

气相色谱法测定米糠脂肪醇中二十八烷醇和三十烷醇的含量

李赫宇,王钰,张东星,於洪建,晏仁义*
(天津益倍生物科技集团有限公司,天津 300457)

摘要:建立气相色谱内标法测定米糠脂肪醇中二十八烷醇和三十烷醇的含量。以三苯基苯为内标物,采用 HP-5 毛细管色谱柱。二十八烷醇和三十烷醇的加标回收率分别为 99.41 % 和 99.48 %, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 3.28 % 和 3.17 %。该方法适用于米糠脂肪醇中高级醇含量分析,为其产品质量的判定提供参考。

关键词:气相色谱;内标法;米糠脂肪醇;二十八烷醇;三十烷醇

Determination of Octacosanol and Triacontanol in Rice Bran Fatty Alcohol by Gas Chromatography
LI He-yu, WANG Yu, ZHANG Dong-xing, YU Hong-jian, YAN Ren-yi*
(Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Gas chromatography (GC) with internal standard was used to establish a method for analysis of octacosanol and triacontanol in rice brane fatty alcohol. Triphenylbenzene was used as internal standard. The separation of target components was performed on a HP-5 capillary column. The recoveries of octacosanol and triacontanol were 99.41 % (relative standard deviation, RSD) 3.28 % and 99.48 % (RSD 3.17 %), respectively. The established method was suitable for the analysis of octacosanol and triacontanol in rice brane fatty alcohol, and could provide reference for the judgment of product quality.

Key words: gas chromatography (GC); internal standard method; rice brane fatty alcohol; octacosanol; triacontanol

引文格式:

李赫宇,王钰,张东星,等.气相色谱法测定米糠脂肪醇中二十八烷醇和三十烷醇的含量[J].食品研究与开发,2020,41(11):179-183

LI Heyu, WANG Yu, ZHANG Dongxing, et al. Determination of Octacosanol and Triacontanol in Rice Bran Fatty Alcohol by Gas Chromatography[J]. Food Research and Development, 2020, 41(11):179-183

米糠是大米加工过程中的副产物,一般会产生约 5 %~8 % 米糠,新鲜米糠中含有米糠油约 16 %~22 %^[1]。米糠油中含有 3 % 左右的米糠蜡,米糠蜡中含有高级脂肪醇和高级脂肪酸,经实验室分析,二十八烷醇占总醇的 11 %~17 %;三十烷醇占总醇的 17 %~22 %^[2-3]。

基金项目:中国博士后科学基金第 65 批面上项目(2019M651055)

作者简介:李赫宇(1982—),男(汉),高级工程师,硕士,研究方向:植物成分研究与开发。

* 通信作者:晏仁义(1982—),男(汉),研究员,博士,研究方向:植物成分研究与开发。

2017 年我国批准米糠脂肪醇为新资源食品,规定其工艺为米糠蜡经皂化、提取、过滤等工艺制成。规定主要成分二十八碳脂肪醇、三十碳脂肪醇、三十二碳脂肪醇的含量之和为 78 %~88 %。我国大米的产量和加工量占世界总量的三分之一,加工副产物米糠的量也惊人,我国目前在米糠的加工利用方面处在初级阶段。米糠脂肪醇作为新资源食品使用一定程度上能拉动米糠的综合利用。

目前米糠脂肪醇的标准还不完善,导致目前市场上的对其运用还存在一定的问题。首先,未制定统

一的具体的含量测定方法,一般参照 GB/T 32947-2016《蜂蜡中二十八烷醇、三十烷醇的测定 气相色谱法》测定,或者自拟定的方法,方法的不一致带来一定的混乱。其次,规定二十八碳脂肪烷醇、三十碳脂肪烷醇、三十二碳脂肪烷醇的含量之和为 78%~88%。经文献调研二十八烷醇和三十烷醇的功能作用完全不同。二十八烷醇又名蒙旦醇,发现其能够治疗人体生殖障碍疾病,逐渐被人们所研究^[4]。后来大量的研究表明二十八烷醇有抗疲劳,增强身体素质(耐力,精力,体力)^[5]、抗凝血作用^[6]、降血脂^[7-8]、升高人体基础代谢率^[9-11]、提高免疫力^[12]、提高反应灵敏度^[13]、保护肝脏^[14]、细胞保护功能^[15]等作用。三十烷醇又名蜂花醇,对植物生长有促进作用,可作为一种新的天然存在的植物生长调节剂^[16]。因此,可能会存在脂肪烷醇的含量之和满足标准,但是比例不同会导致功能的差异。本研究建立气相色谱内标法,用此来测定市场上不同厂家不同批号的米糠脂肪烷醇样本,为米糠脂肪烷醇的含量测定方法及标准的提升提供数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

