

肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的检测

王树堃, 梁少华, 孙 聪

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:建立了反相高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇含量。利用水对样品进行萃取定容,采用 Agilent ZORBAX 300SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,甲醇和 0.1% 冰乙酸溶液作为流动相,在 0.8 mL/min 流速下进行梯度洗脱,蒸发器温度 55 °C, N₂ 压力 206.84 kPa, 增益 10, 以外标法对肌醇进行定量。结果表明:该方法在 0.01 ~ 1.00 mg/mL 质量浓度范围内线性良好,标准曲线回归方程相关系数(R^2)为 0.993 4,加标回收率为 80% ~ 108%,相对标准偏差均小于 6%。该方法前处理简单、重复性好、灵敏度高、结果准确可靠,可应用于肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的检测。

关键词:肌醇;肌醇脂肪酸酯;高效液相色谱-蒸发光散射法

中图分类号:TS229; TS207.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2021)09-0141-04

Detection of inositol during the preparation of inositol fatty acid esters

WANG Shukun, LIANG Shaohua, SUN Cong

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

Abstract: A reverse-phase high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) method was developed for the analysis of inositol during the preparation of inositol fatty acid esters. The sample was extracted and diluted with water for subsequent analysis. The Agilent ZORBAX 300SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was utilized. The mobile phase was methanol solution containing 0.1% acetic acid and the flow rate was 0.8 mL/min. Evaporator temperature was 55 °C and N₂ pressure was 206.84 kPa with the gain 10. Inositol was quantified by external standard method. The results showed that the method had good linearity for inositol in the range of 0.01 - 1.00 mg/mL and R^2 was 0.993 4. The recoveries of inositol were in the range of 80% - 108% with the relative standard deviation less than 6%. This method was simple, stable, sensitive and reliable. It could be applied to the determination of inositol during the preparation of inositol fatty acid esters.

Key words: inositol; inositol fatty acid esters; high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector

肌醇(Inositol),又名环己六醇^[1],是动植物生长发育所必需的低分子有机物^[2],具有调节胆固醇水平、调控细胞活动等功效,被广泛应用于医药、食

品、饲料等领域^[3]。肌醇因其特殊的6羟基结构,亲水性强,难以与油脂分子互溶,因此在油脂行业中的应用受到限制。为了改善肌醇的脂溶性,研究者采用酯化的方法,将肌醇转化为肌醇脂肪酸酯^[4-5]。但由于缺乏具体的检测方法评估体系中肌醇的转化程度,为工艺条件的确定提出了挑战。

现行国家标准(GB 5009.270—2016)采用微生物法和气相色谱法测定食品中肌醇含量,其中微生物法耗时较长且重现性较差^[6],而气相色谱法需要硅烷化试剂衍生,操作复杂,且高浓度的衍生试剂对色谱的损伤及污染较大^[7],在大批量样品检测中两

收稿日期:2021-07-06;修回日期:2021-07-12

基金项目:国家“十三五”重点研发项目“特色油料适度加工与综合利用技术及智能装备研发与示范”(2018YFD0401100)

作者简介:王树堃(1996),男,硕士研究生,研究方向为植物油料综合利用(E-mail)435909901@qq.com。

通信作者:梁少华,教授,硕士生导师(E-mail)shaohualiang832@126.com。

种方法均具有局限性。此外,有利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[8]、高效液相色谱(HPLC)^[9-11]、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)^[12]、离子色谱^[13]、毛细管电泳^[14]等方法对肌醇进行定性定量分析。其中HPLC以分辨率高、速度快、重复性好等优点被广泛应用在生化、食品、药品等领域中肌醇含量的测定,如:陈地灵等^[15]利用Rezex RCM-Monosaccharide Ca²⁺(8%)色谱柱和去离子水为流动相,采用HPLC-ELSD法检测了化橘红中肌醇的含量;Perelló等^[16]采用HPLC-MS法对唾液中肌醇含量进行了直接测定。然而,这些方法在测定肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的含量时易受到其他物质的干扰,影响肌醇的准确定量,因此迫切需要建立一种肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的检测方法对肌醇进行准确定量。

