

实验技术与方法

高效液相色谱法测定卤制鸡肝中两种胆固醇氧化物

李向梅,周建科,付艳芳

(河北大学理化分析中心 河北省分析科学技术重点实验室,河北保定 071002)

摘要:目的 建立一种可以分析测定鸡肝中7-酮基胆固醇和胆甾烯酮的方法。方法 样品与弗罗里硅土填料混合研磨后装柱,乙腈为洗脱剂,萃取与净化一步完成。无水乙醇为流动相,在240~285 nm变波长条件下液相色谱测定。结果 2种胆固醇氧化物在0.25~100 μg/ml范围内线性关系良好, r 均>0.999 3,方法检出限分别为0.015、0.045 μg/g。优化条件下,组分在鸡肝样品中的平均回收率在74.1%~97.0%之间, $RSDs$ <5.57%。结论 该方法适合于鸡肝中胆固醇氧化物的测定。

关键词:高效液相色谱;胆固醇氧化物;7-酮基胆固醇;胆甾烯酮;鸡肝;食品

中图分类号:R155; R155.5; O657.7⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0156-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.013

Determination of two cholesterol oxidation products in marinated chicken liver by HPLC

LI Xiang-mei, ZHOU Jian-ke, FU Yan-fang

(Research Center of Physics and Chemistry Analysis, Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province, Hebei University, Hebei Baoding 071002, China)

Abstract: Objective The aim was to establish a method for the simultaneous determination of 2 kinds of cholesterol oxidation products (COPs: 7-ketocholesterol, cholesta-4, 6-dien-3-one) by HPLC. **Methods** The mixture of samples and Florisil packing were grinded, then packed to a syringe column. The extraction and purification of the samples were carried out with one-step using acetonitrile as eluting reagent. With anhydrous ethanol as mobile phase, the two components were determined by liquid chromatography under 240-285 nm. **Results** There was a good linearity in the range of 0.25-100 μg/ml and the correlation coefficients were greater than 0.999 3. The detection limits for 2 COPs were 0.015 and 0.045 μg/g, respectively. Under the optimal conditions, the recovery rates of the two target analytes were between 74.1% -97.0% and the relative standard deviations ($RSDs$) were no more than 5.57%. **Conclusion** This method is suitable for the determination of cholesterol oxides in chicken liver.

Key words: HPLC; cholesterol oxidation products; 7-ketocholesterol; cholesta-4,6-dien-3-one; chickens liver; food

胆固醇是脊椎动物细胞的重要组分,几乎存在于人体所有器官中。少量的胆固醇对人体健康是必不可少的,它不仅参与形成细胞膜,还是合成性激素、维生素D以及胆汁酸的原料。但胆固醇氧化产物具有细胞毒性^[1],甚至具有致癌性和致突变性^[2];过量胆固醇氧化物(COPs)沉积在血管壁上,会诱发动脉粥样硬化^[3]和神经衰弱等慢性病。因此,监测其在食品中残留状况对人体健康具有重要意义。

胆固醇氧化物的主要分析方法是气相色谱法(GC)^[4-5]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[6-7],进样检测前一般经过皂化、固相萃取净化以及衍生等

预处理步骤。李楠^[8]使用气液色谱法(GLC)和气象色谱-质谱联用法对水产加工制品中的胆固醇氧化物进行了定性定量测定,并且对油脂的过氧化物和胆固醇氧化物含量的相关性进行了探讨。Apprich等^[9]同样使用气相色谱-质谱联用法,分别以 α -胆甾烷和19-羟基胆固醇为内标物,测定了多种胆固醇氧化物和植物甾醇氧化物,但前处理过程复杂、耗时较长。而有关液相色谱法测定卤制鸡肝中胆固醇氧化物的方法鲜见报道。

本试验采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),以基质固相分散萃取处理样品,变波长紫外检测了鸡肝中的7-酮基胆固醇(240 nm)和胆甾烯酮(285 nm)。考察了萃取剂种类和用量、分散剂种类和用量等条件对萃取结果的影响,结果令人满意。

收稿日期:2013-10-14

作者简介:李向梅 女 硕士生 研究方向为分析化学

E-mail:lxm20111119@126.com

通讯作者:周建科 男 研究员 研究方向为分析化学色谱分析

E-mail:zhouniujiangke@126.com

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

液相色谱仪(包括岛津 LP-10AT 高压输液泵)、SPD-10A 紫外检测器、7725i 手动进样阀、N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)、手动过滤装置。

