

非衍生化-气相色谱-串联质谱法测定 植物油中5种植物甾醇

李洁, 李玲, 王艳丽, 李海霞, 鞠香, 刘艳明*, 胡梅, 崔玉花, 张卉

[山东省食品药品检验研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(肉及肉制品监管技术), 山东省特殊医学用途配方食品质量控制工程技术研究中心, 山东省食品药品安全检测工程技术中心, 济南 250101]

摘要: **目的** 基于脂肪酶对脂肪的酶解作用, 构建了一种室温皂化的前处理方式, 将植物油中结合态的甾醇酯高效游离出来, 利用气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)建立植物油中的菜籽甾醇、 β -谷甾醇、芸薹甾醇、豆甾醇、环阿屯醇5种植物甾醇的检测方法。**方法** 植物油经脂肪酶酶解、碳酸钾-乙醇溶液皂化后将甾醇游离出来, 利用正己烷萃取, 采用HP-5MS毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)分离, GC-MS/MS多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行检测, 外标法定量。**结果** 在弱极性色谱柱HP-5MS上5种植物甾醇色谱行为良好; 缓冲溶液pH为9.0、脂肪酶用量为0.05 g、酶解20 min时酶解效果最好, 室温条件进行皂化, 正己烷作为萃取溶剂, β -谷甾醇及其他4种植物甾醇的线性范围分别为0.05~50.00 mg/L和0.05~20.00 mg/L, 相关系数均大于0.999, 方法的加标回收率在84.7%~101.6%之间, 相对标准偏差为1.4%~4.1%, 5种植物甾醇的检出限为3.0 mg/kg, 定量限为10.0 mg/kg。**结论** 本研究开发的方法简便快速, 便于植物油中甾醇的快速测定。

关键词: 气相色谱-串联质谱法; 甾醇; 酶解; 皂化; 植物油

Determination of 5 kinds of phytosterols in vegetable oil by non derivatization-gas chromatography-tandem mass spectrometry

LI Jie, LI Ling, WANG Yan-Li, LI Hai-Xia, JU Xiang, LIU Yan-Ming*,
HU Mei, CUI Yu-Hua, ZHANG Hui

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Supervising Technology for Meat and Meat Products for State Market Regulation, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: Objective To develop a pretreatment method of saponification at room temperature based on the enzymatic hydrolysis of lipase on fat to effectively separate the bound sterol esters from vegetable oil, and develop the determination methods of 5 kinds of phytosterols (namely brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and cycloartenol) in vegetable oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** The oil samples were hydrolyzed by lipase, saponified using potassium carbonate-ethanol system, the sterols were

基金项目: 山东省食品药品检验研究院院级科研课题项目(SDIFDC-KY-2021013)

Fund: Supported by the Institute Level Scientific Research Project of Shandong Institute for Food and Drug Control (SDIFDC-KY-2021013)

*通信作者: 刘艳明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全分析与风险预警。E-mail: msymliu@163.com

*Corresponding author: LIU Yan-Ming, Ph.D., Professor, Shandong Institute for Food and Drug Control, No.2749, Xinluo Street, Gaoxin District, Jinan 250101, China. E-mail: msymliu@163.com

extracted by *n*-hexane, separated by HP-5MS capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), detected by GC-MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode, and quantified by external standard method. **Results** The chromatographic behavior of 5 kinds of phytosterols was good on HP-5MS. When pH of buffer solution was 9.0, lipase dosage was 0.05 g and enzymatic hydrolysis was 20 min, the enzymatic hydrolysis effect was the best, saponification was carried out at room temperature, *n*-hexane was used as extraction solvent, the linear range of β -sitosterol and the other 4 kinds of sterols were 0.05–50.00 mg/L and 0.05–20.00 mg/L, respectively. The correlation coefficients were all greater than 0.999. The spiked recoveries ranged from 84.7%–101.6% with relative standard deviations of 1.4%–4.1%. The limits of detection and limits of quantitation for the 5 kinds of phytosterols were 3.0 and 10.0 mg/kg, respectively. **Conclusion** The method developed in this study is simple and convenient for the rapid determination of phytosterols in vegetable oil.

KEY WORDS: gas chromatography-tandem mass spectrometry; phytosterols; enzymolysis; saponification; vegetable oils

0 引言

植物甾醇是一种重要的天然活性物质,是一类以甾核为基础骨架的化合物,其结构式见图1,其中含量较高的有 β -谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇和芸薹甾醇4种^[1-2]。植物甾醇具有防止冠心病粥样硬化、抗炎、保护皮肤及增强免疫力等作用,能够调节人体对胆固醇的吸收,已被列入功能食品范畴^[3-5]。人体不能自行合成植物甾醇,只能从食物中获取,植物油是膳食甾醇的来源之一^[1-2]。据报道,甾醇处于热、光、金属离子等环境中,容易产生氧化反应,形成甾醇氧化物。在植物油的加工生产环节(脱臭脱酸)及植物油的精炼均容易引起甾醇的氧化和分解,从而导致甾醇的损失^[6-7]。因此,发展一种快速、准确测定植物油中甾醇含量的检测技术,对于评价和监控植物油品质具有重要意义。测定植物甾醇的仪器方法主要有气相色谱法^[8-10]、气相色谱-质谱法^[11-13]、高效液相色谱法^[14-15]和高效液相色谱-串联质谱法^[16-18]。气相色谱-串联质谱法测定甾醇的研究较少。相比于气相色谱法和气相色谱-质谱法,气相色谱-串联质谱法的抗干扰能力更强,使得定性和定量更准确;高效液相色谱法和高效液相色谱-串联质谱法测定时出峰快,可实现甾醇的快速分析,但对流动相的要求较高且有机溶剂的消耗量较大,不利于环境友好。

