

超高效液相色谱法检测角鲨烯

陈伟珠^{1,2}, 方华¹, 张怡评¹, 洪专^{1*}

(1.国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

2.厦门大学化学化工学院化学系, 化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:应用超高效液相色谱法,建立了角鲨烯的测定方法。采用UPLC BEH C18(2.1mm×50mm, 1.7μm)色谱柱考察了流动相有机相比例、流速及柱温对角鲨烯样品分离的影响,确定了最佳色谱条件:等度洗脱,流动相为甲醇-水(95:5, 体积比),流速0.4mL/min,柱温35℃,检测波长210nm。该方法下,角鲨烯在0.2-10μg/mL范围内浓度和面积呈现良好的线性关系,相关系数r为0.9998;检测限为0.1ng,定量限分别为0.25ng,精密度试验RSD(n=6)为0.36%,平均回收率为100.82%(RSD=0.99%)。本方法快速、简单、可靠、灵敏、重复性好,可用于角鲨烯有关样品的快速检测。

关键词:角鲨烯;超高效液相色谱;测定

中图分类号:TS207.3

文献标识码:A

文章编号:1674-506X(2014)06-0074-0003

Determination of Squalene by Ultra Performance Liquid Chromatography

CHEN Wei-zhu^{1,2}, FANG hua¹, ZHANG Yi-ping¹, HONG Zhuang^{1*}

(1.The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China;

2.Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, and the Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The article is researching determination of squalene by Ultra performance liquid chromatography(UPLC). The analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1mm×50mm, 1.7μm). The influence of flow rate, the proportion of organic phase in mobile phase, and column temperature on the separation of squalene was comprehensively studied. The optimal separation condition was as follows: a mobile phase consisting of methanol and water (95:5, v/v) with a isocratic elution profile, UV detection wavelength at 210 nm, 0.4 mL/min of flow rate for mobile phase, 35℃ of column temperature. On the above condition, good linear was observed in the linear range of 0.2-10 μg/mL, and the correlation coefficient r was 0.9998. The limits of detection (S/N=3) were 0.1ng and the limits of quantification (S/N=10) were 0.25ng. The average recovery rates was 100.82% (RSD=0.99%). The RSD of repetition was 0.36%(n=6). This method was simple, accurate and sensitive with a good reproducibility. It is suitable for fast detection of squalene.

Key words: squalene; ultra performance liquid chromatography(UPLC); determination

doi: 10.3969/j.issn.1674-506X.2014.06-017

角鲨烯是一种天然三萜烯类、多不饱和脂肪族 烃类化合物,含有六个非共轭双键。其最初是由日本

收稿日期:2014-10-16

基金项目:厦门海洋研究开发院共建项目(2014),海洋生物技术产业化中试技术研发公共服务平台(12PZP001SF10)与广东海洋经济发展区域示范项目(GD2012-D01-001)。

作者简介:陈伟珠(1981-),女,助理研究员。主要从事海洋天然产物标准样品研制与分析。

* 通讯作者:洪专(1970-),男,博士。研究方向:海洋天然产物。

化学家于 1906 年在鲨鱼的肝油中发现的,1914 年被命名为 Squalene,其化学名称为 2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯,属开链三萜,又称鱼肝油萜,也称鲨烯。目前,角鲨烯主要来自于深海鲨鱼肝油,同时也少量存在于油脂皂化物中,尤其在橄榄油、棕榈油及其脱臭馏出物中含量较多,菜籽油、大豆油、米糠油、棉籽油等植物油也含有一定量角鲨烯。角鲨烯在体内参与胆固醇的生物合成及多种生化反应,促进机体新陈代谢,提高机体的防御机能及应激能力,具有抗衰老、抗肿瘤和提高免疫调节作用等多种生理功能,可广泛地应用于化妆品、医药、食品等多个行业^[1]。

