

检测分析

凝胶净化结合高效液相色谱-蒸发光散射检测器 测定食用油脂中胆固醇含量

吴立平¹, 曾 辉¹, 孙咏梅¹, 谢冰莹²

(1. 攀枝花市产品质量监督检验所, 四川 攀枝花 617000; 2. 攀枝花学院, 四川 攀枝花 617000)

摘要:建立了凝胶净化系统与高效液相色谱-蒸发光散射检测器结合对食用油脂中胆固醇含量测定的方法。结果表明:胆固醇质量浓度在2~200 μg/mL范围内,胆固醇质量浓度的对数与峰面积对数线性关系良好,相关系数为0.998 9,检出限为10 mg/kg,回收率为94.01%~103.80%,相对标准偏差为1.12%~7.25%。该方法可有效减少烦琐的前处理过程对样品中胆固醇含量造成的损失,避免检测过程中出现溶剂响应和溶剂峰干扰,方法简单、可行、有效。

关键词:食用油脂;胆固醇;凝胶净化;蒸发光散射检测器

中图分类号:TS227;O657.7

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)06-0147-03

Determination of cholesterol content in edible oils and fats by gel permeation chromatography combined with high performance liquid chromatography – evaporative light scattering detector

WU Liping¹, ZENG Hui¹, SUN Yongmei¹, XIE Bingying²

(1. Panzhihua Product Quality Supervision and Inspection Institute, Panzhihua 617000, Sichuan, China; 2. Panzhihua University, Panzhihua 617000, Sichuan, China)

Abstract: A method for the determination of cholesterol content in edible oils and fats was established by gel permeation chromatography system combined with liquid chromatography – evaporative light scattering detector. The results showed that the linearity correlation was good in the range of 2 – 200 μg/mL with correlation efficient 0.998 9. The limit of detection, recovery rate and relative standard deviation were 10 mg/kg, 94.01% – 103.80% and 1.12% – 7.25% respectively. The method could effectively reduce the loss of cholesterol caused by cumbersome pre – treatment process, and avoid solvent response and solvent peak interference during detection. The method was proved to be simple, feasible and effective.

Key words: edible oils and fats; cholesterol; gel permeation; evaporative light scattering detector

胆固醇又称胆甾醇,是动物组织细胞不可缺少的重要物质,其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^[1-2]。但过多摄入胆固醇,会引起高胆固醇血症、心肌缺血、心绞痛、脑软化、脑梗塞、冠心病等^[3-4],严重者会导致急性心肌梗塞甚至猝死。

食用油脂主要分为动物油脂、植物油脂和动植物混合油脂,由于自然界中的胆固醇主要存在于动

物性食物之中,植物性食物中只存在结构上与胆固醇十分相似的物质——植物固醇,故本方法只研究动物油脂和动植物混合油脂。食用油脂中胆固醇测定常见于比色法、酶催化法、气相色谱法、液相色谱-紫外检测法、液相色谱-质谱法^[5-7],前处理方法普遍采用皂化、提取与浓缩的方法,其前处理过程烦琐,易造成胆固醇损失,影响检验结果的准确性^[8]。本文采用凝胶净化系统进行前处理结合高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定的方法相较于传统检测方法简化了皂化与提取过程,充分利用了凝胶净化系统预分离与净化功能^[9],又发挥了蒸发光抗干扰能力强的特点,可有效减少因烦琐的前处

收稿日期:2017-05-08;修回日期:2018-01-12

作者简介:吴立平(1981),男,工程师,研究方向为食品仪器分析(E-mail)34843017@qq.com。

理过程导致的胆固醇损失,还可有效改善重现性低与溶剂干扰问题,方法简单有效。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用动物油脂样品为攀枝花市食用动物油脂生产企业送检样品,动植物混合油脂样品为攀枝花市餐饮企业中抽检样品。

乙酸乙酯(色谱纯)、环己烷(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、胆固醇标准物质(纯度99.6%),中国计量科学研究院。

U3000型双三元液相色谱仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;GPC Cleanup 800全自动凝胶净化系统;2000ES型蒸发光散射检测器,美国奥泰科技有限公司;mLINE单道手动移液器,芬兰百得实验仪器(苏州)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

分别称取0.5 g(精确至0.01 g)动物油脂样品和动植物混合油脂样品于不同容量瓶中,用乙酸乙酯-环己烷(1:1)溶液^[10-11]分别定容至10.0 mL,经凝胶色谱装置净化(凝胶色谱柱Bio-Beads S-X3(20 mm×300 mm),流动相为乙酸乙酯-环己烷(1:1),流速5 mL/min,流出收集时间25 min,检测波长205 nm,进样量5.0 mL),收集流出液,氮吹至近干,用无水乙醇定容至5.0 mL,溶液过0.45 μm有机滤膜,收集滤液于进样瓶中,待液相色谱测定。