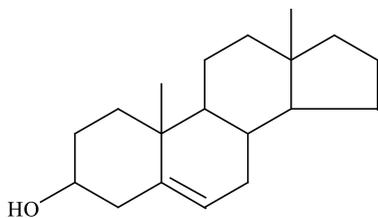


图1 甾核的结构式

Fig.1 Structural formula of steroid nucleus

植物甾醇主要以游离态甾醇和结合态甾醇酯两种形式存在,准确测定甾醇的含量需要测定两种形态的甾醇总

量^[5,19]。目前报道的游离态甾醇的前处理技术主要是固相萃取技术^[20-23],结合态甾醇的检测通常采用皂化水解^[24-26]技术。对于游离甾醇,植物油中脂肪的存在影响其萃取效率,而对于结合态的甾醇酯,需要先将酯释放为游离甾醇,再进行萃取测定。现有国内外文献报道的植物油中甾醇总量的检测方法^[17-18,27-28]均采用氢氧化钾-乙醇溶液对样品进行皂化水解,将甾醇释放出来后,利用衍生化试剂N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺或N-甲基-N-三甲基硅烷七氟丁酰胺衍生化后进行检测。由于皂化条件苛刻(强碱溶液、水浴温度高、皂化时间长)、萃取时操作烦琐、水洗时容易乳化,分层困难,导致目标物的绝对回收率低,结果的重现性差,需要加入内标进行校正,且步骤繁多,不能实现甾醇的快速、准确测定。现行甾醇的检测标准GB/T 23225—2010《动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法》、NY/T 3111—2017《植物油中甾醇含量的测定 气相色谱-质谱法》和NY/T 3945—2021《植物源性食品中游离态甾醇、结合态甾醇及总甾醇的测定 气相色谱-串联质谱法》均基于上述前处理技术建立的。

基于此,本研究拟开发一种快速酶解、室温皂化的前处理技术,无需衍生,建立测定植物油中 β -谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇和芸薹甾醇、环阿屯醇5种甾醇的气相色谱-串联质谱法,为评价和监控植物油品质提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

菜籽甾醇(纯度>98.0%,加拿大TRC公司);芸薹甾醇(纯度>98.7%,日本Tama公司);豆甾醇、 β -谷甾醇(纯度>98.0%,上海ZZBIO公司);环阿屯醇(纯度>98.8%,美国Chroma Dex公司);氢氧化钾、无水乙醇、磷酸二氢钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);碳酸钾(分析纯,莱阳市康德化工有限公司);正己烷(色谱纯,美国Fisher公司);脂肪酶(酶活力 ≥ 1208 U/mg,美国Sigma公司);所用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

TQ-8050 气相色谱-串联质谱仪(日本岛津公司); HP-5MS 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)(美国安捷伦公司); TG-Innowax MS 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)[赛默飞赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; MS204S 电子天平(0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多集团); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); SW22 型恒温水浴振荡仪(德国优博莱公司); 3-18KS 冷冻离心机(美国 Sigma 公司); UMV-2 涡旋混合器(山东青云实验耗材有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

标准溶液的配制: 分别准确称取 10.0 mg 菜籽甾醇、β-谷甾醇、芸薹甾醇、豆甾醇、环阿屯醇标准品于 10.0 mL 容量瓶中, 正己烷定容至刻度, 得到质量浓度为 1.00 mg/mL 的单标标准溶液。量取适量的各甾醇单标标准溶液至同一容量瓶中, 配制成质量浓度为 0.10 和 0.01 mg/mL 的混合标准溶液。分别吸取 0.01 mg/mL 的混合标准溶液 0.05、0.20、0.50 mL 于 10 mL 容量瓶中, 配成质量浓度为 0.05、0.20、0.50 mg/L 的标准工作溶液, 分别吸取 0.10 mg/mL 的混合标准溶液 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中, 配成质量浓度为 1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00 mg/L 的标准工作溶液, 4℃ 储存备用。

磷酸盐缓冲液(pH 9.0)的配制: 称取适量氢氧化钾于 100 mL 烧杯中, 用水溶解, 配制成质量浓度为 400 g/L 的溶液, 冷却后待用。称取磷酸二氢钾 27.0 g 至烧杯中用水溶解, 加入适量上述氢氧化钾溶液, 调节 pH 至 9.0, 转移至 250 mL 容量瓶中定容至刻度。

1.3.2 样品前处理

准确称取 0.10 g 植物油样品于 50 mL 离心管中, 加入 pH 9.0 的磷酸盐缓冲溶液 5 mL 和 0.05 g 脂肪酶, 涡旋混匀 2 min。于 37℃±2℃ 恒温水浴振荡仪中进行酶解, 20 min 后将酶解液取出。待酶解液冷却后加入 1.5 g 碳酸钾, 再依次加入 10 mL 无水乙醇和 10 mL 水, 涡旋混匀皂化 10 min。准确加入 10 mL 正己烷进行萃取 5 min, 6000 r/min 离心 2 min, 移取上层清液于另一个 50 mL 离心管, 再准确加入 10 mL 正己烷萃取一次。合并萃取液, 混匀后上气相色谱-串联质谱仪。

