

酯交换植物油中甾醇含量快速测定方法的建立

朱秀清¹, 窦巍巍², 胡立志¹, 陈昊¹, 于殿宇³, 李佳栋¹

(1. 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150050; 2. 大庆麦伯康生物技术有限公司, 黑龙江 大庆 163316; 3. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 建立简单、快速测定酯交换植物油中高含量的植物甾醇的方法。对紫外比色法分析酯交换植物油中的植物甾醇含量进行研究, 通过单因素与正交试验, 确定最佳的测量条件为显色剂用量 2mL、显色剂组成(铁矾储备液: 浓硫酸)比例 2:8、显色时间 30min、显色温度 20℃。测定结果与气相色谱法结果相比, 相对误差平均偏高 2.95%, 校正后测定结果的相对误差为 0.49%。本方法可用于酯交换植物油中甾醇的定量分析, 操作简单、具有良好的准确性和实用性。

关键词: 酯交换植物油; 紫外比色法; 气相色谱法; 植物甾醇; 测定

Quick Determination of Phytosterol in Transesterified Vegetable Oil

ZHU Xiu-qing¹, DOU Wei-wei², HU Li-zhi¹, CHEN Hao¹, YU Dian-yu³, LI Jia-dong¹

(1. National Research Centre of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150050, China; 2. Daqing Mab Com, Inc, Daqing 163316, China; 3. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A simple and rapid colorimetric method was developed to determine phytosterol content in transesterified vegetable oil. The optimal experimental conditions for the determination of phytosterol content, as determined by one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods, were as follows: the color developer used was composed of iron vitriol stock solution and concentrated sulphuric acid at a ratio of 2:8. the color development was allowed to proceed for 30 min at 20℃ using 2 mL of the color developer. The results obtained by the colorimetric method presented a high relative error of 2.95% in comparison with those obtained by gas chromatography (GC), and the average relative error was 0.49% after calibration. This method was easy, accurate, practical and suitable for the quantitative analysis of phytosterol in transesterified vegetable oil.

Key words: transesterified vegetable oil; colorimetrics; gas chromatography (GC); phytosterol; determination

中图分类号: TS225.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)18-0186-05

植物甾醇(phytosterol), 是植物性食物中含有的类胆固醇物质, 其中植物油中含量最为丰富^[1], 是以环戊烷全氢菲为骨架(又称甾核)的一类天然活性物质, 植物甾醇主要来源于植物油、谷物、水果和蔬菜中^[2]。植物甾醇被誉为“生命的钥匙”, 具有十分重要的生理价值^[3], 如降低血胆固醇、抗癌、抗炎、抗肿瘤、防治心血管疾病等^[4-6]。植物甾醇安全性高, 研究证明植物甾醇能有效降低血液中胆固醇的水平^[7-8], 降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL)的水平, 而对高密度脂蛋白胆固醇(HDL)的影响不大^[9-11], 可用于预防治疗冠状动脉粥样硬化类的心脏病。植物甾醇作为存在于植物细胞中的一类甾体组分和人类膳食脂质中的一类功能性组分, 在医学、食品、化工、饲料、植物基因工程等领域引起高度重视与关注^[12]。但游离甾醇在水和油脂中的低溶解

性限制了它在食品中的实际应用^[13], 通过对植物油脂与甾醇进行酯交换反应, 制备具有较高含量甾醇酯的酯交换植物油, 可以有效的解决甾醇在油脂中溶解性低的问题。甾醇酯具有较高的降胆固醇的效果和较好的脂溶性^[14], 国外市场已研发出添加了植物甾醇酯的保健功能食品, 例如食用油、黄油、人造奶油等^[15-16], 同样在化妆品和医药方面的应用也比较广泛^[17]。建立一种方便、快捷、准确的测定植物油中甾醇含量的方法, 对含植物甾醇的功能性油脂的开发和产业化生产起着重要作用。目前尚无测定植物油中植物甾醇含量的国标检测方法, 现有的测定方法主要有: 毛地黄皂法、可见光比色法、薄层色谱法、高效液相色谱法和气相色谱法(gas chromatography, GC)等^[18]。毛地黄皂法和薄层色谱法分析甾醇处理过程繁杂、数据可靠性较差, 已逐渐

