

快速皂化-中性氧化铝层析净化气相色谱-质谱法测定植物油中的角鲨烯

吴丽华^{1,2}, 赵晶晶¹, 武利梅², 李洁², 李建科²

(1. 西安市粮油质量检验中心, 西安 710003; 2. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 西安 710119)

摘要:为了快速准确地测定植物油中的角鲨烯,通过对样品前处理过程优化和质谱分析条件的摸索,建立了快速皂化-中性氧化铝层析净化气相色谱-质谱法(GC-MS)测定植物油中角鲨烯的方法。结果表明:GC-MS选择离子监测模式内标法定量下,植物油样品中角鲨烯与其他干扰物质得到了良好的分离;在0~194.4 μg/mL质量浓度范围内标准曲线回归方程的相关系数为0.998 6,线性关系良好;方法的变异系数为1.3%~2.6%,加标回收率为95.0%~96.7%;与LS/T 6120—2017相比,所建立的方法具有样品前处理快速简单、精密度好、灵敏度高等优点,大大提高了角鲨烯的检测效率;采用该方法对10种植物油中角鲨烯含量进行检测,10种植物油中均有检出,其中橄榄油中角鲨烯含量最高,约为6 000 mg/kg。

关键词:植物油;角鲨烯;气相色谱法;气相色谱-质谱法

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)10-0132-05

Determination of squalene in vegetable oil by gas chromatography – mass spectrometry with rapid saponification – neutral alumina chromatographic purification

WU Lihua^{1,2}, ZHAO Jingjing¹, WU Limei², LI Jie², LI Jianke²

(1. Xi'an Grain & Oil Quality Inspection Center, Xi'an 710003, China; 2. College of Food Engineering and Nutritional Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: In order to determine squalene in vegetable oil quickly and accurately, through the optimization of sample pretreatment process and exploration of mass spectrometry analysis conditions, the method for determination of squalene in vegetable oil was established with a rapid saponification – neutral alumina chromatographic purification and gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS). The results showed that the peaks of squalene and other impurities in vegetable oil samples were well separated by GC – MS with internal standard method in the selective ion monitoring mode. The correlation coefficient of the regression equation of the standard curve in the mass concentration range of 0 – 194.4 μg/mL was 0.998 6, which indicated that the linear relationship was good. The coefficient of variation of the method

收稿日期:2020-10-09;修回日期:2021-05-31

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1002400, 2019YFD1002403);陕西省功能油脂科技创新团队项目(2018-TD-020);陕西省技术创新引导专项——区域创新能力引导计划项目(2020QFY08-03);陕西省林业科学院科技创新计划专项重点项目(SXLK2020-0213)

作者简介:吴丽华(1978),女,高级工程师,硕士,主要从事粮油检验工作(E-mail)wulihua0820@126.com。

通信作者:李建科,教授,博士生导师,博士(E-mail)jiankel@snnu.edu.cn。

established was 1.3% – 2.6%, and the spiked recovery rate was 95.0% – 96.7%. Compared with LS/T 6120 – 2017, the method established had the advantages of rapid and simple sample pretreatment, good precision, and high sensitivity, which could greatly improve the detection efficiency of squalene. This method established was used to test the squalene content in 10 vegetable oils, and squalene was detected in all of these vegetable oils, with olive oil containing

the highest amount of squalene at approximately 6 000 mg/kg.

