

高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器测定 食品中胆固醇含量

辜英杰, 吴 锐, 闫世平, 牟德海, 苏流坤, 农云军, 郑家概

(中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070)

摘 要: 建立了可满足各类食品(包括动物性食品、动植物混合食品)中胆固醇的 HPLC - ELS D 快速测定方法。样品经 50% (w) KOH 直接皂化和石油醚萃取后进行色谱分析。色谱柱为 ODS 柱, 流动相为乙醇和乙腈, 通过优化梯度洗脱条件, 在 20 min 内实现了胆固醇与干扰物质(如植物甾醇)的有效分离, 分离度 R 大于 1.5。胆固醇色谱峰面积的自然对数与浓度的自然对数呈良好的线性关系 ($r > 0.999 6$), 检出限 (LOD) 为 $0.20 \mu\text{g}(S/N = 3)$, 定量下限 (LOQ) 为 $0.56 \mu\text{g}(S/N = 10)$, 回收率为 93%~96% ($n = 6$), 重复性 $RSD < 3.0\%$ ($n = 6$)。

关键词: 高效液相色谱; 蒸发光散射检测器; 胆固醇

中图分类号: O657.72; Q548.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2006)06 - 0098 - 03

Determination of Cholesterol in Foods by HPLC with Evaporative Light - Scatter Detector

GU Ying-jie, WU Rui, YAN Shi-ping, MU De-hai, SU Liu-kun, NONG Yun-jun, ZHENG Jia-gai
(Guangdong Key Laboratory of Chemical Emergency Test, China National Analysis Center(Guangzhou),
Guangzhou 510070, China)

Abstract: A simple, rapid and accurate method was developed for determination of cholesterol in a variety of foods, including animal and plant originated foods, by high performance liquid chromatography (HPLC) with evaporative light - scatter detector (ELS D). After directly saponified with 50% (w) KOH, the sample was extracted with petroleum ether. The extract was then separated on an ODS column and eluted by mobile phases consisted of ethanol and acetonitrile with a gradient program. Cholesterol was separated satisfactorily with interferences such as phytosterols in 20 minutes with $R > 1.5$. The logarithm of peak areas of cholesterol was plotted against the logarithm of the concentration of standard solutions, and a linear regression coefficient of 0.999 6 was obtained in the range of 20 - 1 200 mg/L. Limit of detection (LOD) was $0.20 \mu\text{g}(S/N = 3)$ and limit of quantification (LOQ) was $0.56 \mu\text{g}(S/N = 10)$. Recoveries of 93% - 96% ($n = 6$) were obtained by spiking experiments. The repeatability (RSD , $n = 6$) of the method was less than 3.0%.

Key words: High performance liquid chromatography; Evaporative light - scatter detector; Cholesterol

胆固醇广泛分布在脂肪、血浆、肝、肾上腺及细胞的脂质混合物中, 作为胆汁酸、性激素、维生素 D_3 等前体物质或生物膜的常在成分起重要作用。但当人体内积累了过多的胆固醇时, 胆固醇不但会沉积在胆道内形成胆石, 而且会沉积到动脉血管内膜上造成动脉粥样硬化^[1]。

食品中胆固醇的测定方法主要包括: 比色法^[2]、酶催化法^[3]、气相色谱法^[4]、高效液相色谱 - 紫外检测法^[1, 5-6]。比色法和酶催化法仅适用于纯动物性食品中胆固醇的测定, 当存在植物甾醇类物质如谷甾醇、豆甾醇等时, 测定结果明显偏高, 且常规比色法存在前处理复杂、误差大、重复性差等问题^[1]。气相色谱法^[4]操作步骤同样繁琐; 另外也有利用 GC - MS 测定胆固醇的报道^[7], 但设备较为昂贵。HPLC - 紫外检测法常采用 205 ~ 210 nm 低波长检测^[5-6], 这使得操作条件比较苛刻, 系统难以稳定。蒸发光散射检测器 (evaporative light-scattering detector, ELS D) 是一种新型质量型检测器, 在不含共轭结构或无紫外吸收物质的分析中具有相当的优势^[8-9]。本文建立了高效液相色谱——蒸发光散射检测器用于食品中胆固醇含量的测定方法, 该方法具有不依赖于样品的光谱特性, 既可充分利用液相色谱分离的优点, 又能克服紫外检测胆固醇时的不稳定。

