

气相色谱-质谱法快速测定鱼油中的生育酚

张喜金*, 魏鲜娥, 蔡伟江, 陈彩云, 黎小兰

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)测定鱼油中生育酚含量的分析方法。**方法** 样品经正己烷提取, 以 HP-5MS 毛细管柱分离, GC-MS 选择离子检测模式测定。**结果** α -、 γ -和 δ -生育酚在 0.002~0.04 mg/mL 的浓度范围内呈良好线性关系, 相关系数 $r^2 > 0.999$ 。此方法 α -、 γ -和 δ -生育酚的检出限($S/N=3$)分别为 0.001、0.002、0.001 mg/g, 定量限($S/N=10$)为 0.003、0.006、0.004 mg/g。在不同添加水平下, 方法的平均回收率分别为 98.6%~99.9%, 相对标准偏差小于 1.0%($n=3$)。**结论** 该方法简便、快速、灵敏、准确, 适合鱼油中生育酚的定性和定量测定。

关键词: 生育酚; 气相色谱-质谱法; 鱼油

Rapid determination of tocopherol in fish oil by gas chromatography-mass spectrometry

ZHANG Xi-Jin*, WEI Xian-E, CAI Wei-Jiang, CHEN Cai-Yun, LI Xiao-Lan

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for rapid determination of tocopherol in fish oil by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** The samples were extracted by n-hexane, and separated by HP-5MS capillary column. Then they were detected by GC-MS with selected ion monitoring mode. **Results** The α -, γ -, δ -tocopherol had good linear relationships in the range of 0.002~0.04 mg/mL, and the correlation coefficients (r^2) were over 0.999. The limits of detection ($S/N=3$) were 0.001, 0.002, 0.001 mg/g, and the limits of quantification ($S/N=10$) were 0.003, 0.006, 0.004 mg/g, respectively. The average recoveries at 3 different spiked levels were 98.6%~99.9%, and the relative standard deviations were less than 1.0% ($n=3$). **Conclusion** The established method is simple, rapid, sensitive and accurate, which is suitable for the qualitative and quantitative determination of tocopherol in fish oil.

KEY WORDS: tocopherol; gas chromatography-mass spectrometry; fish oil

1 引言

生育酚是一类脂溶性功能性化合物的总称, 包含多种生育酚和生育三烯酚^[1,2], 该类化合物在鱼油中天然存在。研究表明, 生育酚在抗氧化^[3]、抑制胆固醇合成^[4]及肿瘤细胞生长、改善动脉粥样硬化及预防心血管疾病等方面具有优越的生理功能^[5,6]。生育酚有 4 种异构体^[7](α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚), 其生物效价和抗氧化性有着明显差异, 其

中 α -、 γ -和 δ -3 种生育酚的在鱼油含量较高。因此, 建立分离测定 α -、 γ -和 δ -这 3 种生育酚异构体含量的分析技术尤为重要。

目前, 文献报道针对生育酚的检测方法主要有反相高效液相色谱法^[8-12]、正相高效液相色谱法^[13,14]、液相色谱-串联质谱法等。而前处理技术主要采用甲醇提取皂化等方法, 处理条件繁琐, 产生偏差较大。本研究采用正己烷提取鱼油中的生育酚, 结合具有强抗干扰能力的气相色谱

*通讯作者: 张喜金, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 215865748@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Xi-Jin, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 215865748@qq.com

-质谱技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), 建立一种简单、快速、灵敏、准确测定鱼油中 α -、 γ -、 δ -生育酚的方法。

2 材料与方法

2.1 实验仪器

7890A GC-5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); HP-5MS 色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m, 美国 Agilent 公司); DB-1MS 色谱柱(30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μ m, 美国 Agilent 公司); DB-1701MS 色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m, 美国 Agilent 公司); XP-205 电子天平(德国赛多利斯公司)

2.2 材料与试剂

α -、 γ -和 δ -生育酚标准品(纯度大于 99.0%, 美国 SUPELCO 公司); 正己烷(色谱纯, 德国 CNW 公司); 鱼油(购自挪威)。

2.3 仪器条件

进样口温度: 300 $^{\circ}$ C; 进样量: 1 μ L; 分流比: 20:1(F/I); 色谱柱: HP-5MS(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m); 流速: 1.5 mL/min; 柱温 275 $^{\circ}$ C; 保持 10 min; 载气: 氦气; 接口温度: 280 $^{\circ}$ C; 电离模式: EI; 电离电压: 70 eV; 电子倍增器电压: 自动调谐值增加 200 V。

