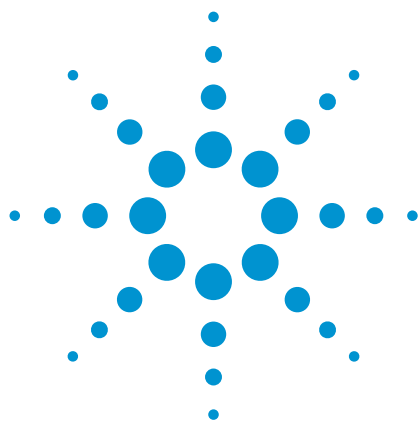




初榨橄榄油的质量分析 – 第 4 部分

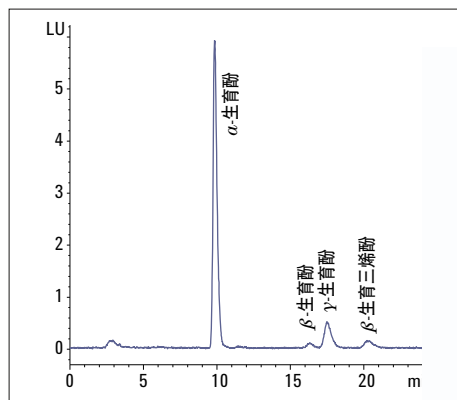
营养学优势 - 利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统定量分析初榨橄榄油中的生育酚和生育三烯酚

应用简报

食品分析与农业

作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔特布隆



摘要

本应用简报中展示了利用带荧光检测的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统对初榨橄榄油中的生育酚和生育三烯酚进行正相色谱分析。结果显示，与标准的不锈钢系统相比，使用生物惰性系统可大大改善保留时间及峰面积的精度。所有八种维生素 E 异构体均具有极好的线性，且检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 均在低 $\mu\text{g/mL}$ 范围内。九个橄榄油样品的分析结果表明：橄榄油中 α -生育酚的含量为 100 至 390 mg/kg 。且检测发现，不完全精制和初榨橄榄油中的维生素 E 含量相同。



Agilent Technologies

前言

初榨橄榄油来自橄榄树 (*Olea europea L.*) 的果实，加工过程仅使用机械压榨，不采用任何热或化学处理。为确保初榨橄榄油产品的真实性，包括无掺假、错贴标签、描述错误或产地误导，过去二十年里已建立有大量用于评估植物油的方法¹。其中对于热处理橄榄油的分析，在之前的应用简报中已有详细介绍^{2,3,4}。

营养学优势方面，初榨橄榄油是许多生物活性成分的优质来源，这些成分对人体健康有较高的化学保护作用。除了高含量的单不饱和及多不饱和脂肪酸之外，它还含有价值极高的抗氧化成分，如植物甾醇、类胡萝卜素、酚类和维生素 E^{5,6}。这些生物活性成分的含量与基因、栽培和环境因素相关。“维生素 E”这个名称包含四种生育酚 (α -、 β -、 γ - 和 δ -生育酚) 和四种生育三烯酚 (α -、 β -、 γ - 和 δ -三烯生育酚) 异构体。所有这八种形式均包含一个色原烷醇环和一个异戊二烯基，生育三烯酚中具有 3 个双键，见图 1。在初榨橄榄油中，生育酚/生育三烯酚总含量的 95% 是 α -生育酚⁶。

由于维生素 E 的生物活性具有多样性，且与大多数单体生育酚和生育三烯酚在癌症或梗塞预防中的作用相关，因此有必要对维生素 E 进行全面的谱图分析⁶。采用合适的色谱技术对所有维生素 E 异构体进行分离、鉴定和定量是对维生素 E 进行全面谱图分析的重要因素。反相 (RP) 和正相 (NP) 高压液相色谱 (HPLC) 均可用于分析生育酚和生育三烯酚。本应用简报中采用了正相超高压液相色谱 (UHPLC)，此系统可实现所有维生素 E 异构体的良好分离⁶。维生素 E 异构体的荧光性质使其可通过灵敏的荧光检测技术进行检测。

已知生育酚非常敏感，常会发生降解，产物包括 (例如) 生育酚红、生育酚紫、对生育酚、醌和二聚反应产物⁷。特别是在光致氧化作用下会发生降解过程，同时在 Fe^{3+} 或 Cu^{2+} 离子存在时的氧化作用下也会发生降解⁷。由于后者的原因，在不锈钢 HPLC/UHPLC 体系中进行的液相色谱分析常会得出非常差的保留时间和峰面积精度。为比较保留时间 (RT) 和峰面积的重现性，本应用简报中同时采用不锈钢 (Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统) 和生物惰性系统 (Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统) 进行分析。