目前,人们更多地关注角鲨烯对人体健康带来的益处,功能性食品市场上此类产品众多,但是至今为止,我国尚未有关角鲨烯测定的国家标准或者规范性文件。目前,关于角鲨烯检测方法有气相色谱法^[2-8]、气相色谱-质谱法^[9-10]、高效液相色谱法^[4,11-14]以及超高效液相色谱法^[15],但分析时间都比较长,一个样品至少要 10min 以上,即使荣维广^[15]建立的超高效液相色谱法,样品的出峰时间也要 9.9min。本文对超高效液相色谱法进一步优化,样品的分析时间比文献^[5]报道的 UPLC 法时间缩短一半,且灵敏度高,准确性好,是一种简便、快速、准确、环保的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器设备与试剂

超高压液相色谱仪配 TUV 检测器:ACQUITY,美国 Waters 公司;Milli-Q 纯水机(德国 Millipore 公司);甲醇、乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司);角鲨烯(纯度 $\geq 98\%$,美国 sigma 公司)。

角鲨烯储备液的制备:精密称取角鲨烯 10mg,用乙腈溶解,置于 10mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀配成角鲨烯储备液 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 色谱条件

液相色谱柱:UPLC BEH C18(2.1mm \times 50mm,1.7 μm),沃特世科技(上海)有限公司;流动相:水-甲醇(5:95);检测波长:210nm;流速:0.5mL/min;进样量:5 μL 。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的选择

采用乙腈/水和甲醇/水作为流动相体系,实验结果表明甲醇/水(v/v,95/5)作为流动相,角鲨烯样品峰保留时间比用乙腈/水(v/v,95/5)短,为 4.4min(见图 1(b))。所以选择甲醇/水(v/v,95/5)作

为流动相。为了考察甲醇/水的不同比例对角鲨烯样品的分离效果的影响,本试验在柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 和流动

