

反相 HPLC 法快速测定鸭蛋蛋黄粉中胆固醇含量

黄红霞^{1,2}, 张声华¹

(1. 华中农业大学食品科技学院功能食品与分子生物学实验室, 武汉 430070; 2. 湖北工业大学生物工程学院, 武汉 430068)

摘要: 通过 RP-HPLC 方法, 比较了不同的流动相、流速、检测波长和温度对鸭蛋蛋黄粉中胆固醇分离效果的影响。确定试验最佳条件为: 流动相: 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 50: 80: 10(体积比), 柱温 45℃, 进样量 20 μL, 流速 1.3 mL/min, 检测波长 205 nm。在此条件下测得的天然红心鸭蛋蛋黄粉和普通鸭蛋蛋黄粉中胆固醇的含量分别为 24.84 mg/g 和 25.75 mg/g。

关键词: 鸭蛋; 胆固醇; RP-HPLC

中图分类号: TS253.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2006)07-0170-05

黄红霞, 张声华. 反相 HPLC 法快速测定鸭蛋蛋黄粉中胆固醇含量[J]. 农业工程学报, 2006, 22(7): 170-174.

Huang Hongxia, Zhang Shenghua. Quick determination of cholesterol content of dried duck egg yolk by RP-HPLC[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(7): 170-174. (in Chinese with English abstract)

0 引言

胆固醇(Cholesterol)几乎存在于动物的所有组织中, 体内有过多的胆固醇将引起高血脂, 进而引发动脉粥样硬化、高血压、冠心病等一系列心血管疾病^[1]。动物体内的胆固醇主要来源于外源性胆固醇的吸收及内源性合成^[2]。禽蛋蛋黄中含有大量的胆固醇, 是人体直接摄入胆固醇的重要途径, 是外源性胆固醇的主要来源。近年来, 随着人们对胆固醇认识的加深, 食品营养知识的普及, 建立一个快速准确测定禽蛋蛋黄中胆固醇含量的方法是十分必要的。

胆固醇的测定方法有比色法、酶法、液相色谱法和气相色谱法等^[3]。对于胆固醇的测定方法, 目前还存在很多争议。有资料表明, 因禽蛋和禽蛋制品中很多物质的干扰, 而导致比色法对禽蛋和禽蛋制品中胆固醇含量的测定有一定程度的影响^[4]。同时通过气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)同比色法测定的结果相比较, 发现不同的比色方法对胆固醇含量的测定结果有很大的影响^[5-8]。色谱技术是一种比较灵敏的分析和分离手段, 因而倍受关注。Jiang 等通过研究发现酶法、GC 法和 HPLC 等方法测定的禽蛋蛋黄中胆固醇的含量之间没有显著差异^[9]。但目前测定胆固醇含量所使用的高效液相色谱(HPLC)方法中, 胆固醇的出峰时间几乎都在 20 min 以上, 操作费时。因此建立高效快速, 操作简单的测定方法非常有必要。本文以鸭蛋蛋黄为原料, 研究反相-HPLC(RP-HPLC)快速测定鸭蛋蛋黄胆固醇含量, 旨在为禽蛋工业化生产中胆固醇的检测提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期: 2005-11-18 修订日期: 2006-03-06

基金项目: 教育部博士点基金(20020504008)

作者简介: 黄红霞(1976-), 女, 博士, 研究方向为功能食品与分子生物学基础。武汉 华中农业大学食品科技学院功能食品与分子生物学实验室, 430070。Email: xiahh0814@163.com

天然红心鸭蛋, 湖北仙桃食品总厂提供; 普通鸭蛋, 市购。

1.2 试验试剂和仪器

99% 胆固醇标准品(sigma); 甲醇、乙腈、异丙醇均为色谱纯; 其余试剂为分析纯。U-3010 紫外可见扫描仪(HITACHI); LC-10AT 液相色谱(SHIMADZU); SPD-10A 紫外可见检测器(SHIMADZU); Zorbax SB-C18柱(Φ4.6 mm×250 mm)(Agilent)。