Key words: vegetable oil; squalene; GC; GC - MS

角鲨烯(Squalene)最初从鲨鱼的肝油中发现,常见于深海鱼肝油中,是一种天然的脂溶性三十碳三萜类化合物,其化学名称为2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯。角鲨烯具有抗氧化、细胞修复、促进血液循环等多种生理功能,被广泛应用于保健食品、化妆品、医药等领域^[1]。近年来越来越多的油脂生产采用冷榨工艺,更大程度地保留了油脂中角鲨烯等活性成分^[2]。目前,LS/T 6120—2017以及其他有关角鲨烯含量的测定方法^[3-5]中前处理方法在不皂化物提取过程均采用液液萃取的方法,液液萃取易乳化,影响提取效率,导致测定结果偏低。本文采用中性氧化铝分离不皂化物去除极性杂质,大大提高了方法的回收率。另外,LS/T 6120—2017采用气相色谱(GC)氢火焰离子化检测器(FID)作为检测手段,因为FID选择性较差,所以样品色谱图杂峰很多,分析时间较长^[6]。本研究采用气相色谱-质谱法(GC-MS),以质谱作为检测器,采用选择离子监测模式(SIM)分析,抗干扰能力强,极大地提高了检测灵敏度和检测效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

角鲨烯(纯度99.5%)、角鲨烷(纯度99.2%)标准品,Sigma-Aldrich公司;丙酮、正己烷均为色谱纯,德国默克公司;氢氧化钾、无水乙醇均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;中性氧化铝,迪马科技有限公司;特级初榨橄榄油(冷榨工艺生产),陇南田园油橄榄科技开发有限公司;特级原香油茶籽油(冷榨工艺生产),湖南大三湘茶油股份有限公司;一级核桃油(冷榨工艺生产),陕西五谷源食品生物技术开发股份有限公司;红花籽油、亚麻籽油、葡萄籽油,均为三级油(压榨工艺生产),原料来自哈萨克斯坦,西安爱菊粮油工业集团;三级米糠胚芽油(压榨工艺生产)、一级大豆油(浸出工艺生产)、一级菜籽油(压榨工艺生产),西安爱菊粮油工业集团;三级漆籽油(压榨工艺生产),商洛秦乔公司。

1.1.2 仪器与设备

岛津GC-14C气相色谱仪(配氢火焰离子化检测器(FID)),日本岛津公司;DB-5MS毛细管柱(30 m×250 μm×0.32 μm)、HP-5毛细管柱(30

m×320 μm×0.25 μm),美国安捷伦公司;Agilent 7890B-7000C气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司。

1.2 试验方法

1.2.1 系列标准工作溶液的配制

称取约10.0 mg(精确至0.000 1 g)角鲨烯和角鲨烷标准品,用正己烷溶解并定容至10 mL容量瓶中,得到角鲨烯和角鲨烷标准储备液。吸取不同体积的角鲨烯标准储备液于10 mL容量瓶中,再分别加入300 μL角鲨烷标准储备液,用正己烷作为溶剂,溶解并定容,得到系列标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理

皂化:于圆底烧瓶中加入300 μL角鲨烷标准储备液,在氮吹仪上吹干,然后再加入0.5 g油脂试样(根据样品中角鲨烯的含量选择不同的称样量0.2~2 g,保证检测值落在标准曲线范围内),加入10 mL 1 mol/L氢氧化钾乙醇溶液,于沸水浴皂化15 min,皂化结束后取出圆底烧瓶置于流动水下迅速冷却至室温。

净化:用20 mL无水乙醇湿法装填10 g中性氧化铝的层析柱,将冷却后的皂化液全部上样,然后用10 mL无水乙醇和10 mL乙醚淋洗层析柱,收集上样液和淋洗液,于旋转蒸发仪上35℃浓缩近干,氮吹吹干,10 mL正己烷定容,待测。

1.2.3 GC和GC-MS分析条件

1.2.3.1 GC分析条件(参照LS/T 6120—2017)

HP-5毛细管柱(30 m×320 μm×0.25 μm);氢火焰离子化检测器(FID),检测器温度300℃;进样口温度250℃;分流比5:1;进样量1.0 μL;升温程序为初始温度160℃,保留1 min,以15℃/min升至220℃,保持2 min,然后以5℃/min升至300℃,保持20 min;载气为高纯氮气,流速1 mL/min。

1.2.3.2 GC-MS分析条件

GC条件:DB-5MS毛细管柱(30 m×250 μm×0.32 μm);升温程序为初始温度160℃,保持1 min,以15℃/min升至300℃,保持5 min;载气为高纯氮气,流速1 mL/min;进样口温度280℃;分流比5:1;进样量1.0 μL。

