固醇得率影响最小,最佳条件为 0.5 mol/L KOH 乙醇液, 65℃ 水浴中皂化 30min,乙醚为萃取剂,该结果与单因素实验基本吻合。

表3 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	胆固醇含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	25.52
2	1	2	2	2	22.96
3	1	3	3	3	20.90
4	2	1	2	3	26.97
5	2	2	3	1	25.88
6	2	3	1	2	24.54
7	3	1	3	2	23.21
8	3	2	1	3	25.27
9	3	3	2	1	25.52
K ₁	23.127	25.233	25.110	25.640	
K ₂	25.797	24.703	25.150	23.570	
K ₃	24.667	23.653	23.330	24.380	
R	2.670	1.580	1.820	2.070	

2.3 标准工作曲线与检测限

将 1.2.1 中胆固醇标准储存液用 1mg/mL 的内标液稀释成一系列浓度不同的标准溶液,浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mg/mL。各浓度标准溶液均取 1mL,通氮气流吹干,然后按 1.2.2 中样品处理方法处理,进 GC 检测,以标准物与内标物的质量比为横坐标,对应峰面积比为纵坐标,制作内标标准曲线,见图 5。从图 5 可以看出,当胆固醇浓度在 0.1~1mg/mL 范围内,其线性回归方程 $Y = 0.569X - 0.0059$,相关系数 $R^2 = 0.9992$ 。按信噪比为 3 计算检出限,该方法胆固醇的最低检出限为 2.21ng。

2.4 方法精密度研究

称取鲑鱼油 6 份(每份约 200mg),每份样品加入 0.1mL 的 10mg/mL 内标液,按 2.2.3 得到的最优方

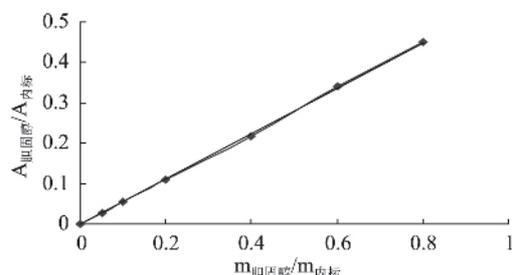


图5 胆固醇检测标准曲线图

注: $Y = A_{\text{胆固醇}}/A_{\text{内标}}$, $X = m_{\text{胆固醇}}/m_{\text{内标}}$, $m_{\text{内标}} = 1\text{mg}$ 。

法处理,胆固醇的测定结果见表 4。从表 4 可以看出,最优条件下胆固醇的含量为 $29.01 \pm 0.56\text{mg/g}$,相对标准偏差为 1.93%($n = 6$)。

表4 方法精密度研究

编号	1	2	3	4	5	6
胆固醇含量 (mg/g)	29.41	29.34	28.75	28.61	28.23	29.71
平均值(mg/g)	29.01 ± 0.56					
变异系数(%)	1.93					

2.5 方法添加回收率

本实验在鲑鱼油样品中加入胆固醇标准液,设置 10、15、20mg/g 三个浓度的添加水平。按 2.2.3 的最优方法处理,先测定样品中胆固醇的本底含量,再分别测定添加胆固醇标准后,样品中胆固醇的含量,并计算添加回收率,结果见表 5。从表 5 中可以得知,方法添加回收率在 89%~110% 之间,说明方法具有较高的准确度。

3 结论

鲑鱼油中胆固醇通常以游离态和胆固醇酯两种形成存在,油样皂化完全与否将直接影响胆固醇总量的测定。本文从单因素条件分别考察了萃取剂、KOH 乙醇液浓度、皂化时间和温度对胆固醇总量测定的影响,并通过正交实验设计确定了最优的油样处理条件;此外,还建立了以正三十二烷为内标物的胆固醇 GC/FID 分析方法,该方法灵敏、准确。在最优条件下:采用乙醚为萃取液、0.5mol/L KOH 乙醇液、皂化温度 65℃、皂化时间 30min 时,测定的胆固醇总量为 $29.01 \pm 0.56\text{mg/g}$ 。

参考文献

- [1] 黄磊,詹勇,许梓荣. 虾蟹类胆固醇需要量的最新研究[J]. 饲料研究, 2004(11): 41-43.
- [2] 汪留全,李海洋,胡王. 饲料中胆固醇水平对幼蟹生长和饲料利用率影响的研究[J]. 淡水渔业, 2004, 34(1): 13-15.
- [3] 张晶,汤均,谭莹,等. 气相色谱-氢火焰离子化检测器测定奶茶饮料中的胆固醇[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): (下转第 289 页)

表2 线性关系、相关系数、检测限和定量限

项目名称	线性范围(μg/mL)	相关系数 R ²	线性方程	检测限(μg/mL)	定量限(μg/mL)
PC	0.191~1.910	0.9959	Y = 54.137X + 1.6733	0.05	0.19
LPC	0.236~2.360	0.9986	Y = 192.16X + 17.50	0.07	0.24
GPC	0.016~0.160	0.9991	Y = 210.13X + 14.021	0.005	0.016

