

检测分析

初榨葡萄籽毛油中维生素 E、植物甾醇及角鲨烯的快速同步检测

蔡媛媛¹, 张 晖¹, 王兴国¹, 王 立¹, 钱海峰¹, 肖俊勇², 从仁怀²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 无限极(中国)有限公司, 广州 510000)

摘要: 建立一种高准确度、快速的 HPLC 方法测定初榨葡萄籽毛油中维生素 E、植物甾醇(菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、谷甾烷醇)及角鲨烯的含量。样品经高温皂化, 以无水乙醚为提取剂提取, 纯化后采用 HPLC 检测。流动相采用 A 相甲醇-乙腈-叔丁基甲醚(体积比 85.5:8:6.5), B 相超纯水-冰醋酸(体积比 99:1), 梯度洗脱, 进样量 20 μ L, 流速 1.0 mL/min, 维生素 E 与 3 种常见植物甾醇、角鲨烯检测波长分别为 292 nm 与 210 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 谷甾烷醇采用 ELSD 检测, 运行时间 25 min。结果表明: 11 种目标物的质量浓度均与峰面积有较好的线性关系, R^2 均大于 0.999, 检出限为 0.10~5.00 μ g/mL, 定量限为 0.17~6.25 μ g/mL; 样品中维生素 E 总含量为 357.09~655.06 mg/kg, 植物甾醇总含量为 1 220.11~3 178.76 mg/kg, 角鲨烯含量为 24.21~67.98 mg/kg。该方法测定相对偏差较小, 结果准确, 可以成批次测定初榨葡萄籽毛油。

关键词: 初榨葡萄籽毛油; 植物甾醇; 谷甾烷醇; 角鲨烯; 生育三烯酚; 生育酚

中图分类号: TS225.1; TQ646 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)09-0137-07

Rapid simultaneous determination of vitamin E, phytosterol and squalene in virgin crude grape seed oil

CAI Yuanyuan¹, ZHANG Hui¹, WANG Xingguo¹, WANG Li¹,
QIAN Haifeng¹, XIAO Junyong², CONG Renhuai²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

2. Infinitus Company, Guangzhou 510000, China)

Abstract: An accurate and fast method was established to detect vitamin E, phytosterol (campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, stanol) and squalene content in virgin crude grape seed oil by HPLC. Sample was saponificated at high temperature, then extracted by absolute ethyl ether, purified and detected by HPLC. HPLC conditions were obtained as follows: mobile phase A methanol-acetonitrile-TBME (volume ratio 85.5:8:6.5), mobile phase B water-acetic acid (volume ratio 99:1), injection volume 20 μ L, detection wavelength 292 nm for vitamin E, 210 nm for campesterol, stigmasterol and β -sitosterol and squalene, column temperature 25 $^{\circ}$ C, ELSD for stanol and operation time 25 min. The results showed that the mass concentrations and peak areas of eleven target objects had a good linear relationship ($R^2 > 0.999$). The detection limit was 0.10-5.00 μ g/mL, and the quantification limit was 0.17-6.25 μ g/mL. The vitamin E content in the sample was 357.09-655.06 mg/kg, the phytosterol content was 1 220.11-3 178.76 mg/kg, and the squalene content was 24.21-67.98 mg/kg. The method had the items of low RSD and accurate result, and could be used to detect virgin crude grape seed oil in batch.

Key words: virgin crude grape seed oil; phytosterol; stanol; squalene; tocotrienol; tocopherol

收稿日期: 2017-12-18; 修回日期: 2018-05-24

作者简介: 蔡媛媛(1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为葡萄籽油营养功能(E-mail) 1505463826@qq.com。

通信作者: 张 晖, 教授(E-mail) Zhanghui@sytu.edu.cn。

葡萄籽油是一种营养成分丰富的新型食用植物

油,含有生育酚、生育三烯酚、植物甾醇、角鲨烯和多酚等多种微量活性成分,尤其是生育三烯酚含量丰富,这些微量成分对人体健康具有积极作用。生育酚可减轻细胞毒性,降低应激反应损伤,改善免疫功能^[1-2],摄入 γ -生育酚可预防前列腺癌^[3]。生育酚三烯酚可预防增生性肥胖^[4]、结肠癌^[5]、心血管疾病等慢性疾病^[6]。植物甾醇对动脉粥样硬化的预防、降低胆固醇吸收与代谢、抗炎症等方面具有积极的作用^[7]。角鲨烯具备延缓细胞衰老、促进人体细胞代谢和显著提高人体免疫功能等作用^[8]。

