

气相色谱-串联质谱法测定不同产地大米中的角鲨烯

李红*, 田福林, 刘成雁, 程光荣

(辽宁省分析科学研究院 辽宁省标准化体系建设工程技术研究中心, 辽宁 沈阳 110015)

摘要: 通过比较大米中角鲨烯的不同提取方法, 选用优化后的索氏提取/气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法对不同产地大米中的角鲨烯进行定性及定量分析。结果表明, 该方法在1~50 mg/L质量浓度范围内线性良好, 相关系数为0.998 7; 检出限为0.1 mg/kg; 在5、20 mg/kg 2个加标水平下的回收率可达96%~104%; 相对标准偏差(RSD)不大于3.6%。对不同产地大米中角鲨烯的分析表明, 该方法的灵敏度高、重复性好, 可作为区分大米不同种属、产地和品质的有效方法。

关键词: 气相色谱-质谱; 角鲨烯; 大米; 索氏提取

中图分类号: O657.63; O629.61 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)10-1179-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.10.020

Determination of Squalene in Rices from Different Areas by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Hong*, TIAN Fu-lin, LIU Cheng-yan, CHENG Guang-rong

(Standard System Engineering Research Center of Liaoning Province, Liaoning Province Academy of Analytic Sciences, Shenyang 110015, China)

Abstract: Different extraction methods of bioactive component squalene in rices were studied and a new method was developed for the determination of squalene in rices. The squalene in rices from different areas were extracted by Soxhlet extract method, and analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry(GC-MS/MS). The results showed that the calibration curve was linear over the concentration of squalene in the range of 1-50 mg/L with a correlation coefficient of 0.998 7. The detection limit(LOD) was 0.1 mg/kg. The recoveries of squalene at two spiked levels of 5 mg/kg and 20 mg/kg were in the range of 96%-104% with relative standard deviations(RSDs) no more than 3.6%. The method was sensitive and reproducible, and could be used to distinguish effectively rices with different species, origins and qualities.

Key words: gas chromatography-tandem mass spectrometry(GC-MS/MS); squalene; rice; Soxhlet extract method

我国是世界上最大的稻米生产国, 产量和种植面积分别占世界的35%和21%^[1], 全国近2/3的人口以大米为主食^[2]。随着生活水平的不断提高, 人们更加关注大米的营养价值。然而我国现阶段的大米标准^[3]不能全面反映稻米的质量状况^[1]。因此, 深入研究大米的主要营养成分, 进而完善大米标准, 对提高消费者的生活质量至关重要。近年来, 大米中黄酮^[4]、脂肪酸^[5-9]、香气物质^[10-12]等营养物质的研究逐渐增多, 但有关大米中角鲨烯的研究却鲜见报道。角鲨烯为长链状三萜化合物, 又名鲨烯、三十碳六烯、角鲨油素或鱼肝油萜等, 化学名为2, 6, 10, 15, 19, 23-六甲基-2, 6, 10, 14, 18, 22-二十四碳六烯^[13]。角鲨烯具有提高体内超氧化物歧化酶(SOD)活性、增强机体免疫能力^[14]、改善性功能、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、防止脂肪酸过氧化形成脂褐斑^[15]等多种生理功能, 是一种无毒性的具有防病、治病作用的海洋生物活性物质。

关于角鲨烯分析方法的研究主要集中在植物油^[14,16]、保健食品^[17]和鲨鱼肝油^[18]等方面, 在其他种类样品中的研究较少。分析方法主要有气相色谱法^[19]和高效液相色谱法(HPLC)^[20]。近年来, 气相色谱-质谱法(GC-MS)^[14,16,21]逐渐应用于角鲨烯的分析, 但多采用全扫描模式, 灵敏度较低。本实验通过比较超声提取法、振荡提取法和索氏提取法对大米中角鲨烯的提取效果, 建立了大米中角鲨烯

收稿日期: 2011-04-26; 修回日期: 2011-06-01

* 通讯作者: 李红, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向: 环境、食品的安全检测, Tel: 024-24211241, E-mail: lh_9214@163.com