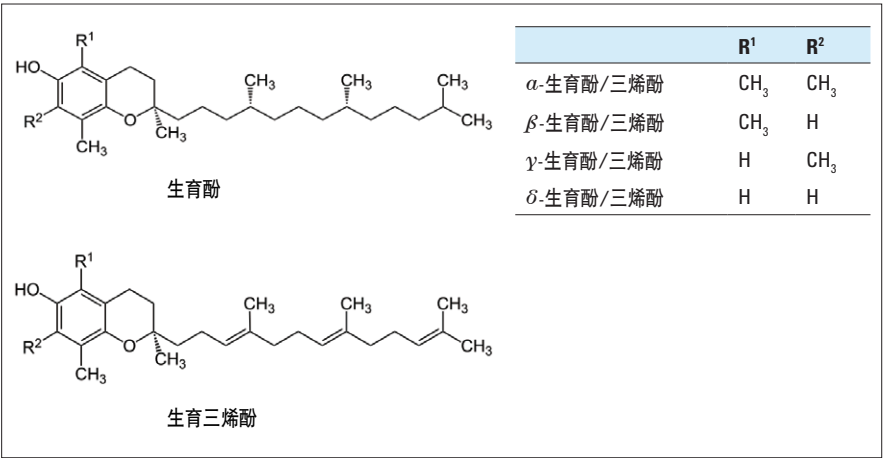


图 1
生育酚和生育三烯酚的结构

实验部分

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高效自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1330B)，用于样品冷却
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)，配置生物惰性溶剂热交换器
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配置生物惰性标准 FLD 流通池

Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 四元泵 (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity 高效自动进样器 (G1367E)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1330B)，用于样品冷却
- Agilent 1290 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配置标准 FLD 流通池

要在 1260 Infinity 四元液相色谱系统（不锈钢和生物惰性）中执行正相色谱分析，清洗和柱塞杆密封垫必须从反相（标配）更换为正相部件：

- 柱塞杆密封垫 - 正相（部件号 0905-1420）
- 清洗密封垫 (PE)（部件号 0905-1718）

样品

生育酚和生育三烯酚混合溶液标准品（溶于庚烷）购自 LGC 标准品公司（特丁顿，英国）。一系列橄榄油（初榨及不完全精制橄榄油）购自本地商店。对于正相分析，橄榄油样品采用庚烷稀释至 100 mg/mL 的浓度，然后注射入 UHPLC 系统进行分析。

色谱条件

长时间运行	
流动相：	tBME:庚烷 (5:95)
流速：	1 mL/min
等度运行：	停止时间 – 45 min
进样体积：	10 µL
柱温箱温度：	4 °C
温度 TCC：	35 °C
DAD：	Ex: 298 nm, Em: 330 nm
峰宽：	> 0.05 min（响应时间为 1 s）(9.26 Hz)

表 1
色谱条件

溶剂

正庚烷及甲基叔丁基醚 (tBME) 均为 LC 级，购自西格玛奥德里奇公司（圣路易斯，密苏里州，美国）。

色谱柱

Agilent LiChrospher DIOL 色谱柱，4 × 250 mm，5 µm（部件号 79925DI-584）

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.04 [35]

结果与讨论

图 2 中展示了采用正相色谱法成功分离生育酚和生育三烯酚标准品（来自 LGC 标准品公司）中的所有维生素 E 异构体的色谱图。实验同时测定了两种系统（1260 Infinity 四元液相色谱系统及 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统）中保留时间和峰面积的精度。图 2 所示为生物惰性系统中六次分析的叠加图，其中的保留时间和峰面积均具有出色的相对标准偏差。

表 2 总结了两种系统中维生素 E 异构体分析的结果。在生物惰性系统中，保留时间精度和峰面积结果更为优异，这是由于存在 Fe³⁺ 离子时异构体会经历氧化过程⁷。对于保留时间精度，生物惰性系统可表现出高达十倍的性能提高，例如 α-生育酚在该系统下的保留时间精度值 RSD 低于 0.07%，而在不锈钢系统中的 RSD 为 0.68%。同时，使用生物惰性系统时，峰面积的精度也可提高三至十倍（α-生育酚为四倍）。

