

高效液相色谱法测定保健食品原料和产品中 角鲨烯的含量

罗娇依, 李 刚, 孙姗姗, 梁瑞强, 董亚蕾, 曹 进*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法测定保健食品和保健食品原料中角鲨烯的含量。**方法** 样品经乙腈提取, 经过 Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱分离以甲醇为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 在紫外检测器 210 nm 波长下测定角鲨烯的含量。**结果** 当角鲨烯浓度在 0.5~300 µg/mL 范围内线性良好($r=0.9999$), 方法检出限为 0.719 mg/kg, 方法定量限为 2.398 mg/kg, 相对标准偏差为 3%, 在复杂基质中方法平均回收率为 92.4%, 在单一基质中方法平均回收率为 114.9%。使用市售样品和原料对该方法进行验证, 检测值在商品标识值的 97%~106% 范围内。**结论** 此方法操作便捷, 适用性广, 验证结果良好, 适合对保健食品和保健食品原料中角鲨烯的含量检测。

关键词: 角鲨烯; 高效液相色谱法; 保健食品; 原料

Determination of squalene in health food and health food raw materials by high performance liquid chromatography

LUO Jiao-Yi, LI Gang, SUN Shan-Shan, LIANG Rui-Qiang, DONG Ya-Lei, CAO Jin*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of squalene in health food and health food raw materials by high performance liquid chromatography. **Methods** After extracting with acetonitrile, the samples were separated by Waters Xbridge C₁₈ column using methanol as the mobile phase at the flow of 1.0 mL/min. The temperature of column was 40 °C, and the squalene content was determined by ultraviolet detector at wavelength of 210 nm. **Results** When the squalene concentration varied from 0.5 to 300 µg/mL, the linearity was good ($r=0.9999$), the limit of detection of the method was 0.719 mg/kg, the limit of quantitation of the method was 2.398 mg/kg, and the relative standard deviation was 3%. The average recoveries were 92.4% in the complex matrix and 114.9% in the single matrix. The method was verified by commercial samples and raw materials, and the detected values were within the range of 97% to 106% of the commodity identification value. **Conclusion** This method is convenient to operate, has wide applicability and good verification results, which is suitable for the determination of squalene content in health food and health food raw materials.

KEY WORDS: squalene; high performance liquid chromatography; health food; raw material

*通讯作者: 曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品分析。E-mail: caojin@tsinghua.org.cn

*Corresponding author: CAO Jin, Ph.D, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@tsinghua.org.cn

1 引言

角鲨烯(squalene),又名三十碳六烯、鱼肝油萜,是一种天然存在的三萜烯类,是高度不饱和脂肪族烃类化合物,分子式 $C_{30}H_{50}$, 分子量为 410.7。虽然在理论上角鲨烯应有 16 个顺反异构体,但来自于深海鲨鱼肝油的天然角鲨烯仅含 1 种异构体,即为全反式结构^[1,2]。

自 1961 年,日本科学家在鲨鱼肝中发现角鲨烯以来,研究者们对角鲨烯展开了大量的研究,并且发现在部分植物、谷物、动物组织、甚至人体内都可提炼出角鲨烯,但深海鲨鱼中角鲨烯含量远远高于其他提取物^[3,4]。目前,市场上所见角鲨烯保健品几乎都使用鲨鱼肝油中提炼的角鲨烯为原料。在保健食品中,角鲨烯的主要功效成分为“提高缺氧耐受力”。而在其他实验中,亦证明了角鲨烯的其他保健功效,如“防癌及抗癌作用”,“调控动物体中胆固醇的代谢,促进心血管健康”和“抗氧化作用,促进皮肤健康”等^[5-8]。

