

文章编号: 1000-5471(2012)03-0044-05

浊点萃取-高效液相色谱法测定油脂中的胆固醇^①

张丽贤, 周光明, 姜兰芳, 许 丽

发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715; 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 建立了一种简单快速的采用浊点萃取-高效液相色谱法测定油脂中的胆固醇的方法. 以非离子表面活性剂 Triton X-114 为萃取剂, 色谱柱为 phenomenex C₁₈, 流动相为甲醇-乙醇等度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 206 nm. 采用 Triton X-114 进行浊点萃取, 分别优化了影响萃取效率的表面活性剂的浓度、盐浓度、平衡温度及时间等条件. 胆固醇的质量浓度在 0.10~150 μg/mL 范围内与其峰面积成良好的线性关系($r=0.999\ 79$), 该方法的定性检测限为 0.03 μg/mL ($S/N=3$), 回收率为 86.00%~93.50%, 可以满足油脂中胆固醇含量的分离测定.

关键词: 浊点萃取; 胆固醇; 高效液相色谱法; Triton X-114 表面活性剂

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

胆固醇广泛存在于动物性食物中^[1]. 研究表明, 摄入过量的胆固醇与高胆固醇血症、动脉粥样硬化等疾病有着必然的联系^[2-4]. 因此有必要建立一种快速简单的方法检测食品中的胆固醇含量.

目前, 检测胆固醇的方法主要包括液相色谱法^[3-17]、气相色谱法^[18-20]、胶束液相色谱法^[21]和分光光度法^[22]. 前处理方法主要有固相微萃取分子印迹技术^[1]、超临界二氧化碳方法^[3]、皂化处理^[11,13]、液液萃取^[15]和分散液液微萃取^[17]等, 这些萃取方法中主要存在的问题是程序复杂, 仪器昂贵, 污染环境. 目前存在的问题是如何选择一种更加简单环保的方法从被测样品中提取胆固醇, 浊点萃取作为前处理提取富集方法, 是近 10 年发展起来的一种特殊的液液萃取分离技术. 该方法只需要一定浓度的表面活性剂溶液, 利用表面活性剂胶束水溶液的增溶性浊点现象, 通过改变实验参数引发相分离, 使表面活性剂结合的疏水性物质和亲水性物质达到理想的分离效果, 从而提高回收率. 该方法具有试剂用量少、环境友好、萃取率高、操作简便等优点, 已被广泛应用于环境样品和医药样品等样品的前处理中^[23-27].

本文采用浊点萃取前处理方法从油脂中提取胆固醇, 免去了皂化繁琐的步骤, 并且该方法既环保成本又低, 操作简单, 与液相色谱联用检测油脂中的胆固醇, 为油脂样品的前处理和胆固醇的检测提供了一种新方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AT 液相色谱输液泵、SPD-20A 紫外检测器、CTO-10AS 柱温箱、LC-Slution 色谱数据处理系统(日本 Shimadzu 公司), 色谱柱为 Phenomenex C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 0.45 μm 针头微孔滤膜过滤器, KH-3200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂), SZ-2 自动双重纯化水蒸馏器(上海泸西分析仪器), FA2004A 型分析天平.

① 收稿日期: 2011-04-01

基金项目: 国家科技重大专项; 重庆市自然科学基金(CSTC, 2007BB5370).

作者简介: 张丽贤(1984-), 女, 山西寿阳人, 硕士研究生, 主要从事色谱分析的研究.

通信作者: 周光明, 教授, 博士生导师.

胆固醇对照品购自中国计量科学研究院,甲醇、乙醇(分析纯,成都市科龙化工试剂),氯化钠(分析纯,重庆北碚化学试剂厂),二次蒸馏水(实验室自制),Triton X-114(Merck),食用油随机购自重庆市场。

1.2 试验方法

1.2.1 对照品溶液的配制

精密称取胆固醇对照品加甲醇配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液,精密吸取适量胆固醇储备液,用 0.03 g/mL Triton X-114 水溶液稀释配制成一系列质量浓度不同的对照品溶液。