MS条件:接口温度300℃,离子源温度230℃,电离方式为EI源,电离电压70 eV,采用SIM模式定量。

1.2.4 标准曲线的绘制

将配制好的系列标准工作溶液按梯度依次进行 GC 和 GC-MS 分析。GC 以角鲨烯与角鲨烷峰面积比为横坐标,角鲨烯与角鲨烷的质量比为纵坐标绘制标准曲线;GC-MS 以角鲨烯定量离子质荷比 (m/z)81.0 与内标物角鲨烷定量离子 m/z 113.1 的离子峰强度比为横坐标,角鲨烯与角鲨烷的质量比为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.5 结果计算

GC 测定样品中角鲨烯含量,按式(1)计算。

$$X = \frac{A_1}{A_s} \times \frac{m_s}{m} \times f \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \quad (1)$$

式中: X 为样品中角鲨烯的含量,mg/kg; A_1 为样品中角鲨烯的峰面积; A_s 为样品中内标角鲨烷的峰面积; m_s 为样品中加入内标角鲨烷的质量, μg ; m 为样品质量,g; f 为角鲨烯和角鲨烷的校正因子(标准系列曲线方程斜率 k 即为 f)。

GC-MS 测定样品中角鲨烯含量,结果也按式(1)计算,只是 A_1 为角鲨烯定量离子 m/z 81.0 的离子峰强度, A_s 为内标物角鲨烷定量离子 m/z 113.1 的离子峰强度。

2 结果与讨论

2.1 GC-MS 分析条件的选择

角鲨烯是一种高度不饱和烃类化合物,相对分

子质量大,沸点高,难挥发^[7]。本试验选用 DB-5MS 毛细管柱,该柱耐高温,工作温度 30~325℃,最高温度可达 350℃。GC-MS 分析中 GC 的进样口温度设置为 280℃,柱箱最终温度设置为 300℃,在此条件下既可保证样品充分汽化,又能保证固定液无流失;MS 的接口温度、离子源温度、电离电压采用仪器推荐的条件均能满足检测要求。根据角鲨烯、角鲨烷的相对分子质量选择 m/z 在 50~550 范围内进行质谱全扫描(Scan),标准物质全扫描总离子流图(TIC)见图 1。

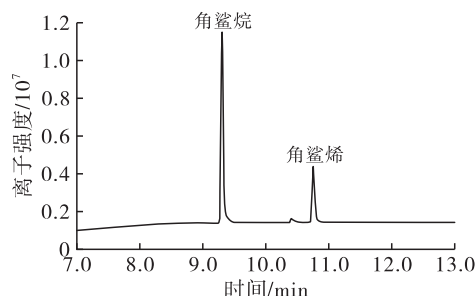


图 1 角鲨烯及角鲨烷标准品全扫描的总离子流图

根据图 1 选定被分析物角鲨烯和角鲨烷,分别提取质谱图并与标准谱库做相似度检索,确认其中角鲨烯和角鲨烷。图 2、图 3 分别为角鲨烯、角鲨烷标准品的质谱图,通常根据质谱图选择灵敏度高且抗干扰能力强的离子碎片作为目标物的定量和定性离子^[8]。