KQ-250DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;MS105DU 型 1/10 万电子天平:瑞士梅特勒-托利多有限公司;岛津 GC-2010 plus 气相色谱仪:日本岛津株式会社。

1.2 材料与试剂

米糠脂肪烷醇:市售。

二十八烷醇和三十烷醇对照品(纯度 99.0%):中国食品药品检定研究院。三苯基苯(纯度 99.5%):Dr. Ehrenstorfer GmbH。色谱纯环己烷:天津市康科德科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

毛细管色谱柱:HP-5 (30 m×0.32 mm,0.25 μm);载气为 N₂,流量为 0.5 mL/min;分流模式,进样量为 2 μL,分流比 50:1。空气流速:300 mL/min;氢气流速:30 mL/min;进样口温度:320℃;检测器温度:340℃。柱温箱温度程序升温:初始温度 250℃保持 1 min,以 5℃/min 升温到 290℃,保持 15 min,再以 8℃/min 的速率升到 300℃,保持 2 min。进样口温度:320℃;氢火焰离子化检测器(flame ionization detector,FID),温度 340℃进行检测。进样体积为 2 μL,分流比 50:1。

1.3.2 内标液的配置

准确称取三苯基苯 25 mg,置于 50 mL 容量瓶中,

用环己烷溶解并定容至刻度线,配成 0.5 mg/mL 的内标溶液。置于 4℃冰箱贮存备用。

1.3.3 标准工作液的配置

准确称取二十八烷醇和三十烷醇各 50 mg 分别置于 10 mL 容量瓶中,加环己烷溶解并定容,配成浓度为 5 mg/mL 的标准贮备液。分别准确移取标准贮备溶液 0.15、0.35、0.55、0.75、1.00、1.25、1.50 mL 于 2 mL 容量瓶,分别准确加入 0.4 mL 内标液,用环己烷定容。配置成 375 μg/mL~3 750 μg/mL 的标准工作溶液。

1.3.4 样品溶液的制备

精密称取样品 10 mg~30 mg,置于 5 mL 容量瓶中,准确加入三苯基苯内标液溶液 1.0 mL,60℃加热溶解,冷却至室温(25℃),用环己烷定容,摇匀。

1.4 测定与计算

在所选的色谱条件下,待色谱仪稳定后,将所配置的一系列浓度的标准工作溶液进样测定。根据内标法的计算公式计算,以 C_i/C_s 为横坐标, A_i/A_s 为纵坐标,绘出标准曲线,并求出回归方程。

$$C_i = f(A_i/A_s)C_s$$

式中: f 为相对校正因子; A_i 为待测溶液中各高级烷醇的峰面积值; A_s 为加入内标物三苯基苯的峰面积值; C_i 为待测组分的浓度; C_s 为内标物的浓度。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