准确测定葡萄籽油中的微量成分对于油的营养功能评价、识别鉴定和质量控制具有重要意义。目前油中微量成分常采用的提取方法有高温皂化^[9]、超临界流体萃取^[10]、液液分散微萃取^[11]和固相萃取^[12]等。定量分析方法主要有高效液相色谱法^[13]、硅烷化气相色谱-质谱联用法^[14]和液相质谱联用技术^[15],一般是对一种或者是几种物质的分析,时间长,未有报道实现过生育三烯酚、植物甾醇、生育酚和角鲨烯的液相色谱同时测定。因此,建立一种快速提取、定量准确的初榨葡萄籽毛油中多种微量活性成分的同时分析方法是重要的。

本研究优化了高温提取初榨葡萄籽毛油中的4种植物甾醇(豆甾醇、 β -谷甾醇、菜油甾醇、谷甾醇)、6种维生素E和角鲨烯的最佳皂化条件,首次建立了初榨葡萄籽毛油中11种生物活性物质同步分析的HPLC定量方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的不同品种葡萄籽:新疆产区的美乐、赤霞珠、克隆松、木纳格、贵人香、梅鹿辄、柔丁香和霞多丽品种;山东产区的工酿一号;云南产区的玫瑰蜜品种。

维生素E标准样品: α -生育酚(纯度 $\geq 98\%$),购自美国Chromadex公司; γ -生育酚(纯度 $\geq 98\%$)、 δ -生育酚(纯度 $\geq 98\%$),均购自美国Sigma公司; α -生育三烯酚(纯度 $\geq 98\%$)、 γ -生育三烯酚(纯度 $\geq 98\%$)、 δ -生育三烯酚(纯度 $\geq 98\%$),均购自美国Matreya公司。

植物甾醇标准品:菜油甾醇(纯度97%),购自日本和光公司;豆甾醇(纯度95%)、 β -谷甾醇(纯度98%),均购自J&K公司; β -谷甾醇(纯度97%),购自美国Matreya公司。角鲨烯(纯度 $\geq 99\%$),购自美国Sigma公司。

甲醇:色谱级,购自Sigma-Aldrich(USA);冰醋酸;超纯水:用Milli-Q water purification system纯

化,购自美国Merck Millipore;乙腈:色谱级,购自Sigma-Aldrich(USA);叔丁基甲醚:色谱级。

1525型系列高效液相色谱系统:配备泵、柱温箱、1525型可变波长紫外检测器和3300型蒸发光散射检测器,购自美国Waters公司; C_{18} -ST色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),购自中国泰科美特公司;Symmetry C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),购自美国Waters公司;Ultimate XB- C_{30} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),购自中国浙江月旭材料科技有限公司;液体混合器;水浴锅。

1.2 实验方法

1.2.1 标准样品溶液的配制

维生素E标准储备液的配制:用无水乙醇配制10、35.3、70.6、176.5、353 μ g/mL和706 μ g/mL α -生育酚系列标准溶液;配制5、10、25、50、100 μ g/mL和200 μ g/mL γ -生育酚系列标准溶液;配制5、12.5、25、50、100、125、200、250 μ g/mL和500 μ g/mL α -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚、 δ -生育酚和 δ -生育三烯酚系列标准溶液。

植物甾醇标准储备液的配制:用无水乙醇配制7.5、15、30、60、120、200、250、500 μ g/mL和1 000 μ g/mL豆甾醇系列标准溶液;配制12.5、25、50、100、200、400、800 μ g/mL和1 000 μ g/mL菜油甾醇系列标准溶液;配制8.5、25、50、100、250、500、1 000、2 000 μ g/mL和2 500 μ g/mL β -谷甾醇系列标准溶液;配制12.5、25、50、62.5、100、250 μ g/mL和500 μ g/mL β -谷甾醇系列标准溶液。

角鲨烯标准储备液的配制:配制6.82、21.142、42.625、85.25、170.5 μ g/mL和682 μ g/mL的角鲨烯系列标准溶液。

1.2.2 样品处理

准确称取2 g(精确到0.000 1 g)的实验室自制的冷榨葡萄籽毛油(采用CA-59-G螺旋榨油机压榨)于150 mL烧瓶中,加入30 mL氢氧化钾溶液,30 mL无水乙醇,适量的TBHQ抗氧化剂,于液体混合器上振荡5 min,混合溶解,直至油脂呈分散状油滴。

将混合的液体样品置于水浴振荡锅中加热反应一段时间,快速冷却,转移皂化液于250 mL的分液漏斗中,分别用50 mL无水乙醚、50 mL超纯水萃取、洗涤,重复操作3次,收集上清液,室温下用氮气吹干,用无水乙醇溶解,过0.22 μ m滤膜,置于-20 $^{\circ}$ C保存。样品提取过程中发生的任何反应均在避光条件下进行。