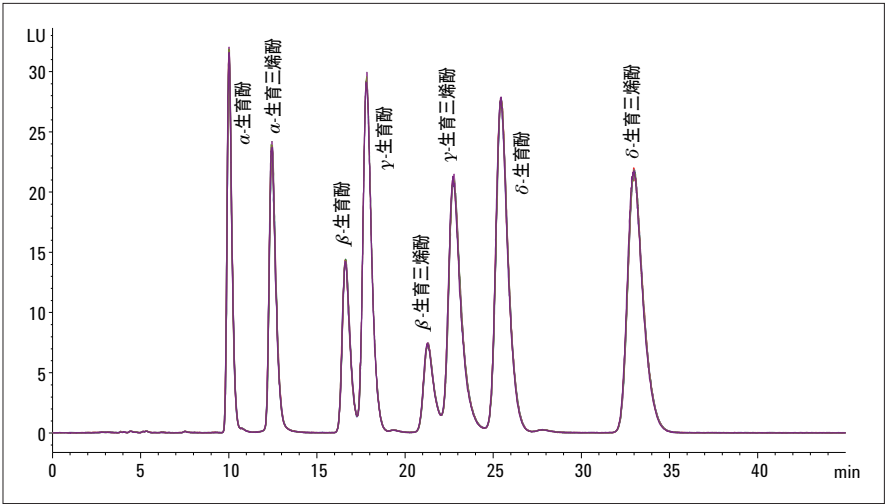


图 2
利用 Agilent Infinity 生物惰性四元液相色谱系统对所有维生素 E 异构体进行六次分析的叠加色谱图

	Agilent 1260 Infinity 生物惰性 四元液相色谱系统		Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统	
	RSD RT (%)	RSD 峰面积 (%)	RSD RT (%)	RSD 峰面积 (%)
α-生育酚	0.069	0.63	0.677	2.64
α-生育三烯酚	0.062	0.94	0.658	2.88
β-生育酚	0.053	0.64	0.65	2.78
γ-生育酚	0.103	0.61	0.691	2.73
β-生育三烯酚	0.103	0.79	0.708	3.32
γ-生育三烯酚	0.097	0.84	0.67	3.78
δ-生育酚	0.062	0.29	0	3.16
δ-生育三烯酚	0	0.34	0	2.74

表 2
Agilent 1260 Infinity SST 生物惰性四元液相色谱系统及 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统的保留时间和峰面积精度

为测定线性、LOD 及 LOQ，使用正庚烷以 1:3 的比例逐级稀释生育酚和生育三烯酚标准品溶液，见表 3。

实验准备了八个不同浓度的系列标准品溶液，然后计算峰面积和对应浓度之间的线性关系。LOD 及 LOQ 分别定义为信噪比 3:1 及 10:1 时的浓度。表 4 列出了所有维生素 E 异构体的线性、LOD 及 LOQ 结果。

所有的维生素 E 异构体均具有极好的线性，相关系数均大于 0.9998。LOD 及 LOQ 均在低 $\mu\text{g/mL}$ 范围内，例如在橄榄油中，少量的 β -生育酚及 β -生育三烯酚也可被检测出。

分析物	浓度 1 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 2 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 3 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 4 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 5 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 6 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 7 ($\mu\text{g/mL}$)	浓度 8 ($\mu\text{g/mL}$)
α -生育酚	463.00	154.33	51.44	17.15	5.72	1.91	0.64	0.21
α -生育三烯酚	447.00	149.00	49.67	16.56	5.52	1.84	0.61	0.20
β -生育酚	203.00	67.67	22.56	7.52	2.51	0.84	0.28	0.09
γ -生育酚	430.00	143.33	47.78	15.93	5.31	1.77	0.59	0.20
β -生育三烯酚	135.00	45.00	15.00	5.00	1.67	0.56	0.19	0.06
γ -生育三烯酚	467.00	155.67	51.89	17.30	5.77	1.92	0.64	0.21
δ -生育酚	423.00	141.00	47.00	15.67	5.22	1.74	0.58	0.19
δ -生育三烯酚	414.00	138.00	46.00	15.33	5.11	1.70	0.57	0.19

表 3
生育酚和生育三烯酚标准品的稀释系列

分析物	相关系数	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
α -生育酚	0.99984	3.34	11.14
α -生育三烯酚	0.99995	2.97	9.89
β -生育酚	0.99998	1.70	5.66
γ -生育酚	0.99992	1.45	4.82
β -生育三烯酚	0.99998	1.75	5.82
γ -生育三烯酚	0.99997	1.73	5.76
δ -生育酚	0.99992	1.03	3.44
δ -生育三烯酚	0.99990	0.99	3.29

表 4
Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统分析所得生育酚和生育三烯酚标准品稀释系列的线性结果

图 3 中展示了初榨橄榄油中维生素 E 异构体的组成分析。与文献报道类似⁶，初榨橄榄油中总维生素 E 异构体含量的 95% 为 α -生育酚。此外，还可检测到少量的 γ -生育酚， β -生育酚及 β -生育三烯酚。