由于并未购买到植物油甾醇的质控样和甾醇酯的标准品, 本研究采用阳性玉米油样品作为标准品对实验条件进行优化。利用 NY/T 3111—2017 对阳性玉米油样品中菜籽甾醇、芸薹甾醇、豆甾醇、β-谷甾醇、环阿屯醇的含量进行了准确定值, 其含量分别为 54.3、1852.8、635.2、5704.3、148.6 mg/kg, 将其作为标准值对本方法的实验条件进行优化。分别探讨酶解条件(酶的用量、酶解时间、酶解 pH)、皂化条件(碱的用量、皂化时间和温度)、萃取条件

(萃取剂的种类和体积)对检出值的影响, 以 5 种甾醇的加标回收率或者检出值作为评价指标选出最优的前处理条件。

1.3.3 气相色谱-质谱条件

色谱柱: HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度: 250℃; 离子源温度: 200℃; 辅助加热温度: 280℃; 进样方式: 不分流进样, 进样量: 1 μL; 程序升温: 150℃ 保持 1 min, 然后以 10℃/min 升至 280℃, 保持 12 min, 再以 20℃/min 升至 300℃, 保持 8 min。电子轰击电离源(electron impact, EI), 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行采集。5 种甾醇的保留时间、监测离子对及对应的碰撞能见表 1。

表 1 5 种甾醇的保留时间、监测离子对和碰撞能量
Table 1 Retention times, monitoring ion pairs and collision energies of 5 kinds of sterols

化合物	保留时间/min	离子对(m/z)	碰撞能/eV
菜籽甾醇	20.470	255.0/159.2*, 255.0/147.2	12, 12
芸薹甾醇	21.695	400.0/315.4*, 315.0/95.2	6, 24
豆甾醇	22.370	255.0/159.2*, 412.0/169.3	9, 30
β-谷甾醇	23.700	414.0/329.4*, 329.0/95.1	9, 24
环阿屯醇	25.625	109.0/67.1*, 135.0/107.1	9, 6

注: *定量离子对。

1.4 数据处理

使用日本岛津公司 Lab Solutions GCMS Solution Ver 4.50 软件进行相关数据处理和分析。

2 结果与分析

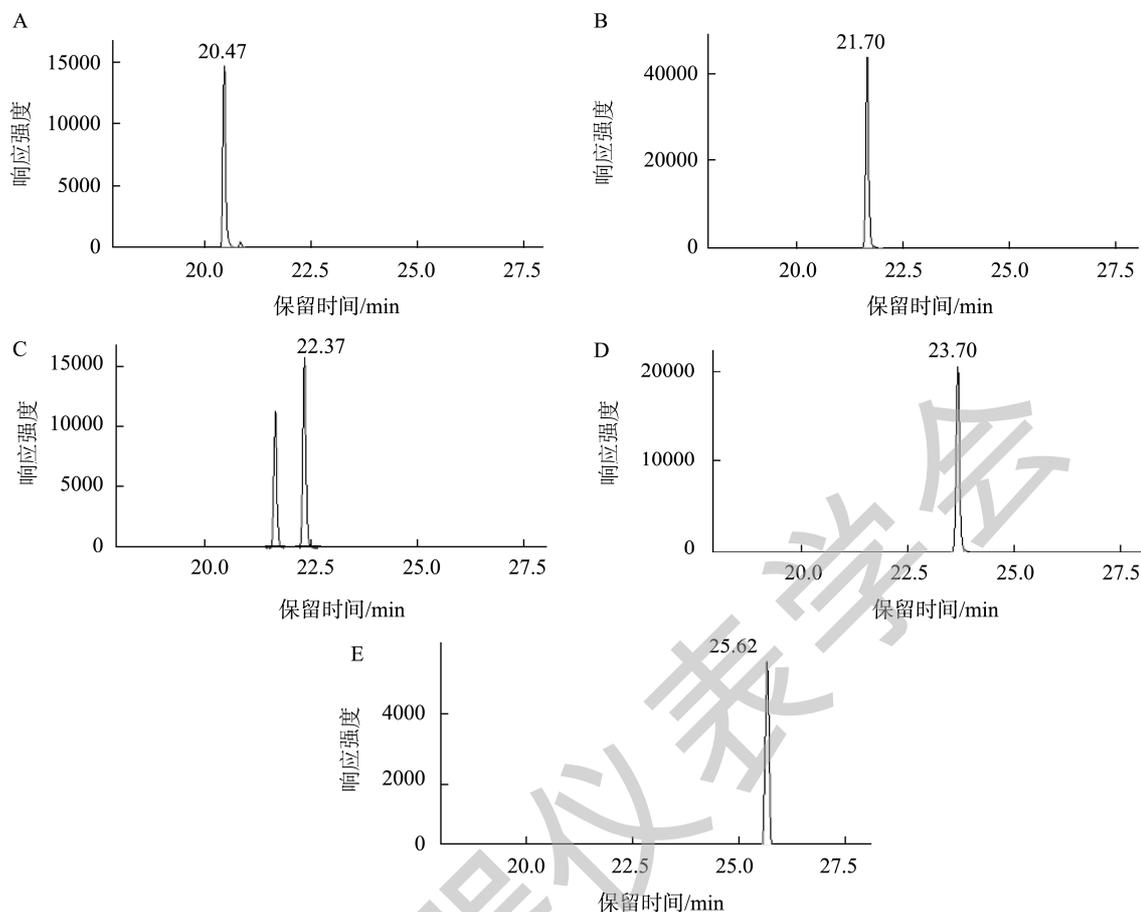
2.1 仪器条件的优化

2.1.1 色谱条件的优化

分别选用 HP-5MS 和 TG-Innowax MS 两种极性的色谱柱对目标物进行分离检测, 结果表明, 5 种甾醇在 TG-Innowax MS 色谱柱上峰拖尾严重, 而在 HP-5MS 色谱柱上 5 种甾醇保留良好, 峰形对称, 满足检测需求, 因此本研究选择弱极性色谱柱 HP-5MS 对目标物质进行分离。5 种甾醇的 MRM 色谱图见图 2。