1.2.3 HPLC - ELSD 分析方法的建立

1.2.3.1 色谱条件

Symmertry C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 相为甲醇 - 乙腈 - 叔丁基甲醚 (体积比 85.5:8:6.5), 流动相 B 相为含 1% 冰醋酸的超纯水溶液, 梯度洗脱, 程序为: 0 ~ 10 min, 100% A; 10 ~ 12 min, 100% A 线性降至 98% A; 12 ~ 25 min, 98% A 保持运行; 25 ~ 28 min, 98% A 线性升至 100% A; 最终平衡 10 min, 等待下一次进样。柱温为 25 °C, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL。生育酚及生育三烯酚检测波长为 292 nm, 菜油甾醇、豆甾醇、β - 谷甾醇和角鲨烯检测波长为 210 nm, 均采用紫外检测器; 谷甾醇采用 ELSD 蒸发光散射检测器检测, 气体流速 0.5 L/min, 气体温度 40 °C, 增益数 4; 两种检测器串联。

1.2.3.2 质控样品的制备

将不同品种、产地的初榨葡萄籽毛油样品随机选取 3 个样本, 分别称取 2 g 于 150 mL 圆底烧瓶内振荡涡旋混匀作为 1 个质控样。将质控样按照 1.2.2、1.2.3.1 方法处理, 上机时每测量 10 个样本插入 1 个质控样品来保证实验的重复性。

2 结果与分析

2.1 样品皂化条件的优化

为得到维生素 E (生育酚和生育三烯酚)、植物甾醇和角鲨烯的最佳皂化条件, 以皂化温度、皂化时间、碱液浓度为考察因素, 总甾醇和维生素 E 含量为评价指标, 经单因素实验分析, 确定适合葡萄籽油皂化提取的最适条件是 80 °C、45 min、3 mol/L 的氢氧化钾溶液。经 HPLC 含量分析可知, 此条件下的维生素 E、植物甾醇和角鲨烯的平均回收率为 96.3%, RSD 为 3.60%。

2.2 液相色谱条件的选择

2.2.1 色谱柱的选择

考虑到极性洗脱, 选择较为常用的 3 种色谱柱 (分别是 C₁₈ - ST 色谱柱 A, Symmertry C₁₈ 色谱柱 B, Ultimate XB - C₃₀ 色谱柱 C) 用于同时分离生育酚、生育三烯酚、豆甾醇、菜油甾醇、β - 谷甾醇和角鲨

烯物质。

色谱柱 A、B 和 C 的填料物质不同, 但色谱柱的长度和粒径相同, 分别进样, 流动相甲醇 - 水 (体积比 98:2), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 紫外检测波长分别是 292 nm 和 210 nm, 等度洗脱。对比 3 个色谱柱的分离情况可知, 色谱柱 C 的洗脱时间较长, 且仅能分离洗脱部分目标分析物, 洗脱在 1 h 内未完成, 且菜油甾醇和豆甾醇峰完全重叠。色谱柱 A 和色谱柱 B 对生育酚、生育三烯酚和角鲨烯的洗脱能力相似, 但色谱柱 A 对 3 种常见的植物甾醇 (菜油甾醇、豆甾醇和 β - 谷甾醇) 的分离效果不明显, 尤其是菜油甾醇和豆甾醇, 色谱峰存在部分重叠, 且在改变流动相组成、梯度洗脱的条件下, 均无法达到菜油甾醇和豆甾醇的基线分离要求, 推测原因是色谱柱填料键合了部分极性基团, 使得极性较弱的菜油甾醇和豆甾醇的洗脱能力减弱, 菜油甾醇和豆甾醇的结构十分相似, 洗脱时间发生重叠。色谱柱 B 在甲醇 - 水 (体积比 98:2) 等度洗脱的条件下, 可实现菜油甾醇与豆甾醇的基线分离, 但豆甾醇的峰形有部分拖尾, 但色谱柱 B 基本满足了 10 种物质的基线分离 (谷甾醇在紫外无响应)。故选择 Symmertry C₁₈ 色谱柱用来分离、定量分析初榨葡萄籽毛油中的不皂化物。

2.2.2 流动相的选择

考虑到谷甾醇在紫外检测器中无响应, 优先考虑紫外条件下 10 种目标分析物的分离情况, 为了 3 种甾醇的峰形, 实现 10 种物质的快速定量分析, 再根据谷甾醇在蒸发光散射检测器下的洗脱情况, 对初始的液相条件进行优化, 以实现生育酚 (α - 、γ - 、δ - 生育酚), 生育三烯酚 (α - 、γ - 、δ - 生育三烯酚), 植物甾醇 (菜油甾醇、豆甾醇、β - 谷甾醇、谷甾醇), 角鲨烯的同时快速分离。

