

冷冻结晶-高效液相色谱法定量分析 食用油中4种生育酚

裘董琦^{1,2}, 赵引弟^{1,2}, 裴 栋^{2,3}, 黄新异^{1,2}, 邸多隆^{1,2}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 中科院西北特色植物资源化学重点实验室/甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000; 3. 云南油橄榄大健康产业创新研究发展有限公司, 云南 丽江 674100)

摘要:为提高生育酚的检测效率,建立了一种冷冻结晶-高效液相色谱(HPLC)法对食用油中4种生育酚(α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚)进行定量分析的方法,并将该方法用于玉米油、花生油和特级初榨橄榄油等食用油中生育酚的定量测定。结果表明:优化的方法为将1.0 g油样充分溶解于40 mL 甲醇-乙酸乙酯-乙醇(体积比5:3:2)混合溶剂中,然后在-18℃下低温冷冻24 h,抽滤、减压蒸干、复溶后上机检测,HPLC采用C₃₀色谱柱,以乙醇-异丙醇(体积比8:1)和水为流动相进行等度洗脱,采用外标法定量;4种生育酚在2~100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好,检出限最低为0.179 $\mu\text{g/mL}$,定量限最低为0.59 $\mu\text{g/mL}$,方法的日内和日间精密度的相对标准偏差(RSD)分别为0.57%~4.98%和1.67%~4.34%,加标回收率为96.57%~109.14%。综上,冷冻结晶-高效液相色谱法具有操作简便、提取效率高、结果准确性好等特点,适用于食用油中生育酚的定量检测。

关键词:冷冻结晶法;生育酚;定量分析;食用油

中图分类号:TS225.1;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)08-0148-05

Quantitative analysis of four tocopherols in edible oils by freezing crystallization – high performance liquid chromatography method

QIU Dongqi^{1,2}, ZHAO Yindi^{1,2}, PEI Dong^{2,3}, HUANG Xinyi^{1,2}, DI Duolong^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. CAS Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources & Key Laboratory of Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Yunnan Olive Health Industry Innovation Research and Development Co., Ltd., Lijiang 674100, Yunnan, China)

Abstract: In order to improve the detection efficiency of tocopherols, a method of freezing crystallization – high performance liquid chromatography (HPLC) for the quantitative analysis of four tocopherols, α -, β -, γ - and δ -tocopherols in edible oils was developed, and the method was applied to the quantitative determination of tocopherols in edible oils such as corn oil, peanut oil, and extra virgin olive oil. The results showed that the optimal method was that 1.0 g oils were fully dissolved in 40 mL solvent

mixture of methanol – ethyl acetate – ethanol (volume ratio of 5:3:2), and then frozen at -18℃ for 24 h. The samples were extracted, filtered, evaporated under vacuum and re-dissolved and then detected. The HPLC was carried out on a C₃₀ column, with the mobile phases of ethanol – isopropanol (volume ratio of 8:1) and water for isocratic elution. The samples

收稿日期:2024-05-20;修回日期:2025-05-22

基金项目:甘肃省重大专项(21ZD4NK045);云南省重大科技专项(202302AE090007);陇南油橄榄产业创新联合体项目(2022-L·YGL-06)

作者简介:裘董琦(1998),女,硕士研究生,研究方向为中药物质基础及质量控制(E-mail)18755201597@163.com。

通信作者:邸多隆,教授(E-mail)didl@licp.cas.cn;黄新异,研究员(E-mail)huangxy@licp.cas.cn。

were quantified by the external standard method. The linearity of the four tocopherols was good in the mass concentration range of 2 – 100 $\mu\text{g/mL}$, the lowest limit of detection was 0.179 $\mu\text{g/mL}$, and the lowest quantitative limit was 0.59 $\mu\text{g/mL}$. The relative standard deviations (RSD) of the intra – day and inter – day precision of the method ranged from 0.57% to 4.98% and 1.67% to 4.34%, and the spiked recoveries ranged from 96.57% to 109.14%, respectively. In conclusion, the freezing crystallization – HPLC method is suitable for the quantitative determination of tocopherols in edible oils because of its easy operation, high extraction efficiency and good accuracy.

