

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2019.05.013

气相色谱法测定动植物油脂中甾醇方法的改进

张颖霞, 张成, 杨慧, 张榴萍, 钱国平, 周洲,
周世龙, 罗世龙, 赵冬旺, 武寅

(中储粮镇江粮油质量检测中心有限公司, 江苏 镇江 212000)

摘要: 在国标方法 GB/T 25223—2010 的基础上, 对气相色谱法测定动植物油脂中甾醇的方法进行了改进, 修改了中性氧化铝柱的制备过程, 将硅胶中甾醇洗提所用溶剂改为丙酮, 衍生化试剂改为 99%N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺+1%三甲基氯硅烷。结果表明: 改进后的方法比国标方法易操作, 气相色谱检测响应值大、成本低, 但检测过程比较耗时。

关键词: 甾醇; 气相色谱法; 检测; 改进

中图分类号: TS210.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2019)05-0065-04

Improvement of determination of sterols in vegetable oils by gas chromatography

ZHANG Ying-xia, ZHANG Cheng, YANG Hui, ZHANG Liu-ping, QIANGuo-ping, ZHOU Zhou,
ZHOU Shi-long, LOU Shi-long, ZHAO Dong-wang, WU Yin

(Sinograin Zhenjiang Grain & Oil Quality Inspection Center Co., Ltd., Zhenjiang Jiangsu 212000)

Abstract: On the basis of national standard method GB/T25223—2010, the method of determining sterols in animal and vegetable oils and fats by gas chromatography was improved and the preparation process of neutral aluminum oxide column was modified. The solvent used for washing sterol in silica gel was replaced by acetone, the derivatization reagent was replaced by 99% BSTFA+ 1% TMCS. The results showed that: The improved method was easier to operate than the national standard method, with high response value and low cost, but longer time.

Key words: sterol; gas chromatography; detect; improvement

甾醇是含羟基的环戊烷骈全氢菲类化合物的总称, 以游离状态或同脂肪酸结合成酯的状态存在于生物体内。甾醇具有降低血脂和胆固醇、消炎退热、抗肿瘤等生理功效^[1-2], 在食用植物油脂中, 玉米油中甾醇含量最为丰富^[3], GB/T 19111—2017《玉米油》附录 A 中对玉米油甾醇含量^[4]做了规定。检测甾醇含量广泛应用的方法有气相色谱法和液相色谱法。液相色谱法不能将甾醇完全分离, 且灵敏度低^[5]; 气相色谱法分离效果好、灵敏度高, GB/T 25223—2010 采用的是气相色谱

法, 但该标准在实际的应用中存在操作难, 气相色谱响应值不够高, 检测成本高等缺点, 因此, 本实验气相色谱法测定动植物油脂中甾醇的方法进行了改进, 旨在解决这些问题。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

食用玉米油: 市售; 99%N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺+1%三甲基氯硅烷(99%BSTFA+1%TMCS)、N-甲基-N-三甲基硅烷基七氟丁酰胺(MSHFBA): sigma 公司; 20 cm×20 cm 硅胶薄层板: 青岛海洋化工厂分厂; 丙酮、乙醇、乙醚、吡啶、1-甲基咪唑均为分析纯, 100~200 目中性氧

收稿日期: 2018-11-28

作者简介: 张颖霞, 1985 年出生, 女, 本科, 助理工程师。

化铝 (柱层析用): 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

7890A 气相色谱仪 (配有氢火焰离子检测器): 美国安捷伦 (Agilent) 公司。

1.3 实验条件

色谱柱: HP-5 石英毛细柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm);升温程序:60 保持 1 min,以 20 /min 升至 260 ,以 2 /min 升至 300 ,保持 18 min;进样口温度:320 ;检测器温度:320 ;载气(N₂)流速 1 mL/min,进样量 1 μL;分

流比 20 1。

1.4 实验方法

动植物油脂中甾醇含量 (1) 国标方法测定:按 GB/T 25223—2010《动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法》的规定进行测定。

