

植物油中角鲨烯的 GC/MS 分析

廖杰 赵玉兰 李宁 周国良

(解放军总医院医学实验测试中心 北京 100853)

摘要 建立植物油中角鲨烯的 GC/MS 分析方法, 植物油经 KOH- 甲醇法皂化和三氟化硼衍生, 经 HP-5MS 毛细管柱分离, 以二十四烷酸为内标, 用 GC/MS 选择性离子监测对角鲨烯进行定量测定。方法在 0.0625 ~ 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 $r > 0.9998$; 最低检测限为 7.8ng/mL。日内精密度为 1.63%~2.89%, 日间精密度为 1.70%~3.22%。加标平均回收率为 89.58% ~ 94.12%。用所建立的方法测定 6 种植物油中角鲨烯含量。

关键词 气相色谱 / 质谱法 (GC/MS) 角鲨烯 植物油

角鲨烯 (Squalene, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, 2,6,10,15,19,23- 六甲基 -2,6,10,14,18,22- 二十四碳六烯) 是生物体内自然生成的一种活性物质, 具有促进血液循环、活化机体细胞、抗氧化、消炎杀菌、细胞修复等功能^[1]。文献报导橄榄油等植物油中也含有一定量的角鲨烯, 降低其过氧化值, 使植物油具有抗氧化活性^[2]。角鲨烯的含量测定方法有滴定分析法、薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法及红外光谱分析法等^[3]。建立从植物油中角鲨烯的气相色谱 / 质谱测定方法, 分析比较 6 种市售植物油中的角鲨烯含量。

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

岛津 GCMS-QP2010 Plus, Milli-Q II 型纯水器。

芝麻油、菜籽油、大豆油、花生油、茶籽油均为市售国产植物油, 橄榄油 (Extra Virgin) 产自希腊。

角鲨烯、二十四烷酸 (C24) 购自 SIGMA 公司; 正己烷、乙醚、甲醇等均为国产色谱纯试剂; 氢氧化钾、三氟化硼 - 乙醚、氯化钠为国产分析纯试剂。

1.2 标准溶液的配制

精密称取角鲨烯 10mg 置 10mL 容量瓶中, 加正己烷适量, 振摇, 使角鲨烯溶解后, 再加正己烷至刻度, 摇匀, 为储备液。

1.3 样品处理

称取 300mg 植物油样品, 放入 300mL 圆底烧瓶中, 加入 5mL 的 0.5mol/L 的氢氧化钾甲醇溶液, 置 100 $^{\circ}\text{C}$ 回流 1h, 冷却后转移入含 500 μL 的 15 $\mu\text{g/mL}$ C24 内标的 15mL 离心管中 (用 3mL 甲醇清洗烧瓶, 并转入离心管中)。加入 1mL14% 的三氟化硼 - 乙醚甲醇溶液, 混均后 100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5min, 此时甲酯化完成。冷却后加入 3mL 正己烷和 1mL 饱和氯化钠溶液, 振荡 2min, 4500r/min

离心 5min 后将提取液转移入 15mL 离心管, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干。用 500 μL 正己烷溶解, 取 1 μL 进样。经 HP-5MS 毛细管柱分离, 以二十四烷酸为内标, 用 GC/MS 选择性离子监测模式对角鲨烯定量测定。

1.4 分析条件

1.4.1 气相色谱条件 色谱柱: HP-5MS 毛细管柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μm); 升温程序: 170 $^{\circ}\text{C}$, 以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 295 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10min; 进样口温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 载气: 高纯氮气; 载气流速: 1.2mL/min; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 1 μL 。

1.4.2 质谱条件 GC/MS 接口温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 离子源温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 电离方式 EI 源; 电离电压: 70eV; 单离子检测: 检测离子角鲨烯为 m/z 69、81、95。碳二十四烷酸为 m/z 74、87、382。

2 结果与讨论

2.1 样品处理条件的选择

文献报导的角鲨烯 GC 测定前处理方法大多数都较为简单, 用正己烷稀释后直接进样, 由于植物油中存在大量脂肪酸以及油脂成分, 使角鲨烯峰形较差, 而且大量高沸点化合物的存在, 对分析系统的污染较大。因此, 先将植物油样品皂化, 使其脱脂, 然后用三氟化硼将高沸点的脂肪酸成分甲酯化, 再进行分析。结果表明, 采用本方法后角鲨烯的峰形得到改善, 减轻对色谱柱和离子源的污染。

2.2 分析条件的确定

角鲨烯是一种高度不饱和烃类化合物, 分子量大, 沸点高 (280 $^{\circ}\text{C}$), 难挥发, 因此, 本文选用 HP-5MS 耐高温 (350 $^{\circ}\text{C}$) 低流失弹性石英毛细管柱, 进样口温度设为 300 $^{\circ}\text{C}$, 程序升温, 使角鲨烯、内标得到良好的分离度, 并与植物油样品中其它组分得到完全分离, 总离子流图 (见图 1)。