尽管角鲨烯因此广泛的功效而受到消费者的关注,我国却没有建立对保健品中角鲨烯的检测的有效标准方法。目前的标准中,仅在国家药品标准和粮油行业标准中收录角鲨烯^[9,10]。但前者引用的检测方法为《中国药典(2000 年版)》^[11],此方法为气相色谱法,分析条件陈旧且现已失效;而后者为针对植物油基质样品进行检测,与鲨鱼肝中提取的角鲨烯基质不符,且处理方法复杂。此外无论是食品安全国家标准,还是《中国药典》,均未收录角鲨烯。因此,为了加强对保健品行业的监测和管理,本研究建立高效液相色谱法测定保健食品和保健食品原料中角鲨烯的含量^[12-15],操作简单,结果准确,为相关检测机构的检测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2695 高效液相色谱仪(带紫外检测器)、XBridge C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m, 美国沃特世科技有限公司);

AL 204、XP 205 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); VORTEX-5 涡旋混合仪(Kylin-bell 仪器制造有限公司)。

角鲨烯标准品(纯度为 99.3%, 德国 Dr.E 公司); 甲醇(质谱纯, 德国默克制药有限公司); 乙腈(质谱纯, 美国飞世尔实验器材有限公司); 保健食品原料和产品各 10 批次, 产品部分为企业提供, 其他为网络采购; 原料均为企业提供。

2.2 标准溶液配制

精密称取 10 mg 角鲨烯标准品于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 摇匀配置成 1000 μ g/mL 的角鲨烯储备液。并将角鲨烯储备液逐级稀释成浓度分别为 0.5、5、10、50、100、200、300 μ g/mL 的标准工作液。

2.3 样品前处理

将角鲨烯软胶囊内容物取出混匀后, 精密称取约 0.5 g 混匀物于 50 mL 具塞容量瓶中; 将角鲨烯保健品原料摇匀后, 精密称取约 0.5 g 混匀物于 50 mL 具塞容量瓶中。用乙腈溶液定容至刻度, 充分震荡提取后, 取部分混匀试液用乙腈稀释 50 倍, 摇匀, 过 0.45 μ m 滤膜, 取得滤液, 即可上机。

2.4 仪器条件

色谱柱为 WATERS XBridge C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 进样体积为 20 μ L; 等度洗脱。

3 结果与分析

3.1 分析条件的选择

本文根据相关参考文献, 将其中各实验所得的仪器条件结论汇总, 并且进行对比实验, 以此筛选出最为合适的分析方法。其中流动相体系使用最广的分别为 100%乙腈^[12]、100%甲醇^[13]和甲醇: 乙腈(60:40, V:V)^[14]。实验表明, 使用 100%甲醇的流动相体系时, 角鲨烯标准品出峰的保留时间最短(如图 1)。其次, 角鲨烯的最大吸收波长为 203 nm

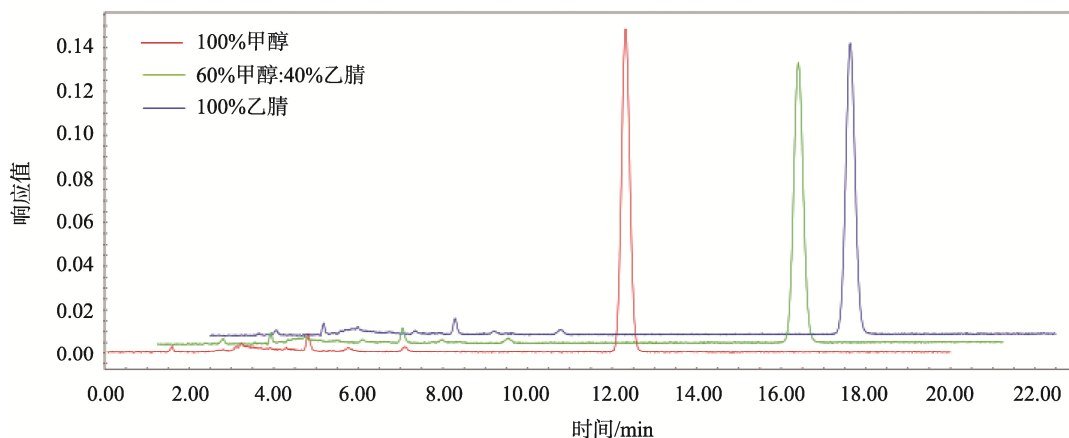


图1 3种流动相对保留时间的对比

Fig. 1 Comparison of retention time of 3 mobile phases

(如图2),但考虑到该波长下流动相末端吸收较大,基线噪音高,经对比后改210 nm为此方法的检测波长(如图3)。最后,对5种常用柱温进行平行对比,分别为室温,30,35,40,45℃。经实验,角鲨烯标准品的保留时间随着温度提高而缩短(如图4),但考虑到高温易影响柱子的寿命,故选择40℃。