1.2.2 标准溶液配制

胆固醇标准储备液(1.0 mg/mL):准确称取胆固醇标准品0.05 g(精确至0.1 mg),用无水乙醇溶解并定容至50 mL。

胆固醇标准使用液(200 μg/mL):吸取胆固醇标准储备液10 mL,用无水乙醇定容至50 mL。

胆固醇标准工作液:分别吸取胆固醇标准使用液10、25、50、250、500、1 000 μL于1.5 mL进样瓶中,用移液管再分别吸取无水乙醇990、975、950、750、500、0 μL,该标准系列工作液的质量浓度分别为2、5、10、50、100、200 μg/mL。

1.2.3 高效液相色谱条件

Thermo Hypersil GOLD C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇,柱温35℃,流速1.0 mL/min;进样量10 μL^[9]。蒸发光散射检测器条件:漂移管温度70℃,雾化器气体流量2.5 L/min,工作模式,不分流模式(撞击器关闭)^[12],信号放大系数1。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的线性范围和检出限

因蒸发光散射检测器响应值与粒子质量(浓

度)成双对数关系^[13-14],故以标准溶液质量浓度的自然对数(X)为横坐标,以相应峰面积的自然对数(Y)为纵坐标进行线性回归,其线性回归方程为 $Y=1.352X+4.388$,相关系数 $R^2=0.9989$,线性范围2~200 μg/mL。本方法采用3倍信噪比所对应质量浓度为仪器检出限,计算出3倍信噪比所对应质量浓度为0.5 μg/mL,按本方法计算方法检出限为10 mg/kg。

2.2 回收率及精密度实验

分别称取同一均匀动物油脂样品(胆固醇含量0.55 g/kg)0.50 g共18份,将样品分成3组,按低、中、高3个加标量加入标准溶液于3组样品中,将3组样品按照1.2.1方法进行前处理后其样品溶液中胆固醇含量分别达到32.5、87.5、177.5 μg/mL,进行6样本平行分析,计算回收率与精密度,测定结果见表1。动植物混合油脂样品(胆固醇含量0.26 g/kg)回收率及精密度实验与动物油脂样品回收率及精密度实验方法相同,加标后样品溶液中胆固醇含量分别达到18.0、73.0、163.0 μg/mL,测定结果见表2。

从表1、表2可以看出,动物油脂样品线性范围内加标回收率可达94.78%~103.80%,相对标准偏差(RSD)在1.57%~7.23%之间;动植物混合油脂样品线性范围内加标回收率可达94.01%~98.81%,相对标准偏差(RSD)在1.12%~7.25%之间。

表1 动物油脂样品胆固醇含量测定回收率及精密度实验结果

样品本底值/ (μg/mL)	加标量/ (μg/mL)	测定值/ (μg/mL)	RSD /%	平均回收率/%
27.5	5	32.391 1	7.23	103.80
		32.564 1		
		32.386 3		
		33.256 7		
		33.063 8		
	60	32.476 5		
		89.994 7		
		88.647 1		
		85.334 9		
		86.002 4		
150	87.929 3	3.52	101.00	
	90.707 6			
	170.000 0			
	171.014 7			
	168.370 0			
27.5	150	170.354 8	1.57	94.78
		172.336 9		
		165.974 4		

表2 动植物混合油脂样品胆固醇含量测定回收率及精密度实验结果

样品本底值/ ($\mu\text{g/mL}$)	加标量/ ($\mu\text{g/mL}$)	测定值/ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD/%	平均回收率/%
13.0	5.0	17.553 3	7.25	94.01
		17.992 9		
		17.759 0		
		18.148 9		
		17.541 5		
		17.206 9		
		71.968 4		
13.0	60.0	72.978 9	1.47	98.81
		70.846 7		
		72.891 3		
		71.936 5		
		73.100 2		
		155.950 0		
		156.331 1		
13.0	150.0	157.645 9	1.12	96.22
		160.335 4		
		157.356 4		
		156.335 8		