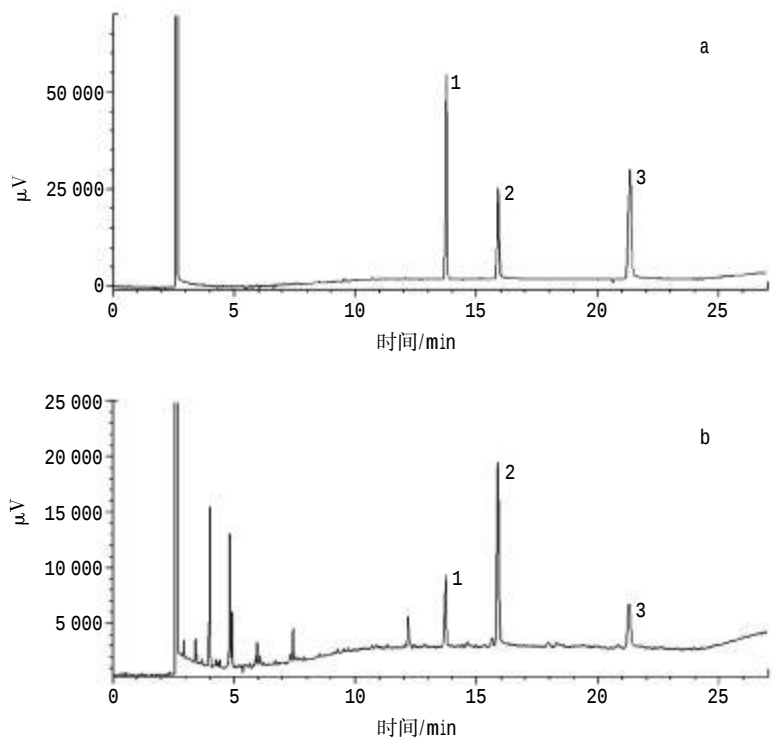
参照国标 GB/T 32947-2016《蜂蜡中二十八烷醇、三十烷醇的测定 气相色谱法》中的色谱条件,进行流速、程序升温与分流比的调整,使方法更适合于米糠烷醇提取物的测试。最终的条件如 1.3.1 所述。色谱图基线较参照方法平稳,三苯基苯、二十八烷醇和三十烷醇分离度良好,如图 1 所示。GB/T 32947-2016《蜂蜡中二十八烷醇、三十烷醇的测定 气相色谱法》测定米糠脂肪烷醇的色谱图如图 2 所示,基线漂移明显,二十八烷醇色谱峰前明显有杂峰未分离开。

2.2 检测限和定量限

按 1.3.1 中色谱条件,将 1.3.2 中标准工作溶液样品,逐级稀释不同浓度,当峰高比基线噪音高 3 倍(即 $S/N=3$)和 10 倍(即 $S/N=10$)时,以此时物质的浓度为检测限和定量限。

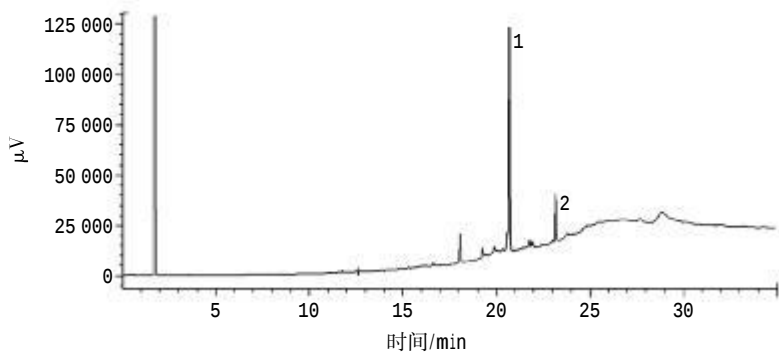
2.3 标准曲线的绘制

按 1.3.1 中色谱条件,测试 1.3.2 中标准工作溶液样品中被测组分与内标物在色谱检测器上的峰面积。以峰面积之比为纵坐标 Y ,浓度比为横坐标 X 做标准曲线。当峰高比基线噪音高 3 倍(即 $S/N=3$)和 10 倍



a 为对照品;b 为样品;1 为三苯基苯;2 为二十八烷醇;3 为三十烷醇。

图 1 对照品和米糠脂肪烷醇样品的气相色谱图
Fig.1 The gas chromatograms of references and sample



1 为二十八烷醇;2 为三十烷醇。

图 2 参照 GB/T 32947-2016 分析样本的气相色谱图
Fig.2 The gas chromatogram of sample analyzed by GB/T 32947-2016

(即 $S/N=10$)时,以此时物质的浓度为检测限和定量限。结果如表 1 所示。当内标物质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$,各标准品在 $375\text{ }\mu\text{g/mL}\sim 3\text{ }750\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内,二十八烷醇和三十烷醇呈现良好的线性关系, $R^2=0.999\text{ }5$,

说明相关性很高。
2.4 精密度试验
精密吸取对照品混合溶液,按照 1.3.1 中色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积值。记录峰面积,分别计算

表 1 标准品标准曲线
Table 1 Standard curves of references

组分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	R^2	检测限/($\mu\text{g/mL}$)	定量限/($\mu\text{g/mL}$)
二十八烷醇	$Y=0.737\text{ }3X-0.012\text{ }9$	$375\sim 3\text{ }750$	$0.999\text{ }5$	123.625	$290.882\text{ }5$
三十烷醇	$Y=0.622\text{ }3X+0.037\text{ }4$	$375\sim 3\text{ }750$	$0.999\text{ }9$	141.500	424.500