鉴于肌醇不具有紫外与荧光特征吸收,仅在通用型检测器下存在响应,本研究建立了反相HPLC-ELSD法对肌醇脂肪酸酯制备过程中的肌醇进行检测,利用外标法对肌醇进行定量分析,为评价肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的转化效率提供支撑,同时为肌醇的深度开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肌醇标准品(纯度≥99%),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;肌醇纯品,上海麦克林(Macklin)生化科技有限公司;油酸酐氯(纯度80%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

甲醇、冰乙酸,均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯),常德成伟贸易有限公司;超纯水。

RCT基本型数显加热磁力搅拌器、Lab Dancer 涡旋振荡器,德国IKA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;Waters E2695型高效液相色谱仪,美国Waters公司;WGL-125B电热鼓风干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

1.2.1.1 标准品工作溶液的制备

精确称量250 mg肌醇标准品于250 mL容量瓶中,用超纯水定容,配制成1.00 mg/mL的标准储备液。分别移取0.1、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL标准储备液至10 mL容量瓶,用超纯水定容,得到0.01、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00 mg/mL肌

醇标准品工作溶液。

1.2.2 样品溶液的制备

以肌醇油酸酯的制备为例,准确称取适量肌醇原料(精确到1 mg)于50 mL圆底烧瓶中,在160℃下搅拌,按照摩尔比1:3~1:9的比例加入油酸酐氯,加热3 h得到反应混合物。将反应混合物移至分液漏斗中,用10 mL蒸馏水洗涤5次,收集水相并定容至250 mL,混匀后静置,从中移取适量样品溶液用0.22 μm聚丙烯滤膜过滤,转移至样品瓶中,加盖密封,待进行HPLC测定。

1.2.3 HPLC测定条件

利用反相高效液相色谱方法,选用非极性的固定相和极性的流动相构成色谱体系。其中:色谱柱为Agilent ZORBAX 300SB-C18(4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温(30±5)℃;流动相为甲醇和0.1%冰乙酸溶液,流速0.8 mL/min,梯度洗脱(见表1);ELSD检测器;雾化器模式冷却;蒸发器温度55℃;N₂压力206.84 kPa,增益10;进样量10 μL。

表1 洗脱梯度

时间/min	0.1%冰乙酸溶液/%	甲醇/%
10	90	10
15	0	100
35	0	100
45	95	5
65	95	5

1.2.4 标准曲线绘制

取1.2.1不同质量浓度的肌醇标准品工作溶液各2 mL,按照1.2.3 HPLC条件进行测定,每个质量浓度重复测定3次,取平均值,以肌醇质量浓度(X)为横坐标,对应的峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.5 方法学验证

1.2.5.1 精密度的实验

移取2 mL 0.90 mg/mL肌醇标准工作溶液,经0.22 μm滤膜过滤后装入样品瓶中,按照1.2.3 HPLC条件,重复进样6次,记录每次测定的峰面积与保留时间,并分别计算峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)。

1.2.5.2 重复性实验

按照1.2.2制备6份相同质量浓度的供试样品溶液,按照1.2.3 HPLC条件进行测定,记录每次测定的峰面积与保留时间,分别计算各组峰面积和保留时间的RSD。

1.2.5.3 稳定性实验

按照1.2.2制备不同质量浓度的供试样品溶液,按照1.2.3 HPLC条件,分别于2、4、6、8、10、12

h 测定样品中肌醇的峰面积与保留时间,并计算肌醇峰面积和保留时间的 RSD。

1.2.5.4 加标回收率实验

将已知肌醇含量的肌醇样品溶液分为 9 份,每份 100 mL,分为 3 组,分别向各组中加入 0.5、1.0、2.0 mg 肌醇标准品,混合均匀,按照 1.2.3 HPLC 条件测定肌醇含量,计算加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 肌醇标准曲线方程

按 1.2.4 方法绘制肌醇标准曲线,肌醇标准曲线方程为 $Y = 3\ 334\ 026X - 2\ 572$,相关系数 (R^2) 为 0.993 4。说明在 0.01 ~ 1.00 mg/mL 范围内,肌醇的质量浓度与峰面积存在良好的线性关系。以 3 倍信噪比计算方法的检出限,以 10 倍信噪比计算方法的定量限,则检出限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.09 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 方法学验证结果