收稿日期: 2011-07-05

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(WB09B201-1)

作者简介: 朱秀清(1968—), 女, 研究员, 硕士, 主要从事大豆精深加工技术研究。E-mail: xqzhuwang@163.com

被淘汰。气相色谱法和高效液相色谱法具有较好的测量精度,但仪器昂贵,操作要求高、标准品价格昂贵。现有的紫外比色法测定植物甾醇的含量具有样品用量少,操作方便,但存在测量精度差,不适合检测油脂中高含量植物甾醇等缺点。

本研究借鉴现有的检测食品和食用油中甾醇含量的紫外比色分析方法,通过对酯交换技术制备的甾醇含量较高的植物油进行定性和定量分析研究,建立一种快速测定植物油中植物甾醇含量的紫外比色法,旨在为添加植物甾醇的功能性油脂的研究和产业化生产提供快捷和简便的监测手段。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

自制酯交换植物油(植物甾醇含量3%~6%);植物甾醇(95%) 西安蓝天生物工程有限责任公司;豆甾醇、 β -谷甾醇、角鲨烷标准样品 美国Sigma公司;石油醚、冰乙酸、硫酸铁铵等均为分析纯。

1.1.2 试剂配制

铁矾储备液:溶解4.463g硫酸铁铵[$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$]于100mL 85%磷酸中,贮于干燥器内,于室温中稳定待用。铁矾显色液:吸取铁矾储备液10mL,用浓硫酸定容至100mL。贮于干燥器内。

1.1.3 仪器与设备

TU-1901 双光束紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;DK-2000-III L 数显恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;7890A 气相色谱仪(FID 检测器)、HP-5 毛细管柱(30m \times 0.32mm, 0.25 μm) 美国安捷伦公司。

1.2 方法

1.2.1 紫外比色法

1.2.1.1 测定方法

称取一定量(100~150mg)的酯交换植物油,置于25mL 试管内,准确记录其质量,加入KOH-乙醇溶液,恒温水浴中皂化30~60min。冷却后加入氯化钠溶液与石油醚10mL,剧烈振荡数分钟后静置分层。取上层石油醚液2mL,氮气吹干后,加入冰乙酸与铁矾显色液,混匀,放置20~30min 后测得吸光度(如浓度过高应进行稀释后测定),对照标准曲线得出相应的甾醇含量。

1.2.1.2 制作标准曲线

依次吸取质量浓度为1mg/mL 甾醇标准常备液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0mL 分别置于10mL 试管内,在各管内加入冰乙酸使总体积皆达4mL。沿管壁加入2mL 铁矾

显色液,混匀,室温下显色20~30min 后,于最大吸收波长下测定吸光度。以甾醇标准浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 气相色谱法

1.2.2.1 色谱条件

进样口温度:300 $^{\circ}\text{C}$;分流比:30:1;柱箱温度:260 $^{\circ}\text{C}$, FID 检测器温度:300 $^{\circ}\text{C}$;载气:氮气流速2.5mL/min 恒流,氢气流速:40mL/min,空气流速400mL/min;进样量:1 μL 。

1.2.2.2 气相色谱法测定样品中甾醇的含量

准确称取酯交换植物油150mg,置于250mL 锥形瓶中,加无水乙醇10mL,再加入氢氧化钾3g,加热回流2h。冷却后加入20mL 去离子水,10mL 正己烷,振荡后静置分层,用10mL 正己烷萃取2~3 次,合并正己烷萃取液,用去离子水洗至pH 值中性,加入适量无水硫酸钠脱水,滤液于旋转蒸发仪浓缩,残液用正己烷定容至10mL,供气相色谱检测。经过0.45 μm 微滤膜过滤后进样测定。