含量的索氏提取/GC-MS/MS定量分析方法,提高了分析灵敏度,并研究了不同产地大米中角鲨烯的含量及分布规律,以期有效区分不同品质、产地大米及资源的进一步开发利用提供科学依据,为大米标准的完善提供数据,为优质稻种的选育体系提供技术支持。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

五常大米、口口牌泰国香米、金豚牌泰国香米、孟乍隆牌泰国香米、盘锦大米、辽星大米、利是粥米、梅河大米。角鲨烯(纯度99%,美国Sigma公司),丙酮、石油醚、乙醇均为色谱纯。

1.2 仪器

7890-7000B型气相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(美国Agilent公司);WHY-2型水浴恒温振荡器(江苏金坛市环宇科学仪器厂);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ3200DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);索氏提取器。

1.3 样品的制备

1.3.1 样品的预处理 取米粒在25℃下干燥处理后,粉碎,备用。

1.3.2 超声提取法 取1.0g经“1.3.1”处理后的样品置于离心管中,加乙醇5.0mL,超声20min,以9980r/min离心10min,取上清液供GC-MS/MS测定。

1.3.3 振荡提取法 取1.0g经“1.3.1”处理后的样品置于离心管中,加乙醇5.0mL,40℃下以200r/min振荡2h,再以9980r/min离心10min,取上清液供GC-MS/MS测定。

1.3.4 索氏提取法 取1.0g经“1.3.1”处理后的样品于滤纸筒中,装入索氏提取器中,加乙醇50mL,水浴加热回流,约10min回流1次,连续提取6h。提取液用旋转蒸发器浓缩至近干,用乙醇定容至1.0mL,供GC-MS/MS测定。

1.4 仪器条件

采用HP-5MS色谱柱(30m×0.25mm×0.25μm);载气:氮气,恒流模式,流速1.0mL/min;不分流进样1μL。进样口温度:300℃;传输线温度:325℃;程序升温:初温160℃,以20℃/min升至295℃,保持10min。电子轰击源(EI),电子能量:70eV,离子源温度:230℃,双四极杆温度:150℃。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

大米基质简单,主要脂溶性成分有棕榈酸、亚油酸、油酸、角鲨烯、甾体类化合物^[2],对角鲨烯干扰较少。另外,大米中的角鲨烯含量相对较高,故采用EI电离方式,选择离子(SIM)模式进行测定,定量离子为 m/z 137,定性离子为121、136、149。大米提取物的总离子流色谱图(TIC)如图1所示。

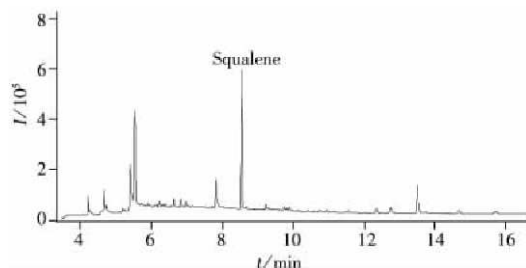


图1 大米样品的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the rice sample

2.2 样品的选择

稻米的加工分为清理、去石、砻谷、谷糙分离、碾白、白米分级、抛光等过程,米糠是碾白过程中糙米碾下的皮层,实验对米糠中角鲨烯的含量进行了分析。结果表明,米糠中角鲨烯的含量明显高于大米中角鲨烯的含量。若选择米糠去除不彻底的大米作为样品,会直接影响样品中角鲨烯的分析结果。因此选择加工彻底、米糠去除完全的大米至关重要。为避免米糠的干扰,本实验均选用精制的特级大米。

2.3 提取方法的选择

以五常大米2号为研究对象,分别考察了超声提取法、振荡提取法和索氏提取法的最佳提取条件,比较了不同提取方法对大米中角鲨烯的提取效果。

2.3.1 超声提取法 考察了提取溶剂对提取效率的影响。分别以乙醇、石油醚和丙酮作为提取溶剂,超声20min,采用GC-MS/MS法测定。结果表明,以乙醇作为提取溶剂时测得样品中的角鲨烯含量