因此,本方法最后将仪器条件定为:以100%甲醇作为流动相,210 nm为检测波长,且柱温为40℃。

3.2 方法学验证

3.2.1 线性关系

将2.2中角鲨烯标准工作液,按上述色谱条件检测,以标准工作液的浓度为横坐标,以色谱峰的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得角鲨烯线性方程: $Y=24388X+25374$,线性相关系数为0.9999。证明,角鲨烯在0.5~300 μg/mL

范围内线性良好(如表1和图5)。

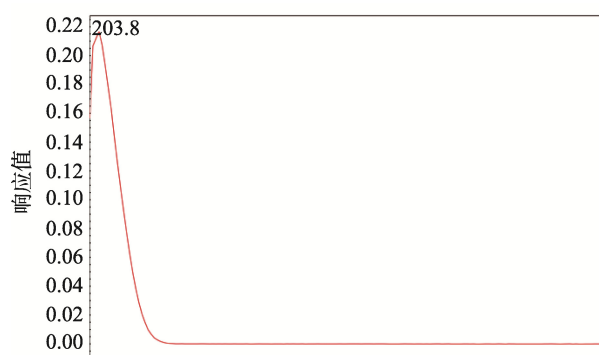


图2 角鲨烯的全波长扫描图

Fig.2 Full wavelength scanning of squalene

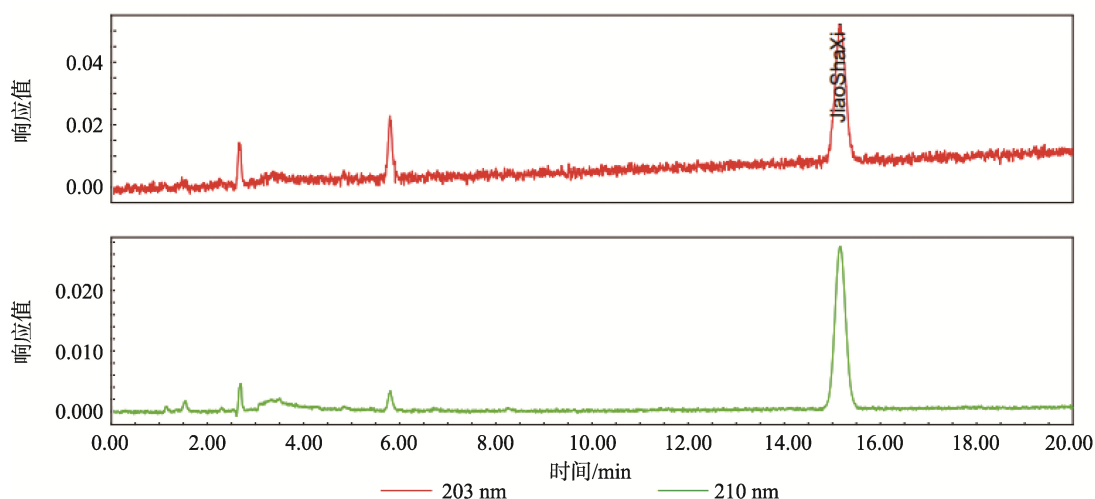


图3 10 μg/mL 角鲨烯标准溶液在203 nm和210 nm的紫外波长下的基线对比

Fig.3 Comparison of baselines of squalene standard (10 μg/mL) under 203 nm and 210 nm of wavelengths