7-酮基胆固醇、胆甾烯酮标准品均购于美国 Sigma, 甲醇、乙腈均为色谱纯, 无水乙醇(分析纯)、Florisil 分散剂(迪马科技)、卤制鸡肝购于当地超市。

标准储备溶液: 准确称取 7-酮基胆固醇和胆甾烯酮标准品, 无水乙醇溶解并定容, 制成质量浓度为 1 mg/ml 的标准储备溶液, 4 °C 低温存放。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

准确称取 1.0 g 样品, 与 1.5 g Florisil 填料一同放入研钵中, 轻研至混合均匀。将研磨均匀的混合物装入 10 ml 注射器内(底部放置一片有机滤膜), 用注射塞压实。8 ml 乙腈洗脱(流速约 1 ml/min), 得到洗脱液 6 ml。取其中的 2 ml 过 0.45 μm 有机膜, 滤液用微氮气流浓缩至干, 甲醇定容至 100 μl。

1.2.2 色谱条件

色谱柱: 迪马 Diamonsil C₁₈ 柱(250 × 4.6 mm, 5 μm); 柱温为室温; 以甲醇为流动相, 流速 1.0 ml/min; 在 0.1 ~ 12 min 检测波长为 240 nm, 12 ~ 20 min 检测波长为 285 nm; 进样量为 20.0 μl。保留时间定性, 峰面积外标法定量。

2 结果与分析

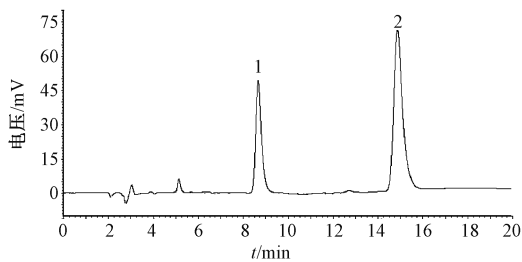
2.1 波长和流动相的选择

本试验考察了 190 ~ 290 nm 紫外检测器直接测定的情况, 在 240 nm 处, 7-酮基胆固醇响应较大, 但是胆甾烯酮响应极小; 285 nm 处胆甾烯酮响应最大, 但 7-酮基胆固醇无响应。故采用变波长模式, 0.1 ~ 12 min 选择 240 nm; 12 ~ 20 min 选择 285 nm 为最佳检测波长。考察了不同比例的甲醇-乙醇体系、甲醇-乙腈-水体系作为流动相的出峰情况, 均有样品基质杂峰的干扰。而采用纯甲醇可避开样品杂质峰的干扰, 故选择纯甲醇为流动相, 两组分保留情况如图 1 所示。

2.2 分散剂的选择及用量

基质固相分散萃取是样品与固体填料(既是分散剂又是吸附剂)通过研磨充分混合装柱, 使样品中的被测目标化合物与填料充分接触, 再用适当洗脱剂净化洗脱的过程。故分散剂的种类与用量是影响萃取效率的重要因素之一。

本试验考察了中性氧化铝、红色硅藻土、白色



注: 1 为 7-酮基胆固醇; 2 为 胆甾烯酮

图 1 标准溶液色谱图

Figure 1 Chromatograms of standard solution

硅藻土、Florisil 作为基质固相分散剂对 7-酮基胆固醇和胆甾烯酮净化及洗提效果的影响。结果表明, 中性氧化铝和红色硅藻土作为分散剂处理样品时, 干扰严重、回收率差。而 Florisil 作为分散剂, 无干扰峰, 回收率也相对理想。所以试验选择 Florisil 作为基质固相分散剂。

鸡肝样品保持 1.0 g 不变, 加入待测组分标准品各 10 μg(下同), 当分散剂 Florisil 为 1.5 g 时, 两种胆固醇氧化物的峰面积最大, 所得回收率最高。结果见图 2。

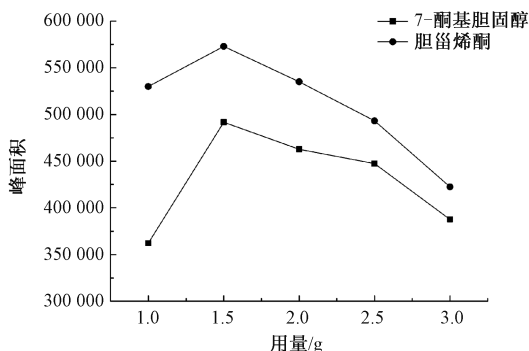


图 2 分散剂用量对回收率的影响

Figure 2 Effect of dispersion medium amount on recovery

2.3 洗脱剂的选择

一般对油脂较多的样品进行处理时, 会在提洗前用正己烷或石油醚进行净化, 减少油脂杂质峰。但试验过程中发现, 正己烷会造成待测组分的损失, 且杂质峰变化不大。故考察了甲醇、二氯甲烷、乙醇和乙腈作为洗脱剂, 直接提洗二组分的情况。经试验确定, 乙腈的洗提效果最好, 二组分回收率相对较高, 杂质峰不干扰测定。故选择乙腈直接洗脱。

