

## 检测分析

# 正相高效液相色谱法同时测定芝麻油中生育酚、芝麻素及芝麻林素含量

张东,段章群,李秀娟,朱琳,薛雅琳

(国家粮食局科学研究院,北京 100037)

**摘要:**建立了正相高效液相色谱法同时测定芝麻油中生育酚( $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚)、芝麻素及芝麻林素含量的方法。样品经正庚烷溶解后,在二醇基硅胶色谱柱上以四氢呋喃-正庚烷溶液洗脱、荧光检测器分析。结果表明:芝麻素及芝麻林素荧光特性良好,样品分析在20 min内完成;方法学评价结果显示生育酚在1.0~5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、芝麻素及芝麻林素在0.1~5.0  $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,相关系数 $R^2$ 均大于0.99;生育酚、芝麻素以及芝麻林素的检出限为0.29~0.74 mg/kg,定量限为0.91~2.10 mg/kg;6种化合物加标回收率为83.47%~104.57%,相对标准偏差为0.38%~6.55%。采用该方法分析了12个芝麻香油、冷榨芝麻油、浸出成品芝麻油中生育酚、芝麻素以及芝麻林素含量,发现芝麻油中生育酚以 $\gamma$ 型为主,芝麻素、芝麻林素含量较高。该方法简单、灵敏度高、重复性好,可用于芝麻油中生育酚、芝麻素及芝麻林素含量的同时检测。

**关键词:**芝麻油;生育酚;芝麻素;芝麻林素;正相高效液相色谱法

中图分类号:TS225.1;TQ646.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)05-0131-04

## Simultaneous determination of tocopherol, sesamin and sesamol in sesame oil by normal phase - high performance liquid chromatography

ZHANG Dong, DUAN Zhangqun, LI Xiujuan, ZHU Lin, XUE Yalin

(Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China)

**Abstract:** A method was developed for simultaneous determination of tocopherol, sesamin and sesamol in sesame oil by normal phase - high performance liquid chromatography. The sample was dissolved by *n*-heptane, and eluted by tetrahydrofuran - *n*-heptane in a DIOL column, and detected by fluorescence detector. The results showed that sesamin and sesamol presented good fluorescent characteristics and the analysis was carried out within 20 min. The evaluation of methodology indicated that tocopherol showed a good linearity in the range of 1.0 - 5.0  $\mu\text{g/mL}$  while sesamin and sesamol of 0.1 - 5.0  $\mu\text{g/mL}$  with correlation coefficients ( $R^2$ ) above 0.99. The limits of detections (LODs) and the limits of quantifications (LOQs) of tocopherol, sesamin and sesamol were 0.29 - 0.74 mg/kg and 0.91 - 2.10 mg/kg, respectively. The average recoveries of six analytes were 83.47% - 104.57%, and the relative standard deviations (RSDs) were 0.38% - 6.55%. Twelve samples including fragrant sesame oil, cold pressed sesame oil and extracted sesame oil were analyzed by this method. The results showed that main tocopherol in the sesame oil was  $\gamma$  type and the contents of sesamin and sesamol were high. The method could be used to simultaneously determine tocopherol, sesamin and sesamol due to its simple operation, high sensitivity and good reproduction.

**Key words:** sesame oil; tocopherol; sesamin; sesamol; normal phase - high performance liquid chromatography

收稿日期:2017-09-07

作者简介:张东(1982),男,助理研究员,硕士,主要从事粮油食品检验工作(E-mail)zd@chinagrains.org。

通信作者:薛雅琳,教授级高级工程师(E-mail)xyl@chinagrains.org。

芝麻油含有高达85%的不饱和脂肪酸,但仍具

有很好的氧化稳定性,良好的氧化稳定性源于其丰富的内源性抗氧化物如生育酚、芝麻素及芝麻林素等<sup>[1]</sup>。芝麻油中芝麻素含量为0.4%~0.8%,芝麻林素含量为0.2%~0.4%,生育酚含量为300~700 mg/kg<sup>[2-4]</sup>。

