

脂质伴随物

DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.2021.03.107

气相色谱法同时快速测定大豆油脱臭馏出物中的生育酚、植物甾醇和角鲨烯含量

甘欢华¹, 张斌², 刘钟栋¹, 李华¹, 魏国华²

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450000; 2. 宜春大海龟生命科学有限公司, 江西 宜春 336000)

摘要:建立了可以同时定量分析大豆油脱臭馏出物中生育酚(α -生育酚、($\beta + \gamma$)-生育酚、 δ -生育酚)、植物甾醇(菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇)和角鲨烯含量的气相色谱检测方法。以十六酸十六醇酯为内标物质,样品直接溶解在内标溶液中,采用HP-1色谱柱分离,以内标法定量。结果表明:各组分之间分离度良好,生育酚、植物甾醇和角鲨烯分别在0.4~6.4 mg/mL、0.5~8.0 mg/mL、0.4~4.0 mg/mL范围内呈现良好的线性关系, R^2 均大于等于0.999,平均加标回收率分别为95.38%~102.78%、96.40%~101.24%、96.14%~104.43%,相对标准偏差均小于10%,检出限分别为0.08、0.15、0.05 mg/L。该方法前处理简单、重复性好、灵敏度高、结果准确可靠,可应用于大豆油脱臭馏出物中生育酚、植物甾醇、角鲨烯含量的同时测定。

关键词:大豆油脱臭馏出物;气相色谱法;同时测定;生育酚;植物甾醇;角鲨烯

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)05-0039-05

Simultaneous and rapid determination of tocopherol, phytosterol and squalene in soybean oil deodorized distillate by gas chromatography

GAN Huanhua¹, ZHANG Bin², LIU Zhongdong¹, LI Hua¹, WEI Guohua²

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450000, China; 2. Yichun Big Turtle Life Science Co., Ltd., Yichun 336000, Jiangxi, China)

Abstract: A gas chromatography detection method was established, which could simultaneously quantitatively analyze the tocopherols (α -tocopherol, ($\beta + \gamma$)-tocopherol, δ -tocopherol), phytosterols (rapeseed sterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol) and squalene in soybean oil deodorized distillate. With cetyl palmitate as the internal standard substance, the sample was directly dissolved in the internal standard solution, and the HP-1 column was used to separate various components. The results showed that the separation of various components was good. The tocopherol, phytosterol and squalene showed good linear relationships in the ranges of 0.4-6.4 mg/mL, 0.5-8.0 mg/mL and 0.4-4.0 mg/mL respectively, the relative coefficients were all greater than or equal to 0.999, and their average recovery rates were 95.38% - 102.78%, 96.40% - 101.24%, 96.14% - 104.43% respectively. The relative standard deviations were all lower than 10%, and their detection limits were 0.08, 0.15 mg/L and 0.05 mg/L, respectively. The method had the items of simple pretreatment, good reproducibility, high sensitivity, and accurate and reliable results, which could be applied in the simultaneous determination of tocopherol, phytosterol and squalene in soybean oil deodorized distillate.

Key words: soybean oil deodorized distillate; gas chromatography; simultaneous determination; tocopherol; phytosterol; squalene

收稿日期:2020-07-27;修回日期:2021-01-27

作者简介:甘欢华(1995),男,在读硕士,研究方向为油脂脱臭馏出物的综合利用(E-mail)1944261576@qq.com。

通信作者:李华,副教授(E-mail)lixian78101@163.com。

油脂脱臭馏出物是提取天然生育酚、植物甾醇、角鲨烯的主要原料^[1]。以大豆油脱臭馏出物(俗称DD油)为例,其组分复杂多样,其中游离脂肪酸含

量 23% ~ 35%, 生育酚含量 3% ~ 20%, 植物甾醇含量 10% ~ 23%, 角鲨烯含量 1% ~ 3%^[2-3]。油脂脱臭馏出物经酯化、酯交换、冷析结晶、精馏等步骤可将生育酚、植物甾醇、角鲨烯逐步分离提取^[4-5]。

天然生育酚具有抗氧化、延缓衰老、提高免疫力及生育能力等功效,被广泛应用于饲料工业、化妆品及食品行业^[6];植物甾醇具有降低胆固醇、调节免疫、抗氧化及抗癌等生理功效,可应用于医药和食品行业^[7];角鲨烯不仅能调节人体代谢、活化细胞,还具有强抗氧化性,能有效防止细胞老化和癌变,提高机体免疫力,主要应用于保健食品和化妆品领域^[8]。