2 结果与分析

2.1 紫外比色法

2.1.1 最大吸收波长

取酯交换植物油样品适量,进行显色处理,于320~900nm 范围内扫描。最大吸收峰在564nm 处,因此,选择564nm 作为测定吸收波长。

2.1.2 甾醇标准曲线

按照1.2.1.2 节方法,得其回归方程为 $Y = 2.88947X + 0.00671$, $R^2 = 0.9995$ 。线性范围为0~0.2mg/mL,检出限为0.007mg/mL,定量限为0.025mg/mL。相关系数为正,说明吸光度随甾醇含量增大而增大,其绝对值接近1,呈较好的正相关性。

2.1.3 稀释倍数的确定

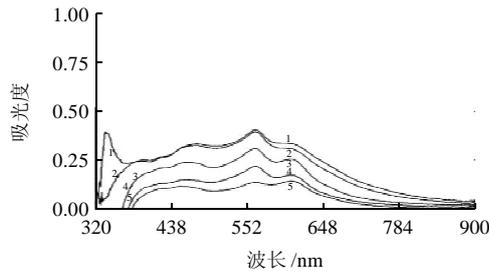
植物油与甾醇酯交换后的油中甾醇的含量较高为3%~6%,不在标准曲线可检测到的范围内,通过稀释的方法加以调整。稀释倍数为10 倍时,标准偏差(s)为0.001%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.09%,为最佳稀释倍数。

2.2 显色反应单因素试验

2.2.1 显色剂用量对显色反应的影响

称取一定量(100~150mg)的酯交换植物油,按照1.2.1.1 节测定方法进行前处理,加入铁矾显色剂体积分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL,15 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min,在最大吸收波长下测定吸光度,以确定最佳用量。从图1 可见,当显色剂用量为2.5mL 时,紫外扫描图1 在

340nm 和 564nm 处出现两个波峰, 564nm 处最大吸收峰较为明显; 当显色剂用量为 2.0mL 和 1.5mL 时, 紫外扫描曲线 2、3 的吸光度在 20~30min 范围内基本保持不变, 且显色剂用量为 2.0mL 和 1.5mL 时最大吸收峰较为明显。由图 2 可见, 当显色剂用量为 2.5 mL 时, 反应的吸光度基本保持不变, 因此, 适宜显色剂用量为 1.5~2.5mL。



1~5 显色剂用量分别为 2.5、2.0、1.5、1.0、0.5mL。

图 1 不同显色剂用量酯交换植物油的吸收谱图

Fig.1 UV spectra of reaction products of transesterified soybean oil and different doses of color developer

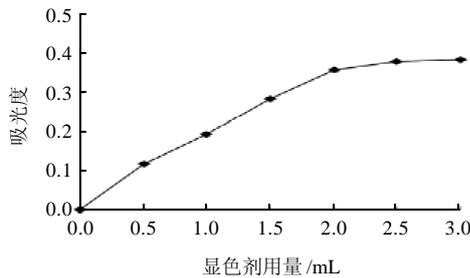


图 2 显色剂用量对显色反应的影响

Fig.2 Effect of color developer dose on reaction

2.2.2 显色温度对显色反应的影响

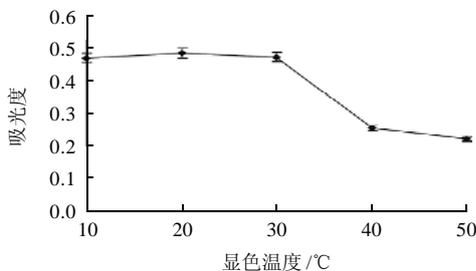


图 3 显色温度对显色反应的影响

Fig.3 Effect of color development temperature on reaction

称取一定量(100~150mg)的酯交换植物油, 按照 1.2.1.1 节测定方法进行前处理, 加入铁矾显色剂 2.0mL,

不同温度下反应 30min, 以确定最佳显色温度。从图 3 可见, 随显色温度的提高, 反应的吸光度缓慢增加, 但 40°C 后空白样品及测定样品颜色均变深, 以同温度条件下反应的空白对照下, 测定吸光度变低, 可见温度较高使反应不稳定。因此, 适宜显色温度为 10~30°C。