Key words: freeze crystallization method; tocopherol; quantitative analysis; edible oil

生育酚是一种脂溶性维生素,具有抗肿瘤^[1]、神经保护^[2]、增强免疫力^[3]、调节心血管系统^[4]和改善生殖功能^[5]等作用。生育酚是人体必需的脂溶性维生素,也是良好的抗氧化剂,在水果、油脂、坚果、蔬菜中广泛存在。生育酚的结构中含有一个芳香环核心和 16 个碳的侧链,根据芳香环核心取代基数量和位置的不同,可分为 α – β – γ – δ – 生育酚 4 种类型。由于食用油中生育酚的含量相对较低且难以分离,因此传统定量分析食用油中生育酚通常需要采用皂化法、固相萃取法^[6]、超声辅助提取法^[7–8]、离子液体萃取法^[9]、分子蒸馏法^[10]等前处理方法来对生育酚进行富集,但这些方法操作步骤较为烦琐,且耗时长、溶剂消耗多。

前期有研究建立了一种采用分步结晶法富集橄榄油中角鲨烯的方法^[11],由于角鲨烯和生育酚在性质上有相似之处,均为食用油中含有的脂溶性微量伴随物,因此可以尝试采用结晶法对生育酚进行前处理。高效液相色谱(HPLC)法具有高分离度和高灵敏度,能够同时分离和定量多种生育酚异构体,是目前最常用的生育酚检测方法。因此,本研究构建了一种冷冻结晶 – HPLC 法定量分析食用油中 4 种生育酚的方法,以期提高生育酚的检测效率并为后续 4 种生育酚的同时测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

特级初榨橄榄油 1、特级初榨橄榄油 2、玉米油 1、玉米油 2 和花生油,购自当地市场; α – 生育酚(98%)、 β – 生育酚(98%)、 γ – 生育酚(98%)和 δ – 生育酚(90%)标准品,中国成都爱发生物科技有限公司;甲醇、乙醇、乙酸乙酯,均为分析纯,天津大茂化学试剂厂;异丙醇,色谱级,德国默克公司。

1.1.2 仪器与设备

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器),美国安捷伦科技有限公司;

KQ – 250DE 型数控超声清洗机,昆山超声仪器有限公司;BCD – 601WDCE 低温冷冻冰箱,海尔智家股份有限公司;Scilogex MX – F 固定式旋涡混匀仪,美国赛洛捷克公司;EYELA N – 1300 旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;QUINTIX224 – 1CN 电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备溶液的配制:精密称取 α – β – γ – δ – 生育酚标准品各 10 mg 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,配制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的标准储备溶液,避光保存于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

标准工作溶液的配制:取适量标准储备溶液,用乙醇逐步稀释成质量浓度分别为 2、4、10、20、40、100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液,现配现用。

1.2.2 样品前处理

采用冷冻结晶法对样品进行前处理。精密称取 1.0 g 食用油样品置于 100 mL 的离心管中,加入 40 mL 甲醇 – 乙酸乙酯 – 乙醇(体积比 5:3:2)混合溶剂,剧烈振摇混合均匀,然后放入 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中,低温冷冻 24 h 使甘油三酯完全结晶固化,冷冻结束后快速抽滤除去甘油三酯,得到滤液。将滤液减压旋转蒸发至干,加入 600 μL 乙酸乙酯复溶后过 0.22 μm 滤膜,待 HPLC 分析。

1.2.3 HPLC 检测条件

HPLC 检测条件参考文献[12]并稍作修改。HPLC 条件:Waters YMC C_{30} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm);柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL ;流动相 A 为乙醇 – 异丙醇(体积比 8:1),流动相 B 为水,A 相与 B 相体积比 80:20;等度洗脱;流速 0.8 mL/min;检测波长 295 nm。