1.2.2 油脂样品溶液的处理

准确称量 0.2 g 食用油样品,置于 25 mL 烧杯中,加入 10 mL 0.03 g/mL Triton X-114 水溶液,超声 5 min 使其充分溶解,3000 r/min 离心 5 min,取上清液于 10 mL 离心管中,依次加入 0.03 g/mL 的 Triton X-114 表面活性剂溶液和质量浓度为 0.06 g/mL 的 NaCl 溶液,混匀后放入 40 °C 恒温水浴中平衡 45 min,使两相分离,弃去上层水相,将下层表面活性剂富集相用甲醇定容至 1.0 mL,以降低表面活性剂的黏度。用 0.45 μm 滤膜过滤,取 20 μL 溶液进样分析。

1.2.3 色谱分析条件

Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 V(乙醇):V(甲醇)=65:35,等度洗脱,体积流量:0.8 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:206 nm;柱温:30 °C。

2 结果与分析

2.1 分析方法的确认

2.1.1 方法专属性考察

取抽滤好的纯甲醇进样 20 μL,记录色谱图 1(a);对照品溶液色谱图 1(b);取空白 0.03 g/mL Triton X-114 表面活性剂 10 mL,按 1.2.2 项下的方法操作,进样 20 μL,记录色谱图 1(c);按照 1.2.2 项下的方法处理食用油样品,进样,记录色谱图 1(d)。胆固醇的保留时间 7.76 min,从图 1(a), (c)中可以看出,表面活性剂水溶液和甲醇在 206 nm 处有吸收,但是对胆固醇的分离和测定无干扰,可以用来提取待测样品中的胆固醇。

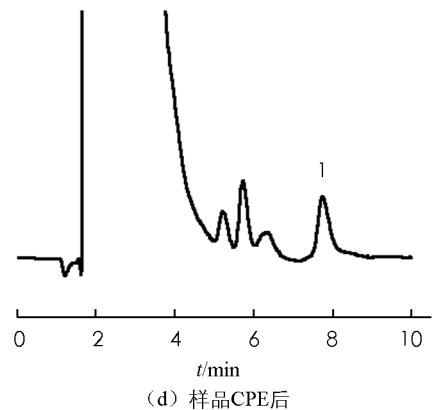
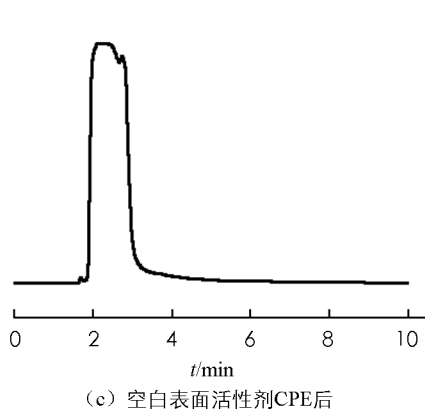
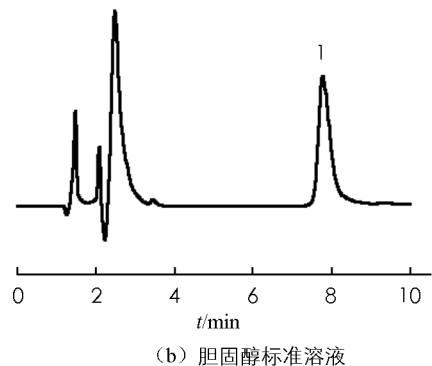
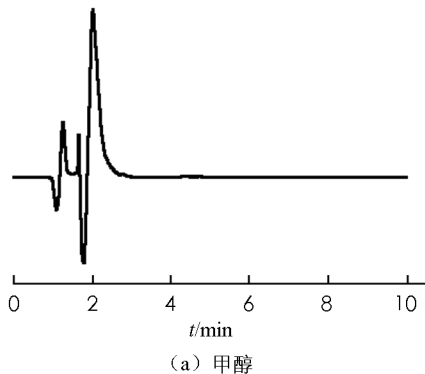


图 1 色谱图

2.1.2 线性关系

将一系列浓度不同的对照品溶液按 1.2.3 项下色谱条件注入液相色谱仪,测定峰面积.以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,进行线性回归.回归方程为 $Y=8\ 772.72+9\ 539.29x$ ($r=0.999\ 79$, $n=8$),在 $0.10\sim 150\ \mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好.当 $S/N=3$ 时,胆固醇的定性检测限为 $0.03\ \mu\text{g/mL}$.

2.1.3 精密度和重现性

精密吸取对照品溶液 $20\ \mu\text{L}$,连续进样 5 次,测定其峰面积,相对标准偏差(RSD)为 1.17% ,表明仪器的精密度高.精密称取同一批油样品 5 份,按 1.2.2 和 1.2.3 项下方法制备样品溶液并进行 HPLC 测定,胆固醇峰面积的 RSD($n=5$)为 2.30% ,结果表明该方法重现性良好.