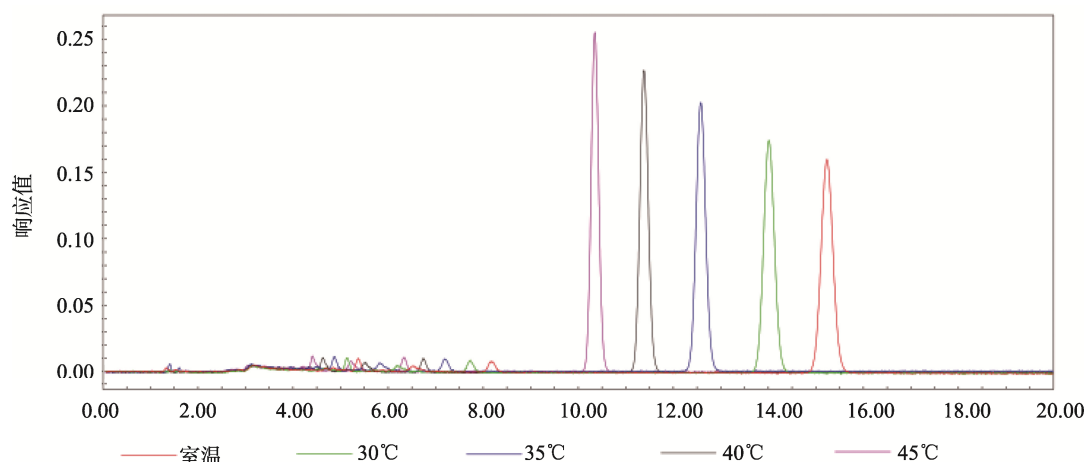


图4 不同温度对保留时间的对比

Fig.4 Comparison of retention time under different temperatures

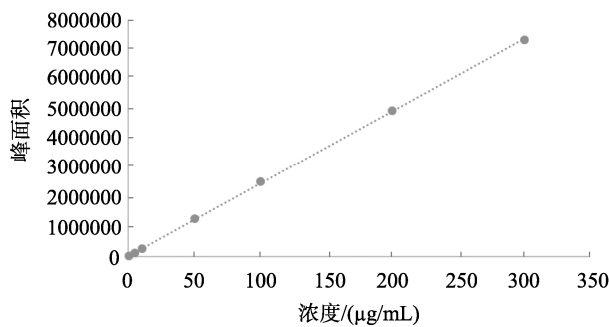


图 5 角鲨烯标准品曲线
Fig.5 Standard curve of squalene

3.2.2 重复性试验

从同一批供试品中精密称取 6 份待测样, 均约为 0.5 g。将这些待测样按照“2.3”下方法制备后, 按“2.4”下仪器条件进行测定。经计算结果, 可得供试品中角鲨烯的平均含量为 56.0%, 精密度为 0.5%, 表明该方法精密度良好。

3.2.3 回收率试验

考虑到大部分角鲨烯产品中角鲨烯含量均在 90 g/100 g 左右, 为更贴近实际样品的回收率检测, 但受到标准品数量的限制, 仅选择了一组中含量(约 50 g/100 g)的阴性基质加标进行回收率测定。

精密称取约 50 mg 角鲨烯标准品于约 0.1g 复杂阴性基质和单一阴性基质中, 按“2.4”中方法提取后进行测定。复杂阴性基质为红景天提取物、水和甘油的混合溶液, 单

一阴性基质为甘油。两种基质分别计算结果, 且做 6 个平行样计算重复性。经检测结果计算得(见表 1), 复杂基质的平均加标回收率为 92.4%(相对标准偏差 relative standard deviation, $RSD \leq 3\%$), 单一基质的平均加标回收率为 114.9%($RSD \leq 3\%$)。

3.2.4 检出限、定量限

精密称取角鲨烯标准溶液于复杂阴性基质和单一阴性基质中, 按“2.3”中方法提取后再取试液稀释 20 倍, 过滤膜上机检测。经检测结果计算, 以信噪比 $S/N=3$ 时为方法检出限, 即 0.719 mg/kg; $S/N=10$ 时为方法定量限, 即 2.398 mg/kg。