1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 标准曲线、检出限和定量限

分别精密吸取不同质量浓度的 4 种生育酚标准

工作溶液,按照 1.2.3 色谱条件进样分析。以标准品的质量浓度(X)为横坐标,响应色谱峰的峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。以 3 倍信噪比(S/N)计算检出限(LOD),以 10 倍 S/N 计算定量限(LOQ)。

1.2.4.2 精密度

将特级初榨橄榄油 1 按照 1.2.3 色谱条件进行分析,在同一天重复进样 6 次,分别计算 4 种生育酚峰面积的相对标准偏差(RSD),考察日内精密度;对同一样品溶液连续进样 3 d,分别计算 4 种生育酚峰面积的 RSD,考察日间精密度。

1.2.4.3 加标回收率

按照高、中、低 3 个水平对特级初榨橄榄油 1 进行混合加标回收实验,每个水平重复 3 次。按式(1)计算加标回收率(R)^[13]。

$$R = (C_A - C_0) / C_B \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_A 为加标食用油生育酚总含量; C_B 为生育酚的加标量; C_0 为食用油中生育酚的本底含量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱的确定

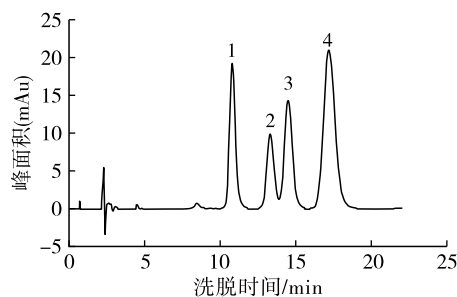
分别采用 C_{18} 色谱柱和 C_{30} 色谱柱进行 4 种生育酚的 HPLC 分离比较。结果发现:使用 C_{18} 色谱柱分离时,由于 β -生育酚和 γ -生育酚仅是甲基的位置不同,因而色谱行为差异较小,无法得到分离;而使用 C_{30} 色谱柱分离时,由于其在硅胶表面键合的烷基链较长,因此不同位置键合的烷基链交叉重叠的可能性较传统的 C_{18} 色谱柱填料大,从而使待测组分通过烷基链孔隙的阻力增大,由于空间位阻的不同, β -生育酚和 γ -生育酚能够在 C_{30} 色谱柱上得到较好分离。因此,本方法最终选择 C_{30} 色谱柱来进行 4 种生育酚的定量分析。

2.1.2 流动相的确定

比较甲醇-水、乙腈-水和乙醇-水 3 种流动相对 4 种生育酚的分离效果。结果表明,在这 3 种流动相组成中, β -生育酚和 γ -生育酚均不能达到基线分离。参考文献[12]在流动相的有机相乙醇中加入少许异丙醇,4 种生育酚的分离度得到改善。因此,选择乙醇-异丙醇-水作为本方法的流动相,并进一步对流动相中有机相体积比进行优化。由于异丙醇黏度较高,当乙醇与异丙醇体积比为 5:1 时,色谱柱柱压较高;当乙醇与异丙醇体积比为 10:1 时,柱压较低,但整体出峰时间过长。综合考虑柱压和出峰时间,最终选择乙醇与异丙醇体积比为 8:1 作为流动相的 A 相,B 相为水。

对流动相组成和流速进行优化,采用等度洗脱,

当流速为 0.5 mL/min, A 相与 B 相的体积比为 75:25 时,4 种生育酚的洗脱时间为 30 min,时间较长。当流速为 0.8 mL/min, A 相与 B 相的体积比为 80:20 时,洗脱时间缩短至 22 min,4 种生育酚基线得到分离。因此,选择等度洗脱,流动相 A 相与 B 相的体积比为 80:20,流速为 0.8 mL/min,在此条件下 4 种生育酚的 HPLC 图如图 1 所示。