2.1.4 实际样品的测定和加标回收率实验

取被测样品食用油,按照 1.2.2 和 1.2.3 项下的方法制备样品溶液,进样 $20\ \mu\text{L}$ 分析,根据回归方程计算胆固醇的含量.精密称取已知含量的同一油样 $0.2\ \text{g}$,称定 9 份分成 3 组,每组准确加入不同含量的对照品溶液,按 1.2.2 和 1.2.3 项下方法制备样品溶液,进样测定,胆固醇的加标回收率测定结果见表 1.

表 1 油样中胆固醇测定结果及加标回收率

样品中测得量/ μg	加入量/ μg	加标后测得量/ μg	RSD/ $\%$ ($n=3$)	加标回收率/ $\%$
3.37	4.00	6.81	1.3	86.00
3.37	8.00	10.85	2.0	93.50
3.37	12.00	14.51	2.1	92.83

3 讨 论

3.1 不同提取溶剂的比较

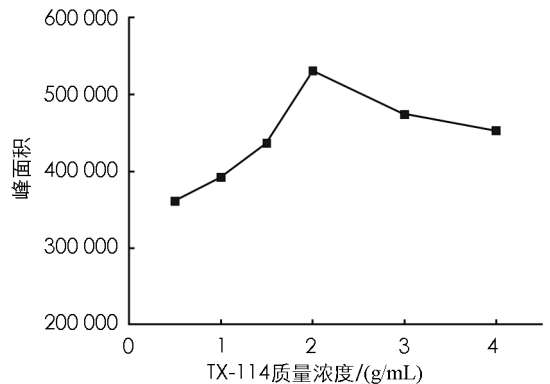
为了考察 Triton X-114 表面活性剂的提取效果,在提取温度为 $25\ ^\circ\text{C}$ 和超声时间为 $10\ \text{min}$ 的条件下,分别研究了甲醇、 90% 甲醇、乙醇、 90% 乙醇与 $0.03\ \text{g/mL}$ Triton X-114 非离子表面活性剂对 $0.2\ \text{g}$ 油脂中胆固醇提取效果的影响.实验结果表明:甲醇和乙醇很难完全溶解油样,而 $0.03\ \text{g/mL}$ Triton X-114 能较好地溶解油样并有效提取出胆固醇.

3.2 表面活性剂浓度的选择

为了确定油样中胆固醇的提取和富集的表面活性剂用量,实验中考察了质量浓度为 $0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.030, 0.040\ \text{g/mL}$ 的 Triton X-114 表面活性剂对油样中胆固醇的提取效果.由图 2 可知,当表面活性剂的质量浓度为 $0.02\ \text{g/mL}$ 时,胆固醇的提取量达到最大,因此表面活性剂的质量浓度选择 $0.02\ \text{g/mL}$.

3.3 NaCl 浓度的选择

在浊点萃取时,在非离子表面活性剂溶液中加入盐析型电解质,可以降低浊点温度,减小凝聚相体积并增大水相密度,降低极性物质在水中的溶解性,使相分离速度加快富集效率提高.由于 Na_2SO_4 在表面活性剂溶液中的溶解度很小,因此实验比较了 NaCl 和 Na_2CO_3 对萃取液的富集效果,结果中发现电解质对改善胆固醇回收率的顺序为 $\text{NaCl} > \text{Na}_2\text{CO}_3$,因此选择 NaCl 电解质来增强离子强度.考察了不同质量浓度的 NaCl ($0.002, 0.004, 0.006, 0.01, 0.015, 0.03$ 和 $0.05\ \text{g/mL}$) 对胆固醇提取量的影响,图 3 结果表明,当 NaCl 的质量浓度为 $0.01\ \text{g/mL}$ 时,胆固醇的提取量最大.