(2) 改进方法测定:在 GB/T 25223—2010 方法基础上,修改了中性氧化铝柱制备过程,将硅胶中甾醇洗提剂改为丙酮,衍生化试剂改为 99%N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺+1%三甲基氯硅烷。改进前后方法对比见表 1。

表 1 改进前后实验方法对比

| 步骤 | 标准方法 | 改进后方法 | 改进点及改进后方法优点 |
|------------|--|--|---|
| 不皂化物的提取 | a. 氧化铝:中性,粒径 0.063~0.200 mm,一级活性。 b. 在 20 mL 乙醇中加入 10 g 氧化铝,将悬浮液倒入玻璃柱中,使氧化铝自然沉降,打开活塞放出溶剂,待液面到达氧化铝顶层时关闭活塞。 c. 称取 0.25 g 样品,加入 1 mL,1 mg/mL 桦木醇内标溶液,加入 5 mL 氢氧化钾-乙醇溶液皂化,皂化液过氧化铝柱,先用 5 mL 乙醇,再用 30 mL 乙醚洗脱不皂化物,除去不皂化物中溶剂。 | a. 氧化铝:中性,100~200 目,580 ,5 h。 b. 在玻璃柱中加入 20 mL 乙醇,快速加入 10 g 氧化铝,使氧化铝自然沉降,打开活塞放出溶剂,待液面到达氧化铝顶层时关闭活塞。 c. 称取 0.25 g 样品,加入 1 mL,1 mg/mL 桦木醇内标溶液,加入 5 mL 氢氧化钾-乙醇溶液皂化,皂化液过氧化铝柱,先用 5 mL 乙醇再用 30 mL 乙醚洗脱不皂化物,除去不皂化物中溶剂。 | 改进了中性氧化铝柱制备方法使得中性氧化铝柱制备更简单,易操作。 |
| 不皂化物中甾醇的分离 | a. 用少量乙醚溶解不皂化物,点板(硅胶板)展开、甲醇醇显色,判断标记甾醇部分、刮板。 b. 在收集的硅胶中加入 0.5 mL 乙醇,用 5 mL 乙醚洗提三次,收集、过滤洗提液并浓缩吹干。 | a. 用少量乙醚溶解不皂化物,点板(硅胶板)展开、甲醇醇显色,判断标记甾醇部分、刮板。 b. 在收集的硅胶中加入 0.5 mL 乙醇,用 5 mL 丙酮洗提三次,收集、过滤洗提液并浓缩吹干。 | 硅胶中甾醇的洗提试剂由乙醚更换为丙酮,甾醇更易溶于丙酮,减少了洗提过程中甾醇的损失。 |
| 甾醇衍生化 | 加入 100 μL 衍生化试剂 (V(MSHFBA) V(1-甲基咪唑)=20 1)于密封反应瓶中,105 烤箱中加热 15 min,冷却到室温。 | 加入 60 μL 吡啶溶解,再加入 240 μL 衍生化试剂 (99%BSTFA+1%TMCS)于密封反应瓶中,75 烤箱中加热 40 min,冷却到室温。 | 在衍生化过程中加入了吡啶,将衍生化试剂由 V(MSHFBA) V(1-甲基咪唑)=20 1 改为 99%BSTFA+1%TMCS 衍生化,温度由 105 改为 75 ,衍生化时间由 15 min 改为 40 min,降低了实验成本,实验时间有所增加。 |
| 气相色谱分析 | a. 固定相 SE-54 ,(50 m× 0.25 mm,薄膜厚度 0.10 μm)。 b. 载气:氢气,流速 36 cm/s,分流比 1 20。 c. 检测器温度:320 ,进样口温度:320 ,柱温采用程序升温的方式:以 4 /min 的速度从 240 增加至 255 。 | a. 固定相 HP-5,长 30 m,内径 0.32 mm,薄膜厚度 0.25 μm。 b. 载气:氮气,流速 1 mL/min,分流比 1 20。 c. 检测器温度:320 ,进样口温度:320 ,柱温采用程序升温的方式:60 保持 1 min,以 20 /min 的速度从 60 增加值至 260 ,再以 2 从 260 增加至 300 ,保持 18 min。 | 载气由氢气改为氮气更为安全;细化了柱温设置,气相色谱条件更加具体、容易操作。 |