2.2.1 精密度

按照 1.2.5.1 方法测定肌醇标准工作溶液的保留时间和峰面积,连续测定 6 次,结果见表 2。

表 2 精密度实验结果

测定次数	峰面积		保留时间	
	测定值/ μm^2	RSD/%	测定值/min	RSD/%
1	3 005 649		6.770	
2	3 157 841		6.775	
3	3 232 153	3.21	6.780	0.07
4	2 970 860		6.780	
5	3 118 329		6.783	
6	3 041 731		6.782	

由表 2 可见,肌醇保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.07% 和 3.21%,小于 5%,表明该方法精密度良好。

2.2.2 重复性

按照 1.2.5.2 对肌醇与油酸酰氯反应混合物进行 HPLC 分析,HPLC 色谱图见图 1,肌醇的保留时间和峰面积见表 3。

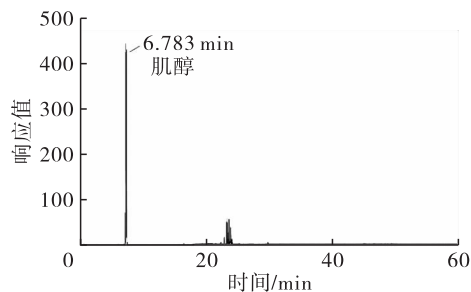


图 1 肌醇与油酸酰氯反应后混合物 HPLC 图谱

表 3 重复性实验结果

测定次数	峰面积		保留时间	
	测定值/ μm^2	RSD/%	测定值/min	RSD/%
1	3 406 992		6.758	
2	3 559 184		6.820	
3	3 644 552	3.01	6.791	0.88
4	3 372 203		6.864	
5	3 519 672		6.732	
6	3 420 730		6.885	

由图 1 可见,保留时间 6.783 min 的峰为肌醇,而肌醇旁边的色谱峰不影响肌醇的分离,说明 HPLC 可以对肌醇与油酸酰氯反应制备肌醇油酸酯过程中反应混合物中剩余的肌醇含量进行很好的定量分析。

由表 3 可知,肌醇的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.88% 和 3.01%,均小于 5%,表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性

按照 1.2.5.3 方法,取 3 组不同肌醇质量浓度的反应混合物样品溶液进行 HPLC 分析,测定肌醇保留时间和峰面积,测定日内稳定性。结果如表 4 所示。

表 4 稳定性实验结果

时间/h	样 1				样 2				样 3			
	保留时间/min	保留时间 RSD/%	峰面积/ μm^2	峰面积 RSD/%	保留时间/min	保留时间 RSD/%	峰面积/ μm^2	峰面积 RSD/%	保留时间/min	保留时间 RSD/%	峰面积/ μm^2	峰面积 RSD/%
2	6.75		1 421 673		6.84		2 927 122		6.80		3 775 779	
4	6.77		1 417 644		6.86		2 936 140		6.84		3 793 775	
6	6.80	0.26	1 419 285	0.80	6.87	0.17	2 917 294	1.10	6.83	0.65	3 833 346	1.10
8	6.77		1 400 859		6.87		2 908 546		6.75		3 765 024	
10	6.78		1 393 722		6.86		2 965 714		6.74		3 814 218	
12	6.79		1 408 692		6.87		2 993 768		6.75		3 878 935	

由表 4 可知,反应混合物样品中肌醇的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 2%,符合《中国药品检验标准操作规程》中的要求(稳定性试验相对标准

偏差不得高于 2%)^[17],表明样品在 12 h 内稳定。

2.2.4 加标回收率

按照 1.2.5.4 测定加标回收率,结果见表 5。

表5 加标回收率实验结果

序号	本底值/mg	肌醇加入量/mg	测定值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.92	0.5	1.46	108		
2	0.92	0.5	1.45	106	103.67	5.09
3	0.92	0.5	1.41	98		
4	0.92	1.0	1.78	86		
5	0.92	1.0	1.76	84	83.33	3.67
6	0.92	1.0	1.72	80		
7	0.92	2.0	2.83	96		
8	0.92	2.0	2.80	94	95.83	2.08
9	0.92	2.0	2.88	98		