最高, 故选择乙醇为提取溶剂。

考察了乙醇作为提取溶剂, 超声时间分别为 10、20、30、40 min 时的提取效率。结果表明, 超声 20 min 后, 随着超声时间的增加, 样品中角鲨烯的含量无明显变化, 故选择 20 min 作为超声时间。

2.3.2 振荡提取法 以乙醇为提取溶剂, 分别选取振荡温度为 30、40、50 ℃, 振荡 2 h, 其中振荡温度为 40 ℃ 时, 得到的角鲨烯含量最高。故选择最佳振荡温度为 40 ℃。

用乙醇作为提取溶剂, 振荡温度为 40 ℃, 考察了振荡时间(1、2、3、4 h)对提取效率的影响。结果表明, 振荡 2 h 后, 随着时间的增加, 角鲨烯含量趋于平缓, 故选择最佳振荡时间为 2 h。

2.3.3 索氏提取法 用乙醇作为提取溶剂进行索氏提取, 考察了提取时间和角鲨烯含量的关系。结果表明, 索氏提取 6 h 后, 随着时间的增加, 测得角鲨烯含量趋于平缓, 故选择 6 h 作为最佳提取时间。

2.3.4 不同提取方法的比较 分别在超声提取法、振荡提取法和索氏提取法的最佳提取条件下进行提取, 并测定大米中角鲨烯的含量, 结果见表 1。

表 1 不同提取方法的比较($n=5$)

Table 1 Comparison of different extract methods($n=5$)

Extract method	Extract solvent	Solvent volume V/mL	Extract time t/h	Squalene content $w/(mg \cdot kg^{-1})$	RSD $s_r/\%$
Ultrasonic extract method	Ethanol	5.0	0.3	11.2	11
Vibrate extract method	Ethanol	5.0	2.0	11.4	3.3
Soxhlet extract method	Ethanol	50	6.0	19.4	3.2

由表 1 可知: 超声提取法的溶剂用量少、耗时短、重复性较差, RSD 为 11%, 提取出大米中角鲨烯的含量为 11.2 mg/kg, 占索氏提取

法的 57.9%; 振荡提取法的溶剂用量少、重复性较好, 但耗时较长, 提取出角鲨烯的含量为 11.4 mg/kg, 占索氏提取法的 58.6%, 该方法可用于大批量样品的快速定量分析; 索氏提取法耗时长、操作较复杂、溶剂用量较大, 但提取出角鲨烯的含量最高(19.4 mg/kg), 且重复性最好。考虑本实验旨在探讨各产地大米中角鲨烯的真实含量及规律, 故选取索氏提取法作为样品的最佳提取方法。

2.4 方法的线性关系与检出限

取角鲨烯标准品 0.1 g(精确至 0.000 01 g), 置于 100 mL 容量瓶中, 加乙醇定容, 得到 1 000 mg/L 的标准储备液。取标准储备液 2.5 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 加乙醇定容, 得到 50 mg/L 的中间工作溶液。稀释中间工作溶液, 分别得到质量浓度为 1、2、5、10、20、50 mg/L 的系列标准溶液, 以各组分的峰面积(y)对质量浓度(x)绘制标准曲线, 得到线性方程为 $y=72.73x+0.6686$, $r^2=0.9987$ 。

取 1.0 g 样品, 分别加入 1、2、5 mg/L 3 个水平(50 μ L)的标准工作溶液, 按“1.3.4”方法进行处理, 每个水平重复测定 3 次。以最低检出浓度计算, 3 倍信噪比为检出限, 10 倍信噪比为定量下限。结果表明: 大米中角鲨烯的检出限为 0.1 mg/kg, 定量下限为 0.3 mg/kg。

2.5 方法的回收率与精密度

取已知角鲨烯含量为 19.4 mg/kg 的五常大米 2 号样品, 分别按 5 mg/kg 和 20 mg/kg 水平进行加标回收实验, 每个加标水平做 5 个平行, 按“1.3.4”方法提取, “1.4”条件进行分析, 测定结果见表 2。由表 2 可知, 角鲨烯的加标回收率为 96%~104%, 相对标准偏差(RSD)均不高于 3.6%。