2 结果与分析

2.1 中性氧化铝柱制备

采用标准方法制备中性氧化铝柱时,氧化铝悬浊液倒入玻璃柱中容易产生断层,且悬浊液很

难转移完全。因此,将中性氧化铝柱制备过程改为先在玻璃柱中加入 20 mL 乙醇,再匀速加入 10 g 氧化铝让其自然沉降,可以解决悬浊液难转移、柱易断层的问题,实验过程中更易操作。

2.2 洗提甾醇溶剂的选择

称取 0.25 g 一级玉米油皂化后过中性氧化铝柱,提取不皂化物,用旋转蒸发仪蒸干,用乙醚溶解、点板、展开、甲醇显色,判断标记甾醇部分、刮板。将刮板收集到的硅胶混合均匀,平均分成两份,标记为 和 。 中加入 0.5 mL 乙醇,用 5 mL 乙醚洗提三次,收集、过滤洗提液并浓缩吹干,加入 60 μ L 吡啶溶解,再加入 240 μ L 衍生化试剂(99%BSTFA+1%TMCS)衍生,进气相色谱检测。 中加入 0.5 mL 乙醇,用 5 mL 丙酮洗提三次,收集、过滤洗提液并浓缩吹干,加入 60 μ L 吡啶溶解,再加入 240 μ L 衍生化试剂(99%BSTFA+1%TMCS)衍生,进气相色谱检测。得到的色谱图分别见图 1, 图 2。

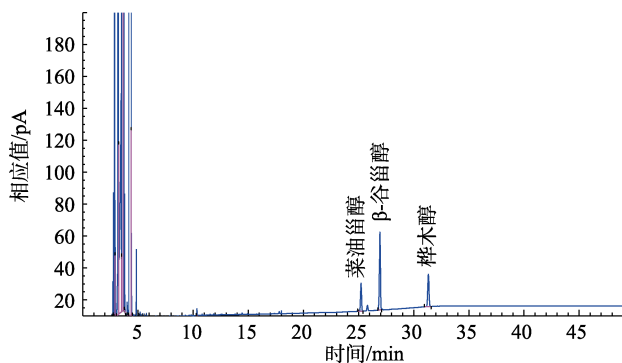


图 1 乙醚洗提硅胶中甾醇得到的色谱图

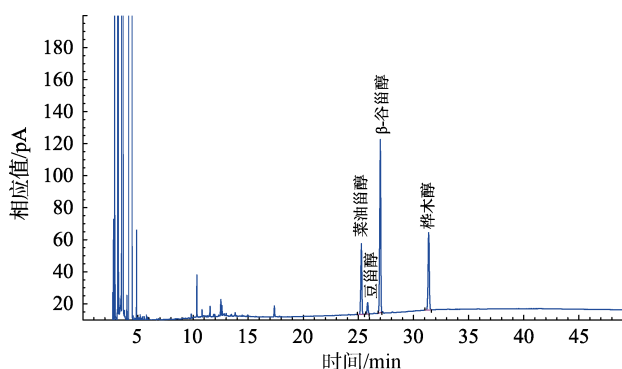


图 2 丙酮洗提硅胶中甾醇得到的色谱图

由图 1, 图 2 可以看出,刮板收集到的硅胶采用丙酮洗提气相色谱检测响应值比较大,与乙醚相比,硅胶中的甾醇更易溶于丙酮,但是丙酮比乙醚难挥发,在氮吹环节比较费时。