由表5可知,3组样品加标回收率在80%~108%之间,RSD小于6%。满足色谱分析回收率70%~130%的要求^[18],表明该方法测定受其他成分干扰较小,结果较为可靠。

3 结论

本文建立了反相HPLC-ELSD方法以测定肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的含量。在肌醇质量浓度为0.01~1.00 mg/mL范围内,标准曲线回归方程相关系数(R^2)为0.9934,检出限为0.05 $\mu\text{g/mL}$,定量限为0.09 $\mu\text{g/mL}$,加标回收率为80%~108%,相对标准偏差均小于6%。方法学的验证结果说明该检测方法检测结果准确、重现性好、灵敏度高,可用于肌醇脂肪酸酯制备过程中肌醇的定量分析。

参考文献:

- [1] 任云娥,李好管. 肌醇的应用、市场及技术进展[J]. 化工科技市场, 2001, 24(10): 11-13.
- [2] EAGLE H, OYAMA V I, LEVY M, et al. Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture[J]. J Biol Chem, 1957, 226(1): 191-205.
- [3] 郭启睿,邱东. 植酸和肌醇在人工骨材料上的应用[C]//中国化学会第一届农业化学学术讨论会论文集. 北京:中国化学会,2019:1.
- [4] 马续红. 羧酸三磷酸肌醇酯的合成及其抗油脂氧化活性的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [5] 郑妍,李东锐,杨天奎,等. 肌醇脂肪酸酯、其制备方法及其应用:CN102336664A [P]. 2012-02-01.
- [6] 周敏,陈亚波,杨彤. 微生物法测定维生素功能饮料中的肌醇含量[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(7): 2123-2125.
- [7] 乔善磊,姜涛,张晓玲,等. 气相色谱法及气相色谱-质谱法测定保健饮料中的肌醇[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(9): 2020-2022.
- [8] SAVVCH A, MARCHYSHYN S M, MILIAN I I. Determination of carbohydrates in the herbal antidiabetic mixtures by GC-MC[J]. Acta Pharm, 2021, 71(3): 429-443.
- [9] SHIN J H, PARK J M, KIM H J, et al. Development

rapid analytical methods for inositol as a trace component by HPLC and LC-MS/MS in infant formula[J]. Korean J Food Sci Anim Resour, 2015, 35(4): 466-472.

- [10] 钱忠义,葛薇薇,仇雅静,等. 高效液相-电喷雾检测法测定赖氨酸肌醇维B₁₂口服溶液中肌醇的含量[J/OL]. 中国药物警戒;1-6[2021-07-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5219.R.20210520.1707.016.html>.
- [11] 胡俊君,仪鑫,胡红娟,等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定荞麦中D-手性肌醇含量的方法[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 248-252.
- [12] KIM J, HOPPEL C L. Comprehensive approach to the quantitative analysis of mitochondrial phospholipids by HPLC-MS[J]. J Chromatogr B, 2013, 912: 105-114.
- [13] DAVID E, TED P, PAMELA F, et al. Determination of free and total myo-inositol in infant formula and adult/pediatric nutritional formula by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, including a novel total extraction using microwave-assisted acid hydrolysis and enzymatic treatment[J]. J Aoac Int, 2013, 96(5): 1068-1072.
- [14] MAROLT G, KOLAR M. Analytical methods for determination of phytic acid and other inositol phosphates: a review [J/OL]. Molecules, 2021, 26(1): 174 [2021-07-06]. <https://doi.org/10.3390/molecules26010174>.
- [15] 陈地灵,陈振兴,林励,等. HPLC-ELSD法测定化橘红中肌醇含量[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(4): 385-387.
- [16] PERELLÓ J, ISERN B, COSTA-BAUZÁ A, et al. Determination of myo-inositol in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2004, 802(2): 367-370.
- [17] 中国药品生物制品检定所,中国药品检验总所. 中国药品检验标准操作规范:2010年版[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [18] 胡桂林,张雪峰,崔涛,等. 气相色谱-质谱/质谱法测定牛奶和奶粉中的肌醇[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(8): 47-49,64.