根据文献报道,检测植物油中生育酚的方法主要有反相高效液相色谱法(RP-HPLC)<sup>[5]</sup>、正相高效液相色谱法(NP-HPLC, GB/T 26635—2011)以及超临界色谱法(SFC)<sup>[6]</sup>,由于采用正相色谱法具有样品前处理简单,回收率高等特点被广泛应用;而芝麻素及芝麻林素的检测方法主要有薄层色谱法(TLC)<sup>[7]</sup>、气相色谱法(GC)<sup>[8]</sup>、气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[9]</sup>以及HPLC法<sup>[10-12]</sup>等,其中以RP-HPLC法为主,直接以甲醇/乙醇水溶液为提取溶剂,或皂化后提取芝麻素、芝麻林素,进行色谱分析、紫外光下检测。但未见采用正相色谱法以及荧光检测器的报道。本研究以芝麻油为研究对象,建立一种能够同时测定生育酚、芝麻素及芝麻林素的正相高效液相色谱方法,旨在为芝麻油掺伪检验及营养评价提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

芝麻油:市售;棕榈原油:由某公司提供(用于生育三烯酚的对照)。

$\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚, $\beta$ -生育三烯酚:美国Sigma公司;芝麻素、芝麻林素:上海源叶生物科技有限公司;正庚烷、四氢呋喃、甲醇:色谱级,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;0.45  $\mu$ m滤膜:天津腾公司。

AB304-S型电子天平:瑞士梅特勒-托利多公司;e2695型高效液相色谱仪配2475型荧光检测器:美国Waters公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 样品制备

精确称取0.25 g芝麻油样品于25 mL棕色容量瓶中,加入少量正庚烷溶解后,以正庚烷稀释并定容至刻度。过0.45  $\mu$ m滤膜后上机分析。如果样品浓度过高,可稀释后再进行分析。

#### 1.2.2 生育酚标准储备溶液制备与定值

分别称取10 mg  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚于50 mL棕色容量瓶中,正庚烷稀释并定容至刻度,得到4种生育酚标准储备溶液。

分别移取5 mL生育酚标准储备溶液至10 mL棕色容量瓶中,氮吹至干,加入甲醇复溶后定容至刻度,摇匀。采用10 mm石英比色皿于270~310 nm

选择适当波长测定其吸光度(吸光度应在0.2~0.8之间),以吸光度除以相应的校正系数定值。

#### 1.2.3 芝麻素、芝麻林素标准储备溶液制备

分别称取6.25 mg芝麻素、芝麻林素于25 mL容量瓶中,加入少量四氢呋喃溶解后,以四氢呋喃稀释并定容至刻度,得到质量浓度为0.25 mg/mL的芝麻素、芝麻林素标准储备溶液。

#### 1.2.4 标准曲线的制作

分别移取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚标准储备溶液至100 mL容量瓶中,正庚烷定容至刻度,得到质量浓度分别为1.0、2.0、3.0、4.0  $\mu$ g/mL和5.0  $\mu$ g/mL的工作液;将芝麻素、芝麻林素标准储备溶液稀释至20  $\mu$ g/mL,分别移取质量浓度为20  $\mu$ g/mL芝麻素、芝麻林素标准溶液0.5、1.25、2.5、5、25 mL至100 mL容量瓶中,正庚烷定容至刻度,得到质量浓度分别为0.1、0.25、0.5、1.0  $\mu$ g/mL和5.0  $\mu$ g/mL的工作液。高效液相色谱分析,以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标制作标准曲线。

#### 1.2.5 荧光特性分析

将芝麻素、芝麻林素标准储备溶液稀释至5  $\mu$ g/mL。室温下采用2475型荧光检测器3D扫描模式测定上述溶液荧光光谱,设定激发波长为295 nm,发射光谱扫描范围为200~800 nm,激发狭缝宽度和发射狭缝宽度均为6 nm。

