

高效液相色谱法测定食品中的胆固醇

李 黎¹, 刘玉峰¹, 唐华澄¹, 李 东¹, 王 晶², 方 向², 吴方迪²

(1. 北京市营养源研究所分析室, 北京 100069 2. 国家标准物质研究中心, 北京 100013)

摘 要: 本文建立了高效液相色谱法测定动物性食品中胆固醇的含量, 确定的色谱条件如下: C₁₈ 色谱柱, 二极管阵列检测器, 205nm 检测波长, 100% 甲醇作为流动相, 1.0ml/min 流速。该方法的精密度 RSD 小于 5%, 回收率大于 96%~102%。在此色谱条件下 15min 内完成了胆固醇的分离, 结果比较理想。研究表明此新建方法准确而快速, 并能适用于绝大部分食品中胆固醇的测定。

关键词: 高效液相色谱; 胆固醇; 食品

Determination of Cholesterol in Foods by HPLC Method

LI Li¹, LIU Yu-feng¹, TANG Hua-cheng¹, LI Dong¹, WANG Jing², FANG Xiang², WU Fang-di²

(1. Laboratory Department of Beijing Research Institute for Nutritional Resources, Beijing 100069, China

2. National Research Center for Standard Substances, Beijing 100013, China)

Abstract: HPLC method was established to determine cholesterol in animal foods. The final chromatographic conditions are: C₁₈ chromatographic column, diode-array detector, detector wave 205 nm, 100% methane elution influent and flow rate 1.0ml/min. The relative standard deviations of this method is below 5% and the recovery is between 96%~102%. The satisfied results can be obtained under this chromatographic conditions, and the separation can be finished within 15 min. The results showed this new HPLC analysis method is both correct and fast enough to be used in assaying most foods containing cholesterol.

Key words: HPLC; cholesterol; food

中图分类号: 0657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0289-03

人体内胆固醇过量容易引发动脉硬化、冠心病、高血压等疾病^[1-3], 需要控制饮食中胆固醇的摄入。因此建立一种准确而行之有效的胆固醇含量的测定方法是十分必要的, 目前, 胆固醇的定量分析方法主要包括: 比色法、薄层层析法、气相色谱法、高效液相色谱法及酶法等^[4-9]。但这些方法都存在着操作繁杂、误差大、重现性差等问题。罗健等人采用薄层扫描法测定食物中胆固醇的含量^[10-11]; 美国公职分析化学家协会公定分析方法(AOAC)推荐用气相色谱法^[12-13]; 我国现行的国家标准中也采用气相色谱法测定肉与肉制品中胆固醇的含量^[14], 但该方法需要找到一种合适的内标物(5- α -胆甾烷)才能有准确的结果, 或者将不皂化物酰化衍生化后进行气相色谱分析。近期美国 FDA 发表的一些资料中提到了对食品采用直接皂化的方法, 将胆固醇提取出来进而检测。本文正是采用了直接皂化法, 利用高效液相色谱测定食品中的胆固醇, 这一方法能够与国际接轨, 可满足营养标签中胆固醇的定量测定要求, 与国标相比本法更为简便、准确、快速的方法。

1 材料与方法

1.1 样品

蛋制品 21 种、乳制品 3 种、甜饼类 1 种、肉类 11 种及其它 2 种。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯; 无水乙醇、无水乙醚、石油醚和无水硫酸钠均为分析纯。

1.3 标准品

标准胆固醇 国家标准物质中心。

1.4 仪器设备

LC-10Avp 型高压液相色谱仪 日本岛津公司; 二极管阵列检测器; 磁力搅拌加热电热套; 水浴锅; 真空泵; 微孔过滤器; 0.45 μ m 微孔滤膜; 25 μ l 微量注射器 岛津公司; pH 试纸。

1.5 方法

1.5.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil™(钻石)C₁₈ 反相色谱柱(4.6mm \times

收稿日期: 2005-12-16

作者简介: 李黎(1980-), 女, 助理工程师, 研究方向为食品营养。

150mm); 流动相: 100% 甲醇(V/V); 测定波长: 205nm; 流速: 1.0ml/min; 柱温: 38℃; 进样量: 10μl。

1.5.2 标准溶液配制

1.5.2.1 标准储备液(浓度约为1mg/ml)