反相高效液相 (RP - HPLC) C₁₈ 色谱柱用于分离甾醇同分异构体时是不容易实现的, 文献报道不多。在 Yuan 等^[16] 文献基础上, 选取甲醇、乙腈、异丙醇、叔丁基甲醚、水作为流动相, 考察不同流动相组成对 11 种目标分析物分离效果的影响, 结果见表 1。

表 1 不同流动相组成对 V_E、植物甾醇及角鲨烯分离效果的影响

流动相	洗脱程序	分离情况
乙腈	1.0 mL/min 等度	45 min 内实现 6 种维生素 E 的分离, 甾醇未被洗脱出来
甲醇	1.0 mL/min 等度	30 min 内实现 10 种目标物质的分离, 但出峰位置较为紧密, 柱压较大; 豆甾醇峰形较差; 谷甾醇与角鲨烯未完全分离
甲醇 - 乙腈 (95:5; 92:8; 90:10)	1.0 mL/min 等度	25 min 内实现 10 种目标物质的分离, 改善峰的分度, 柱压降低, 响应值增加; 谷甾醇与角鲨烯未完全分离

续表 1

流动相	洗脱程序	分离情况
甲醇-叔丁基甲醚(95:5;93.5:6.5;92:8)	1.0 mL/min 等度	20 min 内实现 10 种目标物质的分离,改善峰形,柱压大大降低,脂溶性物质溶解度增加;谷甾醇与角鲨烯未完全分离
甲醇-异丙醇(95:5;93.5:6.5;92:8)	1.0 mL/min 等度	菜油甾醇和豆甾醇的分离度不好,谷甾醇与角鲨烯峰重叠
甲醇-水(98:2)	1.0 mL/min 等度	35 min 内实现 11 种目标物质的分离,甾醇峰有部分拖尾,柱压增加,响应值降低
甲醇-乙腈-叔丁基甲醚(85.5:8:6.5,1%酸化水)	1.0 mL/min 等度	33 min 内实现 11 种目标物质的分离,豆甾醇峰形有所改善,柱压增加,响应值降低
甲醇-乙腈-叔丁基甲醚(85.5:8:6.5,1%酸化水)	1.2.3.1 梯度洗脱程序	25 min 内实现 11 种目标物质的分离,甾醇分离度和峰形均得到改善,柱压降低,响应值增加

由表 1 可知,采用甲醇-乙腈-叔丁基甲醚(85.5:8:6.5,1%酸化水)为流动相,在 1.2.3.1 梯度洗脱程序下,11 种目标物质在 25 min 内完全分离,效果较好。

2.2.3 检测器参数条件的选择

ELSD 是一种通用型的检测器^[17],可用于无紫外吸收的甾醇饱和形式(谷甾醇)物质的测定。根据 1.2.3.1 的流动相组成与洗脱程序,选取 40、50、60、65℃ 和 70℃ 作为温度考察范围,0.5、1.0、1.5 L/min 和 2.0 L/min 作为气体流速考察范围;根据响应值的大小,选取 1、2、4、8 和 16 作为增益值的考察范围,结果见表 2。

由表 2 可知,气体温度为 40℃,气体流速为 0.5 L/min,增益值为 4 时,各含量水平的标准物的线性良好,达 0.999 以上;各含量水平的样品中谷甾醇均有响应,达定量要求。当增益值达 4 时,可明显看出谷甾醇与角鲨烯达到基线分离,无重叠交叉峰。

表 2 不同 ELSD 仪器参数对谷甾醇的响应影响

仪器参数	参数范围	谷甾醇标准品与样品的响应结果
气体温度/℃	40	低含量与高含量目标物均有响应
	50	目标物响应值较低,未达到定量限
	60	低含量样品在出峰时间未检出
	65	低、高含量样品目标物均基本无响应
	70	高含量目标物无响应值
气体流速/(L/min)	0.5	标准物和样品均有有效的响应值
	1.0	低、高含量目标物响应较低,定量难
	1.5	低、高含量样品目标物均基本无响应
	2.0	低、高含量样品目标物均无响应
增益值	1	谷甾醇响应值过低,无法定量
	2	高含量样品可响应,低含量无响应
	4	目标物均有响应,线性达 0.999 以上
	8	基线噪音较大,灵敏度降低
	16	基线噪音过大,线性差,无法定量