2.1.2 质谱条件的确定

首先将 5 种甾醇的标准混合溶液导入气相色谱-串联质谱仪中进行全扫描, 对照 NIST 谱库, 得到 5 种甾醇的保留时间和碎片离子, 选择质量数较大、强度较高的碎片离子, 利用岛津仪器软件的 Auto SRM 功能, 得到离子对和碰撞能量的优化曲线, 选择出最优的离子对及碰撞电压(表 1)。



注: A. 菜籽甾醇; B. 芸藁甾醇; C. 豆甾醇; D. β -谷甾醇; E. 环阿屯醇。

图2 5种植物甾醇标准溶液 MRM 色谱图(5.0 mg/L)

Fig.2 MRM chromatograms of 5 kinds of phytosterols standard solutions (5.0 mg/L)

2.2 前处理条件的优化

由于未购得植物油甾醇的标准参考物质,本研究选择阳性玉米油样品进行实验,以探究最优的前处理条件。利用标准 NY/T 3945—2021 对阳性玉米油样品中菜籽甾醇、芸藁甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、环阿屯醇的含量进行了准确定值,并将其作为标准值对本方法的各实验条件进行优化。

2.2.1 酶解条件的优化

据报道^[17-18,27-28],结合态的植物甾醇酯一般在高温强碱的环境下进行回流皂化以游离出来,皂化条件苛刻,时间长。脂肪酶可以将油脂中的脂肪降解成脂肪酸和甘油三酯,使得皂化实验可以在较温和的条件下进行,甾醇也更容易被萃取出来。本研究考察了脂肪酶的用量及酶的最佳活性条件,通过阳性甾醇的检出值来确定最佳的酶解条件。

本研究考察了脂肪酶在不同 pH (6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 条件下的酶解效率,并对酶的用量进行了优化。从图 3A 可以看出,在酸性条件(pH 6.0)和中性(pH 7.0)条件下,5 种甾醇的检出值较低。pH 为 8.0、9.0、10.0 时,检出值较高,表明脂肪酶在碱性条件下活性较高,随着 pH 的增大,检出值相差不大,因此选择酶解 pH 为 9.0。由图 3B 可以看出,酶

的量为 0.05 g 时,5 种甾醇的检出值最大,酶的量为 0.01、0.02 g 时,检出值仅为 0.05 g 时的 23.2%~56.5%。据文献报道^[29],脂肪酶的添加量会直接影响酶解的反应效率,酶的添加量越大,反应时与样品的接触面积越大,酶解反应越快,反应也越彻底,使得游离态的甾醇更容易被萃取出来。酶的量高于 0.05 g 时,随着酶量的增大,各甾醇的检出值有降低的趋势,可能由于过量的酶的存在使得溶液粘稠,甾醇不能更好地游离在溶液中,正己烷不容易将其萃取出来,进而影响到萃取效率。因此酶的用量选择 0.05 g。

酶解是一个温和反应的过程,酶解时间是影响脂肪酶解是否完全的一个重要因素,进而影响后续甾醇的萃取。本研究考察了酶解 5、10、15、20、25、30 min 对检出值的影响。结果发现,酶解 5 min 时,5 种甾醇的萃取率已经达到 80%,说明脂肪酶对植物油的酶解作用是个快速反应的过程,酶解 20 min 时达到最高。当酶解时间大于 25 min 时,甾醇含量也呈现降低的现象。由于反应达到平衡需要一定的时间,反应时间过短会导致反应不完全,而反应时间过长会使得副产物增多,影响目标物的产量,因此酶解时间过长,可能导致待测组分损失^[29-30],因此本研究选择酶解 20 min。

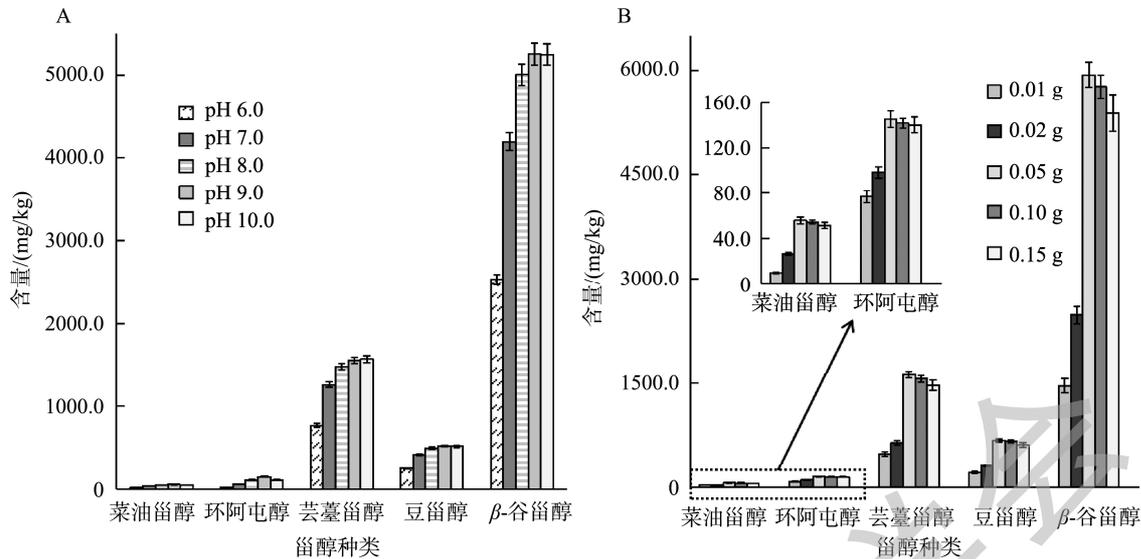


图 3 酶解溶液 pH (A)和酶的用量(B)对玉米油中 5 种甾醇检出值的影响($n=5$)