胆固醇标准溶液: 精密称取标准胆固醇0.1000g, 用无水乙醇定溶于50ml棕色容量瓶中。

1.5.2.2 标准使用液

用移液管分别吸取上述储备液(浓度约为2mg/ml)5、3、2、1ml用重蒸水定容至10ml(浓度分别为1.0、0.6、0.4、0.2mg/ml)。

1.5.3 样品前处理

1.5.3.1 皂化

准确称取样品(一般样品1~5g, 鸡蛋样品0.5g, 蛋黄样品0.25g), 精确至0.0001g, 于250ml平底烧瓶中, 加入30ml无水乙醇, 50%氢氧化钾溶液10ml。如试样脂肪含量较高, 可加入60%氢氧化钾溶液, 将试样在100℃磁力搅拌加热电热套或水浴锅中皂化回流1h, 不时振荡防止试样粘附在瓶壁上, 皂化结束, 用5ml无水乙醇自冷凝管顶端冲洗其内部, 取下烧瓶, 冷却至室温。

1.5.3.2 提取

定量转移全部皂化液于250ml分液漏斗中, 用30ml水分2~3次冲洗平底烧瓶并入分液漏斗, 再用40ml石油醚和乙醚混合液(1:1, V/V)分2~3次冲洗平底烧瓶并入分液漏斗, 加盖, 放气, 混合, 振摇2min, 静置, 分层。转移水相于第二个分液漏斗, 再用30ml石油醚和乙醚混合液(1:1, V/V)重复提取两次, 弃去水相, 合

并三次有机相, 用蒸馏水每次100ml洗涤提取液至中性, 初次水洗时轻轻旋摇, 防止乳化, 提取液通过无水硫酸钠脱水, 转移到150ml平底烧瓶中。

1.5.3.3 浓缩

将上述平底烧瓶中的提取液在真空, 50℃水浴下蒸发至干, 残渣用5ml甲醇溶解, 溶液通过0.45μm过滤膜过滤, 收集清液移入上机小瓶, 用于高效液相色谱仪分析。

1.5.4 定量方法(外标法)

标准曲线制作: 分别取上述标准工作液, 上机。以峰面积为横坐标x, 胆固醇浓度为纵坐标y, 绘制标准曲线。

1.5.5 结果计算

$$X = \frac{c_0 \times A \times V}{A_0 \times m} \times 100$$

式中, X为样品中胆固醇含量, mg/100g; c_0 为标准溶液的浓度, mg/ml; A_0 为标准溶液的峰面积相应值; A为样品的峰面积相应值; V为定容体积, ml; m为样品质量, g。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

据文献报道, 测定胆固醇采用的流动相有乙腈/异丙醇(4/1, V/V)或(2/1, V/V), 也有人采用甲醇/水(95/5, V/V)。本文以100%甲醇作流动相, 避免了有机相与无机相混合对仪器稳定及样品测定结果的影响,

表1 样品精密度实验结果
Table 1 Results of accuracy test of samples

序号	称样量	定容体积	上机浓度(g/ml)	标准浓度(mg/ml)	标准面积	校正因子	样峰面积	含量(mg/100g)
A1	2.1318	5	0.43	1.00	3631818	0.00000028	5007773	323.403
A2	2.1318	5	0.43	1.00	3631818	0.00000028	4784954	309.013
A3	2.1318	5	0.43	1.00	3631818	0.00000028	5052521	326.293
A4	2.1318	5	0.43	1.00	3631818	0.00000028	4935635	318.744
A5	2.1318	5	0.43	1.00	3631818	0.00000028	5026899	324.638
B1	2.0838	5	0.42	1.00	3631818	0.00000028	5122409	338.426
B2	2.0838	5	0.42	1.00	3631818	0.00000028	5117897	338.128
B3	2.0838	5	0.42	1.00	3631818	0.00000028	5167927	341.434
B4	2.0838	5	0.42	1.00	3631818	0.00000028	5242591	346.366
B5	2.0838	5	0.42	1.00	3631818	0.00000028	5181001	342.297
C1	2.0461	5	0.41	1.00	3631818	0.00000028	5111345	343.917
C2	2.0461	5	0.41	1.00	3631818	0.00000028	5129708	345.153
C3	2.0461	5	0.41	1.00	3631818	0.00000028	5196036	349.616
C4	2.0461	5	0.41	1.00	3631818	0.00000028	5153501	346.754
C5	2.0461	5	0.41	1.00	3631818	0.00000028	5297910	356.471

胆固醇	
S	13.240
RSD(%)	3.932

与使用乙腈相比,使用甲醇对操作者来说,挥发性和毒性小一些的,更利于健康与安全。

2.2 检测波长的选择

对胆固醇标准溶液进行扫描后确定在205nm处有最大吸收峰,故选择205nm为测定波长。有些文献报道考虑甲醇的截止波长为205nm,而选择208nm为测定波长时会造成了峰值的降低。通过对大量样品的测定结果表明,选择205nm并没有很大影响。因此,本文还是采用了胆固醇的最大吸收峰波长作为实验条件。