选择离子: α -生育酚: 165(定量), 205, 430; γ -生育酚: 151(定量), 191, 456; δ -生育酚: 137(定量), 177, 402。

2.4 标准溶液配制

2.4.1 标准储备液的配制

分别精密称取 α -、 γ -、 δ -生育酚对照品 20.97、20.42、18.79 mg, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入正己烷溶解并定容至刻度, 摇匀, 得到 α -、 γ -、 δ -生育酚标准储备液浓度

分别为 0.2097、0.2042、0.1879 mg/mL。

2.4.2 标准工作溶液的配制

分别精密移取各生育酚储备液 100、500、1000、1500、2000 μ L 于 10 mL 容量瓶中, 用正己烷定容至刻度, 摇匀, 即得。其中 α -生育酚的浓度为 0.002097、0.010485、0.02097、0.031455、0.04194 mg/mL; γ -生育酚的浓度为 0.002042、0.01021、0.02042、0.03063、0.04084 mg/mL; δ -生育酚的浓度为 0.001879、0.009395、0.01879、0.028185、0.03758 mg/mL。

2.5 样品溶液的制备

精密称取样品 0.2~0.4 g, 置于 25 mL 容量瓶中, 加正己烷溶解并定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μ m 的有机滤膜过滤, 即得供试液。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件选择

3.1.1 提取条件选择

本研究中检测的样品为天然鱼油, 属于纯油脂类样品, 颗粒容易分散, 便于有机溶剂渗透。且生育酚属于脂溶性维生素, 易溶于脂肪和乙醇等有机溶剂。经过反复试验, 确定用正己烷直接提取样品, 结果提取充分。

3.1.2 色谱柱的选择

生育酚属于环链型结构, 极性较弱, 因此选择极性较弱的色谱柱进行分离。考察了 DB-1701MS、DB-1MS 和 HP-5MS 毛细管柱对目标物的保留和分离情况。实验结果显示, 5 种色谱柱对 3 种目标物均有较好的保留, 分离效果良好。由于 HP-5MS 的应用较为广泛, 也保留时间相对较短, 因此选择 HP-5MS 作为分离的色谱柱。在优化的条件下 α -、 γ -和 δ -生育酚混合标准工作液、样品溶液和空白溶液在 SIM 模式下获得离子图见图 1、图 2、图 3。