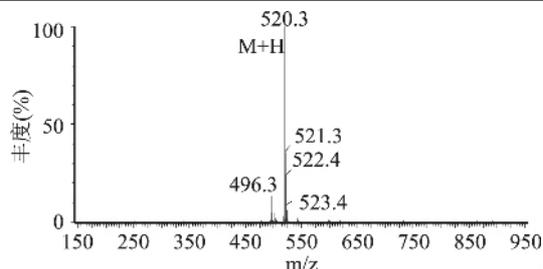


图3 LPC的质谱图(m/z520)

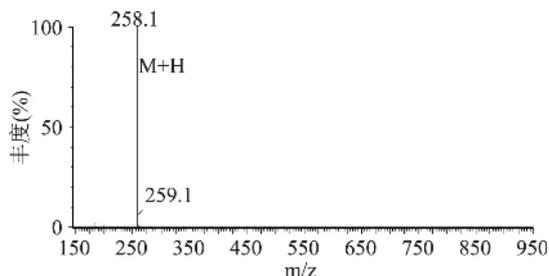


图4 GPC的质谱图(m/z258)

2.4 线性关系、检测限和定量限

准确称取标准品 PC 1.91mg, LPC 2.36mg 和 GPC 4.30mg 于 25mL 容量瓶, 用甲醇定容, 适量稀释至 PC 的最终浓度为 0.191、0.382、0.764、1.146、1.528、1.910μg/mL 的标准系列溶液, LPC 的最终浓度为 0.236、0.472、0.944、1.416、1.888、2.360μg/mL 的标准系列溶液, GPC 的最终浓度为 0.016、0.032、0.064、0.096、0.128、0.160μg/mL 的标准系列溶液。进样 10μL, 经超高效液相色谱-质谱仪测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行回归分析, 绘制标准曲线, 线性范围、相关系数和线性方程如表 2。

将 PC、LPC 和 GPC 标准溶液逐级稀释后, 可以测得其最低检测限($S/N \geq 3$)和最低定量限($S/N \geq 10$)。检测限和定量限如表 2。

2.5 回收率和精密度

在已知 PC、LPC 和 GPC 含量的空白豆酱样品中添加不同量的 PC、LPC 和 GPC 标样, 作加样回收率实验, 平均回收率为 93.2%~97.8%, 相对标准偏差为 1.5%~3.5%, 测定的结果如表 3。

2.6 实际样品的检测

应用本法测定不同批次的豆酱样品, 可以检测到 PC 的检出浓度为 10~16mg/kg, LPC 和 GPC 的检出浓度均处在 10~20μg/kg 范围内。

表3 加样回收率测定结果(n=3)

项目名称	添加浓度(μg/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
PC	3.82	93.7	2.3
	11.46	95.6	2.2
	19.10	94.1	1.6
LPC	4.72	95.5	1.5
	14.16	94.1	3.1
	23.60	95.3	3.5
GPC	0.16	93.2	1.9
	0.48	95.5	2.6
	0.80	97.8	2.5

3 结论

本实验采用超高效液相色谱-质谱联用的方法测定豆酱中 PC、LPC 和 GPC 含量, 具有操作方便、样品处理简单、分析时间短、方法准确、灵敏度高、精密度高、重现性好的优点。通过对仪器色谱条件和质谱条件各项参数的优化, 用 ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱, 在 10min 的时间里将 PC、LPC 和 GPC 这三种极性差别悬殊的物质有效分离和检测, 有效地监控豆酱中 PC 的降解反应。

参考文献

- [1] 黄玉玲, 王洪. 豆瓣酱中黄酮类物质的测定[J]. 中国调味品, 2009, 34(6): 86-88.
- [2] 余浪, 阚建全. 传统豆瓣的研究进展[J]. 中国调味品, 2008(5): 26-31.
- [3] 董晓涓, 冯学伟. 高效液相法测定大豆磷脂中的磷脂酰胆碱[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2000, 26(3): 315-317.
- [4] 曹栋, 裘爱泳. 磷脂及磷脂酰胆碱生物学功能[J]. 粮食与油脂, 2002(11): 23-24.
- [5] 胡援, 闫春. 大豆磷脂乳饮料的开发及疗效[J]. 食品科学, 1993(11): 37-39.
- [6] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.
- [7] 亢爱春, 霍勇, 齐丽彤. 溶血磷脂酰胆碱在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006(14): 12.
- [8] 莫建光, 卢安根, 徐慧, 等. 食品中磷脂酰胆碱检测技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010(1): 409-411.
- [9] 刘明, 徐维峰, 吴文忠. 大豆卵磷脂中脂肪酸组成分析[J]. 大连大学学报, 2009, 30(6): 32-33.

(上接第 286 页)

106-107.

[4] 金米聪, 王立, 符展明. 毛细管气相色谱法同时测定鸡蛋中的胆固醇和 α-维生素 E[J]. 色谱, 2001, 19(5): 478-480.

[5] 鲍忠定, 许荣年, 张颂红. 毛细管气相色谱法测定油中植物甾醇和胆固醇[J]. 分析化学研究简报, 2002, 30(12): 1490-1493.

[6] 彭春喜, 赖毅东. GC-MS 法测定食品中胆固醇含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 281-284.

[7] Bao-Shyung Hwang, Jih-Terng Wang, Youk-Meng Choong. A simplified method for the quantification of total cholesterol in lipids using gas chromatography[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2003, 16: 169-178.