1.3 试验方法

1.3.1 胆固醇标准溶液的配制

准确称取 0.1 g 胆固醇标准品, 用甲醇溶解定容至 50 mL, 然后分别取母液 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 用于绘制标准曲线。

1.3.2 待测样品的制备

准确称取 0.1 g 蛋黄粉, 置于 25 mL 的具塞试管中, 加入 2 mL 10% KOH-乙醇皂化液, 在旋涡混合器上混合后, 放入 50℃水浴中皂化 10 min, 并每隔 1 min 混合几秒。将皂化混合物冷却至室温, 加入 10 mL 正己烷, 在旋涡混合器上震荡萃取 3 次, 收集萃取液, 于旋转真空回收仪中蒸发溶剂, 用甲醇溶解残留物, 并定容至 10 mL 用于测定。

1.3.3 RP-HPLC 测定条件的确定

1) 流动相溶剂系统的确定: 在流速 1.0 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL, 柱温 45℃的条件下, 改变流动相系统, 确定最佳流动相溶剂系统。

流动相系统: 1) 乙腈: 异丙醇= 70: 30(v/v); 2) 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 10: 80: 10; 3) 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 20: 80: 10; 4) 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 35: 80: 10; 5) 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 50: 80: 10。

2) 检测波长和柱温的确定: 在流动相: 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 10: 80: 10, 进样量 20 μL, 流速 1.0 mL/min 的检测条件下, 分别改变波长和柱温, 观察分离效果, 确定最佳波长和柱温。

3) 流速的确定: 在流动相: 乙腈: 甲醇: 异丙醇= 50: 80: 10, 进样量 20 μL, 柱温 45℃的检测条件下, 改变流速, 观察分离效果, 确定最佳流速。

1.3.4 液相色谱测定结果计算方法

$$\text{样品胆固醇含量} = (C_{\text{标}} \times 0.99 \times S_{\text{样}} / S_{\text{标}}) \times V_{\text{样}} / m_{\text{样}}$$

式中 $C_{\text{标}}$ —— 胆固醇标准品浓度; $S_{\text{样}}$ —— 样品胆固醇的峰面积; $S_{\text{标}}$ —— 胆固醇标准品的峰面积; $V_{\text{样}}$ —— 样品定容的体积量; $m_{\text{样}}$ —— 样品的质量, g。同时计算相对标准偏差 ($RSD\%$) 和相对平均偏差 ($RE\%$)^[10]。

1.4 统计学方法

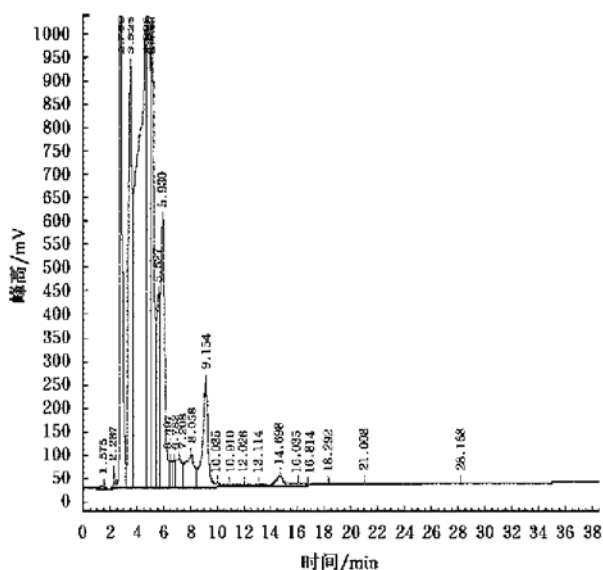
采用 $\bar{x} \pm S$ 表示相关指标, 应用 t 检验进行统计学处理。