Fig.3 Effects of pH of enzymatic hydrolysis solution (A) and enzyme dosages (B) on the detected values of 5 kinds of phytosterols in corn oil ($n=5$)

2.2.2 皂化条件优化

本研究考察了不同碳酸钾的用量(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g)对皂化反应的影响,不同碱量的条件下,玉米油中 5 种甾醇的含量见图 4。不加入碳酸钾时,5 种甾醇的检出值仅为标准值的 50%,不经过皂化作用,可能仅有游离态的甾醇被萃取出来。随着碳酸钾加入量的增加,甾醇含量呈现增加的趋势,加入量为 1.5 g 时,甾醇含量已达到较高水平,但碳酸钾加入量继续增大时,检出值呈稳定趋势,说明碱加入量为 1.5 g 时,皂化反应已完全,因此本研究选择 1.5 g 碳酸钾进行皂化反应。

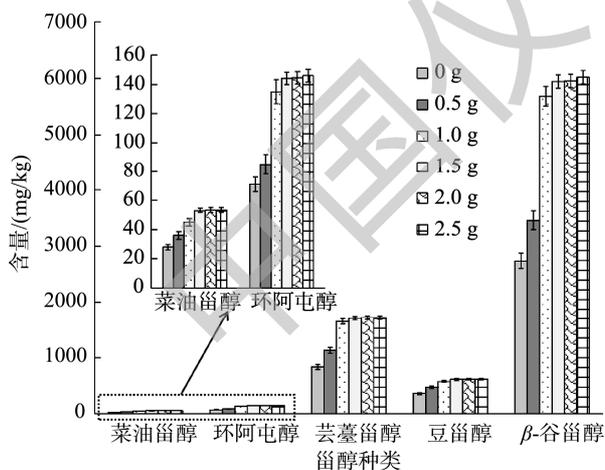


图 4 碱的用量对玉米油中 5 种甾醇检出值的影响($n=5$)

Fig.4 Effects of alkali dosages on the detected values of 5 kinds of phytosterols in corn oil ($n=5$)

本研究还考察了不同皂化时间(2、5、10、15、20、25 min)和皂化温度(25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C)下玉米油中 5 种甾醇的含量,结果显示,皂化时间和温度并未对皂化反应的结果产生明显的影响,5 种甾醇的检出值基本一致。可

能由于样品酶解后,脂肪被降解成脂肪酸和甘油三酯,只需要皂化甾醇酯,皂化反应更容易进行,不会对温度和时间要求苛刻,这也是本研究优于其他高温回流皂化研究^[17-18,27-28]的一个特点。考虑到皂化反应的稳定性和时间成本,本研究选取室温下皂化时间 10 min。

2.2.3 萃取条件优化

在选定的条件下对玉米油进行酶解和皂化反应,在反应后的溶液中加入与样品中含量相等的菜籽甾醇、芸藜甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、环阿屯醇 5 种甾醇,加标含量分别为 50、1600、600、5000 和 150 mg/kg。由于甾醇是一种醇类物质,可以溶于多种有机溶剂,本研究考察了正己烷、二氯甲烷、甲苯、乙酸乙酯和石油醚-乙醚(1:1)作为萃取剂时对 5 种甾醇的萃取效率,结果见图 5。甲苯和二氯甲烷的萃取效果较差,5 种甾醇的回收率为 42.6%~69.7%;乙酸乙酯和石油醚-乙醚作为萃取剂时,菜油甾醇、芸藜甾醇、豆甾醇和 β -谷甾醇的回收率为 69.2%~91.1%,但是环阿屯醇的回收率分别仅为 53.6%和 47.7%;正己烷萃取效果最佳,5 种甾醇的回收率均在 80%以上,因此本研究选择正己烷作为最终的萃取溶剂。

本研究考察了正己烷的体积(5 和 10 mL)和萃取次数(一次和两次)对回收率的影响。结果显示,当 5 和 10 mL 正己烷分别萃取一次时,除 β -谷甾醇的回收率在 95%以上外,其余甾醇的回收率均低于 80%,5 mL 萃取两次时,5 种甾醇的回收率有所增加,但除 β -谷甾醇外,其余甾醇的回收率仍在 90%以下,可能相对于 25 mL 提取液来说,萃取体积太低,能分配至正己烷层的目标物太少,导致回收率偏低。当萃取体积为 10 mL 萃取两次时提取的最充分,5 种甾醇的回收率均在 90%以上,故最终选用 10 mL 正己烷萃取两次作为实验用萃取条件。