#### 1.2.6 正相高效液相色谱分析

采用Waters e2695型高效液相色谱仪测定 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚。默克LiChrospher® 100 DIOL色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)和默克LiChrospher® Si 60色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m),柱温25  $^{\circ}$ C,进样量10  $\mu$ L。流动相A为四氢呋喃-正庚烷溶液(体积比40:1 000),流动相B为四氢呋喃,等度洗脱,流动相流速为1.0 mL/min。荧光检测器,激发波长为295 nm,发射波长为330 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 芝麻素、芝麻林素的荧光特性分析

芝麻素及芝麻林素均含有苯环结构,根据荧光产生与化合物结构的关系,推断两者为荧光物质<sup>[13]</sup>。研究了质量浓度为5  $\mu$ g/mL的芝麻素及芝麻林素荧光光谱性质。试验所用激发波长为295 nm,在200~800 nm范围内扫描得到芝麻素及芝麻林素发射光谱,发现芝麻素及芝麻林素的最大发射波长分别为305.0、329.8 nm。确定最大发射波长后,在200~320 nm范围内扫描芝麻素及芝麻林素激发光谱,发现当激发波长在284 nm处,芝麻素及

芝麻林素荧光强度最强。鉴于芝麻素及芝麻林素的最大发射波长差异较大,试验设计了3种不同的荧光条件,测定其峰面积,见表1。

表1 3种不同荧光条件下芝麻素及芝麻林素的峰面积

序号	激发波长/发射波长/ nm		峰面积/( $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ )	
	激发	发射	芝麻素	芝麻林素
1	284	330	172 380 922	71 844 440
2	284	305	164 371 948	17 610 152
3	295	330	163 350 032	85 727 953

由表1可以看出,3种不同荧光条件下芝麻素的峰面积变化并不明显,而当激发波长为284 nm、发射波长为305 nm时,芝麻林素的峰面积只有另外2种荧光条件的20%左右。因此,将两者最佳激发波长设定为295 nm,最佳发射波长设定为330 nm,与测定生育酚的荧光条件一致。

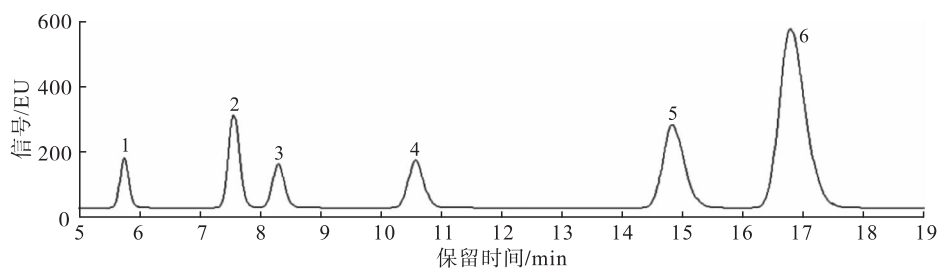
## 2.2 色谱柱的选择

生育酚在C18柱、硅胶柱和二醇柱上均能够很好地分离<sup>[5]</sup>,而芝麻素和芝麻林素在C18柱上分离

的报道较为常见<sup>[11-12]</sup>。本研究分别采用硅胶柱和二醇基硅胶柱分离芝麻油中4种生育酚、芝麻素及芝麻林素。向芝麻油样品中同时添加 $\beta$ -生育三烯酚和 $\gamma$ -生育酚时,硅胶柱无法有效分离。因此,实验采用二醇基硅胶柱作为分离色谱柱。