目前,天然生育酚的检测方法有光谱法、电化学分析法、色谱法与色谱-质谱联用法,其中以高效液相色谱法及气相色谱法应用较为广泛,这两种方法都具有操作简单、灵敏度高、稳定性好、准确性高等优点^[9-10]。植物甾醇的检测方法有薄层色谱法、重量法、比色法、高速逆流色谱法、液相色谱法和气相色谱法^[11]等,其中气相色谱法因检测时间短、选择性高、分离度好、结果准确等优点而被广泛应用^[12]。角鲨烯的检测方法有滴定法^[13]、液相色谱法^[14]、气相色谱法^[15]、气相色谱-质谱联用法等,其中滴定法操作烦琐、误差大,液相色谱法由于样品杂质较多,容易对色谱柱造成损害,而气相色谱-质谱联用法主要应用于组分的定性分析,因此角鲨烯的定量分析多采用气相色谱法^[16]。

本文建立了一种同时测定大豆油脱臭馏出物中生育酚、植物甾醇、角鲨烯的气相色谱法。该方法在 GB 1886.233—2016《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 E》的基础上进行改良,能实现目标组分的分离,以内标法进行定量,是一种方便、快捷、准确的检测方法,可为油脂脱臭馏出物中生物活性成分的快速检测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆油脱臭馏出物,中国储备粮管理集团有限公司;棉籽油脱臭馏出物,新疆棉籽油厂;菜籽油脱臭馏出物,安徽丰大油脂公司;米糠油脱臭馏出物,湖南金健米业股份有限公司;玉米油脱臭馏出物、棕榈油脱臭馏出物,嘉吉粮油有限公司; α -生育酚(纯度 97%),上海安谱实验科技股份有限公司;混合生育酚(纯度 96%),山东新元素生物科技有限公司;豆甾醇(纯度 95%)、 β -谷甾醇(纯度 98%),成都化夏化学试剂有限公司;菜油甾醇(纯度 97%)、菜籽甾醇(纯度 98%),日本和光公司;角鲨烯(纯度 98%),梯希爱化成工业发展有限公司;十六酸

十六醇酯(纯度 98%),东京化成工业株式会社;正己烷、正丁醇均为色谱纯,天津市富宇精细化工有限公司。

GC-2010 气相色谱仪、FID 检测器,岛津公司;GPI-2 气体净化器,浙江福立分析仪器股份有限公司;SHC 型氢气发生器、QL-3 型纯净空气泵,山东赛克赛斯氢能源有限公司;FA2004B 电子天平,上海天美天平仪器有限公司;KQ3200B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 内标溶液的配制

以十六酸十六醇酯为内标物质,先将其完全溶解在正己烷中,再加入一定量的正丁醇,配成 1.5 mg/mL 的内标溶液,其中正己烷、正丁醇的体积比为 1:1。

1.2.2 标准样品溶液的配制

α -生育酚标准溶液的配制:用内标溶液配制 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mg/mL α -生育酚系列标准溶液。

混合生育酚标准溶液的配制:用内标溶液配制 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mg/mL 混合生育酚系列标准溶液。

混合植物甾醇标准溶液的配制:将菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇单体按一定比例混合均匀,用内标溶液配制 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/mL 的混合植物甾醇系列标准溶液。

角鲨烯标准溶液的配制:用内标溶液配制 0.4、0.8、1.6、3.2、4.0 mg/mL 的角鲨烯系列标准溶液。

1.2.3 试验样品的制备

准确称取 0.3 g(精确到 0.000 1 g)待测样品于 25 mL 容量瓶中,用内标溶液定容,在超声波清洗器中振荡 5 min 至样品充分溶解。

1.2.4 色谱条件

安捷伦 HP-1 毛细管柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m);FID 检测器;柱温箱温度 260 $^{\circ}$ C;进样口温度 310 $^{\circ}$ C;检测器温度 310 $^{\circ}$ C;载气为高纯氮气,流量 1 mL/min;氢气流量 32 mL/min;空气流量 300 mL/min;尾吹气流量 30 mL/min;分流比 20:1;进样量 1 μ L。

1.2.5 定性与定量方法

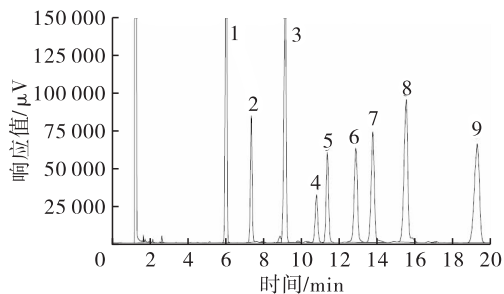
参考 GB 1886.233—2016,混合生育酚采用 α -生育酚标准品进行定性;角鲨烯以标准品对照定性;植物甾醇以各单体标准品进行定性^[17]。混合生育酚、植物甾醇、角鲨烯都采用内标法进行定量。