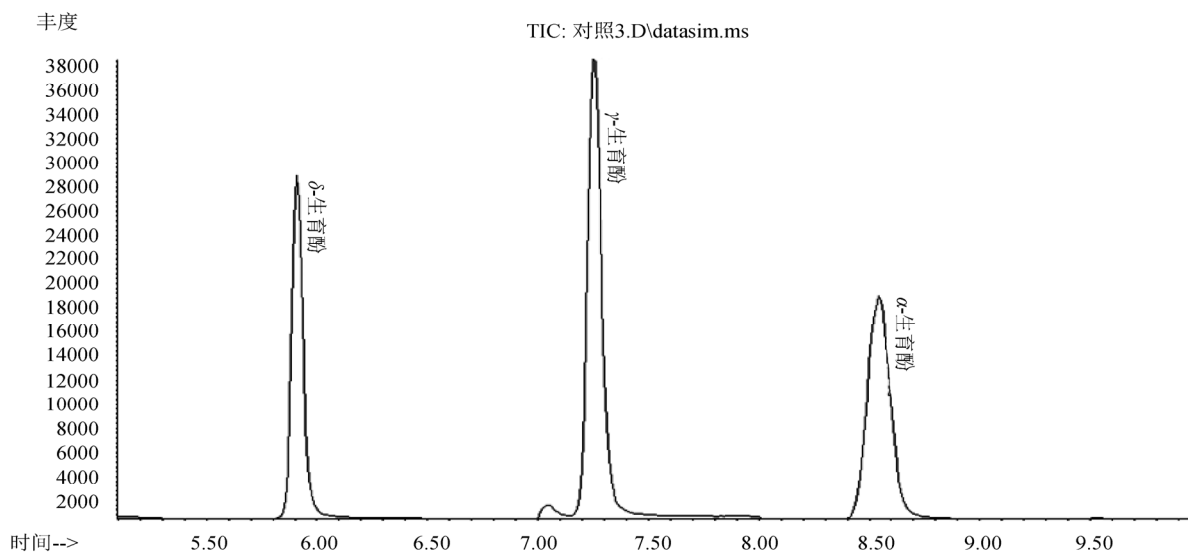


图1 混合标准工作液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard solution

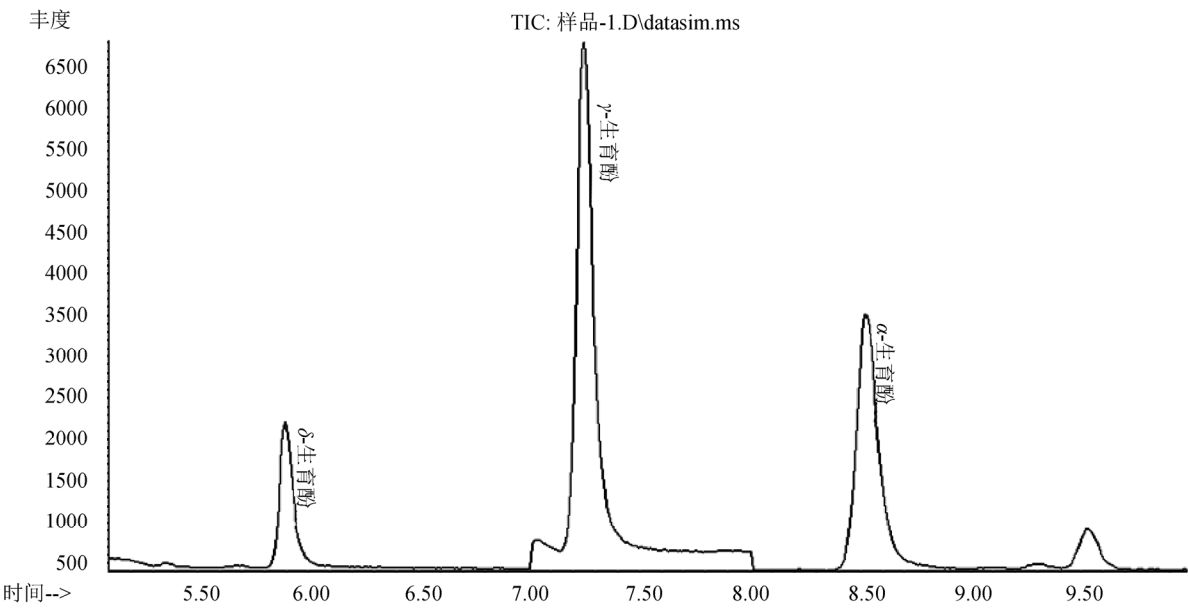


图 2 样品溶液
Fig. 2 Chromatogram of sample solution

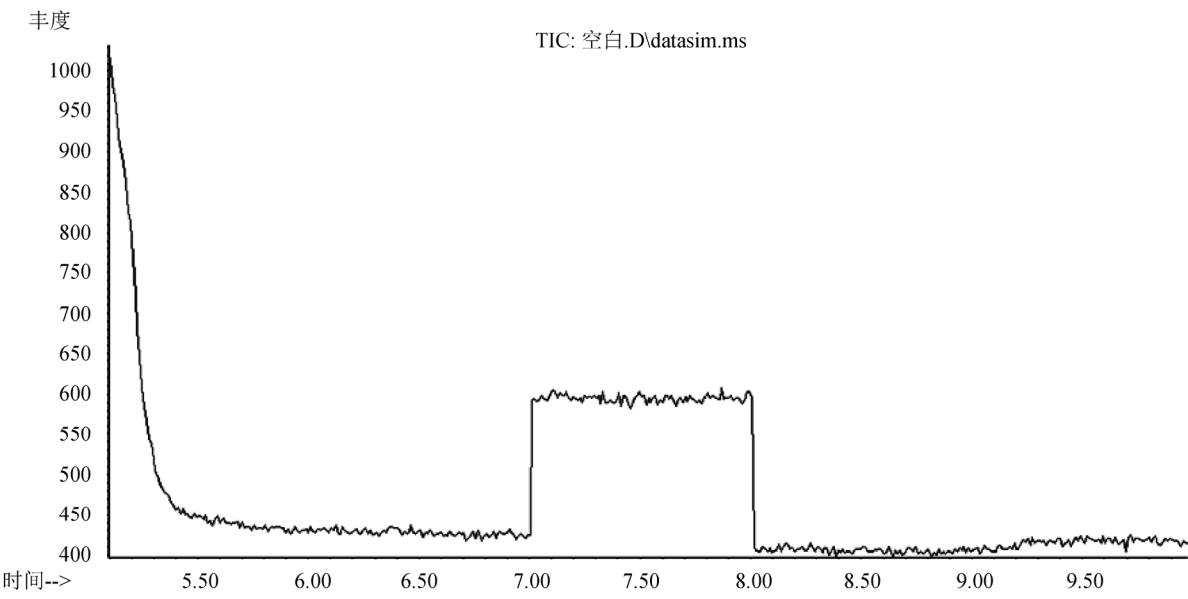


图 3 空白溶液
Fig. 3 Chromatogram of blank solution

表 1 α-、γ-、δ-生育酚的线性范围、线性方程和相关系数
Table 1 Linear ranges, linear equations and correlation coefficients of α-, γ- and δ-tocopherol

组分	线性范围(mg/mL)	线性方程	相关系数(r^2)
α-生育酚	0.002~0.04	$Y=4.311e6 \cdot X-2392$	1.000
γ-生育酚	0.002~0.04	$Y=4.181e6 \cdot X-1164$	0.999
δ-生育酚	0.002~0.04	$Y=2.448e6 \cdot X-1674$	0.999

3.2 方法性能指标

3.2.1 工作曲线和线性范围

在试验条件下, 对标准系列测定 5 次, 结果表明, α -、 γ -、 δ -生育酚在 0.002~0.04 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 相关系数(r^2)大于 0.999, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》^[16]的要求。线性范围、线性方程和相关系数见表 1, 标准曲线见图 4。

3.2.2 精密度试验

取同一批(批号 170201)供试品, 称定 6 份, 按“2.5”项下方法制备, 按“2.3”气相色谱-质谱条件进行测定, 计算鱼油中各生育酚的含量。结果显示鱼油中 α -生育酚的平均含量为 0.365 mg/g, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.7%; γ -生育酚的平均含量为 0.457 mg/g, RSD 为 1.2%; δ -生育酚的平均含量为 0.244 mg/g, RSD 为 0.6%, 表明精密度较好(见表 2)。

