

高效液相色谱法测定玉米植物甾醇中 豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇

刘景凡, 孙 聪, 梁少华

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:旨在为玉米植物甾醇的实际生产或深度开发利用奠定基础,建立了一种同时测定玉米植物甾醇中豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的高效液相色谱检测方法。采用 Waters Symmetry C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 二极管阵列检测器, 检测波长 205 nm, 甲醇-水(体积比 92:8)为流动相进行检测, 外标法进行定量。结果表明:3 种甾醇单体在 125~2 000 μ g/mL 质量浓度范围内线性关系良好, 检出限均不大于 0.07 μ g/mL; 3 种甾醇单体的峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)在仪器精密度实验中介于 0.24%~1.23%, 在样品重复性实验中介于 0.61%~2.38%, 在日内稳定性实验中介于 0.13%~2.92%, 在日间稳定性实验中介于 0.67%~3.43%; 3 种甾醇单体的加标回收率在 76.86%~105.74% 之间, RSD 均小于 5%。综上, 该方法具有灵敏度高、准确性好、操作简便、稳定性好的特点, 可实现玉米植物甾醇中豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的定量分析。

关键词:玉米植物甾醇; 豆甾醇; 菜油甾醇; β -谷甾醇; 高效液相色谱

中图分类号: O657; TS229

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2025)06-0134-05

Determination of stigmasterol, campesterol and β -sitosterol in corn sterols by high performance liquid chromatography

LIU Jingfan, SUN Cong, LIANG Shaohua

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Aiming to lay the foundation for the actual production or deep exploitation and utilization of corn sterols, a high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the simultaneous determination of stigmasterol, campesterol and β -sitosterol in corn sterols. The separation was performed on a Waters Symmetry C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with a diode array detector at a detection wavelength of 205 nm, and methanol-water (volume ratio 92:8) as the mobile phase, and the analytes was quantified by external standard method. The results showed that the linearity of the three sterol monomers was good in the range of 125–2 000 μ g/mL, and the detection limits were not more than 0.07 μ g/mL for all of them. The relative standard deviations (RSD) of the peak area and retention time of the three sterol monomers ranged from 0.24% to 1.23% in the instrumental precision experiments, from 0.61% to 2.38% in the sample reproducibility experiments, from 0.13% to 2.92% in the intra-day stability experiments, and from 0.67% to 3.43% in the inter-day stability experiments. The recoveries of the three sterol monomers ranged from 76.86% to 105.74%, and the

RSD were less than 5%. In conclusion, the method is characterized by high sensitivity, good accuracy, easy operation and good stability, and can realize the quantitative analysis of stigmasterol, campesterol and β -sitosterol in corn sterols.

Key words: corn sterols; stigmasterol; campesterol; β -sitosterol; HPLC

收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-12-02

基金项目: 国家“十三五”重点研发基金资助项目(2018YFD0401100)

作者简介: 刘景凡(1998), 女, 硕士研究生, 研究方向为油脂化学与品质(E-mail) 1663543438@qq.com。

通信作者: 梁少华, 教授(E-mail) shaohuali832@126.com。

近几年,随着玉米产业的飞速发展,我国玉米胚芽油的产量显著提高,占植物油总产量的 5% ~ 8%^[1]。在玉米胚芽油脱臭过程中,回收的脱臭馏出物占油脂总量的 0.3% ~ 0.6%。玉米胚芽油脱臭馏出物中含有 8% ~ 13% 的甾醇^[2],可对其加以利用,增加玉米胚芽油脱臭馏出物的附加值。植物甾醇主要包括 β -谷甾醇、菜油甾醇和豆甾醇等,具有降胆固醇^[3-4]、抑制肿瘤^[5-6]、防治前列腺疾病^[7]、促进新陈代谢、抗氧化和生发养发等生理功能,被广泛应用于化工、医药、食品等领域^[8-11]。