实验共检测了九种橄榄油样品中的维生素 E 含量，见表 5。所测定维生素 E 异构体： α -、 β -、 γ 生育酚及 β -生育三烯酚的含量与文献中描述的含量一致，例如， α -生育酚的含量约为每千克橄榄油中含 100 至 390 mg^{6,8}。不完全精制（样品 3）和初榨橄榄油（样品 1，2 和 4 - 8）在维生素 E 含量方面没有任何差异。

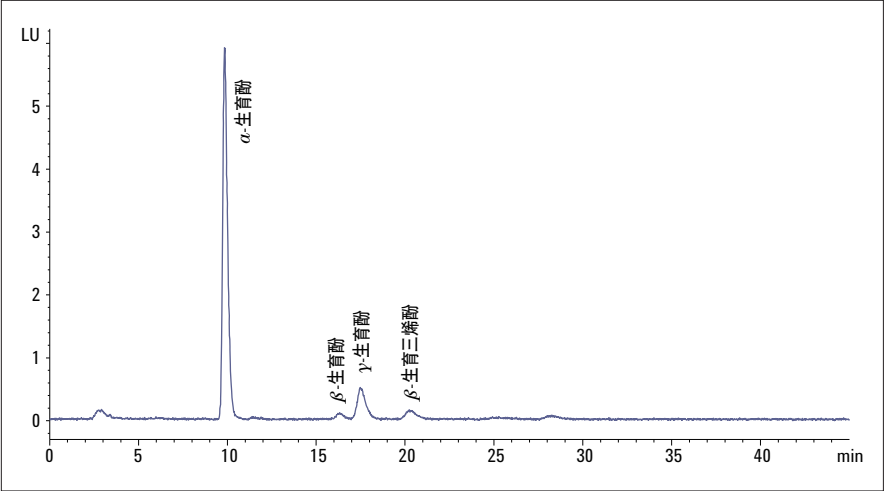


图 3
分析初榨橄榄油中的维生素 E 异构体

橄榄油	#1 mg/kg	#2 mg/kg	#3 mg/kg	#4 mg/kg	#5 mg/kg	#6 mg/kg	#7 mg/kg	#8 mg/kg	#9 mg/kg
α -生育酚	389.7	315.8	179.8	152.1	109.8	168.2	98.9	114.2	337.3
β -生育酚	5.4	3.5	2.5	2.0	3.8	3.0	2.7	2.6	4.3
γ -生育酚	9.1	11.8	12.1	6.6	5.8	9.2	12.0	1.8	4.1
β -生育三烯酚	12.3	5.8	5.3	4.8	3.6	4.9	4.2	5.8	13.3
δ -生育酚	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-

表 5
分析的九种橄榄油样品的维生素 E 含量

结论

存在 Fe^{3+} 或 Cu^{2+} 离子时，生育酚会因氧化作用而发生降解⁷。因此，在分析生育酚和生育三烯酚时，若想获得最高精度的保留时间和峰面积，我们强烈建议使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。此生物惰性系统可将保留时间的精度提高多达十倍，此外，生物惰性系统还可改善约十倍的峰面积精度。

将采用庚烷的正相色谱法与生物惰性系统联用，八种维生素 E 异构体均可获得极好的线性，并且 LOD 及 LOQ 值均在低 $\mu\text{g/mL}$ 范围内。所测九种橄榄油样品中的生育酚/生育三烯酚含量为 100 至 390 mg/kg 橄榄油（以 α -生育酚为例）。不完全精制和初榨橄榄油中维生素 E 的含量无差异。

参考文献

1. Aparicio and Ruiz, "Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques," *Journal of Chromatography A*, 881, 93–104, **2000**
2. Schneider, 初榨橄榄油的质量分析 – 第 1 部分, 安捷伦应用简报, 出版号 5991-1894EN, **2013**
3. Schneider, 初榨橄榄油的质量分析 – 第 2 部分, 安捷伦应用简报, 出版号 5991-1985EN, **2013**
4. Schneider, 初榨橄榄油的质量分析 – 第 3 部分, 安捷伦应用简报, 出版号 5991-1896EN, **2013**
5. Owen *et al.*, "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene," *Food and Chemical Toxicology*, 38, 647-659, **2000**
6. Cunha *et al.*, "Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese Olive Oils Using HPLC with Three Different Detection Systems," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3351-3356, **2006**
7. Cort *et al.*, "Stability of Alpha- and Gamma-Tocopherol: Fe^{3+} and Cu^{2+} Interactions," *Journal of Food Science*, 43, 797-798, **1978**
8. Psomiadou *et al.*, " α -Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1770-1775, **2000**

**[www.agilent.com/
chem/1200BioLC](http://www.agilent.com/chem/1200BioLC)**

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 4 月 1 日，中国出版
5991-2180CHCN



Agilent Technologies