二十八烷醇、三十烷醇与内标物三苯基苯峰面积的比值。结果显示,二十八烷醇与三苯基苯峰面积比值的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.80 %, 三十烷醇与三苯基苯峰面积比值的 RSD 为 1.39 %,表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

精确称取一定量的样品,共 6 份,按照 1.3.4 中的方法制备供试品溶液,按照 1.3.1 中的色谱条件进行分析,测定峰面积,计算含量。结果 6 份样品中,二十八烷醇和三十烷醇含量的 RSD 分别为 4.30 %和 1.67 %,表明此方法的重复性良好。

2.6 稳定性试验

精确称取一定量的样品,按照 1.3.4 中的方法制备供试品溶液,按照 1.3.1 中的色谱条件分别于 1、2、4、8、12、24 h 进样分析,测定峰面积,计算出样品中二十八烷醇和三十烷醇的含量。结果显示,二十八烷醇和三十烷醇含量的 RSD 分别为 3.98 %和 5.01 %,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

分别精密称取供试品 5 mg,共 6 份。分别加入样本中基本等量的二十八烷醇和三十烷醇对照品,按照 1.3.4 中的方法制备供试品溶液,按照 1.3.1 中的方法进行测定。结果如表 2 所示。

由表 2 可以看出,二十八烷醇的回收率为 99.41 %,

表 2 二十八烷醇和三十烷醇加样回收率试验结果

Table 2 The results on the recovery rate of octacosanol and triacontanol

	样品量/ mg	加入量/ mg	测定值/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/%
二十八 烷醇	1.097	1.002	2.052	95.30	99.41	3.28
	1.106	1.002	2.068	95.96		
	1.102	1.002	2.105	100.11		
	1.124	1.002	2.148	102.29		
	1.112	1.002	2.147	103.35		
	1.109	1.002	2.106	99.43		
三十 烷醇	3.345	2.418	5.775	100.49	99.48	3.17
	3.371	2.418	5.687	95.75		
	3.358	2.418	5.789	100.55		
	3.425	2.418	5.922	103.29		
	3.388	2.418	5.697	95.49		
	3.381	2.418	5.831	101.30		

RSD 为 3.28 %;三十烷醇的回收率为 99.48 %,RSD 为 3.17 %,表明本试验所建立的方法能够满足米糠脂肪烷醇中二十八烷醇和三十烷醇的含量测定。

2.8 样品含量测定

按上述的建立的色谱方法,进行样本的含量测定。每份样本重复测定两次,以待测成分与内标物峰面积比,通过回归方程计算出浓度比,从而计算出试样中待测成分的量,计算结果如表 3 所示。

表 3 样品中二十八烷醇和三十烷醇含量

Table 3 The contents of octacosanol and triacontanol in samples

编号	二十八烷醇				三十烷醇				总和
	1	2	平均值	RSD	1	2	平均值	RSD	
1	95.49	94.91	95.20	0.43	-	-	-	-	95.20
2	82.84	85.89	84.36	2.55	3.84	3.88	3.86	0.76	88.22
3	62.45	61.93	62.19	0.59	17.43	17.86	17.65	1.75	79.84
4	69.38	69.28	69.33	0.10	18.59	16.83	17.71	7.03	87.04
5	50.68	51.00	50.84	0.45	28.77	27.23	28.00	3.88	78.84
6	56.37	56.55	56.46	0.22	28.16	28.34	28.25	0.45	84.71
7	53.53	53.96	53.75	0.56	23.97	24.38	24.18	1.21	77.93
8	68.95	67.81	68.38	1.17	11.67	11.25	11.46	2.60	79.84
9	67.81	69.64	68.72	1.89	13.54	13.76	13.65	1.09	82.37
10	68.65	66.95	67.80	1.77	20.50	20.19	20.35	1.09	88.15
11	56.29	57.55	56.92	1.57	11.66	12.10	11.88	2.61	68.8
12	57.03	55.6	56.31	1.80	25.34	24.19	24.76	3.29	81.07
13	63.28	67.65	65.47	4.73	20.10	21.99	21.05	6.35	86.52
14	69.11	68.28	68.70	0.85	19.95	19.98	19.96	0.09	88.66
15	10.84	11.02	10.93	1.22	33.08	33.55	33.31	1.01	44.24