目前,关于植物甾醇的定量分析方法主要有毛地黄皂苷法、Lieberman - Burchard 比色法(L - B 比色法)、薄层色谱(TLC)法、气相色谱(GC)法^[12-13]、高效液相色谱(HPLC)法^[14-15]、气相色谱 - 质谱联用(GC - MS)法^[16-17]、液相色谱 - 质谱联用(LC - MS)法^[18]等。毛地黄皂苷法中所使用的毛地黄皂苷价格昂贵且操作复杂;L - B 比色法易受外界干扰,误差较大;TLC 法操作复杂,数据可靠性差;GC 法和 GC - MS 法分辨率高,热稳定性好,但甾醇分子中的极性羟基沸点高,难以汽化,因此在测定之前需要对样品进行硅烷化处理,耗时长,且所用试剂毒性大、成本高^[19],此外,仪器运行对温度要求较高,易分解或破坏待测组分^[20];LC - MS 法具有灵敏度高、选择性强的特点,但仪器操作及维护烦琐,对操作人员要求较高^[18];HPLC 法是一种常见的色谱技术,不需要衍生化,可直接进样分析,操作简便、准确度高,灵敏度好^[14],但由于豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇结构相似,易发生共洗脱效应,影响检测结果的准确性,如 Zhang 等^[21-22]以乙腈 - 异丙醇 - 水作为 HPLC 流动相检测甾醇时发现豆甾醇和菜油甾醇产生共洗脱效应,吕国提^[23]以 100% 甲醇作为 HPLC 流动相检测时发现菜油甾醇和 β -谷甾醇的色谱峰无法较好地分离,从而影响各甾醇单体的准确定量。因此,建立一种可准确测定玉米植物甾醇中的豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的 HPLC 检测方法具有重要意义。本文构建了一种基于 HPLC 定量分析玉米植物甾醇中豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的方法,以期玉米植物甾醇的实际生产或深度开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米植物甾醇,西安国邦实业有限公司;植物甾醇混合标准品(98.0%),美国 Sigma 公司;甲醇、异丙醇(色谱级),美国 VBS 有限公司。

Waters 1525 高效液相色谱仪、2998 二极管阵列

检测器,美国 Waters 有限公司;SartoriusBSA224S 型分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;HZT - A2000 电子天平,郑州华志科学仪器有限公司;XW - 80A 涡旋振荡器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取 10 mg 植物甾醇混合标准品于 5 mL 容量瓶中,加异丙醇溶解并定容,配制成 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液,用异丙醇稀释成质量浓度分别为 1 000、500、250、125 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液。

1.2.2 样品溶液的制备

称取 10 g 玉米植物甾醇于三颈烧瓶中,加入 90 mL 无水乙醇,在搅拌条件下加热回流 30 min,趁热过滤后,将滤液快速转移至制冷加热循环器,在搅拌速率 50 r/min 的条件下以 0.4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 25 $^{\circ}\text{C}$,养晶 2 h 后,将样品迅速转移至布氏漏斗中抽滤,加入适量的 4 $^{\circ}\text{C}$ 无水乙醇快速冲洗,至无液滴滴下时结束,氮吹干燥。称取一定量的上述干燥样品溶解于异丙醇中,用 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后,转移至样品瓶中待 HPLC 测定。

1.2.3 HPLC 条件

Waters Symmetry C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);色谱柱温度 30 $^{\circ}\text{C}$;流速 1 mL/min;等度洗脱,流动相为甲醇 - 水(体积比 92:8);进样量 10 μL ;二极管阵列检测器;检测时间 25 min;检测波长 205 nm^[23]。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

本实验考察了不同体积比甲醇 - 水作为流动相对豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的色谱峰峰形及分离效果的影响。结果显示:使用 100% 甲醇洗脱时峰形窄且对称,分析时间短,但 3 种甾醇单体未分离开;随着甲醇中水添加比例的增大,3 种甾醇单体的色谱峰逐渐分离,检测时间延长,当甲醇与水体积比为 92:8 时,3 种甾醇单体完全分离,柱效较高,峰形对称,其色谱图见图 1。