2 结果与分析

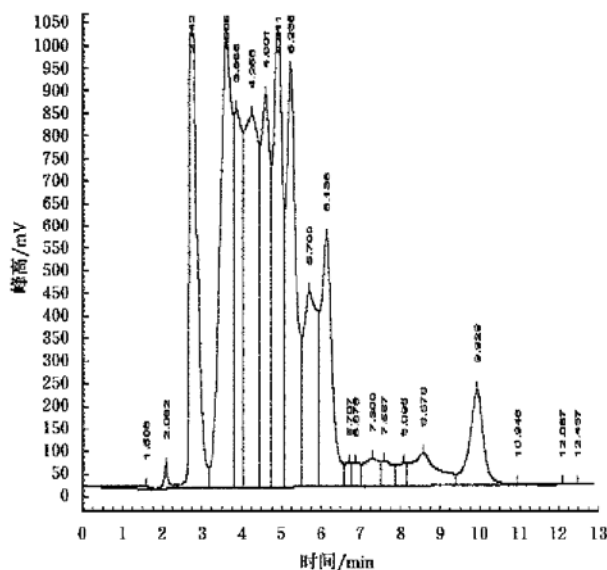
2.1 RP-HPLC 测定条件的确定

2.1.1 流动相溶剂系统的确定

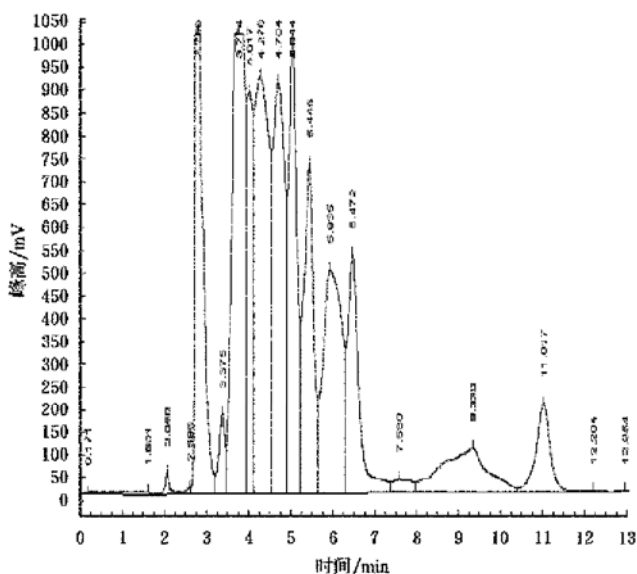
图 1a~ 1d 是改变流动相系统, 其他检测条件不变时的分离图谱。当选用流动相溶剂系统: 乙腈: 异丙醇 = 70: 30 时, 直到 40 min 还未见出峰。说明对在 C18 反相柱中分离非极性的胆固醇时, 此流动相溶剂系统的极性过弱。于是加大极性, 继续改变流动相溶剂系统。当分别使用流动相溶剂系统: 乙腈: 甲醇: 异丙醇 = 10: 80: 10(图 1a), 乙腈: 甲醇: 异丙醇 = 20: 80: 10(图