2.3 衍生化试剂的选择

BSTFA 能够快速地与含有羟基的化合物反应,生成稳定的衍生物,可代替 MSHFBA 与甾

醇反应。一些学者研究表明在 BSTFA 加入 TMCS 可提高反应速率,99%BSTFA+1%TMCS 衍生化效果最佳^[5]。

称取 0.25 g 一级玉米油皂化,过中性氧化铝柱,提取不皂化物,用旋转蒸发仪蒸干,用乙醚溶解、点板、展开、甲醇显色,判断标记甾醇部分、刮板、丙酮洗提硅胶中甾醇,将洗提液混合均匀,平均分成两份,标记为 和 。 中加入 30 μ L 吡啶溶解,再加入 120 μ L 衍生化试剂(99%BSTFA+1%TMCS)衍生,进气相色谱检测。

中加入 150 μ L 衍生化试剂(V(MSHFBA) V(1-甲基咪唑)=20 1)衍生,进气相色谱检测。得到的色谱图分别见图 3, 图 4。

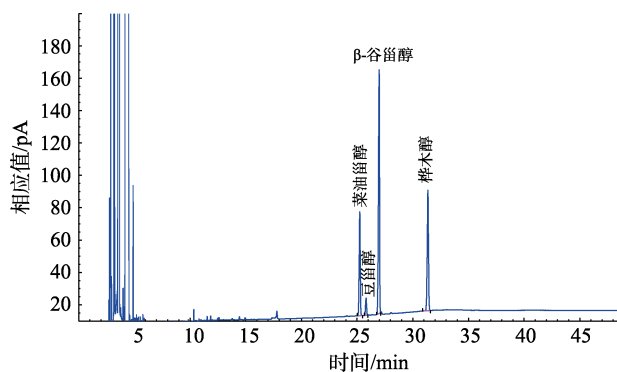


图 3 吡啶+99%BSTFA+1%TMCS 衍生色谱图

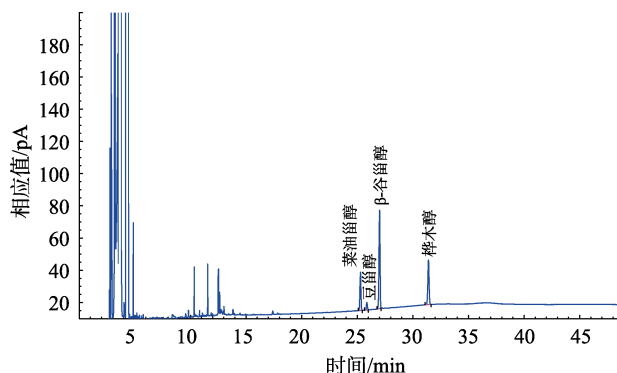


图 4 V(MSHFBA) V(1-甲基咪唑)=20 1 衍生色谱图

由图 3 和图 4 可以看出,在相同浓度下,用 30 μ L 吡啶溶解再加入 120 μ L 衍生化试剂(99%BSTFA+1%TMCS)衍生,气相色谱检测响应值比较大,且 99%BSTFA+1%TMCS 价格比 MSHFBA 低的多,但 99%BSTFA+1%TMCS 衍生化时间比较长。

2.4 采用改进方法测定玉米油中甾醇的重复性

采用改进方法重复检测不同甾醇含量的一级玉米油中甾醇,结果见表 2 和表 3。

由表 2、表 3 可看出,使用改进方法检测甾醇含量的重复性达到检测方法的要求(甾醇含量在

8 000 mg/kg, 变异系数小于 2.3%, 甾醇含量在 4 000 mg/kg, 变异系数小于 4.37%^[7])。

表 2 甾醇含量在 8 000 mg/kg 水平改进后检测方法的重复性

mg/kg

| 样品 | 菜油甾醇含量 | 豆甾醇含量 | β-谷甾醇含量 | 甾醇总含量 |
|--------|----------|--------|----------|----------|
| 1 | 2 149.89 | 800.20 | 6 073.89 | 9 023.97 |
| 2 | 2 201.42 | 819.11 | 6 191.28 | 9 211.81 |
| 3 | 2 204.55 | 816.08 | 6 231.43 | 9 252.06 |
| 4 | 2 215.76 | 834.89 | 6 270.44 | 9 321.10 |
| 5 | 2 271.63 | 846.87 | 6 431.87 | 9 550.37 |
| 6 | 2 201.32 | 815.24 | 6 202.69 | 9 219.25 |
| 变异系数/% | 1.8 | 2.0 | 1.9 | 1.9 |