注:1. δ -生育酚; 2. γ -生育酚; 3. β -生育酚; 4. α -生育酚

Note: 1. δ -Tocopherol; 2. γ -Tocopherol; 3. β -Tocopherol; 4. α -Tocopherol

图 1 4 种生育酚标准品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of four tocopherol standards

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂

由于油脂中含有大量甘油三酯,所以应确保食用油样品在所选提取溶剂中能够完全溶解,并保证甘油三酯在所选溶剂中能够在低温下结晶。在提取溶剂用量 60 mL、冷冻时间 24 h 的条件下,不同提取溶剂对总生育酚含量的影响见表 1。

表 1 不同提取溶剂下总生育酚含量

Table 1 Total tocopherol content under different extraction solvents

溶剂	溶剂体积比	总生育酚含量/ ($\mu\text{g/mL}$)
甲醇-乙酸乙酯	5:5	37.95
乙酸乙酯-乙醇	5:5	28.10
甲醇-乙酸乙酯-乙醇	5:3:2	54.99
甲醇-乙酸乙酯-乙醇	3:4:3	43.77
甲醇-乙酸乙酯-乙醇	4:2:4	47.35

从表 1 可看出:由 3 种有机溶剂组成的混合溶剂对总生育酚的提取效果要优于由 2 种有机溶剂组成的混合溶剂;而当使用甲醇-乙酸乙酯-乙醇(体积比为 5:3:2)的混合溶剂作为提取溶剂时,对生育酚的提取效果最好。因此,选择甲醇-乙酸乙酯-乙醇(体积比 5:3:2)作为提取溶剂。

2.2.2 冷冻时间

冷冻时间较短会导致样品中甘油三酯结晶不完

全,从而影响后续样品的处理和生育酚测定结果的准确性;而当甘油三酯完全结晶后,过长的冷冻时间会使样品处理时间变长,造成时间和资源的浪费。以甲醇-乙酸乙酯-乙醇(体积比 5:3:2)为提取溶剂,在提取溶剂用量 60 mL 的条件下,不同冷冻时间对总生育酚含量的影响见图 2。

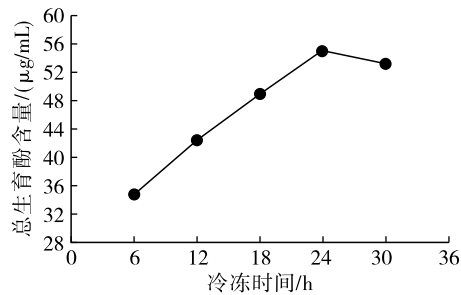


图 2 不同冷冻时间下总生育酚含量
Fig. 2 Total tocopherol content at different freezing time

从图 2 可以看出,随着冷冻时间的延长,总生育酚含量逐渐提高,在冷冻时间为 24 h 时达到最大值,之后随着冷冻时间的延长,总生育酚含量略有下降。因此,选择 24 h 为最佳冷冻时间。

2.2.3 提取溶剂用量

以甲醇-乙酸乙酯-乙醇(体积比 5:3:2)为提取溶剂,在冷冻时间 24 h 的条件下,不同提取溶剂用量对总生育酚含量的影响见图 3。

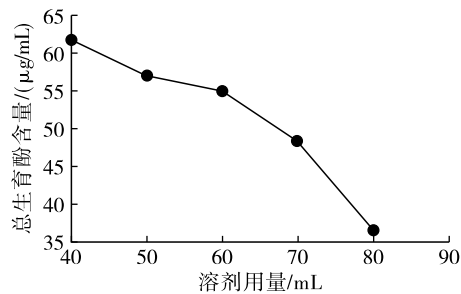


图 3 不同提取溶剂用量下总生育酚含量
Fig. 3 Total tocopherol content at different extraction solvent dosages