2.3 HPLC 方法学验证

2.3.1 线性范围、检出限、定量限

在优化的液相条件下,考察 11 种目标物质的线性、灵敏度(检出限和定量限),结果如表 3 所示。

表 3 维生素 E、植物甾醇及角鲨烯的线性范围、检出限、定量限(n=6)

分析物	线性范围/(μg/mL)	标准曲线方程	回归系数(R ²)	检出限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
α-生育酚	10~706	y=0.000 1x+4.507 4	0.999 5	0.44	1.42
γ-生育酚	5~200	y=0.000 4x+1.630 4	0.999 7	0.40	1.00
δ-生育酚	5~500	y=0.000 2x+0.891 4	0.999 8	0.20	0.63
α-生育三烯酚	5~500	y=0.000 1x-2.442 5	0.999 9	0.20	1.00
γ-生育三烯酚	5~500	y=0.000 2x-1.096 8	1.000 0	0.15	0.43
δ-生育三烯酚	5~500	y=0.000 1x-1.445 7	0.999 5	0.10	0.44
菜油甾醇	12.5~1 000	y=0.000 2x+11.006	0.999 5	1.00	2.00
豆甾醇	7.5~1 000	y=0.000 1x-11.009	0.999 2	0.89	1.78
β-谷甾醇	8.5~2 500	y=0.000 2x-102.41	0.999 9	0.30	1.60
谷甾醇	12.5~500	y=0.000 01x+5.266 7	0.999 6	5.00	6.25
角鲨烯	6.82~682	y=0.000 01x-0.036 7	0.999 6	0.11	0.17

由表 3 可知,11 种目标物质的质量浓度与峰面积的线性关系良好,回归系数均大于 0.999。以 3 倍和 10 倍的信噪比分别计算 11 种目标物质的检出限和定量限,维生素 E、3 种常见甾醇、角鲨烯的检出限是 0.10~1.0 μg/mL,定量限是 0.17~2.00 μg/mL,

低于现有方法的灵敏度范围。而饱和形式的谷甾醇在 ELSD 检测器中的检出限是 5.00 μg/mL,定量限是 6.25 μg/mL,不高于现有方法^[16]。该方法的线性范围宽和灵敏度高,适合于初榨葡萄籽毛油中的维生素 E、植物甾醇及角鲨烯的定量分析。

2.3.2 精密度实验

日内精密度是在相同条件下,对3个水平的样品(低水平样品中维生素E含量是267.22 mg/kg,总甾醇含量是621.28 mg/kg,角鲨烯含量是6.81 mg/kg;中水平样品中维生素E含量是391.58 mg/kg,总甾醇含量是2179.45 mg/kg,角鲨烯含量是39.14 mg/kg;

高水平样品中维生素E含量是587.13 mg/kg,甾醇含量是2818.32 mg/kg,角鲨烯含量是39.33 mg/kg;9种标准品均是50 μg/mL)分别进行6次重复测定。日间精密度是在相同条件下,对3个水平的样品分别连续测定5 d,以5 d的实验结果作为仪器方法的精密度考察指标。结果见表4。

表4 标准品及不同含量水平样品的日内、日间精密度

分析物	标准品 RSD/%		高水平样品 RSD/%				中水平样品 RSD/%				低水平样品 RSD/%			
			日内		日间		日内		日间		日内		日间	
	日内	日间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间
α-生育酚	0.62	0.21	1.96	0.83	2.18	1.23	1.04	1.00	1.41	0.90	0.95	0.80	0.57	6.08
γ-生育酚	0.65	0.14	1.25	0.88	1.06	1.25	1.42	0.96	2.37	0.86	1.96	5.08	0.87	4.40
α-生育三烯酚	0.28	0.19	1.53	0.95	1.65	1.12	3.38	0.89	4.38	3.04	3.72	0.63	1.75	4.43
γ-生育三烯酚	0.37	0.17	1.04	0.96	1.19	1.09	1.57	0.87	2.30	0.93	1.83	0.65	3.51	4.16
菜油甾醇	0.23	0.66	1.70	1.11	2.84	2.25	3.06	1.08	4.58	1.15	2.44	1.33	2.10	6.07
豆甾醇	0.47	0.72	3.30	0.63	3.93	1.17	1.25	1.10	1.54	1.20	7.96	1.27	8.52	6.21
β-谷甾醇	0.23	0.81	1.25	0.88	2.84	1.98	1.49	1.20	2.32	1.41	0.61	1.53	1.74	6.25
谷甾醇	0.68	1.14	1.51	0.33	2.49	0.32	3.76	3.62	2.25	1.68	3.76	1.46	1.61	5.21
角鲨烯	0.05	1.10	2.96	1.77	1.75	6.05	7.56	1.83	4.69	1.27	3.12	4.26	1.63	7.57