3.2.3 重复性试验

取同一样品溶液, 按“2.3”气相色谱-质谱条件连续进

样 5 针进行测定, 计算各生育酚峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果显示 α -生育酚 RSD 为 0.2%, γ -生育酚 RSD 为 0.7%, δ -生育酚 RSD 为 0.5%。表明重复性较好(见表 3)。

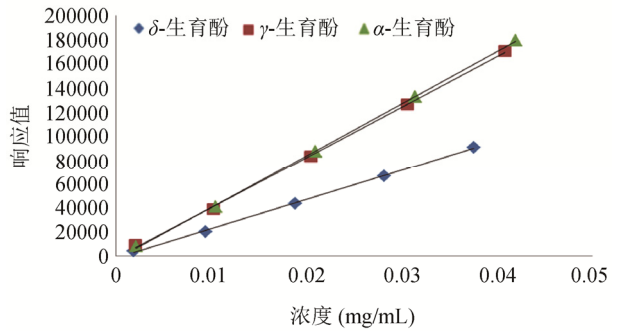


图 4 α -、 γ -、 δ -生育酚的标准曲线
Fig. 4 Standard curves of α -, γ - and δ -tocopherol

表 2 精密度试验结果
Table 2 Precision test results

组分	序号	称样量(g)	稀释体积(mL)	浓度(mg/mL)	含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	RSD (%)
α -生育酚	1	0.25171	25	0.003681	0.3655	0.365	1.7
	2	0.25349	25	0.003722	0.367		
	3	0.27225	25	0.003988	0.3662		
	4	0.28951	25	0.004336	0.3744		
	5	0.24899	25	0.003569	0.3583		
	6	0.25552	25	0.003671	0.3591		
γ -生育酚	1	0.25171	25	0.004558	0.4527	0.457	1.2
	2	0.25349	25	0.004631	0.4567		
	3	0.27225	25	0.005009	0.4599		
	4	0.28951	25	0.00541	0.4671		
	5	0.24899	25	0.004515	0.4533		
	6	0.25552	25	0.004652	0.4551		
δ -生育酚	1	0.25171	25	0.002452	0.2435	0.244	0.6
	2	0.25349	25	0.002487	0.2452		
	3	0.27225	25	0.002672	0.2453		
	4	0.28951	25	0.002817	0.2432		
	5	0.24899	25	0.002413	0.2422		
	6	0.25552	25	0.002483	0.2429		