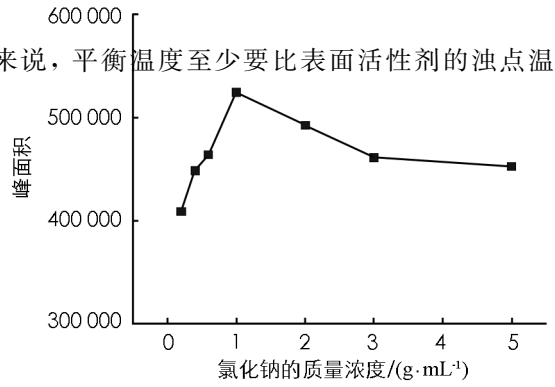
平衡温度: $40\ ^\circ\text{C}$; 平衡时间: $40\ \text{min}$

图 2 表面活性剂 TX-114 的浓度对提取胆固醇峰面积的影响

3.4 平衡温度和时间的影响

适当提高平衡温度可以增加待测物的分配系数,一般来说,平衡温度至少要比表面活性剂的浊点温度高出 $15\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[28]. 本实验考察了平衡温度对胆固醇提取量的影响,测量了平衡温度为 $30, 35, 40, 45, 50, 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时的胆固醇提取量,实验表明当平衡温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时提取量最大. 在浊点萃取中,适当延长平衡时间有利于被提取物质的分配,但是过长的平衡时间也会增加样品处理时间. 由实验结果可以得出,当时间为 40 min 时,提取的胆固醇峰面积最大. 所以实验选择平衡时间为 40 min .

综上所述,本研究采用非离子表面活性剂 Triton X-114 进行提取油样中的胆固醇,简化了油脂前处理步骤,避免使用更多有机试剂,并提高了萃取效率,结合高效液相色谱方法测定胆固醇含量,为油脂中的脂溶性物质预富集和检测提供了一种新方法.



TX-114 的质量浓度为 0.02 g/mL , 平衡温度: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;
平衡时间: 40 min

图3 NaCl 的浓度对胆固醇峰面积的影响

参考文献:

- [1] SHI Yun, ZHANG Jiang-hua, SHI Dan, et al. Selective Solid-Phase Extraction of Cholesterol Using Molecularly Imprinted Polymers and Its Application in Different Biological Samples [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 42: 549-555.
- [2] SPENCE J D, JENKINS D J, DAVIGNON J. Dietary Cholesterol and Egg Yolks: Not for Patients at Risk of Vascular Disease [J]. Can J Cardiol, 2010, 26: 336-339.
- [3] VEDARAMAN N, BRUNNER G, SRINIVASA K C, et al. Extraction of Cholesterol from Cattle Brain Using Supercritical Carbondioxide [J]. Supercritical Fluids, 2004, 32: 231-242.
- [4] DONG J, CHEN W X, WANG S, et al. Jones Oxidation and High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Cholesterol in Biological Samples [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 858: 239-246.
- [5] SINGH R, AJAGBE M, BHAMIDIPATI S, et al. A Rapid Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Cholesterol and 1, 2-Dioleoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine in Liposome-Based Drug Formulations [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1073: 347-353.
- [6] HOJO K, ITO A, HAKAMATA H, et al. Determination of Total Cholesterol in Serum By High-Performance Liquid Chromatograph with Electrochemical Detection [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1166: 135-141.
- [7] LIN Y T, WU S S, WU H L, et al. Highly Sensitive Analysis of Cholesterol and Sitosterol in Foods and Human Biosamples By Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1156: 280-287.
- [8] OSWALD S, SCHEUCH E, CASCORBI I, et al. A LC-MS/MS Method to Quantify the Nove Lcholesterol Lowering Drug Ezetimibe in Human Serum, Urine and Feces in Healthy Subject Genotyped for SLCO1B1 [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 830: 143-150.
- [9] 曹晓钢, 于刚, 叶小利, 等. 中药提取抑制胆固醇的研究 [J]. 中成药, 2009, 31: 616-618.
- [10] 王芳, 赵余庆. 鹿花盘中胆固醇的 HPLC 测定 [J]. 中草药, 2009, 40: 286-287.
- [11] 郭涛, 杜蕾蕾, 万辉, 等. 高效液相色谱法测定胆固醇含量鉴别地沟油 [J]. 食品科学, 2009, 30: 286-289.
- [12] 岳志华, 孙会敏, 田颂九. HPLC-ELSD-UV 法同时测定人体胆结石中胆固醇、胆红素及各种胆酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2004, 24: 310-314.
- [13] 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: 499-501.
- [14] 张蓉真, 李珑, 刘树淘, 等. 测定鸡蛋胆固醇呢的高效液相色谱新方法 [J]. 色谱, 1998, 16: 91-94.
- [15] 陈永伟, 李杰, 邢秀英, 等. 油脂中胆固醇含量的快速测定法 [J]. PART B: CHEM ANAL, 2009, 45: 180-181.
- [16] 张蕊, 祖丽亚, 樊铁, 等. 测定胆固醇含量鉴别地沟油的研究 [J]. 中国油脂, 2006, 31: 65-67.
- [17] DANESHFAR A, KHEZELI T, LOTFI H J. J Determination of Cholesterol in Food Samples Using Dispersive Liquid-