注:-表示未检出。

3 讨论与结论

本文建立了气相色谱法,以三苯基苯为内标测定新资源食品米糠脂肪烷醇中二十八烷醇和三十烷醇的含量,通过分离条件的优化和方法学考察,建立的方法可满足米糠脂肪烷醇的质量分析要求。分离采用HP-5色谱柱,在375 μg/mL~3 750 μg/mL内均具有良好的线性关系($R^2>0.999$)。

15份市场上收集的样本的分析结果表明有4份样本的含量不符合我国法规的要求(其中有3份含量略超过88%)。所分析的样本中三十二烷醇的含量都很低(小于2%),甚至未检测到。并且二十八烷醇和三十烷醇的对照品易得,而三十二烷醇的对照品难买到。从报道的功能方面考虑,多集中在二十八烷醇的生物活性方面,其他两个烷醇的生物活性报道很少。随着纯化技术的进步,能够获得高纯度的二十八烷醇产品,比如样本1和2中二十八烷醇含量分别高达95.20%和84.36%。并且国外的运用中高纯度的二十八烷醇比较受欢迎。因此从实际出发对米糠脂肪烷醇的标准是否可以只测试二十八烷醇和三十烷醇含量,并且规定二十八烷醇需达到某个含量,根据分析检测的15份样本可参考制定二十八烷醇达到50%。另外,对于规定3个烷醇含量之和不能超过88%,是否会限制新技术的运用,不能体现优质优价。

参考文献:

- [1] 徐学兵. 油脂化学[M]. 北京: 中国商业出版社, 1993, 314-317
- [2] 汪云, 雕鸿荪. 米糠蜡的组成分析[J]. 中国油脂, 1998, 23(6): 39-41
- [3] 李桂华, 付黎敏, 刘达富, 等. 糠蜡的精制与组成分析研究[J]. 粮食与油脂, 2000, 13(7): 2-6
- [4] 何新益. 二十八烷醇的研究状况及应用[J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 219-220
- [5] 陈芳, 赵广华, 蔡同一, 等. 二十八烷醇对强制冷水应激大鼠行为及神经内分泌指标的影响[J]. 营养学报, 2007, 29(4): 408-410
- [6] 陈友双, 李家元. 功能性物质二十八烷醇生理活性及应用研究进展[J]. 广西工学院学报, 2005, 16(3): 19-22
- [7] Arruzazabala M L, Carbajal D, Mas R, et al. Cholesterol-lowering effects of policosanol in rabbits[J]. Biol Res, 1994, 27(3): 205-208
- [8] 刘元法, 王兴国, 倪伯文, 等. 米糠活性物质二十八醇功能性研究[J]. 中国油脂, 2001, 26(5): 63-65
- [9] 霍君生, 韩雅珊, 石阶平, 等. 二十八烷醇对小鼠心肌及骨骼肌能量代谢的影响[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(3): 5-7
- [10] Kato S, Karino K, Hasegawa J, et al. Octacosanol affects lipid metabolism in rats fed on a high fat diet[J]. Br J Nut, 1995, 73(3): 433-442
- [11] 白树民, 谢力勤, 刘成林, 等. 食品添加二十八烷醇对吊尾大鼠部分生理指标影响的观察[J]. 航天医学与医学工程学, 1997, 10(6): 450-452
- [12] 曹植然, 李利平, 徐玉清, 等. 二十八烷醇对实验动物免疫功能及游泳耐力的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 158-160
- [13] Fontani G, Maffei D, Lodi L. Policosanol, reaction time and event-related potentials[J]. Neuropsychobiology, 2000, 41(3): 158-165
- [14] Rao KS, Mishra, SH. In vitro assessment of antihepatotoxic activity of n-octacosanol[J]. India J Pharm Sci, 1997, 59(6): 292-294
- [15] 刘福玉, 王坤平, 罗勇军, 等. 二十八烷醇对缺氧大鼠保护作用初步研究[J]. 西南国防医药, 2010, 20(6): 649-651
- [16] Ries SK, Wert VF, Sweeley CC. Triacantanol: a new naturally occurring pant growth regulator[J]. Science, 1977, 1399-1341

收稿日期:2019-06-06

**高举中国特色社会主义伟大旗帜，
坚定不移走中国特色社会主义道路。**