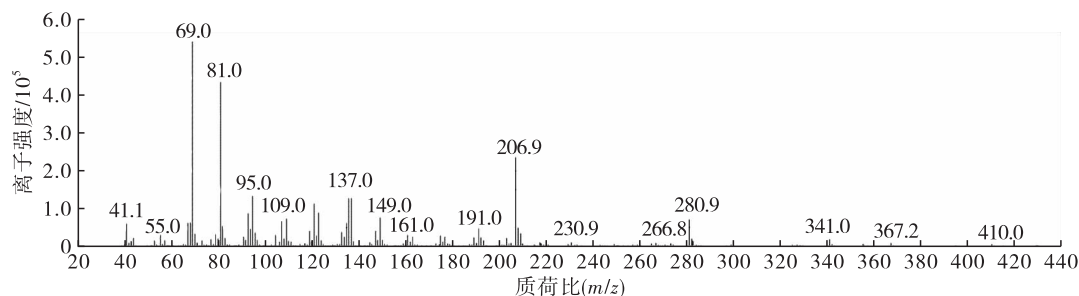


图 2 角鲨烯标准品质谱图

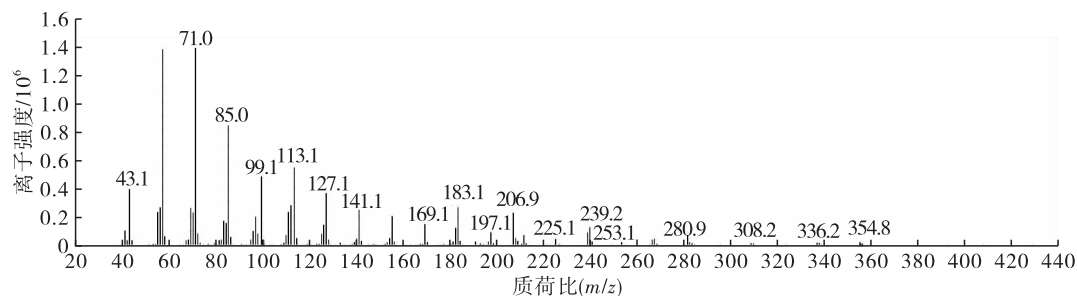


图 3 角鲨烷标准品质谱图

由图 2、图 3 可见:角鲨烯离子强度最高的是 m/z 69.0,角鲨烷离子强度最高的是 m/z 71.0,由于角鲨烷和角鲨烯最高强度离子质荷比较小,存在的干扰较多,所以不选择最高强度的离子作为定量离

子,选择角鲨烯的特征离子中强度较高的离子 m/z 81.0 作为定量离子, m/z 341.0、206.9、137.0 作为定性离子;选择角鲨烷的特征离子中灵敏度较高的离子 m/z 113.1 为定量离子, m/z 336.2、239.2、

141.1 作为定性离子。

2.2 GC 和 GC-MS 对植物油中角鲨烯的分离效果

采用 GC 和 GC-MS 分析了橄榄油、油茶籽油、

核桃油中角鲨烯,对分离效果进行比较。以油茶籽油为例,图 4 和图 5 分别为油茶籽油的色谱图(GC)和总离子流图(GC-MS)。

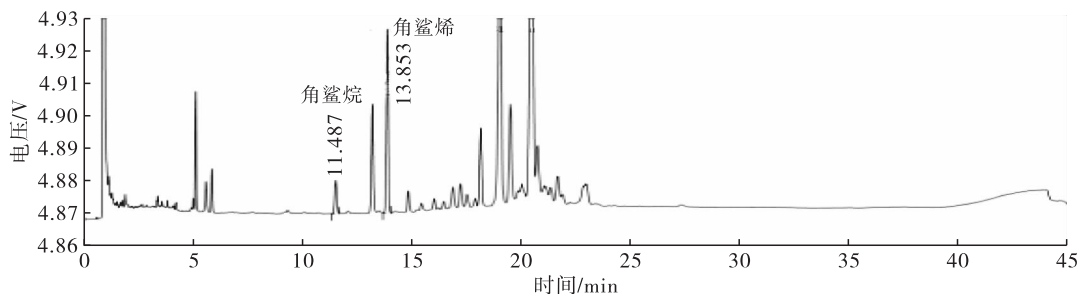


图 4 油茶籽油色谱图(GC)