由表4可以看出,9种标准品的保留时间日内RSD为0.05%~0.68%,日间RSD为0.14%~1.14%;3种不同含量水平的样品中9种目标物保留时间日内RSD为0.33%~5.08%,日间RSD为0.32%~7.57%,峰面积的日内RSD为0.61%~7.96%,日间RSD为0.57%~8.52%,表明该液相方法具有良好的准确性。

2.3.3 加标回收率实验

选择3个含量水平的初榨葡萄籽毛油样品(含量水平与精密度实验相同),分别添加浓度与样品含量一致的9种标准溶液,测定平均加标回收率,结果见表5。

表5 高、中、低水平样品的加标回收率(n=6) %

分析物	加标回收率			
	高水平加标回收率	中水平加标回收率	低水平加标回收率	平均加标回收率
α-生育酚	99.8	102.5	102.8	101.7
γ-生育酚	103.2	96.5	102.1	100.6
α-生育三烯酚	98.8	93.3	106.8	99.6
γ-生育三烯酚	102.1	100.3	96.2	99.5
菜油甾醇	92.1	96.8	95.1	94.7
豆甾醇	97.3	93.6	102.7	97.9
β-谷甾醇	95.7	97.6	98.1	97.1
谷甾醇	92.6	102.7	96.6	97.3
角鲨烯	89.1	83.3	93.5	88.6

由表5可知,不同含量水平样品添加9种标准物

质的平均加标回收率范围是88.6%~101.7%,表明该方法适用于不同含量的样品测定,结果稳定可靠。

2.3.4 重现性与稳定性实验

选取3种梯度的初榨葡萄籽毛油样品(含量水平与精密度实验一致),选择在0、4、8、12、16、20 h和24 h依次进样,计算处理样品放置不同时间的稳定性。按照确定的样品处理方法和液相分离方法,选取3种典型的初榨葡萄籽毛油样品,每种样品制备6次平行,计算每个样品的保留时间和峰面积的RSD值,以评价建立的液相方法的重现性。实验结果如表6所示。

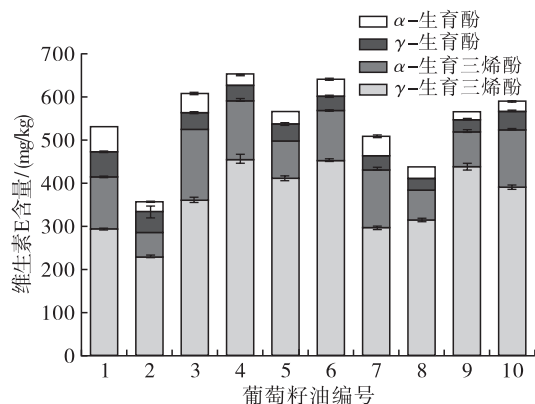
表6 重现性与稳定性实验结果(n=6)

分析物	高水平 RSD/%		中水平 RSD/%		低水平 RSD/%	
	重现性	稳定性	重现性	稳定性	重现性	稳定性
α-生育酚	5.78	0.58	4.89	3.65	3.06	1.50
γ-生育酚	2.31	0.84	4.15	5.12	3.99	0.81
α-生育三烯酚	1.72	0.48	3.91	4.45	1.91	4.64
γ-生育三烯酚	1.41	0.50	0.62	0.24	3.83	3.79
菜油甾醇	7.70	4.55	2.76	0.57	3.41	3.34
豆甾醇	7.86	3.59	1.21	1.75	4.52	4.54
β-谷甾醇	2.53	2.68	2.00	0.50	1.65	1.01
谷甾醇	2.51	3.49	6.30	6.26	3.91	4.61
角鲨烯	6.08	5.07	6.55	5.60	7.02	5.36

从表6可以看出,样品的重现性 *RSD* 在 0.62% ~ 7.86%,稳定性 *RSD* 在 0.24% ~ 6.26%,表明该实验方法的重现性和稳定性均良好,满足要求。

2.4 快速同步方法测定初榨葡萄籽毛油中维生素E、植物甾醇、角鲨烯含量

根据建立的 HPLC - UVD - ELSD 方法,对 10 种不同品种的初榨葡萄籽毛油进行生育酚、生育三烯酚、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、谷甾醇和角鲨烯组成及含量分析,结果见图1~图3。