3.3 样品测定结果

为此方法做进一步验证, 使用本方法对市售二十批次角鲨烯保健食品和保健食品原料进行测定。市售角鲨烯产品通常为单一基质且角鲨烯含量较高(≥ 85 g/100 g)。为验证角鲨烯含量的高低是否对检测方法有影响, 因此选择了表 3 中 1 号(≥ 2.5 g/100 g)和 4 号(45 g/100 g)样品分别为低含量和中含量的产品代表。而保健食品原料均为高纯角鲨烯提取液(≥ 98 g/100g)。

将以上样品按照“2.3”中方法进行提取后检测。所得结果均按照基质类型(复杂/单一)分别折算回收率以计算结果, 测定结果如表 2 和表 3。由结果可见, 测定含量均在标示值的 97%~106%范围内。即证明了该方法对实际样品检测的可行性。

表 1 回收率结果(%)
Table 1 Results of recovery (%)

	1	2	3	4	5	6	平均回收率	RSD
单一基质	115.1	116.7	116.1	115.7	116.8	109.0	114.9	2.6
复杂基质	93.7	91.4	91.4	90.7	90.8	96.3	92.4	2.4

表 2 市售 10 种角鲨烯保健食品含量测定结果
Table 2 Content results of 10 squalene products

样品序号	样品名称	称样量/g	测定浓度/(μg/mL)	折回收率后含量结果/(g/100 g)	平均含量/(g/100 g)	包装标识含量/(g/100 g)
1	海狗油胶囊	0.5040	7.4	4.0	4.0	≥ 2.5
		0.5010	7.4	4.0		
2	鱼灵软胶囊	0.5010	218.4	94.8	94.4	94.8
		0.4974	214.9	94.0		
3	角鲨烯软胶囊-1	0.4970	203.6	89.1	87.8	85.0
		0.4990	198.2	86.4		
4	角鲨烯红景天软胶囊	0.5015	88.7	47.9	47.4	45
		0.5008	86.8	46.9		
5	鲛鲨烯胶囊	0.5004	214.0	93.0	99.0	100
		0.5013	241.9	105.0		

续表 2

样品序号	样品名称	称样量/g	测定浓度/(μg/mL)	折回收率后含量结果 /(g/100 g)	平均含量 /(g/100 g)	包装标识含量 /(g/100 g)
6	角鲨烯软胶囊-2	0.5040	213.2	92.0	95.0	90
		0.4999	225.0	97.9		
7	角鲨烯软胶囊-3	0.5069	226.4	97.2	96.7	95.2
		0.4975	219.8	96.1		
8	角鲨烯软胶囊-4	0.5017	217.5	94.3	93.5	95.2
		0.5060	215.6	92.7		
9	鲨烯补氧胶丸	0.5026	210.5	91.1	90.9	90.6
		0.4982	207.8	90.8		
10	角鲨烯软胶囊-5	0.4973	230.3	100.8	98.5	98.3

表 3 10 种角鲨烯保健食品原料含量测定结果
Table 3 Content results of 10 squalene raw material

样品序号	称样量/g	测定浓度/(μg/mL)	折回收率后含量结果/(g/100 g)	平均含量/(g/100 g)	包装标识含量/(g/100 g)
1	0.5001	230.2	100.2	98.4	99
	0.4999	222.1	96.7		
2	0.4998	219.1	95.4	97.5	99
	0.4979	228.1	99.7		
3	0.5015	228.9	99.3	98.5	99
	0.4998	224.4	97.7		
4	0.4990	223.1	97.3	97.8	98
	0.4991	225.5	98.3		
5	0.4986	223.2	97.4	99.4	99
	0.4971	231.6	101.4		
6	0.4981	228.8	99.9	98.9	98
	0.4993	224.7	97.9		
7	0.4986	218.1	95.2	96.8	98
	0.4994	226.1	98.5		
8	0.5013	229.4	99.6	96.5	99
	0.5012	215.4	93.5		
9	0.5002	224.4	97.6	98.3	99
	0.4984	226.8	99.0		
10	0.5051	225.6	97.2	97.6	99
	0.5011	225.7	98.0		