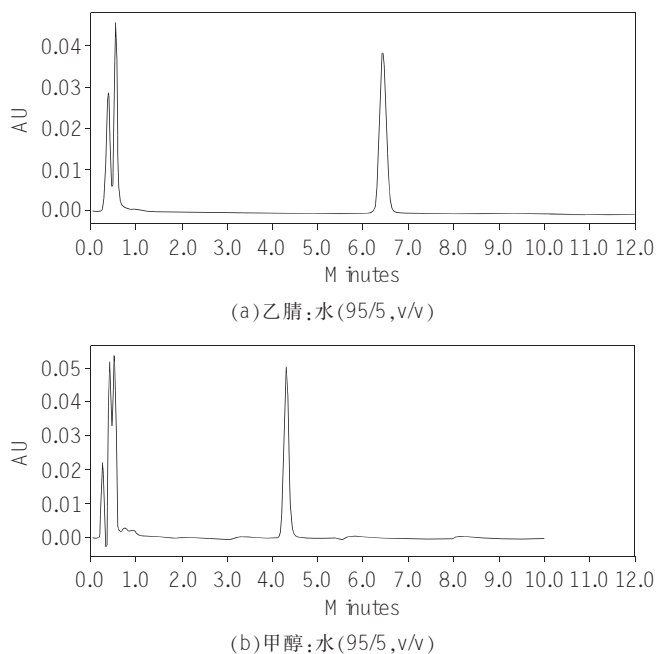


图1 角鲨烯在甲醇:水(95/5,v/v)与乙腈:水(95/5,v/v)不同流动相条件下的色谱图

Fig.1 The chromatography of squalene under the different mobile phase

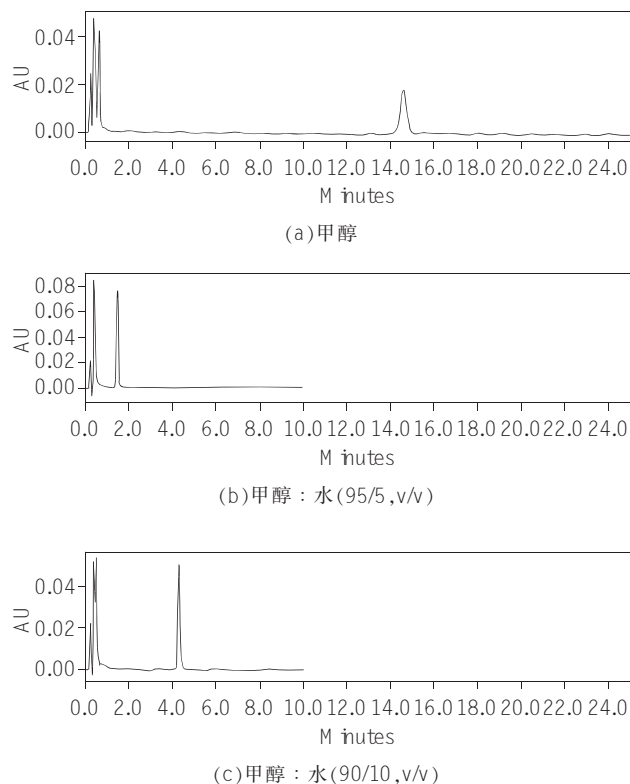


图2 角鲨烯在甲醇:水不同比例的流动相条件下的色谱图

Fig.2 The chromatography of squalene destroyed by high-temperature

相流速为 0.5mL/min 的相同条件下,改变甲醇/水的比例,分别为 100/0、95/5 和 90/10,谱图见图 2。试验结果表明,样品在不同比例的流动相条件下都能与杂质峰分开,但是随着水比例的增加,样品的保留时间增加,当水增加到 10%时,样品主峰的保留时间为 14.3min。综合考虑样品的保留时间和分离效果,选择甲醇/水(v/v, 95/5)作为流动相。

2.1.3 柱温的选择

在甲醇/水(v/v, 95/5)作为流动相和流速为 0.5mL/min 的相同条件下,改变柱温(30℃、35℃和 40℃),考察柱温对分离效果的影响。试验结果表明,虽然样品的保留时间随着柱温的提高而缩短,但变化不是特别明显,且在三种柱温条件下,样品主峰跟其它杂质峰均分离良好。所以综合考虑样品的保留时间和柱子的使用寿命,柱温选择 35℃。

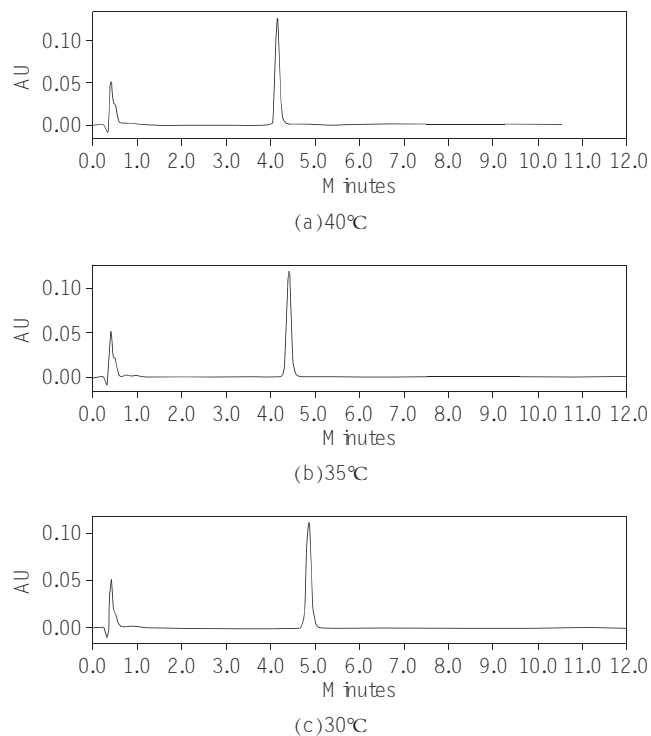


图3 角鲨烯在不同柱温条件下的色谱图

Fig.3 The chromatography of squalene under the different temperature

2.2 检出限与定量下限

将对照品溶液逐级稀释后,以信噪比 S/N=3 时的质量浓度为检出限,S/N=10 时的质量浓度为定量下限。计算得出检出限为 0.1ng,定量限为 0.25ng。

2.3 线性关系

取角鲨烯对照品适量,精密称定 10mg,用乙腈溶解,置于 10mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀配成