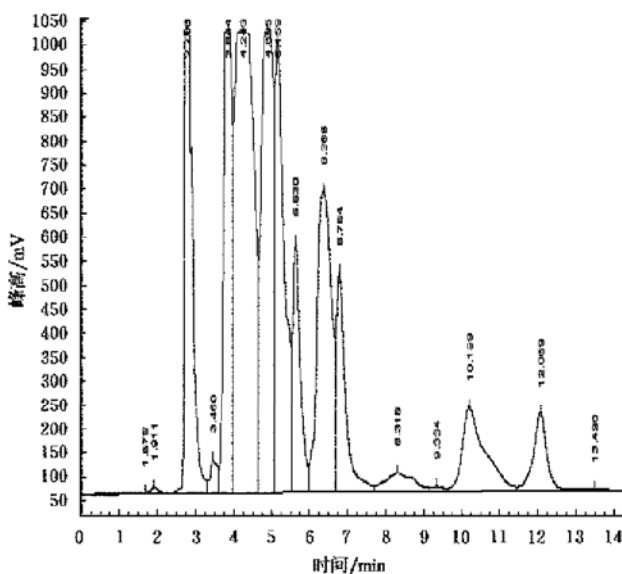
a. 乙腈: 甲醇: 异丙醇=10:80:10



b. 乙腈: 甲醇: 异丙醇=20:80:10



c. 乙腈: 甲醇: 异丙醇=35:80:10



1b) 和乙睛：甲醇：异丙醇= 35：80：10(图 1c) 时, 胆固醇出峰时间都在 9~ 10 min 左右。其分离度分别为 0.88, 0.98 和 0.97, 可见未能把胆固醇和与胆固醇极性极接近的峰完全分离开。且对于液相色谱而言, 其分离度一般都要达到 1~ 1.5。由此可知, 前面的几种溶剂系统还未能达到分离的要求。可以采用继续增加流动相的极性, 延长保留时间, 达到增加分离度的目的。

改变流动相为乙睛：甲醇：异丙醇= 50：80：10 (图 1d) 时, 待测样品胆固醇的出峰时间为 12.152 min, 分离度为 1.25。由此可以确定乙睛：甲醇：异丙醇= 50：80：10 为分离胆固醇的最佳流动相。

2.1.2 柱温对分离效果的影响

改变柱温, 观察 35℃ 和 45℃ 柱温对其分离效果的影响。35℃ 时, 胆固醇出峰时间为 10.250 min; 45℃ 时为 9.206 min。提高温度缩短了保留时间, 且并未见其它影响。于是可以选择 45℃ 作为柱温。

2.1.3 检测波长的确定

经过在紫外区扫描胆固醇溶液, 其最大吸收峰在 199.5 nm 处, 但由于甲醇溶剂透过波长的下限为 205 nm, 而选择检测波长时, 一般不能低于溶剂透过的下限, 于是选择 2 个检测波长(205 nm、210 nm) 来比较其对胆固醇分离效果的影响。结果发现, 改变波长, 在其他条件不变的情况下, 胆固醇的峰面积和峰面积百分比变化较大, 当检测波长为 210 nm 时, 所得胆固醇峰面积为 970954, 峰面积百分比为 52%; 检测波长为 205 nm 时, 其胆固醇峰面积为 1634096, 峰面积百分比为 58%。这说明波长对定量测定胆固醇含量的影响还是很大的。于是选择 205 nm 作为定量测定胆固醇的检测波长。

2.1.4 流速对分离效果的影响

观察流速为 1 mL/min 和 1.3 mL/min(图 1d, 2) 时, 对待测样品中胆固醇的分离效果。结果表明, 增大流速, 缩短了保留时间, 且对分离效果影响不大。由此,

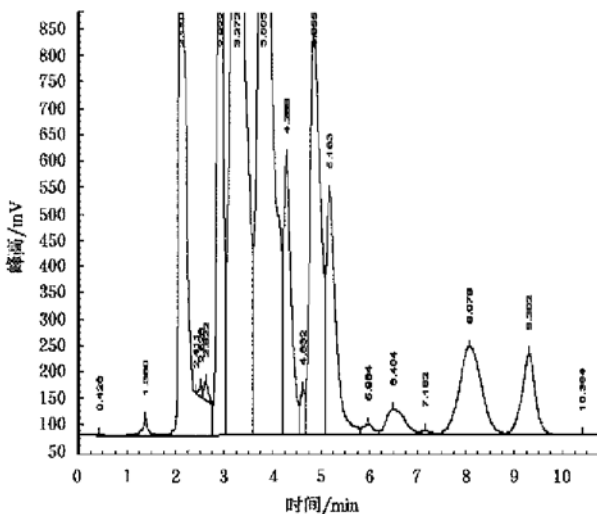


图 2 鸭蛋蛋黄粉胆固醇 HPLC 分离图(流速 1.3 mL/min)
Fig. 2 HPLC profile of cholesterol from yolk powder of duck's egg flow rate ($v = 1.3 \text{ mL/min}$)