从图 3 可以看出:随着溶剂用量的增加,总生育酚含量逐步降低,可能是由于溶剂用量增加,在回收溶剂步骤中需要的时间增加,从而造成部分生育酚降解损失;但溶剂用量太少会造成提取不完全。因此,选择 40 mL 为最佳提取溶剂用量。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线回归方程和检测限、定量限

4 种生育酚的标准曲线回归方程、相关系数和线性范围见表 2。

由表 2 可知,4 种生育酚在 2~100 μg/mL 的质量浓度范围内线性关系良好。比较已知低浓度样品

和空白样品所测得的信号,计算出 α -、 β -、 γ -生育酚和 δ -生育酚的 LOD 分别为 0.507、0.601、0.577 μg/mL 和 0.179 μg/mL,LOQ 分别为 1.69、2.00、1.92 μg/mL 和 0.59 μg/mL。

表 2 4 种生育酚的标准曲线回归方程、相关系数和线性范围
Table 2 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of the four tocopherols

生育酚	回归方程	决定系数(R^2)	线性范围/ (μg/mL)
α -生育酚	$Y=6.9078X+4.3897$	0.9998	2~100
β -生育酚	$Y=10.0640X+2.4246$	0.9998	2~100
γ -生育酚	$Y=10.3660X-3.4582$	0.9999	2~100
δ -生育酚	$Y=7.7823X-5.2164$	0.9984	2~100

2.3.2 精密度

方法的精密度如表 3 所示。

表 3 方法的精密度

生育酚	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
α -生育酚	4.98	4.06
β -生育酚	4.44	3.80
γ -生育酚	4.98	1.67
δ -生育酚	0.57	4.34

从表 3 可以看出, α -、 β -、 γ -生育酚和 δ -生育酚的日内精密度 RSD 在 0.57%~4.98% 之间,日间精密度 RSD 在 1.67%~4.34% 之间,表明该方法精密度较高,重复性和稳定性良好。

2.3.3 加标回收率

4 种生育酚的加标回收率见表 4。

表 4 方法的加标回收率($n=6$)

生育酚	本底含量/ (mg/kg)	加标水平/ (mg/kg)	测定值/ (mg/kg)	平均回 收率/%	RSD/%
α -生育酚	105.27	84.22	186.88	96.90	6.59
		105.00	214.06	103.61	4.08
		126.33	238.40	105.38	6.16
β -生育酚	99.76	79.80	177.57	97.51	4.10
		99.76	203.28	103.77	4.52
		119.71	218.60	99.27	5.15
γ -生育酚	65.26	52.21	119.34	103.58	3.83
		65.26	128.77	97.31	6.13
		78.00	147.21	105.06	5.09
δ -生育酚	7.45	5.96	13.21	96.57	5.07
		7.45	15.03	101.78	5.66
		8.95	17.22	109.14	5.32

从表 4 可以看出,该方法的平均回收率为 96.57%~109.14%,RSD 为 3.83%~6.59%,表明

该方法准确性良好。

2.4 实际样品中4种生育酚含量的测定

采用所建立的方法对特级初榨橄榄油2、玉米油1、玉米油2和花生油等不同食用油中 α -、 β -、 γ -生育酚和 δ -生育酚含量进行测定,结果见表5。

表5 不同食用油中4种生育酚的含量

Table 5 Contents of four tocopherols in different

生育酚	edible oils			mg/kg
	特级初榨橄榄油2	玉米油1	玉米油2	花生油
α -生育酚	37.05	43.70	124.60	102.24
β -生育酚	9.48	28.30	32.20	ND
γ -生育酚	6.26	190.82	199.47	64.58
δ -生育酚	ND	23.46	24.14	6.58
总计	52.79	286.28	380.41	173.40