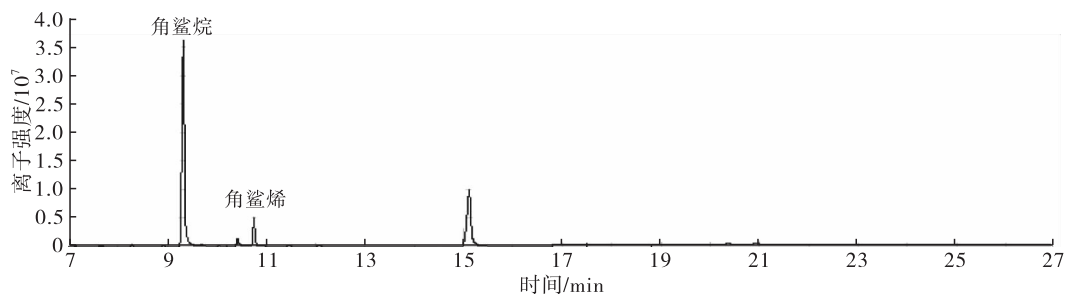


图 5 油茶籽油总离子流图(GC-MS)

由图 4 可知:角鲨烯在气相色谱氢火焰离子化检测器上的响应值较高、分离情况较好;不足之处在于该检测器是一种通用性检测器,很多物质在其上都有响应,所以在进行样品色谱分析时基质中杂质较多,需要较长的分析时间才能使干扰物质从色谱柱全部流出,通常一个样品分析时间需要 45 min 以上。由图 5 可以看出,由于 SIM 采集的离子少、离子特征性强,因此干扰少、灵敏度高、定量更准确,并且分析时间短,与气相色谱法相比大大提高了检测

效率。

2.3 GC 和 GC-MS 测定角鲨烯的标准曲线回归方程、相关性及检出限

按照 1.2.4 方法绘制 GC 和 GC-MS 分析的标准曲线,计算两种检测方法的标准曲线回归方程、相关性及方法的检出限,结果见表 1。由表 1 可见,两种方法回归方程均线性良好,GC-MS 的检出限低于 GC 中的检出限,说明 GC-MS 检测角鲨烯的灵敏度更高。

表 1 两种检测方法的标准曲线回归方程、相关系数和检出限

检测方法	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数(R^2)	检出限/(mg/kg)
GC	$y = 0.8830x - 0.0187$	0 ~ 194.4	0.9974	5.0
GC-MS	$y = 2.3374x + 0.3427$	0 ~ 194.4	0.9986	0.26

2.4 样品前处理方法的确定

本文在 LS/T 6120—2017 方法的基础上,对油脂样品皂化温度、皂化时间以及皂化液体积进行试验优化,最终选取皂化温度为沸水浴、皂化液为 10 mL 1 mol/L 氢氧化钾乙醇溶液、皂化时间为 15 min,皂化结束用流动水迅速冷却后通过中性氧化铝层析柱去除皂化物高级脂肪酸钾盐等极性物质,从而将角鲨烯、甾醇等不皂化物从油脂中分离出来。

以油茶籽油作为油样,添加角鲨烯标准物质,分别按照 LS/T 6120—2017 和本文研究的方法进行样品前处理,采用 GC-MS 检测,计算角鲨烯回收率,结果见表 2。

由表 2 可见:本文研究采用的前处理方法与标准方法相比节省时间、有机试剂使用量少、操作简便;加标回收率较高,表明该方法的提取净化效果好;变异系数小,说明方法稳定性好。

表 2 两种样品前处理方法比较

前处理方法	处理一个样品所需时间/h	试剂用量/mL	加标回收率/%	变异系数/%
LS/T 6120—2017	1.5	205	68 ~ 85	3.0 ~ 4.6
本研究采用的方法	0.5	60	94 ~ 99	1.3 ~ 2.6

2.5 方法的准确性与重复性

采用本文研究建立的快速皂化-中性氧化铝层析净化 GC-MS 测定油茶籽油中角鲨烯含量,重复测定 5 次,并进行 3 个水平的加标试验,每个水平重复测定 3 次,结果分别见表 3 和表 4。

表 3 GC-MS 测定油茶籽油中角鲨烯结果

不同测定次数的测定值/(mg/kg)					平均值/ (mg/kg)	RSD/%
1	2	3	4	5		
131.15	132.57	134.21	135.24	135.88	133.81	1.45