2.3 样品皂化液的选择

试样如果含有较高的脂肪,则加入的氢氧化钾溶液的浓度要较高,加入无水乙醇的量也要适当增加。这样能够保证样品被完全皂化,而且不会出现乳化的现象。实验对氢氧化钾的用量进行了研究,当氢氧化钾的用量为10ml和15ml能保证完全皂化,对结果无明显影响。最后确定采用50%的氢氧化钾溶液的用量为10ml。

2.4 样品萃取剂的选择

通常采用的萃取剂有乙醚、石油醚、正己烷等。考虑到成本问题,采用乙醚、石油醚较为便宜。但由于乙醚挥发性太大,且乙醚、石油醚萃取效果区别不大,因此采用乙醚/石油醚(1/1,V/V)。

2.5 标准回归方程

用胆固醇标准储备液配成0.2、0.4、0.6、1.0mg/ml系列使用液,分别取10 μ l进行色谱测定,以胆固醇浓度作为纵坐标y,峰面积x为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $y=0.00000026x-0.01693817$,相关系数 $R^2=0.9991$,说明呈线性回归,可以用于定量分析。

2.6 精密度实验

抽取2种样品,各称取3份,按本方法进行测定,每份重复测定5次,结果见表1。 $RSD < 5\%$,说明方法有较高的精密度。

2.7 准确度实验

对同一样品进行加标回收实验,结果见表2。从表2中得知,回收率在96%~102%之间,有较高的准确度。

3 结 论

本文对高效液相色谱法测定食品中胆固醇含量的方法进行了探讨,通过对大量样品进行检测,并对检测方法、实验条件及结果的精密度、准确度进行讨论。最终确定了适用于食品中胆固醇含量测定的方法,使用C₁₈色谱柱,二极管阵列检测器,205nm检测波长,100%甲醇作为流动相,1.0ml/min流速,在15min内完成了食品中胆固醇的测定,效果比较理想。

参考文献:

- [1] 曹劲松. 两种测定鸡蛋胆固醇方法的比较[J]. 食品科学, 1996, 17(9): 48-51.
- [2] 鲍忠定, 许荣年, 张金华, 等. 毛细管气相色谱法测定奶粉中胆固醇的含量[J]. 中国乳品工业, 1999, 27(1): 35-36.
- [3] 凌强, 田克勤. 食品营养与卫生[M]. 2版. 大连: 东北财经大学出版社, 2002: 15.
- [4] 张蓉真, 李琰, 刘树滔, 等. 测定鸡蛋胆固醇的高效液相色谱新方法[J]. 色谱, 1998, 16(2): 91-94.
- [5] JIANG Z, FENTON M, SIM J S. Comparison of four different methods for egg cholesterol determination[J]. Poultry Science, 1991, 70(4): 1015-1019.
- [6] BEYER J D, MILANI F X, DUTELLE M J, et al. Gas chromatographic determination of cholesterol in egg products. [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1989, 72(5): 746-748.
- [7] MAURICE D V, LIGHTSEY S F, HSEN K T, et al. Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC[J]. Food Chemistry, 1994, 50: 367-372.
- [8] BEYER R S, JENSEN L S. Overestimation of the cholesterol content of eggs[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 917-920.
- [9] 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.
- [10] 董元伟, 徐汉江. 薄层扫描法测定施通根胶囊中胆固醇的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(1): 13-14.
- [11] 罗健, 张学新, 钟爱. 薄层扫描法测定食物中胆固醇的含量[J]. 广西药学院学报, 1996, 12(2): 88-90.
- [12] JEON I J, IKINS W G. Analyzing food for nutrition labeling and hazardous contaminants[M]. CRC Press, 1994: 80.
- [13] Nutrition value label information for products marketed in the united states of America[EB/OL]. <http://www.itscb.com>.
- [14] GB/T 9695.24-1990 肉与肉制品胆固醇含量测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992: 286-288.

表2 样品加标回收率实验结果
Table 2 Results of sample recovery test

称样量(g)	原含量(mg)	标准加入量(mg)	加标测定值(mg)	回收率(%)
2.0849	3.522	1.000	4.510	99.74
2.0849	3.522	1.000	4.432	98.01
2.0832	3.519	2.000	5.356	97.04
2.1477	3.628	2.000	5.503	97.78
2.3326	3.940	3.000	7.100	102.30
2.2998	3.885	3.000	6.689	97.15
2.1491	3.630	5.000	8.324	96.45
2.1565	3.643	5.000	8.412	97.33