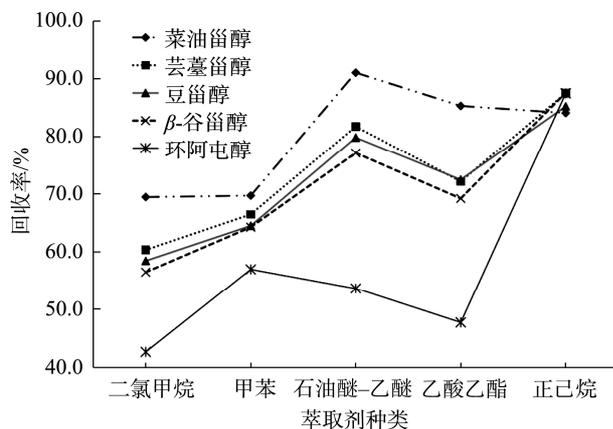


图5 萃取剂对玉米油中5种甾醇回收率的影响(n=5)

Fig.5 Effects of extraction solvent on recoveries of 5 kinds of phytosterols in corn oil (n=5)

2.3 基质效应的考察

由于植物油基质比较复杂,可能会产生一定的基质效应(matrix effect, ME),需要对ME进行评价。根据文献报道^[31], $ME=(\text{基质匹配校正曲线的斜率}/\text{溶剂标准曲线的斜率}-1)\times 100\%$ 。当 $|ME|$ 小于20%时,表示弱基质效应,可忽略不计; $|ME|$ 为20%~50%时,表示中等基质效应; $|ME|$ 大于50%时表示强基质效应,需要进行基质效应校正。分别选用花生油、玉米油、大豆油、芝麻油的基质溶液作为溶剂配制5种甾醇的标准溶液,与正己烷配制的溶剂标准溶液进行比较,计算ME。结果显示,5种甾醇在这4种植物油中的ME值为0.8%~16.3%,均小于20%,表现为弱基质效应,不需要进行基质效应校正,因此本研究采用溶剂标准溶液进行定量分析。

2.4 方法学评价

2.4.1 标准曲线与定量限

在上述优化条件下,对5种甾醇的标准系列溶液进行测定,得出质量浓度和峰面积响应的线性关系。以质量浓度为横坐标(X, mg/L),峰面积为纵坐标(Y),拟合线性方程,得出相关系数(r^2),见表2。 β -谷甾醇的线性范围为0.05~50.00 mg/L,其他4种甾醇的线性范围为0.05~20.00 mg/L。根据各化合物在谱图上的峰高以及峰附近的平均噪声高度计算信噪比,分别以3倍信噪比和10倍信噪比计算其对应浓度,确定每一个化合物的检出限和定量限,结果显示,5种甾醇的检出限为3.0 mg/kg,定量限为10.0 mg/kg,与标准NY/T 3945—2021中各甾醇的定量限一致。

2.4.2 加标回收率与精密度实验

对玉米油样品进行3个水平的加标实验,根据样品中各甾醇的含量水平,加标量分为两组。芸薹甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇的加标量为200、500、1000 mg/kg,菜籽甾醇、环阿屯醇的加标量为50、100、200 mg/kg,每个加标水平平行测

定6次,计算各甾醇的加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。结果显示,在添加质量浓度范围内,甾醇的平均回收率在84.7%~101.6%之间,RSDs在1.4%~4.1%之间,该方法的准确度和精密度均符合要求。

表2 5种甾醇的线性方程及其相关系数
Table 2 Linear equations and their correlation coefficients of 5 kinds of phytosterols

化合物	线性方程	相关系数(r^2)
菜籽甾醇	$Y=1.60\times 10^4 X$	0.9998
芸薹甾醇	$Y=2.75\times 10^4 X$	0.9995
豆甾醇	$Y=1.61\times 10^4 X$	0.9996
β -谷甾醇	$Y=2.31\times 10^4 X$	0.9994
环阿屯醇	$Y=7.74\times 10^4 X$	0.9998

2.5 本研究方法与标准方法的比较

本研究所建立的方法和NY/T 3111—2017中的气相色谱-质谱法分别测定了玉米油中菜籽甾醇、芸薹甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、环阿屯醇含量,考察了本方法与标准方法内、外标定量的差异性。每一方法平行测定6次,计算每种方法测得各个甾醇的平均值及其RSDs,结果见表3。本研究测得的5种甾醇的含量与标准方法内标法测得的一致,本方法的RSDs在0.8%~3.0%之间,标准方法内标法的RSDs在2.9%~3.4%之间,两种方法均有良好的重现性。而标准方法外标法定量时,检测结果偏低,检测值仅为内标法的73.1%~76.9%,RSDs高达40.4~43.3%,重现性很差,不能对样品进行准确的定量。这是由于标准方法使用强碱溶液进行皂化,水洗步骤容易乳化,分层困难,导致目标物的回收率较低,因此标准需采用内标法定量以校正烦琐的前处理对检测带来的误差,内标的使用增加了实验的成本。标准方法前处理时间需要7 h,本研究方法仅需要2.5 h,提高了检测效率。相较于标准方法和已报道的前处理技术皂化条件苛刻、萃取时分层困难、需要衍生和内标校正的特点,本研究开发的方法更加简便快速准确,便于植物油中甾醇的批量测定。

3 结论

本研究开发了一种温和的酶解皂化前处理方式,不需要高温强碱皂化、水洗、固相萃取净化和衍生步骤,高效便捷,适用于批量样品的检测。同时利用MRM模式进行定性定量分析,降低了目标峰的干扰,提高了方法的精准性和重现性。将建立的方法应用于植物油生产企业,对植物油生产的各个环节(脱臭、脱酸)中甾醇的含量进行检测,通过监测甾醇含量的变化,有助于企业对植物油加工及生产工艺进行优化,降低甾醇损失。