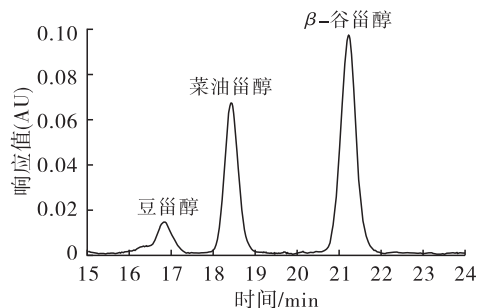


图 1 豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的色谱图

Fig.1 Chromatograms of stigmasterol, campesterol and β -sitosterol

2.2 方法线性关系和检出限、定量限

将按 1.2.1 方法配制的不同质量浓度的植物甾醇标准工作溶液,按 1.2.3 色谱条件进行检测,以豆甾醇、菜油甾醇和β-谷甾醇的质量浓度(x)为横坐

标,以其对应的峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,基于响应值标准偏差(S)和标准曲线斜率(M)法计算检出限和定量限,以 3 倍 S/M 作为检出限,10 倍 S/M 作为定量限,结果见表 1。

表 1 3 种甾醇单体的保留时间、线性方程、检出限和定量限

Table 1 Retention time, linear equation, detection limits and quantitative limits of three sterol monomers

组分	保留时间/min	线性方程	相关系数	检出限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
豆甾醇	16.76	$y = 4\,533.7x - 109.6$	0.999 5	0.01	0.04
菜油甾醇	18.40	$y = 4\,408.1x + 4\,594.2$	0.999 0	0.05	0.17
β-谷甾醇	21.22	$y = 4\,443.3x + 6\,147.1$	0.999 1	0.07	0.24

由表 1 可知,在该检测条件下豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇的出峰时间分别为 16.76、18.40、21.22 min,分离效果较好。3 种甾醇单体的检出限为 0.01~0.07 μg/mL,定量限为 0.04~0.24 μg/mL。豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇在 125~2 000 μg/mL 质量浓度范围内线性相关系数均大于 0.99,线性关系良好,能够满足分析的要求,可用于豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇的定量分析。

2.3 仪器精密度

制备 2 mL 524 μg/mL 的植物甾醇标准溶液,按 1.2.3 色谱条件重复进样 6 次,分别记录豆甾醇、菜油甾醇和β-谷甾醇的保留时间和峰面积,并计算豆甾醇、菜油甾醇和β-谷甾醇的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD),结果如表 2 所示。

表 2 仪器精密度($n=6$)

Table 2 Precision of instrument($n=6$)

组分	平均峰面积	RSD _{峰面积} /%	平均保留时间/min	RSD _{保留时间} /%
豆甾醇	781 279	1.23	16.76	0.25
菜油甾醇	3 251 535	0.73	18.40	0.24
β-谷甾醇	5 312 755	0.69	21.22	0.25

由表 2 可知,豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇的峰面积和保留时间的 RSD 分别为 0.69%~1.23% 和 0.24%~0.25%,均小于 5%,表明该方法对豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇的定量分析具有良好的精

密度,可靠性高。

2.4 样品重复性

按 1.2.2 方法制备待测样品溶液,按 1.2.3 色谱条件重复进样 6 次,分别记录豆甾醇、菜油甾醇和β-谷甾醇的保留时间和峰面积,计算豆甾醇、菜油甾醇和β-谷甾醇的保留时间和峰面积的 RSD,结果如表 3 所示。

表 3 样品重复性($n=6$)

Table 3 Sample repeatability($n=6$)

组分	平均峰面积	RSD _{峰面积} /%	平均保留时间/min	RSD _{保留时间} /%
豆甾醇	393 482	2.38	16.99	0.61
菜油甾醇	1 586 206	1.06	18.63	0.65
β-谷甾醇	2 580 894	1.34	21.47	0.71

由表 3 可知,豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇的峰面积和保留时间的 RSD 分别为 1.06%~2.38% 和 0.61%~0.71%,均小于 5%,说明该方法对豆甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇的分离及定量影响较小,样品在进样时误差小、准确性高。

2.5 样品稳定性

2.5.1 日内稳定性

按 1.2.2 方法制成 500、1 000、1 500 μg/mL 质量浓度的样品溶液,在同一天每隔 2 h 重复进样 6 次,分别计算豆甾醇、菜油甾醇和β-谷甾醇的保留时间和峰面积的 RSD,考察日内稳定性,结果如表 4 所示。

表 4 日内稳定性($n=6$)

Table 4 Intra-day stability($n=6$)