表 4 GC-MS 测定油茶籽油中角鲨烯的加标回收率

加标量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	加标回收率/%
116.64	244.62	95.0
583.20	692.97	95.9
1 166.40	1 261.62	96.7

表 5 10 种植物油中角鲨烯的含量

										mg/kg
橄榄油	油茶籽油	核桃油	红花籽油	米糠胚芽油	大豆油	菜籽油	亚麻籽油	葡萄籽油	漆籽油	
6 359.90	133.81	22.71	54.59	131.45	52.39	34.18	27.25	60.22	35.34	

在测定橄榄油中角鲨烯含量时应该注意,由于橄榄油中角鲨烯含量过高,角鲨烯和角鲨烷的面积比超过了标准曲线的线性范围,所以需要进行稀释。为了保证内标法定量时待测样中内标质量与标准物质系列中的一致,可将橄榄油称样量减少到 0.2 g,内标物添加量增加到 900 μ L,定容体积增加至 30 mL。

3 结论

本研究建立了快速皂化-中性氧化铝层析净化气相色谱-质谱法测定植物油中角鲨烯的方法。该方法与 LS/T 6120—2017 相比,前处理方法操作简便、快速,气相色谱-质谱选择离子监测模式定量测定检出限更低,检测灵敏度、准确度显著提高。因此,该方法适用植物油中角鲨烯的检测。

采用该方法检测多种植物油中角鲨烯含量,结果发现,角鲨烯在植物油中广泛存在,但是含量普遍较低,一般在 0.02%~0.14% 范围内,而橄榄油的角鲨烯含量比较高,可达 0.6% 左右。本文仅检测了少量的植物油样本,下一步可以采集更多种类、不同产地、不同生产工艺的植物油,对其角鲨烯含量进行测定,以了解角鲨烯在更多的植物油样品中的存

在量及加工工艺对其的影响等。

由表 3 可见,5 次重复测定的 RSD 为 1.45%。由表 4 可见,各个水平加标回收率结果均较好。结果说明本文所建立的方法重复性好,准确度高,满足植物油中角鲨烯的测定。

2.6 植物油样品的检测

采用本研究建立的快速皂化-中性氧化铝层析净化 GC-MS 测定了 10 种植物油中的角鲨烯含量,每个样品重复测定 3 次取平均值,结果见表 5。

由表 5 可见,常见植物油中角鲨烯含量较低,如菜籽油中为 34.18 mg/kg,大豆油中为 52.39 mg/kg,米糠胚芽油、油茶籽油中角鲨烯含量稍高,均可达到 130 mg/kg 以上,橄榄油中角鲨烯含量最高,是菜籽油的近 200 倍。

在量及加工工艺对其的影响等。

参考文献:

- [1] 朱云. 植物油中角鲨烯含量及其在油脂加工与使用过程中的变化[J]. 中国油脂,2019,44(12): 136-138.
- [2] 张喜金,苏昭仑,黄康惠. 高效液相色谱法测定角鲨烯软胶囊中的角鲨烯[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(8):3108-3113.
- [3] 钟冬莲,汤富彬,沈丹玉,等. 油茶籽油中角鲨烯含量的气相色谱法测定[J]. 分析试验室,2011,30(11):104-106.
- [4] 王李平,林晨,方军,等. 凝胶色谱-气相色谱法测定 11 种动植物油中角鲨烯的含量[J]. 食品工业科技,2015(6):69-71.
- [5] 谢勇,苏素娇,梁一池. 气相色谱法测定茶籽油中角鲨烯含量的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2012,33(1):42-44.
- [6] 张东生,薛雅琳,金青哲,等. 油茶籽油中角鲨烯含量的测定[J]. 中国油脂,2013,38(11):85-88.
- [7] 张青龄. 橄榄油中角鲨烯含量的气相色谱/质谱分析法[J]. 福建分析测试,2011,20(3):1-4.
- [8] 汤富彬,沈丹玉,刘毅华,等. 油茶籽油和橄榄油中主要化学成分分析[J]. 中国粮油学报,2013,28(7):108-113.