

张艳红, 彭镰心, 赵 钢. 气相色谱法测定藜麦中肌醇的方法研究[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(10): 162–166.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.10.030

气相色谱法测定藜麦中肌醇的方法研究

张艳红^{1,2}, 彭镰心^{1,2}, 赵 钢^{1,2}

(1. 成都大学药学与生物工程学院, 四川成都 610106; 2. 成都大学农业部杂粮加工重点实验室, 四川成都 610106)

摘要:采用气相色谱法检测藜麦中肌醇的含量。样品用 70% 乙醇超声提取 30 min, 取上清液减压蒸发至干, 加入 4 mL 硅烷化试剂 80 ℃ 衍生 20 min, 经正己烷萃取后, 经 HP-5 色谱柱分离, FID 检测器测定, 以出峰时间定性, 外标法定量。结果表明, 肌醇在 0~20 μg/mL, 肌醇的浓度与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数 $r^2 > 0.999$, 检出限和定量限分别为 0.5 mg/100 g 和 1.5 mg/100 g, 在 3 个添加水平下回收率为 89.5%~102.3%, 相对标准偏差为 3.1%~4.9%。说明该检测方法灵敏、准确、重复性好, 适用于藜麦中肌醇含量的测定。

关键词:藜麦; 肌醇; 气相色谱法

中图分类号: S512.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)10-0162-04

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 属于苋科藜属一年生双子叶植物^[1], 是联合国国际粮农组织 (FAO) 确认的唯一一种能满足人体基本营养需求的单体植物, 被正式推荐为最适宜人类的完美“全营养食品”, 具有“超级谷物”之美誉。它含有丰富的蛋白质、淀粉、脂肪、矿物质和维生素等常规营养成分, 还含有黄酮、多酚、槲皮素、皂苷、凝集素等生物活性营养成分^[2], 在抗氧化、抗癌、抗炎、降糖降脂、减肥等方面有着较为广泛的应用^[3]。

肌醇, 别称环己六醇, 广泛存在于各种动植物和微生物体内, 在荞麦、南瓜、长角豆和柑橘等农作物中均含有丰富的肌醇^[4-7]。肌醇是动物和微生物的生长因子, 其化学结构类似于葡萄糖, 因此具有多羟基化合物所具有的化学性质^[8-9], 且具有类似维生素 B₁ 和生物素的作用, 它能促进脂肪代谢, 降低体内胆固醇和甘油三酯水平, 对脂肪肝、肝硬化和糖尿病等疾病有免疫、预防和治疗的作用^[10-11]。根据 GB 14880—2012《食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准》要求, 肌醇被允许在调制乳粉 (仅限儿童用乳粉)、果蔬汁 (肉) 饮料 (包括发酵型产品等) 和风味饮料中限量添加^[12]。

目前尚未发现专门针对藜麦中肌醇含量测定

的相关报道和研究。有关文献报道的肌醇检测方法多适用于婴幼儿食品、乳品、饮料和保健食品等, 常用的检测方法有高碘酸钾氧化法^[13-14]、微生物法^[15-16]、液相色谱法^[4,17]、液相色谱-质谱法^[18]、气相色谱法^[19-21]、气相色谱-质谱法^[22-23]、毛细管电泳法^[24]、离子色谱法^[25]等。本试验在国家标准方法的基础上^[15,21], 采用硅烷化衍生法对肌醇进行衍生后, 采用气相色谱法对藜麦中肌醇的衍生物进行定性定量分析, 通过对前处理及衍生方法进行考察, 并进行系统性的方法学验证, 建立了一种准确可行的藜麦中肌醇的气相色谱测定方法, 以期对藜麦中肌醇的检测提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验仪器、试剂和材料

7890B 气相色谱仪: 带 FID 检测器, 美国 Agilent 公司; CP224S 电子天平: 德国 Sartorius 公司; Allegra 64R 离心机: 美国 Beckman Coulter 公司; 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; KQ5200B 型超声波仪: 昆山市超声仪器有限公司; 恒温热水浴槽: 北京中兴伟业仪器有限公司。

肌醇标准品 (≥99%): 美国 Sigma-Aldrich 公司; 正己烷: 美国 Fisher 公司; 无水乙醇、N,N-二甲基甲酰胺: 北京迪马科技有限公司; 三甲基氯硅烷: 梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 六甲基二硅胺烷: 瑞士 Fluka 公司。