4 结 论

本文建立了高效液相色谱法来检测保健食品原料和产品中角鲨烯的含量。经方法学验证结果表明,线性关系和相关系数、重复性、回收率、检出限和定量限等均符合分析要求。且对共二十批次的市售保健产品和原料进行了含量测定,结果均与产品标识含量相似且偏差值不超过6%。因此,此方法不仅操作便捷,并且验证结果良好,适合在检测工作中使用。

参考文献

- [1] Thorbjarnarson T, Drummond JC. Occurrence of an unsaturated hydrocarbon in olive oil [J]. *Analyst*, 1935, (60): 23–29.
- [2] 刘纯友, 马美湖, 靳国锋, 等. 角鲨烯及其生物活性研究进展[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(5): 147–156.
Liu CY, Ma MH, Jin GF, *et al.* Research process on squalene and bioactivities [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2015, 15(5): 147–156.
- [3] 罗章. 西藏牦牛肉品质及加工特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
Luo Z. Meat quality and processing character for tibet Yak [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [4] Dewitt S, Goodman. Squalene in human and rat blood plasma [J]. *J Clin Invest*, 1964, (43): 1480–1485.
- [5] Newmark HL. Squalene, olive oil and cancer risk review and hypothesis [J]. *Cancer Epidemiol*, 1997, (889): 193–203.
- [6] Harivardhan LR, Couvreur P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2009, (61): 1412–1426.
- [7] Cho S, Choi CW, Lee DH, *et al.* High-dose squalene ingestion increases type I procollagen and decreases ultraviolet-induced DNA damage in human skin in vivo but is associated with transient adverse effects [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2009, (34): 500–508.
- [8] 马力, 陈永忠, 钟海雁, 等. 油茶籽油中角鲨烯的高效液相色谱分析[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(8): 353–356.
Ma L, Chen YZ, Zhong HY, *et al.* HPLC analysis method of squalene in camellia seed oil [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2016, 44(8): 353–356.
- [9] WS-10001-(HD-0818)-2002 化学药品地方标准上升国家标准(第九册)角鲨烯[S].
WS-10001-(HD-0818)-2002 Local standards for chemical rise to national

standard (volume 9) squalene [S].

- [10] LS/T 6120-2017 粮油检验 植物油中角鲨烯的测定 气相色谱法 [S].
LS/T 6120-2017 Inspection of grain and oils- Determination of squalene in vegetable oil- Gas chromatograph [S].
- [11] 《中华人民共和国药典(2000年版)》二部 附录V E 气相色谱法[S].
Pharmacopoeia of The People's Republic of China(2000) Volume 2 Appendix V E Gas chromatograph [S].
- [12] Lu HT, Jiang Y, Chen F. Determination of squalene using high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *Chromatographia*, 2004, (59): 367–371.
- [13] 陈伟珠, 晋文慧, 张怡评, 等. 角鲨烯的高效液相色谱检测法[J]. *食品研究与开发*, 2015, (36): 131–133, 181.
Chen WZ, Jin WH, Zhang YP, *et al.* Determination of squalene by high performance liquid chromatography with photodiode array detector [J]. *Food Res Dev*, 2015, (36): 131–133, 181.
- [14] 张喜金, 苏昭仑, 黄康惠. 高效液相色谱法测定角鲨烯软胶囊中的角鲨烯[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, (6): 3108–3113.
Zhang XJ, Su ZL, Huang KH. Determination of squalene in squalene soft capsule by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, (6): 3108–3113.
- [15] 陈伟珠, 方华, 张怡评, 等. 超高效液相色谱法检测角鲨烯[J]. *食品与发酵科技*, 2014 (50): 74–76, 86.
Chen WZ, Fang H, Zhang YP, *et al.* Determination of squalene by ultra performance liquid chromatography [J]. *Food Ferment Technol*, 2014, (50): 74–76, 86.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



罗娇依, 硕士,, 主要研究食品检测。
E-mail: nifdc_ljy@126.com



曹 进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品分析。
E-mail: caojin@tsinghua.org.cn