收稿日期: 2005 - 12 - 25; 修回日期: 2006 - 02 - 13

作者简介: 辜英杰 (1970 -), 男, 四川仁寿人, 高级工程师, Tel: 020 - 87681384, E - mail: yingjiegu@21cn.com

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-20A 液相色谱仪 (包括二元梯度泵, 自动进样器、控温箱、控制系统), 美国 Alltech-2000 蒸发光散射检测器, 岛津 LC solution 色谱工作站, 超声波发生器、氮气吹干仪。

胆固醇标准品 (纯度大于 98%, Sigma), 乙腈为色谱纯, 乙醇、石油醚、无水硫酸钠均为分析纯, 50% (w) 氢氧化钾溶液。

样品为奶油饼干, 其配料包括: 面粉、植物调和油、奶油、奶粉等。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack VP-ODS (4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相 A: 乙醇 - 乙腈 (体积比 20 : 80), 流动相 B: 乙醇 (100%)。线性梯度: 在 0 ~ 25 min 内, 流动相 B 以线性从 0% 上升至 50%; 柱温为 35 °C; 流速为 1.0 mL/min; 蒸发光散射检测器氮气流速 2.6 L/min, 漂移管温度 90 °C。

1.3 标准溶液的配制

胆固醇标准储备液: 准确称取标准胆固醇 100 mg, 置于 50 mL 容量瓶, 用乙醇稀释、定容, 配置成 2.00 g/L 的标准储备液。

胆固醇标准工作液: 取标准储备液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、5.0、6.0 mL 分别以乙醇稀释至 10 mL, 配置成 20、40、80、160、320、640、1 000、1 200 mg/L 系列标准工作溶液。

1.4 样品处理

准确称取 5 ~ 10 g 样品于 250 mL 平底烧瓶中, 加水 10 mL 超声振荡使样品分散均匀, 加入乙醇 40 mL, 再加 50% (w) KOH 溶液 20 mL, 摇匀, 置于 80 °C 水浴中皂化 1 h, 冷却后, 用 30 mL 乙醚萃取 4 次, 合并乙醚层, 用水洗至中性, 经过无水硫酸钠柱脱水, 浓缩至约 1 mL, 用氮气吹干, 加入乙醇溶解并定容至 5 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 即为待测液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

为了建立满足不同食品中胆固醇分析检测需要的通用方法, 本文选取了成分非常复杂的奶油饼干作为研究对象, 其配料包括: 面粉、植物调和油、奶油、奶粉等。由于植物油中含有的植物甾醇类物质 (包括豆甾醇、谷甾醇、菜籽甾醇和菜油甾醇) 与胆固醇化学性质接近, 选择合理的色谱条件使胆固醇与植物甾醇类物质有效分离, 才能保证测试结果的准确可靠。

文献 [8] 报道了用纯甲醇为流动相, 但该色谱条件无法满足复杂样品中胆固醇的分析。通过反复实验, 建立了满足不同食品中胆固醇测定的色谱条件如“1.2 所述”。图 1 为胆固醇标准和奶油饼干样品提取液的色谱分离图, 胆固醇与其它甾醇类物质分离效果良好, 分离度大于 1.5。

2.2 蒸发光散射检测器参数的优化

蒸发光散射检测主要参数有漂移管温度和雾化气体流速^[8-9]。根据流动相的种类和比例, 首先保持氮气流速 2.2 L/min 不变, 改变漂移管温度, 观察信号基线水平和噪音, 90 °C 时流动相基本挥发, 噪音不是太大。固定漂移管温度为 90 °C, 观察不同氮气流速时胆固醇的信号强度, 在较小噪音水平上, 产生最大检测响应值的最低气流速为 2.6 L/min。故选定漂移管温度为 90 °C, 氮气流速为 2.6 L/min。

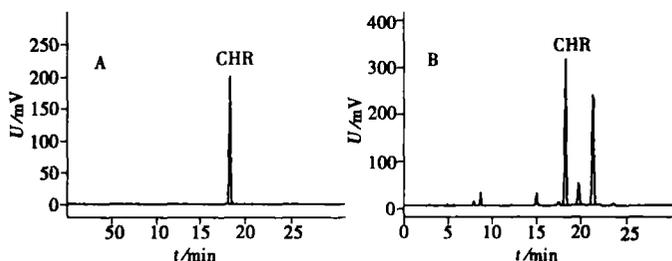


图 1 胆固醇标准 (A) 和奶油饼干样品提取液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of cholesterol (CHR) standard (A) and extract solution of butyric cookies (B)