2.2.3 显色时间对显色反应的影响

称取一定量(100~150mg)的酯交换植物油, 按照 1.2.1.1 节测定方法进行前处理, 15°C 反应条件下确定最佳显色时间。从图 4 可见, 随显色时间的延长, 反应的吸光度呈先升高再缓慢下降的趋势, 在 25~35min 间, 显色反应稳定, 反应的适宜时间为 25~35min。

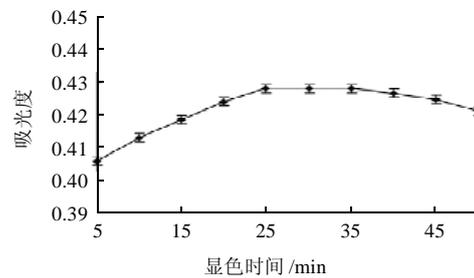
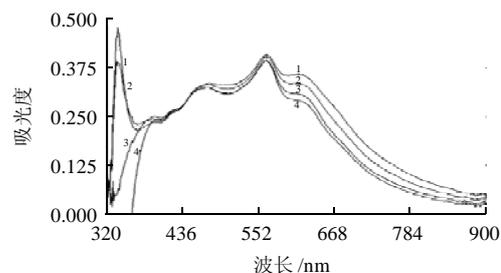


图 4 显色时间对显色反应的影响

Fig.4 Effect of color development time on reaction

2.2.4 显色剂(铁矾储备液:浓硫酸)组成比例对显色反应的影响

称取一定量(100~150mg)的酯交换植物油, 按照 1.2.1.1 节测定方法进行前处理, 15°C 条件下反应 30min, 确定最佳显色时间。从图 5 可见, 随显色剂组成中铁矾储备液加入量的增加, 在 564nm 处的吸光度呈下降趋势。组成比例为 0.5:9.5 时, 在 340nm 和 564nm 处出现两个波峰, 最大吸收峰出现在 340nm 处, 对测定结果有影响; 在 1:9 时, 在 340nm 和 564nm 处出现两个波峰, 最大吸收峰出现在 564nm 处; 在 1.5:8.5 和 2:8 时, 在 340nm 处未出现波峰, 在 564nm 处吸光度稳定。因此, 适宜的显色剂组成比例选择为 1:9~2:8。



1~4 显色剂组成比例分别为 0.5:9.5、1:9、1.5:8.5、2:8。

图 5 显色剂组成比例对显色反应的影响

Fig.5 Effect of color developer composition on reaction

2.2.5 紫外比色法显色条件正交优化试验

选取4个对显色过程影响较大的因素(即显色时间、显色剂用量、显色剂的组成比例)为研究对象,以吸光度为考察指标进行正交试验,其因素水平见表1。由表2可以看出,影响显色反应的因素的主次关系为显色剂用量>显色剂组成比例>显色时间>显色温度。通过以上分析确定最佳反应条件为A₂B₂C₃D₂,即显色剂用量2mL,显色剂组成比例2:8,显色时间30min,显色温度20℃。在最佳反应条件下测量结果与GC法具有较好的一致性,即紫外法4.17%,GC法为4.05%。

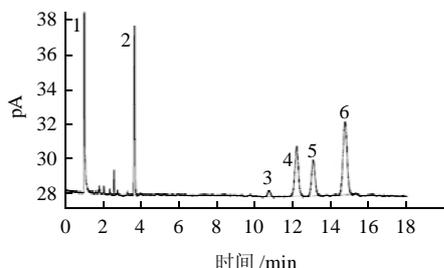
表1 紫外比色法显色反应因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	A 显色时间/min	B 显色剂用量/mL	C 显色剂组成比例	D 显色温度/℃
1	25	1.5	1:9	10
2	30	2.0	1.5:8.5	20
3	35	2.5	2:8	30

表2 紫外比色法显色反应正交试验结果及分析
Table 2 Results and range analysis of orthogonal tests

试验号	A	B	C	D	吸光度
1	1	1	1	1	0.3858
2	1	2	2	2	0.4857
3	1	3	3	3	0.4832
4	2	1	2	3	0.3945
5	2	2	3	1	0.4887
6	2	3	1	2	0.4782
7	3	1	3	2	0.3923
8	3	2	1	3	0.4747
9	3	3	2	1	0.4767
k ₁	0.452	0.391	0.446	0.450	
k ₂	0.454	0.483	0.452	0.452	
k ₃	0.448	0.479	0.455	0.451	
R	0.006	0.092	0.009	0.002	
主次关系	B > C > A > D				
最优条件	A ₂ B ₂ C ₃ D ₂				