组分	质量浓度/(μg/mL)	平均峰面积	RSD _{峰面积} /%	平均保留时间/min	RSD _{保留时间} /%
豆甾醇	500	188 591	2.92	16.74	0.26
	1 000	408 387	2.30	16.75	0.13
	1 500	688 803	2.19	16.74	0.23
菜油甾醇	500	800 463	1.52	18.34	0.25
	1 000	1 686 469	1.37	18.36	0.13
	1 500	2 906 773	1.07	18.37	0.25
β-谷甾醇	500	1 292 926	2.50	21.10	0.26
	1 000	2 727 375	1.00	21.13	0.14
	1 500	4 721 920	0.38	21.17	0.24

由表 4 可知,豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的峰面积和保留时间的 RSD 分别为 0.38% ~ 2.92% 和 0.13% ~ 0.26%,均小于 5%,表明该方法在 12 h 内对豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的检测结果较为准确。

表 5 日间稳定性 ($n=6$)
Table 5 Inter-day stability ($n=6$)

组分	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	平均峰面积	RSD _{峰面积} /%	平均保留时间/min	RSD _{保留时间} /%
豆甾醇	500	189 725	2.32	16.98	0.67
	1 000	404 884	1.71	16.98	0.93
	1 500	693 183	2.56	17.00	0.71
菜油甾醇	500	808 099	1.46	18.60	0.71
	1 000	1 699 802	1.91	18.61	0.90
	1 500	2 924 308	1.55	18.66	0.70
β -谷甾醇	500	1 291 417	3.43	21.39	0.74
	1 000	2 741 942	1.98	21.44	0.93
	1 500	4 744 929	2.12	21.51	0.73

由表 5 可知,豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的峰面积和保留时间的 RSD 分别为 1.55% ~ 3.43% 和 0.67% ~ 0.93%,均小于 5%,表明该方法在 6 d 内对豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的检测结果较为准确。

表 6 加标回收实验结果 ($n=3$)
Table 6 Results of recovery experiments ($n=3$)

组分	本底值/($\mu\text{g/mL}$)	加标水平/($\mu\text{g/mL}$)	测定值/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	RSD/%
豆甾醇	34.95	13.68	47.86	94.37	4.09
	34.95	24.63	53.88	76.86	1.70
	34.95	32.84	69.01	103.71	1.58
菜油甾醇	132.33	56.84	192.43	105.74	4.04
	132.33	102.31	225.97	91.53	2.67
	132.33	136.41	257.19	91.53	4.37
β -谷甾醇	222.81	91.19	307.11	92.44	4.18
	222.81	164.14	366.42	87.49	4.36
	222.81	218.86	408.46	84.83	4.20

由表 6 可知,玉米植物甾醇样品中 3 种甾醇单体的加标回收率在 76.86% ~ 105.74% 之间,RSD 均小于 5%,表明该方法测定豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇时受其他成分干扰较小,精密度好,准确度高。

3 结 论

本实验建立了玉米植物甾醇中豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的 HPLC 测定方法。以甲醇-水(体积比 92:8)为流动相,外标法定量测定样品中植物甾醇的含量。在 125 ~ 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓

2.5.2 日间稳定性

移取 500、1 000、1 500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的样品溶液,每隔 24 h 测定 1 次,共测 6 次,分别计算豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的保留时间和峰面积的 RSD,考察日间稳定性,结果如表 5 所示。

2.6 方法加标回收率和精密度

移取一定量 1.2.2 处理后的玉米植物甾醇样品,分别添加 3 个水平的植物甾醇混合标准品,按照 1.2.3 色谱条件测定各甾醇的含量,计算样品的加标回收率及其 RSD,结果见表 6。

度范围内,豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的线性关系良好,检出限为 0.01 ~ 0.07 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.04 ~ 0.24 $\mu\text{g/mL}$,加标回收率在 76.86% ~ 105.74% 之间,RSD 均小于 5%。在仪器精密度、样品重复性、日内稳定性、日间稳定性实验中,豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 5%。综上,该方法具有灵敏度高、准确性好、操作简单、稳定性好的特点,可用于玉米植物甾醇中豆甾醇、菜油甾醇和 β -谷甾醇的定量分析。

参考文献:

- [1] 张雅娜, 张晟, 周媛媛, 等. 水酶法提取玉米胚芽油的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 253 – 256.
- [2] 吕双双. 玉米胚芽油脱臭馏出物中甾醇和 V_E 的提取及甾醇性能研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2015.
- [3] 梁娇, 张鹰. 植物甾醇提取分离方法研究进展[J]. 食品安全导刊, 2020(23): 29.
- [4] VOLGER O L, MENSINK R P, PLAT J, et al. Dietary vegetable oil and wood derived plant stanol esters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE * 3 – Leiden transgenic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 157 (2): 375 – 381.
- [5] 杜茹芸, 徐红斌, 周耀斌. 超高效液相色谱法检测固体粉状保健品中豆甾醇、菜油甾醇、 β – 谷甾醇的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(21): 7189 – 7193.
- [6] AWAD A B, WILLIAMS H, FINK C S. Phytosterols reduce *in vitro* metastatic ability of MDA – MB – 231 human breast cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2001, 40 (2): 157 – 164.
- [7] COLEMAN C I, HEBERT J H, REDDY P. The effect of phytosterols on quality of life in the treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. *Pharmacotherapy*, 2002, 22 (11): 1426 – 1432.
- [8] AWAD A B, FINK C S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action [J]. *J Nutr*, 2000, 130(9): 2127 – 2130.
- [9] 毛文岳, 段向东, 邵琳雅, 等. 牡丹花粉植物甾醇的分析及其与油菜花粉的比较[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(11): 35 – 37.
- [10] JONES P J, MACDOUGALL D E, NTANIOS F, et al. Dietary phytosterols as cholesterol – lowering agents in humans [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997, 75 (3): 217 – 227.
- [11] 李玉莲, 何炯斌, 谭红, 等. 植物甾醇饲喂育肥猪效果研究及经济效益分析[J]. 中国猪业, 2023, 18(6): 46 – 49, 52.
- [12] 黄银波, 花露, 陈君, 等. 气相色谱法测定植物甾醇中 β – 谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇的含量[J]. 现代食品, 2021(14): 179 – 182.
- [13] 张颖霞, 张成, 杨慧, 等. 气相色谱法测定动植物油脂中甾醇方法的改进科技[J]. 粮油食品, 2019, 27(5): 65 – 68.
- [14] 尹君, 胡鹏辉, 舒畅. 高效液相色谱法同时检测脂类药用辅料中胆甾醇、豆甾醇和 β – 谷甾醇的含量[J]. 中南药学, 2022, 20(3): 609 – 612.
- [15] 董笑菲. HPLC 法测定发酵冬虫夏草菌丝粉中麦角甾醇的含量[J]. 现代食品, 2019(18): 154 – 157.
- [16] 束彤, 常应九, 高庆超, 等. 利用 GC – MS 检测和鉴定沙棘籽油甾醇[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(5): 7 – 12.
- [17] 林晨, 黄丽英. GC – MS 分析不同栽培模式金线莲药材中的甾醇类物质的含量[J]. 海峡药学, 2022, 34 (4): 112 – 115.
- [18] 石晶, 顾强, 乙小娟, 等. 高效液相色谱 – 质谱法测定橄榄油中 β – 谷甾醇的含量[J]. 食品科技, 2015, 40 (6): 352 – 354, 359.
- [19] 木其尔, 夏欣然, 杨春雪, 等. 气相色谱法测定食品中植物甾醇含量研究[J]. 中国食物与营养, 2021, 27 (11): 19 – 23.
- [20] FENG S, LIU S, LUO Z, et al. Direct saponification preparation and analysis of free and conjugated phytosterols in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by reversed – phase high – performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2015, 181: 9 – 14.
- [21] ZHANG X, CAMBRAI A, MIESCH M, et al. Separation of $\Delta 5$ – and $\Delta 7$ – phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high – performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54 (4): 1196 – 1202.
- [22] ZHANG X, GEOFFROY P, MIESCH M, et al. Gram – scale chromatographic purification of *beta* – sitosterol. Synthesis and characterization of *beta* – sitosterol oxides [J]. *Steroids*, 2005, 70(13): 886 – 895.
- [23] 吕国提. 毛竹笋头中 β – 谷甾醇的提取分离研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.