通过这些分离条件的选择, 初步确定通过 RP-HPLC 定量分析鸭蛋蛋黄粉中胆固醇的色谱分离条件为流动相: 乙睛：甲醇：异丙醇= 50：80：10, 柱温 45℃, 进样量 20 μL , 流速 1.3 mL/min, 检测波长 205 nm。

2.2 RP-HPLC 测定胆固醇标准曲线绘制

从图 3 中可得 HPLC 测定胆固醇含量时, 胆固醇含量在 0.0226~ 0.4062 mg/mL 之间的范围内, 其浓度与峰面积都具有良好的线性关系。

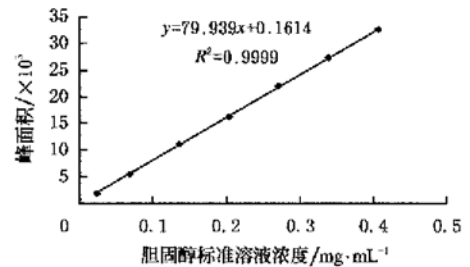


图 3 RP-HPLC 测定胆固醇标准曲线
Fig. 3 Standard curve of cholesterol by RP-HPLC

2.3 鸭蛋蛋黄粉中胆固醇含量的测定

通过取线性范围内胆固醇溶液浓度 (0.4062 mg/mL) 为标准, 通过峰面积和浓度的比值关系, 在流动相为乙睛：甲醇：异丙醇= 50：80：10, 检测波长 205 nm, 流速 1.3 mL/min, 柱温 45℃ 的检测条件下, 测定鸭蛋蛋黄粉中胆固醇含量。标准溶液、天然红心鸭蛋蛋黄粉和普通鸭蛋蛋黄粉中胆固醇的分离图谱见图 4~ 6。通过测定并计算得到样品胆固醇总含量见表 1。

表 1 RP-HPLC 测定鸭蛋蛋黄粉胆固醇含量 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Cholesterol content of dried duck egg yolk by RP-HPLC ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

蛋品	胆固醇含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%	RE/%
普通鸭蛋蛋黄粉	25.75 \pm 0.19	0.72	0.61
天然红心鸭蛋蛋黄粉	24.84 \pm 0.15	0.62	0.51

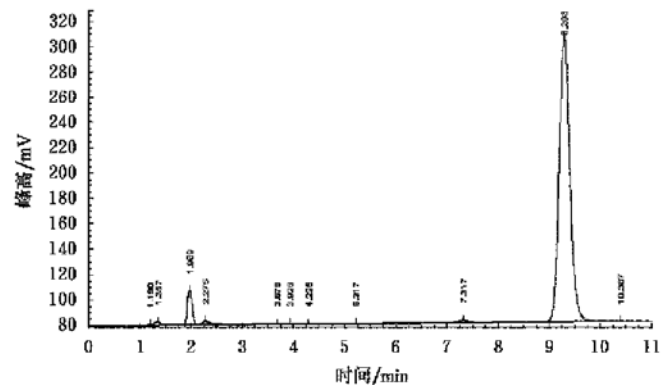


图 4 胆固醇标准品 HPLC 图
Fig. 4 HPLC of the standard sample of cholesterol

Quick determination of cholesterol content of dried duck egg yolk by RP-HPLC

Huang Hongxia^{1,2}, Zhang Shenghua¹

(1. *Laboratory of Functional Food and Molecular Biology Bases, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *College of Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China*)

Abstract: Effects of different mobile phases, flow rates, detecting wavelengths and temperatures on cholesterol separation of dried duck egg yolk were studied by direct saponification-RPHPLC. The optimal chromatographic conditions of RP-HPLC are as follows: mobile phase is acetonitrile : methol : isopropanol= 50 : 80 : 10(v/v/v); UV detecting wavelength is 205 nm; flow rate is 1.3 mL/min; column temperature is 45°C. Cholesterol content of the dried natural red yolk of duck egg and the common dried duck eggs yolk are 24.84 mg/g and 25.75 mg/g respectively under the above conditions.

Key words: duck egg; cholesterol; RP-HPLC