2 结果与分析

2.1 色谱分离

在设定的色谱条件下,分别测定角鲨烯、 α -生

育酚单体、混合生育酚标样、混合植物甾醇标准溶液,混合标准品气相色谱图如图1所示。



注:1.角鲨烯;2.δ-生育酚;3.(β+γ)-生育酚;4.α-生育酚;5.菜籽甾醇;6.菜油甾醇;7.豆甾醇;8.β-谷甾醇;9.十六酸十六醇酯。

图1 混合标准品气相色谱图

从图1可以看出,角鲨烯、δ-生育酚、(β+γ)-生育酚、α-生育酚、菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、

β-谷甾醇、十六酸十六醇酯分离良好,保留时间分别为6.044、7.370、9.154、10.809、11.326、12.878、13.774、15.548、19.288 min。

2.2 方法学评价

2.2.1 标准曲线与检出限

将配制的标准溶液按1.2.4色谱条件进行检测,分别以α-生育酚、植物甾醇、角鲨烯与十六酸十六醇酯峰面积比为横坐标(x),以α-生育酚、植物甾醇、角鲨烯与十六酸十六醇酯质量浓度比为纵坐标(y),绘制标准曲线,以3倍信噪比确定检出限,结果如表2所示。

由表2可知,各目标组分的质量浓度与峰面积呈良好的线性关系,且相关系数均大于等于0.999,α-生育酚、植物甾醇和角鲨烯的检出限为0.05~0.15 mg/L。

表2 α-生育酚、植物甾醇及角鲨烯的线性关系与检出限

目标组分	线性范围/(mg/mL)	标准曲线方程	相关系数(R^2)	检出限/(mg/L)
α-生育酚	0.4~6.4	$y = 33.608x + 3.280$	0.999 5	0.08
菜籽甾醇	0.5~8.0	$y = 35.177x + 0.477$	0.999 7	0.15
菜油甾醇	0.5~8.0	$y = 35.072x + 1.486$	0.999 1	0.15
豆甾醇	0.5~8.0	$y = 35.189x + 1.664$	0.999 0	0.15
β-谷甾醇	0.5~8.0	$y = 35.154x + 2.188$	0.999 0	0.15
角鲨烯	0.4~4.0	$y = 29.276x + 1.115$	0.999 9	0.05

2.2.2 方法精密度与加标回收率

为验证该方法在实际应用中的可行性,在已知生育酚、植物甾醇、角鲨烯含量的大豆油脱臭馏出物中分别加入不同加标量的标准品,并充分振荡,溶解均匀,用本方法进行定量分析,结果如表3所示。

表3 生育酚、植物甾醇、角鲨烯精密度和回收率试验结果($n=7$)

待测组分	本底值	加标量	测定值	回收率	RSD
生育酚	8.54	10.18	18.25	95.38	1.57
		20.07	27.93	96.61	4.14
		30.16	38.52	99.40	5.87
		40.26	49.92	102.78	2.83
植物甾醇	14.62	20.26	34.15	96.40	3.96
		40.37	54.76	99.43	2.24
		60.16	74.38	99.34	1.84
		80.76	96.38	101.24	5.63
角鲨烯	1.87	2.07	3.86	96.14	4.58
		4.05	5.83	97.78	5.27
		8.13	10.36	104.43	1.59
		16.77	18.43	98.75	3.43

由表3可知,在4个不同加标水平下,生育酚、植物甾醇、角鲨烯的回收率分别为95.38%~102.78%、96.40%~101.24%、96.14%~104.43%,相对标准偏差

(RSD)分别为1.57%~5.87%、1.84%~5.63%、1.59%~5.27%。根据GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》规定,被测组分含量大于100 mg/kg时,加标回收率范围为95%~105%,由此可知试验得到的加标回收率都在规定范围内,说明该方法准确度、精密度较高。

2.2.3 重复性试验

取同一批次样品,分别制备6份待测样品,连续进样6次,用本方法进行分析,根据生育酚、植物甾醇、角鲨烯的含量评价方法的重复性,测定结果如表4所示。

表4 生育酚、植物甾醇和角鲨烯重复性试验结果($n=6$)

待测组分	不同次数测定值						平均含量	RSD
	1	2	3	4	5	6		
生育酚	8.54	8.27	8.49	8.63	8.39	8.51	8.47	1.48
植物甾醇	14.62	14.28	14.60	14.93	14.56	14.78	14.63	1.50
角鲨烯	1.87	1.84	1.79	1.82	1.90	1.88	1.85	2.22