表 3 甾醇含量在 4 000mg/kg 水平改进后检测方法的重复性

mg/kg

| 样品 | 菜油甾醇含量 | 豆甾醇含量 | β-谷甾醇含量 | 甾醇总含量 |
|--------|----------|--------|----------|----------|
| 1 | 1 706.14 | 247.51 | 3 616.54 | 5 570.19 |
| 2 | 1 661.47 | 240.50 | 3 518.16 | 5 420.12 |
| 3 | 1 717.88 | 248.96 | 3 633.19 | 5 600.03 |
| 4 | 1 651.33 | 240.48 | 3 495.08 | 5 386.89 |
| 5 | 1 642.20 | 237.47 | 3 473.85 | 5 353.53 |
| 6 | 1 706.37 | 247.74 | 3 612.02 | 5 566.14 |
| 变异系数/% | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

2.5 改进方法与标准方法检出限比对

用正己烷配制浓度均为 25 ng/mL 菜油甾醇、豆甾醇、β-谷甾醇混标,分别取 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mL,分别用改进方法(包括前处理)和标准方法(包括前处理)检测 6 次,6 次测定结果色谱峰响应均相当于基线噪声 3 倍(S/N=3)时计算各组分的最低检出限,结果见表 4。

表 4 改进方法和标准方法检出限结果 mg/kg

| 甾醇 | 改进方法检出限 | 标准方法检出限 |
|---------|---------|---------|
| 菜油甾醇 | 0.1 | 0.8 |
| 豆甾醇 | 0.1 | 0.8 |
| β-谷甾醇含量 | 0.1 | 0.8 |

由表 4 可得出,使用改进方法检出限比标准方法检出限低。原因是将洗提硅胶中甾醇的溶剂改为丙酮,前处理损失减少了,衍生化试剂改为 99%BSTFA+1%TMCS 衍生化后色谱的响应值变大了。

3 结论

通过改进方法与国标方法比对可得出:改进方法中性氧化铝柱更易制备,采用丙酮洗提硅胶中的甾醇气相色谱响应值更高,前处理采用 30 μL

吡啶溶解再加入 120 μL 衍生化试剂(99%BSTFA+1%TMCS)衍生气相色谱响应值更大,且衍生化成本低,重复性实验表明改进方法稳定,适用于甾醇含量的测定,但改进方法比较耗时。

参考文献:

- [1] KRITCHEVSKY D, CHEN S C. Phytosterols-health benefits and potential concerns:a review[J]. Nutrition Research, 2005, 25(5): 413-428.
- [2] ROBERT A, MOREAU BRUCE D, WHITAKER KEVIN B, et al. Phytosterols, and health-promoting uses[J]. Progress in Lipid and Analysis Diversity, Quantitative Research, 2010, 101: 1471-1476.
- [3] 韩军花, 杨月欣, 冯妹, 等. 中国常见植物食品中植物甾醇的含量和居民摄入量初估[J]. 卫生研究, 2007, 36(3): 301-305.
- [4] 玉米油: GB/T 19111-2017 [S].
- [5] 杨虹, 姜元荣, 魏婷婷, 等. 食用油中植物甾醇测定方法的优化及含量分析[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(2): 120-123.
- [6] LIU R, ZHOU J L, WILDING A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1022(1/2): 179-189.
- [7] 动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法: GB/T 25223-2010 [S].