2.4 洗脱剂体积的选择

洗脱剂体积对待测组分回收率影响很大。本试验考察了洗脱剂体积在 5 ~ 9 ml 范围内二组分的提洗情况, 如图 3 所示, 洗脱剂体积从 5 ~ 8 ml, 二组分峰面积逐渐增大, 9 ml 时峰面积明显减小, 故最终确定洗脱剂乙腈的体积为 8 ml。

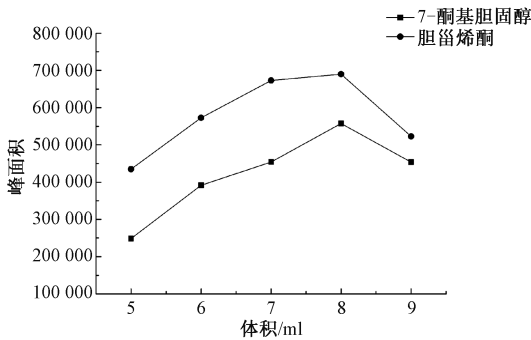


图3 洗脱剂体积对回收率的影响

Figure 3 Effect of elution volume on recovery

2.5 线性方程、相关系数及检出限

取适量标准储备溶液混合后用无水乙醇逐级稀释,配成系列浓度的工作溶液。以峰面积对质量浓度绘制标准工作曲线,在 0.25 ~ 100 μg/ml 范围内 7-酮基胆固醇和胆甾烯酮的线性关系良好。两组分的仪器检出限分别为 0.05 和 0.15 μg/ml,方法的检出限与仪器检出限、取样量、进样量和样品制备富集倍数有关,计算结果见表 1。

表1 线性方程、相关系数和方法检出限

Table 1 Linear equations, correlation coefficients and method detection limits

组分	线性方程	r	检出限 / (μg/g)
7-酮基胆固醇	$y = 11386.8x + 12112.3$	0.999 3	0.015
胆甾烯酮	$y = 25769.8x + 9864.33$	0.999 9	0.045

2.6 加标回收率、精密度

分别在 1.0 g 样品中加入标准品 2、6、10 μg,按照 1.2 处理方法,在最优条件下测定两组分的回收率,平行测定 6 次,结果见表 2。

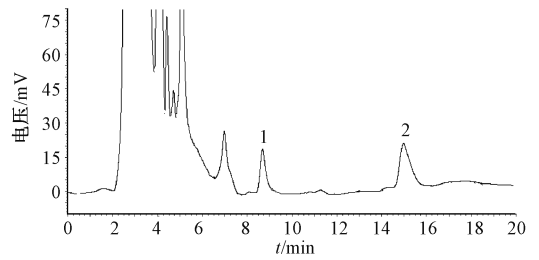
表2 鸡肝样品回收率和精密度 (n=6)

Table 2 The recoveries and precision

组分	样品本底值	加入量 / μg	测定量 / μg	平均回收率 / %	RSD / %
7-酮基胆固醇	未检出	2	1.93	96.5	2.34
		6	5.82	97.0	5.57
		10	9.49	94.9	2.70
胆甾烯酮	未检出	2	1.64	82.0	1.66
		6	5.14	85.7	4.08
		10	7.41	74.1	4.50

2.7 实际样品测定

分别取卤制鸡肝、卤制鸡心样品各 1.0 g,按照 1.2 处理方法,在最佳萃取条件和色谱条件下进行测定,7-酮基胆固醇和胆甾烯酮均未检出,测定实际样品色谱图见图 4 ~ 7。本试验对卤制鸡心样品也进行了测定,初步表明该方法也适用于其他卤制品,但有待于进一步评价。



注:1为7-酮基胆固醇;2为胆甾烯酮

图4 鸡肝样品加标色谱图

Figure 4 Chromatogram of spiked chicken liver

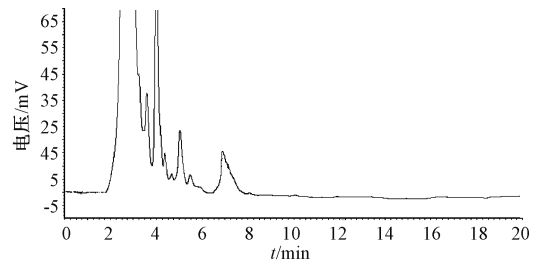
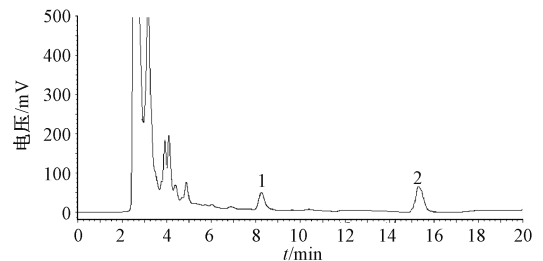