注:图中1~10编号葡萄籽品种依次是贵人香、美乐、赤霞珠、木纳格、克隆松、梅鹿辄、霞多丽、柔丁香、玫瑰蜜、工酿一号。下同。

图1 初榨葡萄籽毛油维生素E组成及含量分布

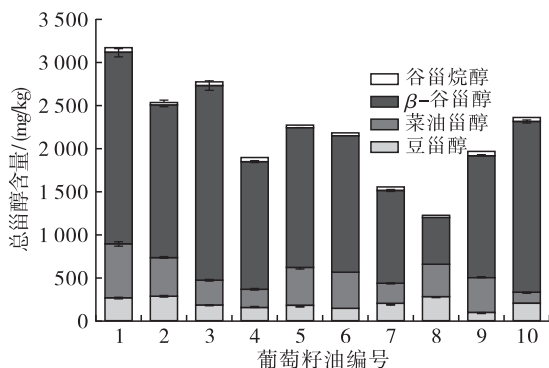


图2 初榨葡萄籽毛油植物甾醇组成及含量分布

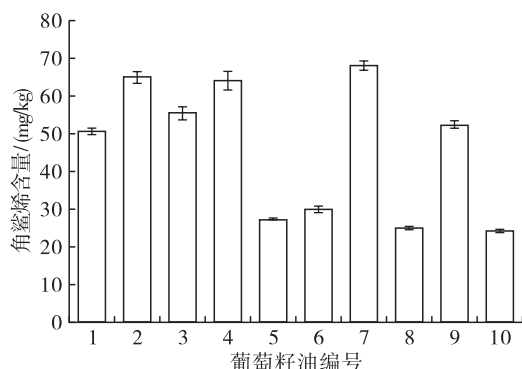


图3 初榨葡萄籽毛油角鲨烯含量

由图1~图3可知,10种初榨葡萄籽毛油的维生素E组成主要是 α -生育酚及生育三烯酚, γ -生育酚及生育三烯酚,总含量分布在 357.09 ~ 655.06

mg/kg,木纳格的含量最高,美乐的含量最低。甾醇主要成分是 β -谷甾醇,其次是菜油甾醇、豆甾醇,有少量的饱和形式的谷甾醇,总甾醇含量分布在 1 220.11 ~ 3 178.76 mg/kg,柔丁香的含量最低,贵人香的含量最高。角鲨烯含量分布在 24.21 ~ 67.98 mg/kg,霞多丽含量最高,山东工酿一号含量最低。总维生素E和植物甾醇含量分布与文献含量相近,角鲨烯含量分布略低于文献[18]。由数据可以看出,每种葡萄籽油的维生素E、植物甾醇、角鲨烯的组成一致,但含量呈差异化分布。

3 结论

首次建立了葡萄籽油中生育酚、生育三烯酚、植物甾醇、角鲨烯同时测定的 HPLC - UVD - ELSD 联用的液相色谱方法。确定了样品前处理的最佳提取条件是在碱浓度为 3 mol/L 的环境中,水浴 80 °C 高温皂化时间 45 min。最佳流动相条件为 A 相:甲醇 - 乙腈 - 叔丁基甲醚(体积比 85.5:8:6.5),B 相:1% 冰醋酸酸化的水,梯度洗脱,维生素E紫外检测波长 292 nm,3种常见甾醇和角鲨烯紫外检测波长 210 nm。ELSD 用于谷甾醇的检测,最佳仪器参数为气体温度 40 °C、载气流速 0.5 L/min、增益值 4。优化后的条件可适用于成批次的葡萄籽压榨油中维生素E、植物甾醇、角鲨烯的组成及含量分布分析,仅需 25 min,检出限低,灵敏度高,精密度好,加标回收率高,准确性好,重现性良好。

不同初榨葡萄籽毛油的成分含量分布存在着较大差异,贵人香品种的总甾醇含量最高,木纳格品种的维生素E含量最高,梅鹿辄次之,霞多丽品种的角鲨烯含量最高。综合来看,贵人香品种的维生素E、甾醇及角鲨烯的含量组成较为均衡,含量水平较高。

参考文献:

- [1] 徐红丽,王静,韩丽华,等. α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚对小鼠急性四氯化碳肝损伤保护作用的研究[J]. 营养学报, 2017, 39(3):270-274.
- [2] PEH H Y, TAN W S, LIAO W, et al. Vitamin E therapy beyond cancer:tocopherol versus tocotrienol [J]. Pharmacol Ther, 2016, 162:152-169.
- [3] GALLI F, AZZI A, BIRINGER M, et al. Vitamin E: emerging aspects and new directions[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 102:16-36.
- [4] MUTO C, YACHI B, AOKI Y. Gamma-tocotrienol reduces the triacylglycerol level in rat primary hepatocytes through regulation of fatty acid metabolism[J]. J Clin Biochem Nutr, 2013, 52(1):32-37.
- [5] 吴轲,蔡美琴. 生育三烯酚抗结肠癌作用及机制研究进展