由表4可知,生育酚、植物甾醇和角鲨烯的RSD为1.48%~2.22%,说明该方法的重复性较好,能满足检测要求。

2.3 本方法与常规方法的比较

取4个不同批次样品,按1.2.3分别制备4份待测样,用常规方法(其中测定生育酚及角鲨烯含量的常规方法分别采用GB 1886.233—2016及LS/

T 6120—2017,测定植物甾醇含量的常规方法参照文献[17])与本方法分别检测其中的生育酚、植物甾醇和角鲨烯含量,结果如表5所示。对表5结果进行显著性差异分析,结果如表6所示。

表5 生育酚、植物甾醇和角鲨烯含量常规检测与同时快速检测的结果比较($n=2$)

样品批次	生育酚		植物甾醇		角鲨烯	
	常规方法	本方法	常规方法	本方法	常规方法	本方法
1	8.98	8.69	14.83	14.59	1.23	1.18
2	10.07	9.82	17.93	18.10	2.85	2.86
3	7.79	7.56	18.77	19.01	1.62	1.67
4	12.02	11.78	13.69	13.85	1.41	1.45

表6 两种方法结果的显著性差异分析

差异源	均方	F值	临界值	显著性
生育酚	0.127 5	0.039 4	5.987 4	不显著
植物甾醇	0.013 6	0.002 2	5.987 4	不显著
角鲨烯	0.000 3	0.000 6	5.987 4	不显著

注:临界值为0.05显著性水平上的。

由表6可知,在0.05显著性水平上,生育酚、植物甾醇、角鲨烯的F值均小于临界值,说明常规方法与本方法结果不存在显著性差异,进一步说明了本研究建立的方法准确、可靠。

2.4 本方法应用于其他植物油脱臭馏出物样品中生育酚、植物甾醇及角鲨烯含量的测定

分别取棉籽油脱臭馏出物、米糠油脱臭馏出物、菜籽油脱臭馏出物、棕榈油脱臭馏出物及玉米油脱臭馏出物按本方法1.2.3和1.2.4测定其中的生育酚、植物甾醇及角鲨烯含量,结果如表7所示。

表7 5种植物油脱臭馏出物中生育酚、植物甾醇及角鲨烯的含量

样品	生育酚	植物甾醇	角鲨烯
棉籽油脱臭馏出物	7.62	13.69	0.56
米糠油脱臭馏出物	3.57	15.43	1.92
菜籽油脱臭馏出物	8.45	22.39	0.97
棕榈油脱臭馏出物	1.23	2.10	0.72
玉米油脱臭馏出物	8.56	9.73	2.17

由表7可知:棕榈油脱臭馏出物中生育酚、植物甾醇及角鲨烯含量都较少;菜籽油脱臭馏出物中植物甾醇含量最高,为22.39%;玉米油脱臭馏出物中的生物活性成分相对较为丰富;这5种植物油脱臭馏出物中生育酚、植物甾醇及角鲨烯的测定结果与文献[18-19]报道相符合。因此,本方法在其他脱臭馏出物样品检测中的应用存在一定可行性,具体的确切结论还需要进一步的试验验证。

3 结论

本研究首次建立了一种同时测定大豆油脱臭馏

出物中生育酚、植物甾醇及角鲨烯含量的气相色谱法。该方法以十六酸十六醇酯为内标物质,待测样品不需要烦琐的前处理过程,直接溶解在内标溶液中。结果表明:生育酚、植物甾醇和角鲨烯分别在0.4~6.4 mg/mL、0.5~8.0 mg/mL、0.4~4.0 mg/mL范围内呈现良好的线性关系,相关系数均大于等于0.999,平均加标回收率分别为95.38%~102.78%、96.40%~101.24%、96.14%~104.43%,相对标准偏差均小于10%,检出限分别为0.08、0.15、0.05 mg/L。该方法检出限低、精密度高、重复性好、加标回收率高,可应用于大豆油脱臭馏出物中生育酚、植物甾醇、角鲨烯含量的快速检测。同时对该方法应用于其他植物油脱臭馏出物样品的检测进行初探,发现该方法具有一定的应用潜力,值得进一步开发完善。

参考文献:

- [1] 琚裕杰. 大豆油脱臭馏出物中生物活性成分综合提取工艺研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2015.
- [2] 尹秀莲,马海乐,游庆红. 大豆油脱臭馏出物预酯化工工艺研究[J]. 轻工科技,2014,30(6):29-30.
- [3] 胡小泓,刘文涛,刘昌伟,等. 大豆油脱臭馏出物中提取维生素E研究探讨[J]. 粮食与油脂,2002(2):2-3.
- [4] 代志凯,李祥清,马金萍,等. 大豆油脱臭馏出物中同时提取角鲨烯、生育酚和植物甾醇的工艺研究[J]. 粮油食品科技,2018,26(2):21-24.
- [5] 陈璐. 大豆脱臭馏出物中角鲨烯的提取研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2015.
- [6] 张兰,王磊. 植物中维生素E的生物学功能研究进展[J]. 生物技术进展,2016,6(6):389-395.
- [7] 鲁海龙,史宣明,张旋,等. 植物甾醇制取及应用研究进展[J]. 中国油脂,2017,42(10):134-137.
- [8] 徐向华,张欣,于瑞祥,等. 高效液相色谱法同时测定植物油中角鲨烯、生育酚和甾醇[J]. 食品科学,2015,36(16):141-147.

(下转第70页)

- [46] YAO Y P, ZHAO G Z, XIANG J Y, et al. Lipid composition and structural characteristics of bovine, caprine and human milk fat globules [J]. *Int Dairy J*, 2016, 56: 64 – 73.
- [47] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Lipid composition analysis of milk fats from different mammalian species: potential for use as human milk fat substitutes [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(29): 7070 – 7080.
- [48] BENOIT B, FAUQUANT C, DAIRA P, et al. Phospholipid species and minor sterols in French human milks [J]. *Food Chem*, 2010, 120(3): 684 – 691.
- [49] SALA – VILA A, CASTELLOTE A I, RODRIGUEZ – PALMERO M, et al. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation [J]. *Nutrition*, 2005, 21(4): 467 – 473.
- [50] ZOU X Q, GUO Z, HUANG J H, et al. Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(29): 7158 – 7167.
- [51] CARR B R, SIMPSON E R. Cholesterol synthesis in human fetal tissues [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982, 55(3): 447 – 452.
- [52] WOOLLETT L A. Review: transport of maternal cholesterol to the fetal circulation [J]. *Placenta*, 2011, 32(B): S218 – S221.
- [53] 曹宇彤. 不同泌乳期中国汉族人乳类固醇组学分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [54] WATTS R, DILS R. Human milk: quantitative gas – liquid chromatographic analysis of triglyceride and cholesterol content during lactation [J]. *Lipids*, 1968, 3(6): 471 – 476.
- [55] CLARK R M, FERRIS A M, FEY M, et al. Changes in the lipids of human milk from 2 to 16 weeks postpartum [J]. *J Pediatr Gastr Nutr*, 1982, 1(3): 311 – 315.
- [56] BOERSMA E R, OFFRINGA P J, MUSKIET F A, et al. Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: an international comparative study [J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(5): 1197 – 1204.
- [57] KAMELSKA A M, PIETRZAK – FIECKO R, BRYL K. Determination of cholesterol concentration in human milk samples using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *J Appl Spectrosc*, 2013, 80(1): 148 – 152.

(上接第 42 页)

- [9] 王石, 王峻, 肖志明, 等. 天然维生素 E 的检测技术研究进展 [J]. *中国饲料*, 2017(15): 28 – 33, 38.
- [10] LI C M, YAO Y P, ZHAO G Z, et al. Comparison and analysis of fatty acids, sterols, and tocopherols in eight vegetable oils [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(23): 12493 – 12498.
- [11] 蒋晓彤, 杨济泽. 气相色谱法测定保健食品中植物甾醇的含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(17): 5889 – 5895.
- [12] 梁艳, 张英, 吴晓琴. 植物甾醇的提取分离和分析检测方法研究进展 [J]. *中国粮油学报*, 2006, 21(3): 1 – 7.
- [13] Squalene in oils and fats titrimetric method; AOAC official method 943.04 [S]. Rockville: AOAC, 1996.
- [14] 蔡媛媛, 张晖, 王兴国, 等. 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 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(9): 137 – 143.
- [15] 朱琳, 薛雅琳, 刘晓辉, 等. 气相色谱内标法测定植物油中角鲨烯含量 [J]. *中国粮油学报*, 2017, 32(12): 117 – 120.
- [16] 卢克刚, 张红霞. 植物来源角鲨烯的制备与检测方法研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(9): 217 – 224.
- [17] 杨春英, 刘学铭, 陈智毅, 等. 气相色谱 – 质谱联用法测定 14 种食用植物油中的植物甾醇 [J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(2): 123 – 128.
- [18] 吴海艳. 棉籽油脱臭馏出物中提取维生素 E 和植物甾醇 [D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [19] 汪金字. 米糠油脱臭馏出物的综合利用 [D]. 北京: 北京化工大学, 2016.