## 2.3 高效液相色谱条件的优化

采用默克LiChrospher® 100 DIOL色谱柱同时分离4种生育酚、芝麻素和芝麻林素。以正庚烷和四氢呋喃作为流动相,通过调整两者比例达到最佳分离效果。结果表明:当采用含有3.85%四氢呋喃的正庚烷溶液洗脱目标物时,分析时间大于30 min,且芝麻林素和芝麻素峰宽较大;因此试验增加了四氢呋喃的比例,以含3.85%四氢呋喃的正庚烷-四氢呋喃(体积比97:3)洗脱目标化合物时,峰型得到明显改善,灵敏度提高,分析时间缩短至20 min以内。在此条件下,6种化合物能够得到较好的分离,色谱图见图1。



注:1.  $\alpha$ -生育酚;2.  $\beta$ -生育酚;3.  $\gamma$ -生育酚;4.  $\delta$ -生育酚;5. 芝麻林素;6. 芝麻素。

图1 生育酚、芝麻素及芝麻林素正相高效液相色谱图

## 2.4 方法学评价

### 2.4.1 线性关系、检出限和定量限

配制一系列不同质量浓度的生育酚、芝麻素及芝麻林素混合工作液(生育酚质量浓度分别为1.0、

2.0、3.0、4.0、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,芝麻素及芝麻林素质量浓度分别为0.1、0.25、0.5、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),进样分析,以目标物的峰面积 $Y$ 为纵坐标,质量浓度 $X$ 为横坐标制作标准曲线,结果见表2。

表2 生育酚、芝麻素及芝麻林素的线性关系、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性关系	$R^2$	线性范围/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	检出限/( $\text{mg}/\text{kg}$ )	定量限/( $\text{mg}/\text{kg}$ )
$\alpha$ -生育酚	$Y = 7.89 \times 10^6 X - 1.12 \times 10^5$	0.993 3	1.0 ~ 5.0	0.74	2.10
$\beta$ -生育酚	$Y = 1.77 \times 10^7 X - 1.74 \times 10^6$	0.992 9	1.0 ~ 5.0	0.30	1.01
$\gamma$ -生育酚	$Y = 6.43 \times 10^6 X + 3.31 \times 10^5$	0.996 6	1.0 ~ 5.0	0.52	1.60
$\delta$ -生育酚	$Y = 1.28 \times 10^7 X + 6.16 \times 10^5$	0.996 4	1.0 ~ 5.0	0.29	1.00
芝麻林素	$Y = 1.56 \times 10^7 X + 1.00 \times 10^6$	0.999 6	0.1 ~ 5.0	0.67	2.02
芝麻素	$Y = 3.22 \times 10^7 X + 2.01 \times 10^6$	0.999 6	0.1 ~ 5.0	0.34	0.91

由表2可以看出,生育酚在1.0~5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芝麻素及芝麻林素在0.1~5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好,相关系数 $R^2$ 均大于0.99,满足检测需求。检出限和定量限以向空白样品中逐级降低加标浓度的方法来确定,以色谱峰信噪比( $S/N$ )3为方

法的检出限,信噪比( $S/N$ )10为定量限。生育酚、芝麻素以及芝麻林素的检出限为0.29~0.74  $\text{mg}/\text{kg}$ ,定量限为0.91~2.10  $\text{mg}/\text{kg}$ 。

### 2.4.2 加标回收率和精密度

分别在芝麻油样品中加入生育酚、芝麻素及芝

麻林素标准溶液,使得生育酚加标水平分别为200.00、500.00、1 000.00 mg/kg,芝麻素及芝麻林素加标水平分别为1 000.00、3 000.00、6 000.00 mg/kg,按试验给定的方法进行测定,每个添加水平重复测定6次,计算得到方法的加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表3。由表3可以看出,6种目标化合物加标回收率为83.47%~104.57%,相对标准偏差为0.38%~6.55%。说明本方法重复性好,准确度高,符合检测要求。

表3 生育酚、芝麻素及芝麻林素加标回收率和精密度试验结果( $n=6$ )