表 2 角鲨烯的加标回收率和精密度($n=5$)

Table 2 Recoveries and precisions of squalene($n=5$)

No.	Added 5 mg $\cdot$ kg ⁻¹		Added 20 mg $\cdot$ kg ⁻¹	
	Recovery R/%	RSD $s_r/\%$	Recovery R/%	RSD $s_r/\%$
1	104	3.6	104	3.1
2	101		101	
3	99		98	
4	96		96	
5	98		98	

2.6 不同产地大米的角鲨烯含量测定

采用索氏提取/气相色谱-串联质谱法对不同产地大米中角鲨烯的含量进行分析, 结果见图 2。结果显示, 五常大米(五常大米 1~5 号)的角鲨烯含量最高, 分别为 21.8、19.4、22.1、17.7、19.8 mg/kg; 其次为辽宁大米(盘锦大米、辽星大米、利是粥米), 分别为 13.5、14.3、15.0 mg/kg; 吉林大米(梅河大米)的角鲨烯含量为 13.4 mg/kg, 比辽宁大米略低; 泰国香米(口口牌、金豚牌、孟乍隆牌)的角鲨烯含量最低, 分别为 8.52、6.65、7.80 mg/kg。可见, 不同产地大米中的角鲨烯含量各不相同, 普遍呈现出北高南低的趋势。

另外, 按稻米种属分类, 五常稻米、辽宁稻米和吉林稻米属于粳型稻, 泰国香稻属于籼型稻^[22]。泰国香米(口口牌、金豚牌、孟乍隆牌)的角鲨烯含量明显低于其他地区, 因此认为大米中的角鲨烯含

量除受地理位置和气候的影响外,还可能与稻米的种属有较大关系。具体的影响因素及影响程度还需作进一步的研究和探讨。

3 结 论

对于大米中角鲨烯的分析国内外鲜有文献报道,针对这一现状,本文比较了超声提取法、振荡提取法和索氏提取法对大米中角鲨烯的提取效果。与超声提取法和振荡提取法相比,索氏提取法得到的角鲨烯含量较高,重复性较好,适合大米中角鲨烯的提取。据此建立了索氏提取/气相色谱-串联质谱测定大米中角鲨烯含量的分析方法。对不同地区大米中角鲨烯含量的分析结果表明,本方法准确性好、精密度高,可为大米的品质鉴别及优质稻种的选育提供可靠的科学依据。

参考文献:

- [1] Ma L, Zhang H C, Dai Q G, Huo Z Y, Xu K. *Jiangsu Agr. Sci.* (马雷, 张洪程, 戴其根, 霍中洋, 许轲. 江苏农业科学), **2003**, 5: 7-10.
- [2] Hui R H, Hou D Y, Li T C, Xing X Y, Liu X Y, Diao Q P. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (回瑞华, 侯冬岩, 李铁纯, 邢晓燕, 刘晓媛, 刁全平. 质谱学报), **2008**, 29(6): 349-352.
- [3] GB 1354-2009. Rice. National Standards of the People's Republic of China(大米. 中华人民共和国国家标准).
- [4] Hou R X, Wu X L, Zhang L H, Hui R H, Diao Q P. *Food Sci.* (侯锐晓, 吴稀林, 张路祎, 回瑞华, 刁全平. 食品科学), **2008**, 29(9): 451-454.
- [5] Zhang M, Li H M, Yu H. *Mach. Cereal Oil Food Proc.* (张敏, 李红梅, 于浩. 粮油加工与食品机械), **2005**, 9: 67-69.
- [6] Zhou Z, Blanchard C, Helliwell S, Robards K. *Cereal Sci.*, **2003**, 37(3): 327-335.
- [7] Gaydou E M, Raonizafinimanana R, Bianchini J P. *Chem. Mater. Sci.*, **1980**, 57: 141-142.
- [8] Champagne E T, Grimm C C. *Cereal Chem.*, **1995**, 72: 255-258.
- [9] Begum M, Bhattacharya R. *J. Food Sci. Technol.*, **2000**, 37: 58-60.
- [10] Jing Y Q, Li K, Wei X J. *Chin. Rice*(景延秋, 李珂, 魏喜军. 中国稻米), **2008**, 2: 13-15.
- [11] Gu J M. *J. Chin. Cereal Oils Assoc.* (顾建明. 中国粮油学报), **1999**, 14(5): 15-17.
- [12] Yang J, Xiong G Q, Cheng W, Yang Y P, Liao T. *Hubei Agr. Sci.* (杨洁, 熊光权, 程薇, 杨玉平, 廖涛. 湖北农业科学), **2010**, 49(11): 2898-2902.
- [13] Li D M, Wang J, Bi L W, Zhao Z D. *Biom. Chem. Eng.* (李冬梅, 王婧, 毕良武, 赵振东. 生物质化学工程), **2006**, 40(1): 9-12.
- [14] Mao D B, Jia C X, Sun X L, Yang G M. *J. Chin. Cereal Oils Assoc.* (毛多斌, 贾春晓, 孙晓丽, 杨公明. 中国粮油学报), **2007**, 22(2): 79-82.
- [15] Chen Z N, Liang Z H. *J. Instrum. Anal.* (陈振宁, 梁志华. 分析测试学报), **2003**, 22(6): 77-79.
- [16] Liao J, Zhao Y L, Li N, Zhou G G. *Mod. Instrum.* (廖杰, 赵玉兰, 李宁, 周国民. 现代仪器), **2008**, 5: 36-37.
- [17] Fu S, Xiang S X. *Chin. J. Heal. Labor. Technol.* (付松, 向仕学. 中国卫生检验杂志), **2003**, 13(6): 717.
- [18] Li H, Ruan D L, Li Y G. *Chin. J. Mar. Drugs*(李和, 阮栋梁, 李玉帼. 中国海洋药物), **2004**, 3: 34-35.
- [19] Zhou M J, Xiang S X, Yin D G, Zhang Z J. *J. Prev. Med. Inf.* (周茂君, 向仕学, 殷德桂, 张正江. 预防医学情报杂志), **2003**, 19(2): 186-187.
- [20] Liang X H, Zheng C X, Zhang F X. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (梁新华, 郑彩霞, 张风侠. 时珍国医国药), **2010**, 21(8): 1856-1857.
- [21] Jia C X, Mao D B, Yang J, Sun X L, Song Y W. *Nat. Prod. Res. Dev.* (贾春晓, 毛多斌, 杨靖, 孙晓丽, 宋艳伟. 天然产物研究与开发), **2007**, 19: 256-258, 289.
- [22] Zhang Z M, Wang B Z, Huang X. *Jiangxi Agr. Sci. Technol.* (张振民, 王碧专, 黄曦. 江西农业科技), **1998**, 3: 10-12.

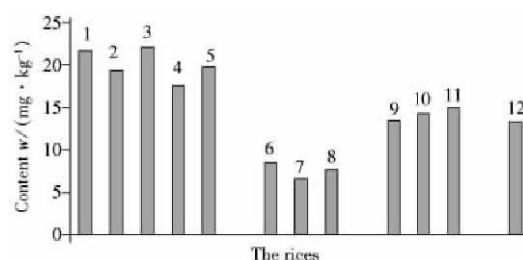


图2 不同产地大米中的角鲨烯含量

Fig. 2 Squalene content in rices from different areas
1-5. Wuchang rice No. 1-5(五常大米1~5号), respectively; 6. Ko-ko Thailand rice(口口牌泰国香米); 7. Jintun Thailand rice(金豚牌泰国香米); 8. Meng-zhalong Thailand rice(孟乍隆牌泰国香米); 9. Panjin rice(盘锦大米); 10. Liaoxing rice(辽星大米); 11. Lishi rice(利是粥米); 12. Meihe rice(梅河大米)