表3 本研究方法和标准方法对5种甾醇的测定结果的差异性
Table 3 Differences between this method and standard method in the determination results of 5 kinds of phytosterols

化合物	本研究方法		NY/T 3111—2017(内标法)		NY/T 3111—2017(外标法)	
	平均含量/(mg/kg)	RSDs/%	平均含量/(mg/kg)	RSDs/%	平均含量/(mg/kg)	RSDs/%
菜籽甾醇	53.3	2.4	54.3	3.4	41.4	42.3
芸薹甾醇	1795.4	0.8	1852.8	2.9	1425.6	41.8
豆甾醇	605.0	1.4	635.2	3.1	487.5	42.7
β -谷甾醇	5834.9	0.6	5704.3	3.2	4377.4	40.4
环阿屯醇	153.8	3.0	148.6	3.3	108.7	43.3

参考文献

- 钟巧莉, 朱志鑫, 吴惠勤, 等. 衍生化气相色谱-质谱法测定植物油中植物甾醇[J]. 分析测试学报, 2012, 31(8): 987-991.
ZHONG QL, ZHU ZX, WU HQ, *et al.* Determination of phytosterols in vegetable oils by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(8): 987-991.
- 彭祖茂, 朱丽, 邓梦雅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱同时测定植物油中14种营养成分[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1140-1146.
PENG ZM, ZHU L, DENG MY, *et al.* Simultaneous determination of 14 nutrients in vegetable oils by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(11): 1140-1146.
- KOLENC Z, POTOČNIK T, BREN U, *et al.* Determination of *Camelina* oil sterol composition and its application for authenticity studies [J]. Acta Chim Slov, 2020, 67(4): 1163-1171.
- 赵红帅, 常森, 赵起越, 等. 有机气溶胶中甾醇类化合物的研究进展[J]. 分析实验室, 2016, 35(1): 121-124.
ZHAO HS, CHANG M, ZHAO QY, *et al.* Research progress of sterols compounds in organic aerosol [J]. Chin J Anal Lab, 2016, 35(1): 121-124.
- 贾文聪, 方恩华, 吴易峰, 等. 油茶籽油甾醇存在形态及其在精炼和贮藏过程中动态变化分析[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 39-45.
JIA WC, FANG ENH, WU YF, *et al.* Free and bound phytosterols in camellia seed oil and their dynamic changes during refining and storage [J]. Food Sci, 2021, 42(16): 39-45.
- 余慧, 徐宝成, 王大红, 等. 植物甾醇氧化物的形成、摄入及健康相关效应[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 306-314.
YU H, XU BC, WANG DH, *et al.* Formation, intake and health-related effects of phytosterol oxidation products [J]. Food Sci, 2021, 42(23): 306-314.
- 胡银洲, 黄伟素, 陆柏益. 食品中植物甾醇氧化物研究进展[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(11): 117-122, 128.
HU YZ, HUANG WS, LU BY. Researches on phytosterol oxidation products in food [J]. J Chin Cereal Oils Ass, 2013, 28(11): 117-122, 128.
- 甘欢华, 张斌, 刘钟栋, 等. 气相色谱法同时快速测定大豆油脱臭馏出物中的生育酚、植物甾醇和角鲨烯含量[J]. 中国油脂, 2021, 46(5): 39-42, 70.
GAN HH, ZHANG B, LIU ZD, *et al.* Simultaneous and rapid determination of tocopherol, phytosterol and squalene in soybean oil deodorized distillate by gas chromatography [J]. China Oils Fats, 2021, 46(5): 39-42, 70.
- 蒋晓彤, 杨济泽. 气相色谱法测定保健食品中植物甾醇的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5889-5895.
JIANG XT, YANG JZ. Determination of phytosterol in health food by gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5889-5895.
- HAMDAN IJA, CLAUMARCHIRANT L, GARCIA-LIATAS G, *et al.* Sterols in infant formulas: Validation of a gas chromatographic method [J]. Int J Food Sci Nutr, 2017, 68(6): 695-703.
- SOMMER K, VETTER W. Gas chromatography with mass spectrometry detection and characterization of 27 sterols in two truffle (*Tuber*) species [J]. J Food Compos Anal, 2020, 94: 103650.
- CHEN S, BI YL, SUN S, *et al.* The content and composition of total, free, and esterified sterols of lotus plumule oil by GC-MS/FID [J]. J Am Oil Chem Soc, 2017, 94: 363-373.
- 陈帅, 毕艳兰, 汪学德, 等. GC-MS/FID法分析玉米胚芽油中的甾醇和甾醇酯[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(5): 131-137.
CHEN S, BI YL, WANG XD, *et al.* The analysis of sterols and sterol esters of corn germ oil by GC-MS/FID [J]. J Chin Cereal Oils Ass, 2017, 32(5): 131-137.
- 杜茹芸, 徐红斌, 周耀斌. 超高效液相色谱法检测固体粉状保健品中豆甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(21): 7189-7193.
DU RY, XU HB, ZHOU YB. Determination of stigmasterol, campesterol and β -sitosterol in solid powder healthy food by ultra performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(21): 7189-7193.
- MITEI YC, NGILA JC, YEBOAH SO, *et al.* Profiling of phytosterols, tocopherols and tocotrienols in selected seed oils from Botswana by GC-MS and HPLC [J]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86(7): 617-625.
- NZEKOU FK, CAPRIOLI G, RICCIUTELLI M, *et al.* Development of an innovative phytosterol derivatization method to improve the HPLC-DAD analysis and the ESI-MS detection of plant sterols/stanols [J]. Food Res Int, 2020, 131: 108998.
- PHUONG DL, THUY NT, LONG PQ, *et al.* Fatty acid, tocopherol, sterol compositions and antioxidant activity of three garcinia seed oils [J]. Rec Nat Prod, 2018, 12(4): 323-331.
- BROUGHTON R, RUIZ-LOPEZ N, HASSALL KL, *et al.* New insights in the composition of wax and sterol esters in common and mutant sunflower oils revealed by ESI-MS/MS [J]. Food Chem, 2018, 269: 70-79.
- BROUGHTON R, BEAUDOIN F. Analysis of free and esterified sterol content and composition in seeds using GC and ESI-MS/MS [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2295: 179-201.