化合物	本底值/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	加标回收率/%	RSD/%
$\alpha$ -生育酚	2.43	200.00	83.47	2.39
		500.00	86.40	3.91
		1 000.00	92.46	1.77
$\beta$ -生育酚	14.96	200.00	104.57	0.38
		500.00	97.59	3.64
		1 000.00	94.71	3.22
$\gamma$ -生育酚	422.78	200.00	97.39	0.55
		500.00	95.37	4.46
		1 000.00	85.33	3.04
$\delta$ -生育酚	1.88	200.00	85.40	3.02
		500.00	89.58	4.57
		1 000.00	96.15	0.83
芝麻林素	3 263.08	1 000.00	87.46	6.55
		3 000.00	97.58	5.11
		6 000.00	101.39	3.42
芝麻素	4 434.19	1 000.00	91.86	1.35
		3 000.00	84.51	6.07
		6 000.00	88.06	3.72

## 2.5 实际样品测定

采用本文建立的方法分析了12个芝麻香油、冷榨芝麻油、浸出成品芝麻油中生育酚、芝麻素以及芝麻林素含量。芝麻油中 $\alpha$ -、 $\delta$ -生育酚含量均小于10 mg/kg, $\beta$ -生育酚含量小于50 mg/kg; $\gamma$ -生育酚含量为397.06~423.56 mg/kg;芝麻素、芝麻林素含量分别在3 207.43~4 434.19 mg/kg、2 513.15~3 263.08 mg/kg。

## 3 结论

本研究建立了正相高效液相色谱同时测定芝麻油中生育酚、芝麻素及芝麻林素的方法。结果表明,

该方法可以快速、准确地测定芝麻油中生育酚、芝麻素及芝麻林素的含量。通过样品测定发现,芝麻油中主要生育酚以 $\gamma$ 型为主,芝麻素和芝麻林素含量较高。

## 参考文献:

- [1] 徐学兵. 油脂化学[M]. 北京:中国商业出版社,1993:303-305.
- [2] 刘玉兰,钟雪玲,汪学德,等. 冷榨芝麻油与浸出精炼芝麻油品质差异研究[J]. 中国油脂,2012,37(12):5-9.
- [3] RANGKADILOK N, PHOLPHANA N, MAHIDOL C, et al. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand[J]. Food Chem, 2010, 122(3): 724-730.
- [4] CHENG Y, SHAO Y, YAN W. Sesamin and sesamol contents in various commercial sesame oils [J]. Planta Medica, 2011, 77(12): 1363.
- [5] 于瑞祥,张欣,张秀芹,等. 反相高效液相色谱法同时测定植物油中四种生育酚[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6):764-767.
- [6] 毛多斌,贾春晓,孙晓丽,等. 几种功能性植物油中角鲨烯和维生素E分析[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(2):79-82.
- [7] KAMAL - ELDIN A, YOUSIF G, APPELQVIST L A. Thin - layer chromatographic separations of seed oil unsaponifiables from four *Sesamum* species[J]. J Am Oil Chem Soc, 1991, 68(11):844-847.
- [8] TASHIRO T, FUKUDA Y, OSAWA T, et al. Oil and minor components of sesame (*Sesamum indicum* L.) strains [J]. J Am Oil Chem Soc, 1990, 67(8):508-511.
- [9] 张令莉,郑永杰,任桂兰. CO<sub>2</sub>超临界萃取芝麻油中芝麻素含量的GC-MS测定[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2006, 22(5):28-30.
- [10] KAMAL - ELDIN A, YOUSIF G, APPELQVIST L A. Lignan analysis in seed oils from four sesamum species: comparison of different chromatographic methods [J]. J Am Oil Chem Soc, 1994, 71(2):141-147.
- [11] 余少冲,钟玲,李迎霞,等. 芝麻中芝麻素含量的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(5):527-529.
- [12] 戴洪平,王兴国,金青哲. HPLC法测定芝麻油中生理活性成分——芝麻素[J]. 食品科技, 2004(3):86-88.
- [13] 张根旺. 油脂化学[M]. 北京:中国财政经济出版社, 1999:233-235.