2.3 样品处理方法

本研究对直接皂化方法与先提取脂肪再皂化的传统方法^[3-4]进行了比对实验,鸡蛋、牛奶、奶油饼干等样品中胆固醇含量测定结果及其加标回收率均没有明显的差别,与文献报道的结论相同^[1]。同时,实验表明样品是否皂化完全对胆固醇的测定结果的准确性影响较大。对于高脂肪含量的样品需要增加碱液量来达到完全皂化的目的,本实验加入 50% (w) KOH 溶液 20 mL。另外,糖或蛋白含量高的样品加入乙醇后容易团聚,预先加水使其振荡分散均匀对于保证样品完全皂化是非常重要的。

2.4 标准曲线与线性范围

分别取“1.3 配制的系列标准溶液,进样 20 μL ,以峰面积 A ($\text{mV} \cdot \text{s}$)的自然对数值为纵坐标,以浓度 (mg/L)的自然对数值为横坐标进行线性回归,得到回归方程 $\ln A = 3.3911 + 1.8688 \ln C$, $r = 0.9996$ 。可见,胆固醇质量浓度在 20 ~ 1200 mg/L 内,线性关系良好。

2.5 检出限 (LOD)与定量下限 (LOQ)

由于蒸发光散射器对胆固醇的响应不呈线性,为此将质量浓度为 100 mg/L 的胆固醇标准溶液逐级稀释,依次进样 20 μL ,观察其信噪比 S/N ,可得到方法的检出限 (LOD)为 0.20 μg ($S/N = 3$),方法的定量下限 (LOQ)为 0.56 μg ($S/N = 10$)。

2.6 精密度与回收率试验

取一定量的奶油饼干样品 6 份,按前述方法测定,结果其胆固醇含量为 1.26 mg/g , RSD 为 2.8%。对蛋黄样品中胆固醇测定进行了重复性实验,得到蛋黄中的胆固醇含量为 11.2 mg/g , RSD 为 2.5%。

准确称取已知胆固醇含量的各类样品,分别加入一定量的胆固醇标准溶液,按“1.4 节的方法处理成待测溶液,在优化的色谱条件下测定其胆固醇含量,计算其回收率。对不同类型样品的回收率实验表明,方法的回收率在 93% ~ 96%之间,结果见表 1。

表 1 方法的回收率 ($n = 6$)
Table 1 Recovery of the method ($n = 6$)

Samples	Original	Added	Found	Recovery	RSD
	$w_0 / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$w_A / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$w_F / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$\bar{R} / \%$	$s_r / \%$
Butyric cookies (奶油饼干)	1.26	1.00	2.20	94	2.9
		2.00	3.12	93	2.4
Vitelline (蛋黄)	11.2	5.00	16.0	96	1.9
		10.0	20.7	95	2.2
Blend vegetable oil (植物调和油)	未检出	0.50	0.48	96	2.9
		1.00	0.93	93	2.6

参考文献:

- [1] FENTON M. Chromatographic separation of cholesterol in foods[J]. J Chromatogr, 1992, 624: 369 - 388
- [2] 中华人民共和国国家标准, GB/T 5009.101 ~ 5009.2003 - 2003, 食品卫生检验方法 理化部分 (二) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004: 135 - 138
- [3] 余碧钰, 刘向龙, 陆小龙, 等. 酶催化分光光度法测定食品中总胆固醇含量 [J]. 光谱实验室, 1999, 16(6): 653 - 655
- [4] 中华人民共和国国家进出口商品检验局 AOAC 编译委员会编译. 美国公职分析化学协会公定分析方法 (1990 年第十五版) [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990: 1219 - 1221
- [5] 黄岛平, 陈建红, 劳燕文, 等. HPLC 紫外检测器测定出口月饼中的胆固醇 [J]. 光谱实验室, 2001, 18(4): 499 - 501
- [6] EUGEN DS, KATSAN D IS, ADD IS P B. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols and cholesterol in tissue [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 27: 1137 - 1140
- [7] 李攻科, 何小青, 杨云, 等. 用微波辅助皂化 GC-MS 测定血清中的胆固醇 [J]. 分析测试学报, 1999, 18(3): 15 - 18
- [8] 刘凤萍, 戴华, 李拥军, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定五种甾醇含量 [J]. 分析科学学报, 2002, 18(3): 230 - 232
- [9] 魏决, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术 [J]. 色谱, 2000, 18(5): 399 - 401