图5 鸡肝实际样品色谱图

Figure 5 Chromatogram of the chicken liver



注:1为7-酮基胆固醇;2为胆甾烯酮

图6 鸡心样品加标色谱图

Figure 6 Chromatogram of spiked chicken heart

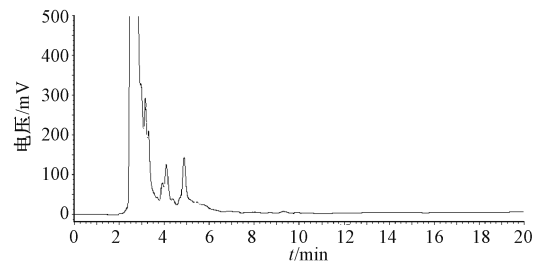


图7 鸡心实际样品色谱图

Figure 7 Chromatogram of the chicken heart

3 小结

本试验建立了基质固相分散-高效液相色谱紫外变波长检测鸡肝中 2 种胆固醇氧化物的方法,样品处理技术集均化、提取、净化于一体,操作简单快速,适合于鸡肝中胆固醇氧化物的测定。

参考文献

- [1] ZHOU Q. An excess concentration of oxysterol in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 149(1):191-197.
- [2] Morin R J, HU B, PENG S K, et al. Cholesterol oxides and carcinogenesis [J]. *J Clin Lab Anal*, 1991, 5(3):219-225.
- [3] Brown A J, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, 142(1):1-28.
- [4] 陆敏, 周建科, 梁俊红. 气相色谱法测定烤鱼片中胆固醇氧化物 [J]. *食品工业科技*, 2004, 51(1):133-134.
- [5] Johnsson L, Dutta P C. Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1064(2):213-217.
- [6] Azadmard-Damirchi S, Dutta P C. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(1):36-42.
- [7] Angulo A J, Romera J M, Ramirez M, et al. Determination of cholesterol oxides in dairy products: effect of storage conditions [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45:4318-4323.
- [8] 李楠. 水产加工制品中胆固醇氧化物的分布与由来 [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(6):27-31.
- [9] Apprich S, Ulberth F. Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1055(1):169-176.

第46届国际食品添加剂法典委员会会议在香港召开

2014年3月17日至21日,第46届国际食品添加剂法典委员会(CCFA)会议在香港举行。来自56个成员国和1个成员组织(欧盟)及34个国际组织的260余名代表参加了本届会议。中国作为CCFA主持国,会议由国家食品安全风险评估中心承办,香港食物安全中心协办。国家食品安全风险评估中心总顾问、CCFA主席陈君石院士全程主持会议。国家卫生计生委副主任陈啸宏、香港食物及卫生局局长高永文出席开幕式并致辞。

中国派出来自国家卫生计生委、质检总局、工信部、粮食局、中国商业联合会、食品添加剂配料协会、香港食物环境卫生署、澳门民署的23名代表组成的中国代表团参加会议,国家食品安全风险评估中心刘金峰主任任代表团团长。此外,另有来自香港食物环境卫生署、行业协会、企业的60余名代表列席会议。

陈啸宏副主任在致辞中指出,中国主持CCFA会议以来,与CCFA各成员国坦诚合作,认真负责推动各项工作。CCFA成员国和观察员人数平稳上升,先后完成了食品工业用加工助剂和香料的使用等法典标准,审议通过了大量食品添加剂标准,国际食品添加剂通用法典标准取得显著进展,对维护消费者健康发挥了积极作用。他介绍,2013年中国完成了近5000个食品标准的清理,目前正在抓紧开展食品安全国家标准整合工作,到2015年底基本形成中国食品安全标准体系。他表示,中国与各国紧密合作,积极参与国际食品安全标准工作,为维护食品安全、促进国际贸易做出贡献。

本次会议将重点研究食品添加剂法典通用标准(GSFA)、食品添加剂编码系统(INS)、联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)优先评估的食品添加剂名单、食品添加剂质量规格标准等相关内容。中国作为CCFA主持国,将认真参与各项议题的讨论,并以会议为平台,积极开展与相关各方在食品添加剂管理领域的交流与合作。

国家食品安全风险评估中心

二〇一四年三月十八日