- Liquid Microextraction Followed by HPLC-UV [J]. *Chromatogr. B* 2009, 877: 456.
- [18] HWANG B S, WANG J T, CHOONG Y M. J A Simplified Method for the Quantification of Total Cholesterol In Lipids Using Gas Chromatography [J]. *Food Composition and Analysis*, 2003, 16: 169.
- [19] MOHAMED A H S, BERTUCCI P, FRANZO L. Simultaneous Determination of Plasmatic Phytosterols and Cholesterol Precursors Using Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS) with Selective Ion Monitoring (SIM) [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 842: 43–47.
- [20] BERTA L T, ALBERTO Z G, OSCAR B J. Gas Chromatographic-Mass Pectrometric Determination of Brain Levels of Cholest-8-en-3 β -ol (Lathosterol) [J]. *Journal of Chromatogr. B* 2007, 850: 177–182.
- [21] BERTHOD A, TOMER S. Polyoxyethylene Allkyl Ether Nonionic Surfactants; Physicochemical Properties and use for Cholesterol Determination in Food [J]. *Talanta*, 2001, 55(1): 69–83.
- [22] SRIVASTAVA M, JADEGOUD Y, NAGANA G A, et al. An Accurate Method for Cholesterol Analysis in Bile Anal [J]. *Lett*, 2005, 38: 2135–2141.
- [23] FANG Q, YEUNG H W, LEUNG H W. J Micelle-Mediated Extraction and Preconcentration of Ginsenosides from Chinese Herbal Medicine [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 904: 47–55.
- [24] WANG L, CAI Y Q, HE B. Determination of Estrogens in Water by HPLC-UV Using Cloud Point Extraction [J]. *Talanta*, 2006, 70: 47–51.
- [25] SANTALAD A, SRIJARANAI S. Cloud-Point Extraction and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Carbamate Insecticide Residues in Fruits [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 1307–1317.
- [26] ZHOU J H, CHEN J D, YANG H C, et al. Determination of Prometryne in Water and Soil by HPLC-UV using Cloud-Point Extraction [J]. *Talanta*, 2009, 79: 189–193.
- [27] YAO B J, YANG L, HU Q J. Clouding of Triton X - 114: The Effect of Added Electrolytes on the Cloud Point of Triton X - 114 in the Presence of Ionic Surfactants [J]. *Colloids Surf, A* 1995, 104: 307–312.
- [28] 李 卓, 董文宾, 李 娜, 等. 浊点萃取技术及其在食品检测预处理中的应用 [J]. *食品科技*, 2010, 35: 277–280.

Determination of Cholesterol in Oil and Fat Using Cloud Point Extraction by HPLC-UV

ZHANG Li-xian, ZHOU Guang-ming, JIANG Lan-fang, XU Li

Key Laboratory on Luminescence and Real - Time Analysis (Southwest University), Ministry of Education;

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: A fast, simple and sensitive sample preparation procedure based on cloud point extraction(CPE) is proposed for the determination of cholesterol in oil and fat using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and UV detection. The non-ionic surfactant Triton X-114 was chosen as the extract solvent. The samples were analyzed on a Phenomenex C18 column with ethanol-methanol as the mobile phase using isocratic elution. The flow rate was 0.8 mL \cdot min⁻¹, and UV detection wavelength was set at 206 nm. Optimized conditions for the pretreatment of oil and fat included the concentration of the surfactant Triton X-114, the concentration of sodium chloride, equilibration temperature and equilibration time. A good linear correlation was observed to exist between the concentration of cholesterol in the range of 0.10–150 μ g/mL and its peak area ($r=0.999\ 79$). The limit of detection (LOD) was 0.03 μ g/mL ($S/N=3$), and the average recovery varied from 86.00% to 93.50%. This new method is fast, easy to operate, sensitive and environment-friendly, and can meet the requirements of determination of cholesterol of oil and fat.

Key words: cloud point extraction; cholesterol; high performance liquid chromatography; Triton X-114 surfactant

责任编辑 潘春燕