2.3 气相色谱法测定样品中甾醇的含量



1.溶剂(正己烷); 2.角鲨烷(3.651min); 3.菜籽甾醇(10.710min); 4.菜油甾醇(12.179min); 5.豆甾醇(13.051min); 6.β-谷甾醇(14.729min)。

图6 酯交换大豆油的气相色谱图

Fig.6 Gas chromatogram of transesterified soybean oil

采用GC法对酯交换大豆油中甾醇进行了定性定量分析,图6为酯交换大豆油中甾醇的GC图谱。对照标准样品GC图谱,确定酯交换大豆油中的各种甾醇的出峰先后顺序为菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、β-谷甾醇。

2.4 检测精度的评价

2.4.1 紫外比色法与气相色谱法测定结果的比较分析

表3 两种方法测定结果的对比分析

Table 3 Comparative analysis of the results obtained for phytosterol content in transesterified vegetable oil by colorimetric method and GC method

样品	气相色谱法		紫外比色法		
	测定值/%	测定值/%	绝对误差/%	*相对误差/%	校正值/%
1	3.29	3.41	0.12	3.65	3.27
2	4.05	4.17	0.12	2.96	4.03
3	5.05	5.18	0.13	2.57	5.04
4	5.96	6.11	0.15	2.52	5.97
5	3.61	3.73	0.12	3.32	3.59
6	4.42	4.48	0.06	1.36	4.34
7	5.67	5.88	0.21	3.70	5.74
8	5.69	5.89	0.20	3.51	5.75

注: *与GC法测定结果的相对误差。

由表3可以看出,紫外比色法分析结果略高于气相色谱法,紫外比色法测定绝对值平均高0.14%,绝对误差最大为0.21%,平均偏高0.14%,相对误差最大为3.70%,平均偏高2.95%。差别幅度与甾醇含量不存在关联,紫外比色法测定植物甾醇总含量接近GC测定值。若用平均偏高0.14%作为该法测定后的校正值,则与气相色谱法测定值分别相差-0.02%、-0.02%、-0.01%、0.01%、-0.02%、-0.08%、0.07%、0.06%,则相对误差仅为-0.61%、-0.49%、-0.20%、0.17%、-0.55%、-1.81%、1.23%、1.05%。

由表3、4进行分析,采用t检验法检验两种方法测定结果的差异性,计算得: $s = 0.048$, $t = 0.1229$,自由度 $f = 8 - 1 = 7$,若 $\alpha = 0.05$ 时,查t分布表得 $t_{表} = 2.3646$,现 $t < t_{表}$,说明两种方法测定结果没有显著性差异。采用F检验法检验两种方法的精密度差异,计算得: $F = s_2^2/s_1^2 = 0.04$,按自由度 $f_1 = 3 - 1 = 2$, $f_2 = 5 - 1 = 4$,若 $\alpha = 0.05$ 时,查F分布表得, $F_{\alpha(2,4)} = 6.94$,现 $F < F_{表}$,说明两种测定方法的精密度差异不显著。

表4 两种方法精密度的对比分析

Table 4 Comparative analysis of the precision of colorimetric method and GC method

样品	测定次数	测定平均值/%	标准偏差/%	相对标准偏差/%	置信区间/%
紫外比色法	5	4.17	0.12	2.88	4.17 ± 0.054
GC法	3	4.05	0.063	1.56	4.05 ± 0.036

2.4.2 稳定性实验

取酯交换植物油样品, 分别于 5、10、15、20、30、40、50、60min 显色, 5~20min 吸光度不稳定; 20~60min 吸光度相对稳定, 其 5 个时间点吸光度的均值为 0.4260, RSD 为 0.141%, 表明供试品溶液在显色 20~60min 较稳定。

2.4.3 精密度实验

取酯交换植物油样品, 连续测定 5 次, 吸光度的相对标准偏差为 0.176%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 回收率实验