2.3 讨论

本方法检出限达到 10 mg/kg, 相较于国家标准方法 GB 5009. 128—2016《食品安全国家标准 食品中胆固醇的测定》具有更低的检出限; 由于蒸发光散射检测器固有特性, 检测中不会出现类似紫外检测器或者二极管阵列检测器中负溶剂峰现象, 其色谱峰峰形对称, 干扰较小。标准溶液系列线性相关系数可达 0. 998 9, 超过国家标准 GB/T 27404—2008 对检测方法确认的要求, 同采用国家标准方法使用容量瓶为定容容器配相同质量浓度的标准溶液进行对比, 其峰响应值相近程度达到 99. 7% 以上。

采用乙酸乙酯-环己烷溶液直接提取结合凝胶净化系统处理方法相较于采用传统皂化、提取、浓缩前处理方法, 凝胶系统因具有净化与预分离作用, 减少了杂质干扰, 也减少了过多操作步骤造成的成分损失与误差^[15], 提高了样品加标回收率, 样品检测重现性更好, RSD 也在国家标准 GB/T 27404—2008 对检测方法确认的控制范围内。

3 结论

利用凝胶净化结合高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定食用油脂中胆固醇含量的方法检出限为 10 mg/kg, 测定食用油脂时回收率可达 94. 01% ~ 103. 80%; 对于低含量的样品测定时精密度在 7. 5% 以内, 检测中不会出现溶剂峰干扰。前处理过程采用乙酸乙酯-环己烷溶液直接提取结合凝胶净

化系统的方法可简化传统胆固醇测定中前处理过程, 有利于提高工作效率, 降低系统误差。

通过实验验证, 该方法不仅适用于食用油脂中胆固醇含量测定, 同样也适用于包含动物性食品、动植物混合性食品胆固醇含量测定, 并具有与食用油脂中胆固醇含量测定相近的检出限、回收率以及 RSD。另外, 本方法可以作为胆固醇含量常用检测方法的一种补充, 对于同时具有蒸发光散射检测器与紫外检测器或者二极管阵列检测器的实验室可以扩展仪器故障排查的方式与实验室内部仪器、方法比对方式。关于社会普遍关注的餐饮行业是否使用回收油脂或“地沟油”, 可利用本方法检测其胆固醇含量进行间接筛查与判别。

参考文献:

- [1] 辜英杰, 吴锐, 闫世平, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定食品中胆固醇含量[J]. 分析测试学报, 2006, 25(6): 98-100.
- [2] 朱炳祺, 刘柱, 陈万勤, 等. 食品中胆固醇的检测方法的实验室转移确认验证[C]. 中国药学会第二届药物检测质量管理学术研讨会论文集, 2015.
- [3] 丁卓平, 王明化, 刘振华, 等. 食品中胆固醇含量测定方法的研究与比较[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 130-135.
- [4] 李黎, 刘玉峰, 唐华澄, 等. 高效液相色谱法测定食品中的胆固醇[J]. 食品科学, 2004, 28(4): 289-291.
- [5] 李珂, 高允生, 李炳龙, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法检测天然牛黄与酶促牛黄中胆固醇含量[J]. 医药导报, 2011, 30(12): 1633-1636.
- [6] 张旭, 胡艳, 蒋桂韬, 等. 蛋黄中胆固醇含量测定方法的研究[J]. 检测分析, 2011(12): 35-38.
- [7] 高瑜莹, 裘爱泳, 潘秋琴, 等. 植物甾醇的分析方法[J]. 中国油脂, 2001, 26(1): 25-28.
- [8] 张庆波. 气相色谱质谱法检测食品中胆固醇含量的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [9] 赵丽娟, 彭跃, 关屏. 凝胶色谱在有机前处理中的应用[C]. 辽宁省环境科学学会学术年会, 2006.
- [10] 魏作君, 钱国平, 王慧, 等. 有机溶剂中胆固醇溶解性能研究[C]. 全国化学工程与生物化工年会, 2005.
- [11] 周相娟, 李伟, 许华, 等. 凝胶渗透色谱技术及其在食品安全检测方面的应用[J]. 现代仪器, 2009(1): 1-4.
- [12] 刘苇, 金成, 孔维军, 等. 高效液相色谱蒸发光散射法测定牛黄中多种有效成分含量及其质量相关性研究[J]. 分析化学, 2010, 38(4): 522-526.
- [13] 曹雨震, 周倩如. 蒸发光散射检测器及其应用[J]. 现代商检科技, 1995, 5(6): 46-51.
- [14] 王巧娥, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2006, 25(6): 126-132.
- [15] 张蓉真, 李珑, 刘树滔, 等. 测定鸡蛋胆固醇的高效液相色谱新方法[J]. 色谱, 1998, 16(2): 91-94.