- [J]. 中国慢性病预防与控制, 2017, 8(25):636-638.
- [6] 李凤娟. 生育三烯酚预防动脉粥样硬化的机理研究[D]. 合肥:中国科技大学, 2009.
- [7] 任建敏. 食物中植物甾醇生理活性及药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22):389-393.
- [8] 雷茜茜. 角鲨烯的抗氧化活性及其脂质体制备研究[D]. 海口:海南大学, 2013.
- [9] 王素君, 李培武, 张良晓, 等. 超声波辅助提取植物油中甾醇和生育酚[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(3):373-378.
- [10] UDDIN M S, SARKER M Z, FERDOSH S, et al. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review[J]. J Sci Food Agric, 2015, 95(7):1385-1394.
- [11] SUN J, ZHAO X E, DANG J, et al. Rapid and sensitive determination of phytosterols in functional foods and medicinal herbs by using UHPLC-MS/MS with microwave-assisted derivatization combined with dual ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction[J]. J Sep Sci, 2017, 40(3):725-732.
- [12] SAGRATINI G, ALLERGRINI M, CAPRIOLI G, et al. Simultaneous determination of squalene, α -tocopherol and β -carotene in table olives by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection[J]. Food Anal Methods, 2013, 6(1):54-60.
- [13] TSOCHATZIS E D, TZIMOU-TSITOURIDOU R. Validated RP-HPLC method for simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in whole grain barley using matrix solid-phase dispersion[J]. Food Anal Methods, 2015, 8(2):392-400.
- [14] CHEN Y Z, NKAO S Y, JIAN H C, et al. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Drug Anal, 2015, 23(4):636-644.
- [15] GU Q, YI X, ZHANG Z, et al. A facile method for simultaneous analysis of phytosterols, erythrodiol, uvaol, tocopherols and lutein in olive oils by LC-MS[J]. Anal Methods, 2016, 8(6):1373-1380.
- [16] YUAN C X, JU Y J, JIN R S, et al. Simultaneous determination of tocopherols, phytosterols and squalene in vegetable oil deodorizer distillates by HPLC-DAD[J]. Chromatographia, 2015, 78(3/4):273-278.
- [17] NAIR V D P, KANFER I J H. Determination of stigmasterol, β -sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(3):731-737.
- [18] WEN X, ZHU M H, HU R, et al. Characterisation of seed oils from different grape cultivars grown in China[J]. J Food Sci Technol, 2016, 53(7):3129-3136.

(上接第136页)

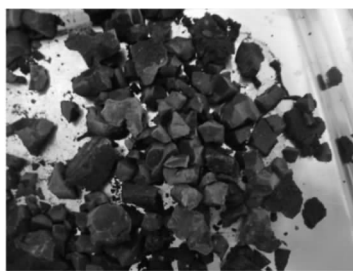


图5 蛋白泥碳饼



图6 挤压脱水后的湿豆渣

3 实际应用

根据对济宁市污水处理厂 50 t/d 水热炭化污泥处理生产线的实测, 处理 1 t 污泥的成本约 150

元, 远低于目前大部分烘干或蒸发工艺, 且该工艺对污泥中的有机物质保留完好, 反应后污泥碳饼的热值约 7.5 MJ/kg, 相当于褐煤的热值。对一般的市政污泥, 可用于电厂掺煤燃烧(若原料污泥的有机物质含量高, 反应后的污泥碳饼热值会更高)。因大豆分离蛋白工艺过程产生的污泥中含大量的有机物质, 还可以考虑将反应后的蛋白泥用于动物饲料, 处理后的黑泥可用于有机肥原料。

4 结束语

污泥水热炭化技术整个处理过程能达到“无害化、资源化、减量化、稳定化”的要求, 且运行成本低, 对环境情况、污泥的有机物质含量、含沙量等要求不高, 能有效脱除大豆分离蛋白生产过程中产生的污泥中的水分, 且能有效保留污泥中的有机物质, 是一种具有极高环保价值的污泥处理工艺。

参考文献:

- [1] 李磊, 张尊举. UASB + A/O 工艺处理大豆蛋白生产废水[J]. 环境科学与管理, 2016, 41(7):109-112.
- [2] 刘峻, 葛怀波, 朱召军. 大豆蛋白纤维生产废水处理工程设计及运行[J]. 煤炭与化工, 2016(9):122-124.