表 3 重复性试验结果
Table 3 Repeatability test results

序号	1	2	3	4	5	RSD/%
α -生育酚	12485	12477	12454	12466	12511	0.2
γ -生育酚	18187	18222	18334	18202	18455	0.7
δ -生育酚	4094	4111	4088	4125	4133	0.5

3.2.4 检出限

以 3 倍信噪比计算检出限, α -生育酚检出限为 0.008 $\mu\text{g/mL}$, 得到方法的 α -生育酚检出限为 0.001 mg/g ; γ -生育酚检出限为 0.017 $\mu\text{g/mL}$, 得到方法的 γ -生育酚检出限为 0.002 mg/g ; δ -生育酚检出限为 0.012 $\mu\text{g/mL}$, 得到方法的 δ -生育酚检出限为 0.001 mg/g 。

以 10 倍信噪比计算定量限, α -生育酚定量限为 0.027 $\mu\text{g/mL}$, 得到方法的 α -生育酚定量限为 0.003 mg/g ; γ -生育酚定量限为 0.057 $\mu\text{g/mL}$, 得到方法的 γ -生育酚定量限为 0.006 mg/g ; δ -生育酚定量限为 0.039 $\mu\text{g/mL}$, 得到方法的 δ -生育酚定量限为 0.004 mg/g 。

3.2.5 回收率

精密称取样品 9 份(已知 α -生育酚含量: 0.365 mg/g ; γ -生育酚含量: 0.457 mg/g ; δ -生育酚含量: 0.244 mg/g), 置于 25 mL 容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 各组分别精密加入生育酚的标准液(α -生育酚浓度: 0.07451 mg/mL ; γ -生育酚浓度: 0.08188 mg/mL ; δ -生育酚浓度: 0.08655 mg/mL)4.0、5.0、6.0 mL。按“2.5”项下方法制备, 按“2.3”气相色谱-质谱条件进行测定。

实验测得本法 α 、 γ 和 δ -生育酚平均回收率分别为: 98.6%、99.3%、99.9%, RSD 分别为 1.0%、0.8%、0.9%, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》^[15]的要求, 其结果见表 4。

表 4 回收率结果
Table 4 Results of recovery

组分	加标(mL)	序号	测得加标量(g)	加标量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
α -生育酚	4	1	0.297744	0.298	99.91	98.6	1.0
		2	0.290969	0.298	97.64		
		3	0.292458	0.298	98.14		
		4	0.365119	0.3726	97.99		
	5	5	0.362851	0.3726	97.38		
		6	0.36601	0.3726	98.23		
		7	0.442466	0.4471	98.96		
		8	0.442169	0.4471	98.89		
		9	0.447309	0.4471	100.04		
γ -生育酚	4	1	0.324521	0.3275	99.09	99.3	0.8
		2	0.322653	0.3275	98.51		
		3	0.327286	0.3275	99.93		
		4	0.407731	0.4094	99.59		
	5	5	0.41263	0.4094	100.78		
		6	0.403603	0.4094	98.58		
		7	0.486643	0.4913	99.05		
		8	0.488802	0.4913	99.49		
		9	0.485254	0.4913	98.76		
δ -生育酚	4	1	0.342569	0.3462	98.95	99.9	0.9
		2	0.347636	0.3462	100.41		
		3	0.342425	0.3462	98.9		
		4	0.432925	0.4328	100.02		
	5	5	0.435673	0.4328	100.66		
		6	0.438462	0.4328	101.3		
		7	0.514837	0.5193	99.14		
		8	0.520401	0.5193	100.21		
		9	0.513747	0.5193	98.93		

3.2.6 稳定性试验

在室温下,分别测定样品溶液在不同放置时间0、2、4、8、12、24 h时各生育酚含量变化,结果表明,生育酚对照品溶液分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h后, α -、 γ -、 δ -生育酚的RSD分别为0.4%、0.4%、0.7%,表明生育酚对照品溶液在室温下24 h内的稳定性良好