角鲨烯储备液 1000 μ g/mL。精密量取不同体积的储备液,配制浓度为 0.2 μ g/mL,0.5 μ g/mL,1 μ g/mL,2 μ g/mL,4 μ g/mL,8 μ g/mL,10 μ g/mL 的标准工作溶液,精密量取 10 μ L 注入液相色谱仪,以峰面积(Y)对溶液的质量浓度(X)进行线性回归。结果表明,角鲨烯浓度在 0.20–10 μ g/mL 范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=38848X-1273.5$ ($r=0.9998$)。

表 1 角鲨烯线性关系测定结果

Tab.1 The result of linear relation between concentration of squalene and peak area

| 浓度/ μ g/mL | 峰面积 |
|----------------|--------|
| 0.2 | 8640 |
| 0.5 | 18806 |
| 1 | 37326 |
| 2 | 75293 |
| 4 | 152356 |
| 8 | 306826 |
| 10 | 390240 |

2.4 精密度与重现性

取 2.3 项配置的浓度为 4.0 μ g/mL 的溶液连续进样 6 次,峰面积的 RSD(n=6)为 0.36%(见表 2),表明仪器精密度良好。

表 2 精密度结果

Tab.2 The result of precision

| 次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 峰面积 | 154037 | 153857 | 153039 | 153189 | 152674 | 153843 |
| RSD/% | 0.36 | | | | | |

2.5 加标回收率

精密称取不同量的角鲨烯,按照“储备液的制备”方法制备供试品溶液,在相当于供试品溶液 80%、100%、120%的浓度下,分别(下转第 86 页)

表 3 加标回收试验

Tab.3 Result of recovery test

| 加入量 / μ g/mL | 测得值 / μ g/mL | 回收率 /% | 回收率平均值 /% | RSD |
|---------------------|---------------------|-----------|--------------|------|
| 4.4 | 4.4 | 100.00 | | |
| 4.2 | 4.3 | 102.38 | | |
| 4.0 | 4.0 | 100.00 | | |
| 5.0 | 5.0 | 100.00 | | |
| 5.2 | 5.2 | 100.00 | 100.82 | 0.99 |
| 4.8 | 4.8 | 100.00 | | |
| 6.0 | 6.1 | 101.67 | | |
| 6.4 | 6.5 | 101.56 | | |
| 5.6 | 5.7 | 101.79 | | |

- [7] 刘玲,韩本勇,陈朝银.核桃蛋白研究进展[J].食品与发酵工业,2009(9):116-118.
- [8] 冯春艳,荣瑞芬,刘雪峥.核桃仁及内种皮营养与功能成分分析研究进展[J].食品工业科技,2011(2):20-25.
- [9] 张庆祝,丁晓雯,陈宗道,等.核桃蛋白质研究进展[J].粮食与油脂,2003(5):21-23.
- [10] 孙树杰,王兆华,宋康,等.核桃营养价值及功能活性研究进展[J].中国食物与营养,2013(5):72-74.
- [11] 顾成鹏,徐霞,潘科,等.核桃仁的功能特性及其药理研究进展[J].农产品加工,2009(9):53-57.
- [12] 黄黎慧,黄群,孙术国,等.核桃的营养保健功能与开发利用[J].粮食科技与经济,2009(4):48-50.
- [13] Zhao G, Etherton T D, Martin K R, et al. Dietary α -linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women [J]. The Journal of Nutrition,2004,134(11): 2991-2997.
- [14] Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, et al. Original Communications -Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts [J]. European Journal of Clinical Nutrition,2002,56 (7): 629-637.
- [15] Tapsell L C, Batterham M, Gillen L, et al. Increasing PUFA intake with walnuts in a low fat diet supports long term weight loss in diabetes [J]. FASEB J,2008 (22):708-713.
- [16] 王丁丁,赵见军,张润光,等.核桃油研究进展[J].食品工业科技,2013(16):383-387.
- [17] 刘金福,王浩田,刘坤明.核桃乳饮料生产工艺研究[J].天津农学院学报,2000,7(1):8-11.
- [18] 于爱霞,华欲飞,芦叶青.工艺条件对高蛋白核桃粉复溶性质的影响[J].中国油脂,2013,38(3):19-23.
- [19] 徐效圣,申玉飞,张新明,等.调味核桃仁加工工艺及其配方研究[J].农产品加工,2013(3):44-45.