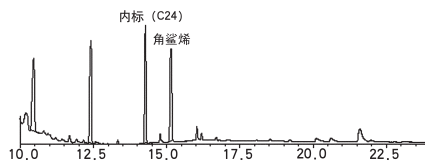


图1 植物油样品的总离子流图

由于角鲨烯在植物油中含量较低,为提高检测灵敏度,减少基质中其它组分对测定的干扰,根据角鲨烯和内标的质谱图(见图2),我们选择SIM模式,检测离子角鲨烯为 m/z 69、81、95。碳二十四烷酸为 m/z 74、87、382。

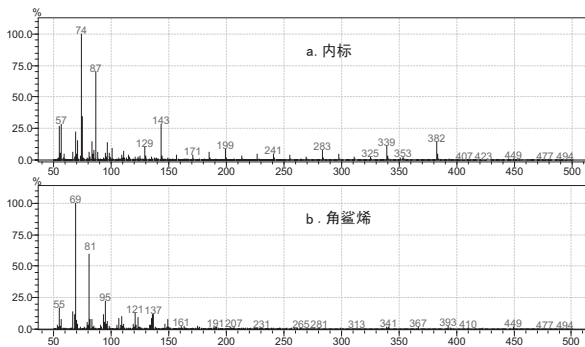


图2 角鲨烯和内标(C24)的质谱图

2.3 方法的线性范围和最低检出限

精密量取适量储备液,用内标液稀释成含角鲨烯浓度为0.0625、0.125、0.250、0.500、1.00、2.00 mg/mL的溶液,取 $1\mu\text{L}$ 进样,以峰面积对浓度进行线性回归,结果表明,在上述范围内线性良好,回归方程为 $Y=0.1575638x+0.001703$, $R=0.9998$ 。在测定条件下,当信噪比为3时,角鲨烯的最低检出限为7.82ng/mL。

2.4 方法的精密度与回收率

取高、中、底3个不同浓度标准稀释溶液,按标准曲线制定,在日内重复测定3次,日间重复测定3次,按标准曲线计算浓度,结果角鲨烯的日内精密度(RSD)为1.63%~2.89%,日间精密度(RSD)为1.70%~3.22%。

称取已测定角鲨烯含量的植物油,准确加入角鲨烯标准液,然后按样品测定方法处理并测定,计算出角鲨烯含量,所得含量减去植物油测得含量,即为回收率。本法测定3份,平均回收率为90.60% ($n=3$),RSD0.79%。

2.5 植物油样品分析

用所建立的方法,对6种市售植物油样品进行分析,其中角鲨烯的含量分别为芝麻油 $13.79\mu\text{g/mL}$ 、菜籽油 $17.18\mu\text{g/mL}$ 、茶油 $17.56\mu\text{g/mL}$ 、豆油 $51.81\mu\text{g/mL}$ 、花生油 $66.31\mu\text{g/mL}$ 、橄榄油 $981.41\mu\text{g/mL}$ 。从测定结果可以看出,橄榄油中的角鲨烯含量明显高于其它植物油,这也是原生橄榄油具有抗氧化功效的原因之一。我们在实验中还发现,角鲨烯的含量随着样品打开包装后放置的时间而逐渐降低,说明加工、运输和贮存条件对角鲨烯的含量都会有较大影响。

3 结论

角鲨烯是具有促进血液循环、活化机体细胞、抗氧化、消炎杀菌、细胞修复等功能的天然活性成分,植物油的抗氧化功效与其角鲨烯含量相关。本文建立GC/MS测定植物油中角鲨烯含量的方法。植物油经皂化、甲酯化后,经HP-5MS毛细管柱分离,以二十四烷酸为内标,用GC/MS选择性离子监测对角鲨烯进行定量测定。方法灵敏、准确,适用于测定植物油中的角鲨烯含量。

参考文献

- 1 周茂君, 向仕学等. 保健食品中角鲨烯的气相色谱分析, 预防医学情报杂志, 2003, 19(2):186~187
- 2 Nenadis Nikolaos, Tsimidou Maris, Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79:257~259
- 3 Michael Murkovic, Sonja Lechner, Ariane Pietzka, et al, Analysis of minor components in olive oil, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 61:155~160

Determination of squalene in vegetable oils by GC/MS

Liao Jie Zhao Yulan Li Ning Zhou Guoyin

(Medical experiment and analysis center of General Hospital of PLA, Beijing 100853)

Abstract A method was developed for the determination of squalene in vegetable oils by gas chromatography-mass spectrometry(GC/MS) with selective ion monitoring. After saponification with potassium hydroxide and devariation using borontrifluoride, vegetable oils were separated on a HP-5MS column. Lignoceric acid($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$) was selected as the internal standard. The linear range of the method was 0.0625~2.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9998$). The detection limit of squalene was 7.8ng/mL. The within-day RSD were 1.63%~2.89% The between-day RSD were 1.70%~3.22%, The average recovery of squalene was 90.60%. The method has been successfully applied in the determination of squalene in 6 vegetable oils.

Key words Gas chromatography-mass spectrometry(GC/MS) Squalene Vegetable oil