4 结 论

本文采用正己烷对鱼油进行提取,采用 HP-5MS(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m)作为色谱柱,结合气相色谱-质谱法分析,通过优化提取方法和色谱条件,建立了快速检测鱼油中 α -、 γ -和 δ -生育酚的分析方法。通过测定其线性范围、检出限、稳定性和回收率实验等,结果 α -、 γ -和 δ -生育酚在0.002~0.04 mg/mL的浓度范围内呈良好线性关系,相关系数 $r^2>0.999$;此方法 α -、 γ -和 δ -生育酚的检出限($S/N=3$)分别为0.001、0.002、0.001 mg/g,定量限($S/N=10$)为0.003、0.006、0.004 mg/g;在不同添加水平下,方法的平均回收率分别为98.6%~99.9%,相对标准偏差小于1.0%($n=3$)。实验结果表明,方法操作简便、快速、灵敏、准确,适合鱼油中生育酚的定性和定量测定。

参考文献

- [1] 樊明涛,吴守一,马海乐. 维生素E测定方法的研究进展[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2002, 23(1): 54-57.
Fan MT, Wu SY, Ma HL. The research progress of the determination method of vitamin E [J]. Jiangsu Univ J (Nat Sci Ed), 2002, 23(1): 54-57.
- [2] Yoshida Y, Niki E, Noguchi N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects [J]. Chem Phys Lipids, 2003, 123(1): 63-75.
- [3] 傅恩厚. 维生素E的生化性能及其在化妆品中的应用[J]. 精细化工信息, 1987, 12: 18-19.
Fu EH. Biochemical properties of vitamin E and its application in cosmetics [J]. Fine Spec Chem, 1987, 12: 18-19.
- [4] Dass, Das LM, Szabo G, *et al.* Cardioprotection with palm oil tocotrienols: Comparison of different isomers [J]. Am J Phys Heart Circul Phys, 2008, 294(2): H970-H978.
- [5] Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: Function and metabolism [J]. J Official Pub Federation Am Soc Ex Biol, 1999, 13(10): 1145-1155.
- [6] Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols [J]. Life Sci, 2006, 78(18): 2088-2098.
- [7] 凌关庭,唐述潮,陶民强. 食品添加剂手册(3版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
Ling GT, Tang SC, Tao MQ. Handbook of food additives (3th Ed) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [8] 孙亚兰,李帮锐,黎冠,等. 反相高效液相色谱法测定奶粉中维生素A和维生素E异构体[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(3): 612-615.
Sun YL, Li BR, Li G, *et al.* Determination of Vitamin A and the isomers of Vitamin E in milk powder by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(3): 612-615.
- [9] 陈树东,林晓佳,吴钟玲,等. 食品中维生素E异构体的检测技术研究进展[J]. 现代食品科技, 2011, 27(6): 710-712.
Chen SD, Lin XJ, Wu ZL, *et al.* Recent progress of researches on inspection technologies for isomers of vitamin E [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(6): 710-712.
- [10] 赵海燕,赵赓,杨永红,等. 冷皂化-HPLC测定强化食品中的维生素A、E的方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(4): 344-346.
Zhao HY, Zhao R, Yang YH, *et al.* Study on the method of determination of vitamin A and E in fortified foods by cold saponification-HPLC [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(4): 344-346.
- [11] 杨管娥,张忠鹏,张素花,等. HPLC法测定沙棘油乳剂精华素中维生素E的含量[J]. 日用化学工业, 2001, 6: 50-51.
Yang GE, Zhang ZP, Zhang SH, *et al.* HPLC method was used to determine the content of vitamin E in the serum emulsifier [J]. China Surfact Det Cosmet, 2001, 6: 50-51.
- [12] 于瑞祥,张欣,张秀芹,等. 反相高效液相色谱法同时测定植物油中四种生育酚[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 764-767.
Yu RX, Zhang X, Zhang XQ, *et al.* Simultaneous determination of four tocopherols in vegetable oils by reverse phase high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(6): 764-767.
- [13] 张征,徐春祥,刘佳娣,等. 正相超高压液相色谱法测定植物油中的维生素E[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(10): 109-111.
Zhang Z, Xu CX, Liu JD, *et al.* Determination of vitamin E in vegetable oil by HPLC [J]. J Chin. Cereals Oils Ass, 2012, 27(10): 109-111.
- [14] 乔海鸥,王辛,王敏娟. 正相高效液相色谱-荧光检测法同时测定植物油中的四种维生素E异构体[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1271-1274.
Qiao HO, Wang X, Wang MJ. Simultaneous determination of four vitamin E isomers in vegetable oil by normal-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(6): 1271-1274.
- [15] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范[S].
GB/T 27404-2008 laboratory quality control specification [S].

(责任编辑:姜 珊)

作者简介



张喜金,主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 215865748@qq.com