(上接第76页) 考察加标回收率。每个浓度制备3份,以供试品溶液峰面积平均值和对照品溶液峰面积平均值的比值作为回收率。得到方法的平均回收率为100.82%,RSD为0.99%,表明方法的回收率良好。

3 结论

本实验建立了角鲨烯的超高效液相方法,使用UPLC BEH C18(2.1mm×50mm,1.7 μ m)对角鲨烯含量进行直接检测,角鲨烯峰与其他杂质峰得到很好分离,且经方法学考察表明,线性关系、精密度、稳定性、重现性、回收率等均符合分析要求,方法准确。而且该方法的流速不仅比文献^[15]报道的方法低,且样品的保留时间缩短,节约溶剂和时间,尤其适合高通量样品的检测。

参考文献

- [1] 宋菲,雷茜茜,陈卫军,等.角鲨烯脂质体的制备及其性质研究[J].食品科技,2014,39(3):41-44.
- [2] 王军,翁幼竹,苏永全,等.福建近海姥鲨肝油中角鲨烯的分离测定[J].厦门大学学报(自然科学版),2002,41(4):506-508.
- [3] 周茂君,向仕学,殷德桂,等.保健食品中角鲨烯的气相色谱分析[J].预防医学情报杂志,2003,19(2):186-187.
- [4] 王启辉,刘洋,张经华,等.气相色谱法同时测定人血清中角鲨烯和5种非胆固醇类固醇的报告[J].现代生物医学进展,2009,9(4):721-725.
- [5] 钟冬莲,汤富彬,沈丹玉,等.油茶籽油中角鲨烯含量的气相色谱法测定[J].分析试验室,2011,11(30):104-106.
- [6] 谢勇,苏素娇,梁一池.气相色谱法测定茶籽油中角鲨烯含量的研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2012,33(1):42-44.
- [7] 宗万里,曲淑霞,鲁刚.毛细管气相色谱法测定角鲨烯软胶囊中角鲨烯含量[J].生命科学仪器,2012,10(6):7-9.
- [8] 邹海民,曹铸,曾红燕.功能食品中角鲨烯的气相和液相色谱方法比较[J].现代预防医学,2014,41(2):293-299.
- [9] 赵明桥,李攻科,栾天罡,等.固相微萃取-气相色谱-质谱联用法测定海水中角鲨烯及其与赤潮的关系[J].分析化学,2000,28(11):1326-1330.
- [10] 耿树香,宁德鲁,张艳丽,等.不同品种及成熟度橄榄油中角鲨烯的检测分析[J].广东农业科学,2013(3):79-81.
- [11] 梁新华,郑彩霞,张风侠,等.甘草角鲨烯的提取及高效液相色谱分析[J].北京林业大学学报,2010,32(3):123-126.
- [12] 龚丽,常伟,黄湛,等.橄榄油中角鲨烯的提取与检测[J].食品与发酵科技,2013,49(5):72-74.
- [13] 张欣,于瑞祥,杨瑞钰,等.植物油中角鲨烯的提取与高效液相色谱法分析[J].中国粮油学报,2013,28(5):96-99.
- [14] Lu H A, Jiang Y, Chen F. Preparative separation and purification of squalene from the microalga *Thraustochytrium* ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A,2003(994):37-43.
- [15] 荣维广,刘华良,李莉,等.超高效液相色谱法测定保健食品中角鲨烯[J].预防医学情报杂志,2013,29(8):734-736.