- [20] 黄银波, 花露, 陈君, 等. 气相色谱法测定植物甾醇中 β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇的含量[J]. 现代食品, 2021, (14): 179-182.
HUANG YB, HUA L, CHEN J, *et al.* Determination of glutosterol, vegetable oil sterol, soybean sterol and canola sterol in phytosterol by gas chromatography [J]. Mod Food, 2021, (14): 179-182.
- [21] 何仲强, 林晓佳, 陈树东, 等. 固相萃取-同位素稀释-气相色谱-质谱法检测婴幼儿配方米粉中的五种甾醇[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 209-215, 74.
HE ZQ, LIN XJ, CHEN SD, *et al.* Simultaneous determination of five sterols in infant formula rice flour by solid phase extraction-isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(1): 209-215, 74.
- [22] 徐宝成, 张良晓, 王华, 等. SPE-GC-GC-TOFMS 检测油脂中游离甾醇及精炼废弃油脂的判别[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 188-193.
XU BC, ZHANG LX, WANG H, *et al.* A method for determination of free phytosterols derived from vegetable oils by SPE-GC-GC-TOFMS and its application for discrimination of refined waste oils [J]. Food Sci, 2015, 36(2): 188-193.
- [23] 许永, 孔维松, 王晋, 等. 气相色谱-质谱联用法测定新鲜烟叶中的7种甾醇[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(5): 107-112.
XU Y, KONG WS, WANG J, *et al.* Determination of 7 sterols in fresh tobacco leaves by GC-MS [J]. China Food Addit, 2021, 32(5): 107-112.
- [24] 杜杰, 刘春梅, 林春兰, 等. 气相色谱法测定食用油中的植物甾醇[J]. 中国油脂, 2021, 46(9): 145-148.
DU J, LIU CM, LIN CL, *et al.* Determination of pHyosterols in edible oil by GC [J]. China Oils Fats, 2021, 46(9): 145-148.
- [25] 张颖霞, 张成, 杨慧, 等. 气相色谱法测定动植物油脂中甾醇方法的改进[J]. 粮油食品科技, 2019, 27(5): 65-68.
ZHANG YX, ZHANG C, YANG H, *et al.* Improvement of determination of sterols in vegetable oils by gas chromatography [J]. Sci Technol Cere Oils Food, 2019, 27(5): 65-68.
- [26] 钟冬莲, 莫润宏, 王蕤, 等. 反相聚合物固相萃取-气相色谱-质谱法测定植物油中角鲨烯和四种植物甾醇[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 231-236.
ZHONG DL, MO RH, WANG R, *et al.* Determination of squalene and four phytosterols in vegetable oil by polymeric reversed solid phase extraction followed by GC-MS [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(4): 231-236.
- [27] MATTHAUS B, OZCAN MM. Quantification of sterol contents in almond (*Prunus amygdalus* L.) oils [J]. Iran J Chem Chem Eng, 2020, 39(2): 203-206.
- [28] 翟孟婷, 谢亮, 林泽峰, 等. 食用植物油中甾醇总含量测定方法的优化[J/OL]. 中国粮油学报: 1-9. [2022-09-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.ts.20211202.1054.008.html>
ZHAI MT, XIE L, LIN ZF, *et al.* Optimization of determination method for total sterol content in edible vegetable oil [J]. J Chin Cereal Oils Ass: 1-9. [2022-09-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.ts.20211202.1054.008.html>
- [29] 杨馨怡. 1,3-甘油二酯的酶法制备及其功效评价研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
YANG XY. Study on the enzymatic preparation of 1,3-diglycerol and its efficacy [D]. Tai'an: Shangdong Agricultural University, 2022.
- [30] 孙姗姗, 李婷婷, 陈启, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛源性酪蛋白方法中酶解条件的优化及酶解性能的评价[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(10): 1157-1163.
SUN SS, LI TT, CHEN Q, *et al.* Optimization of enzymolytic conditions and evaluation of enzymolytic properties in determination of bovine casein by UPLC in hyphenation with MS/MS tandem [J]. Phys Test Chem Anal, 2019, 55(10): 1157-1163.
- [31] 杨志敏, 张文, 吴福祥, 等. 气相色谱-三重四极杆质谱动态多反应监测模式测定枸杞干果中118种农药残留[J]. 色谱, 2021, 39(6): 659-669.
YANG ZM, ZHANG W, WU FX, *et al.* Determination of 118 pesticide residues in dried wolfberry by gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry in dynamic multiple reaction monitoring mode [J]. Chin J Chromatogr, 2021, 39(6): 659-669.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



李洁, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分析与风险预警。
E-mail: lijie982217@126.com



刘艳明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全分析与风险预警。
E-mail: msymliu@163.com