注:ND表示未检出

Note: ND. Not detected

从表5可以看出:在特级初榨橄榄油2、玉米油1、玉米油2和花生油中,特级初榨橄榄油的总生育酚含量最低,而玉米油2中总生育酚含量最高;特级初榨橄榄油中未检测到 δ -生育酚,花生油中未检测到 β -生育酚;两种玉米油中的 γ -生育酚含量较高且较为接近,均达190.00 mg/kg以上;玉米油2中的 α -生育酚含量最高,达到124.60 mg/kg。

3 结论

本文建立了一种冷冻结晶和高效液相色谱联用对食用油中 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚进行定量分析的方法,并应用该法对不同食用油中生育酚的含量进行了测定。将1.0 g油样充分溶解于40 mL甲醇-乙酸乙酯-乙醇(体积比5:3:2)混合溶剂中,然后在-18℃下低温冷冻24 h,抽滤、减压蒸干、复溶后,进行HPLC检测。结果表明:4种生育酚可实现基线分离,在2~100 μ g/mL质量浓度范围内线性关系良好,决定系数均大于0.998,平均加标回收率为96.57%~109.14%,RSD为3.83%~6.59%。该方法具有回收率高、重现性好、操作简单、提取率高等特点,适用于食用油中生育酚的定量检测。

参考文献:

[1] ABU-FAYYAD A, NAZZAL S. Extraction of vitamin E isomers from palm oil: Methodology, characterization, and *in vitro* anti-tumor activity[J]. J Am Oil Chem Soc, 2017, 94(9): 1209-1217.

[2] TRELA-MAKOWEJ A, LEŚKIEWICZ M, KRUK J, et al. Antioxidant and neuroprotective activity of vitamin E homologues: *In vitro* study[J/OL]. Metabolites, 2022, 12(7): 608[2024-05-20]. <https://doi.org/10.3390/metabo12070608>.

[3] LEE G Y, HAN S N. The role of vitamin E in immunity[J/OL]. Nutrients, 2018, 10(11): 1614[2024-05-20]. <https://doi.org/10.3390/nu10111614>.

[4] SOZEN E, DEMIREL T, OZER N K. Vitamin E: Regulatory role in the cardiovascular system[J]. IUBMB Life, 2019, 71(4): 507-515.

[5] BALTUSNIKIENE A, STANEVICIENE I, JANSEN E. Beneficial and adverse effects of vitamin E on the kidney[J/OL]. Front Physiol, 2023, 14: 1145216[2024-05-20]. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1145216>.

[6] 黄燕, 林灵超, 蒋婷婷, 等. 在线固相萃取-二维液相色谱法同时测定儿童配方奶粉中维生素A、D、E[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 317-323.

[7] YANG Y, LU D, YIN S, et al. A convenient ultrasound-assisted saponification for the simultaneous determination of vitamin E isomers in vegetable oil by HPLC with fluorescence detection[J]. J Sep Sci, 2018, 41(8): 1829-1838.

[8] 黄睿, 李钰, 何文绚, 等. 一种快速简单的植物油不皂化物提取方法[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(6): 1852-1856.

[9] YIN S, YANG Y, ZHANG J, et al. A novel ionic liquid-based liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight vitamin E isomers in human serum[J]. J AOAC Int, 2020, 103(4): 989-996.

[10] 丁朝中, 林文, 陈乐清, 等. 分子蒸馏法浓缩 α -生育酚的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(5): 44-48.

[11] ARESTA A, DAMASCELLI A, DE VIETRO N, et al. Measurement of squalene in olive oil by fractional crystallization or headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography[J]. Int J Food Prop, 2020, 23(1): 1845-1853.

[12] 孙亚兰, 李帮锐, 黎冠, 等. 反相高效液相色谱法测定奶粉中维生素A和维生素E异构体[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(3): 612-615.

[13] 朱蕊, 薛斌, 任兴发. 食用植物油中4种合成抗氧化剂HPLC检测的QuEChERS预处理技术研发[J/OL]. 中国油脂, 1-12[2024-05-20]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230669>.