采用加样回收法。取同批酯交换油脂样品 5 份, 精密量取浓度为 5.0mg/mL 植物甾醇对照品溶液 2mL, 分别加入上述 5 份样品中。按国标铁矾显色法处理, 加 2mL 显色剂, 于最大吸收波长处测定吸光度, 计算回收率(表 5)。计算紫外比色法平均回收率为 98.61%, 相对标准偏差为 0.57%, 表明加样回收可满足要求, 测定结果准确可靠。

表 5 回收率测定结果
Table 5 Result of fortified recoveries

编号	样品中 含量/mg	加入 量/mg	测定 量/mg	回收 率/%	平均回收 率/%	RSD/%
1	2.26	10.00	12.09	98.27		
2	2.3	10.00	12.09	97.88		
3	2.28	10.00	12.16	98.83	98.61	0.57
4	2.14	10.00	2.08	99.36		
5	2.25	10.00	12.12	98.71		

3 结 论

以高含量甾醇的酯交换植物油为检测对象, 探索紫外比色法测定甾醇含量的可行性, 与气相色谱法比较分析表明, 测定结果的精密度较高。相对误差平均偏高 2.95%, 校正后测定结果的相对误差为 0.49%。与现有紫外测定方法测定相比, 本方法操作简单、准确。该方法可为添加植物甾醇的功能性油脂的研究和产业化生产提供快捷和简便的监测手段。

参 考 文 献:

- [1] OSTLUND R E. Phytosterols in human nutrition[J]. Annual Review of Nutrition, 2002, 22: 533-549.
- [2] DAVID K, SHIRLEY C C. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review[J]. Nutrition Research, 2005, 25(5): 413-428.
- [3] LIN L. Sterol esters of conjugated linoleic acid and process for their production: US, 6413517 B1[P]. 2002-01-02.
- [4] 韩军花, 杨月欣. 植物甾醇的性质、功能及应用[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2001, 28(5): 285-291.
- [5] 文镜, 樊蓉. 植物甾醇和植物甾烷醇降胆固醇的功效和安全性[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 437-442.
- [6] 张品, 邓乾春, 黄庆德, 等. 不饱和脂肪酸植物甾醇酯的合成工艺研究进展[J]. 中国油脂, 2009, 34(7): 37-41.
- [7] LEES A M, MOK H Y, LEES R S, et al. Plant sterols as cholesterol-lowering agents[J]. Atherosclerosis, 1977, 28(2): 325-328.
- [8] DARTEA C K, HIGGINS J D. Stable salad dressings: US, 6123978[P]. 2000-09-26.
- [9] WEBER N. Cholesterol-lowering food additives: lipase catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters[J]. Food Research International, 2002, 35(1): 177-181.
- [10] WEBER N, WEITKAMP P, MUKHERJEE K. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(1): 67-71.
- [11] VILLENEUVE P, TURON F, CARO Y, et al. Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(1): 150-155.
- [12] 吴时敏, 吴谋成. 植物甾醇的研究进展与趋向(I): 植物甾醇的基础研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(2): 73-75.
- [13] 陈茂彬, 黄琴, 吴谋成. 植物甾醇油酸酯产品的合成工艺研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(6): 63-65.
- [14] 唐传核, 彭志英. 一种新型功能性食品: 植物甾醇酯[J]. 中国油脂, 2001, 26(1): 60-63.
- [15] WESTER I. Cholesterol-lowering effect of plant sterol[J]. European Journal of Lipid Science and Nutrition, 2000, 38(8): 639-674.
- [16] STEWART D J, MILANOVA R, ZAWISTOWSKI J W, et al. Phytosterol compositions and use thereof in foods, beverages, pharmaceuticals, nutraceuticals and the like: US, 6087353[P]. 2000-07-11.
- [17] LIU Linsen. Sterol esters of conjugated linoleic acids and process for their production: US, 6413571[P]. 2002-07-02.
- [18] 冯妹元, 韩军花, 刘成梅. 常见精炼油中植物甾醇测定方法的建立及含量分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(3): 197-201.