测试样品藜麦购买于成都家乐福超市, 分别为晨亿、众恬、尚贡、仓天然和 CASA VERDE

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 四川省重点研发项目 (编号: 2019FS0526)。

作者简介: 张艳红 (1993—), 女, 四川广元人, 硕士研究生, 主要从事食品安全与质量控制研究。E-mail: 930386447@qq.com。

通信作者: 彭镰心, 男, 副教授, 研究方向为药食同源作物营养功能评价与产品开发。E-mail: penglianxin@ced.edu.cn。

GOURMET 共 5 个品牌的藜麦米。

1.2 肌醇含量测定方法

1.2.1 色谱条件和系统适应性试验 色谱柱: HP-5(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm); 氮气流速: 1.0 mL/min; 进样口温度: 280 °C; 检测器温度: 300 °C; 进样体积: 1.0 μL; 进样模式: 分流; 分流比: 10 : 1; 温度程序: 120 °C, 保持 2 min, 以 10 °C/min 升温至 280 °C, 保持 5 min。检测器: 氢火焰离子化检测器(FID)。在上述色谱条件下, 肌醇保留时间为 11 min 左右, 且达到峰形对称, 分离良好, 标准溶液图谱和藜麦样品中肌醇代表性图谱见图 1 和图 2。

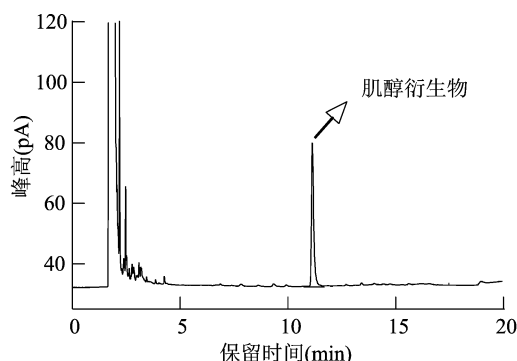


图1 肌醇浓度为 20 μg/mL 的标准溶液色谱

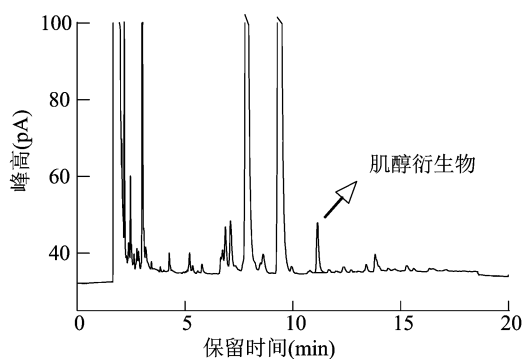


图2 样品色谱图

1.2.2 溶液配制 肌醇标准溶液: 称取 100 mg(精确到 0.1 mg) 经过 105 °C 烘干 2 h 的肌醇标准物质于 100 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇溶解并定容至刻度, 混匀, 配制成 1.0 mg/mL 肌醇标准储备液, 4 °C 条件下保存。取 1 mL 肌醇标准储备液用 70% 乙醇定容至 100 mL, 得到浓度为 10 μg/mL 的标准工作液。硅烷化试剂: 分别吸取体积比为 1 : 2 : 8 的三甲基氯硅烷、六甲基二硅胺烷、N,N-二甲基甲酰胺, 混匀, 临用现配。

1.2.3 样品前处理 (1) 试验处理。称取试样 2 g 于 25 mL 容量瓶中, 加入 2/3 体积 70% 乙醇溶液,

超声提取 30 min, 用 70% 乙醇定容至刻度, 混匀, 过滤。取过滤后溶液 5 mL 于旋转蒸发瓶中。(2) 衍生。向浓缩瓶中加入 10 mL 无水乙醇, 在 80 °C 水浴旋转浓缩至近干时再加入 5 mL 无水乙醇继续浓缩至彻底干燥。向浓缩瓶中加入 4 mL 硅烷化试剂, 溶解后转移至有螺纹盖的离心管中, 放置于 (80 ± 2) °C 水浴锅中进行衍生反应 20 min, 反应后取出冷却至室温, 加入 10 mL 水, 混匀后再加入 5 mL 正己烷, 涡旋 2 min, 离心分层后, 取上层清液供气相色谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 超声时间对肌醇含量的影响

设置超声时间为 10、20、30、40、50、60 min 进行含量测定试验, 结果见图 3。结果表明, 超声时间对藜麦中肌醇含量的影响较为明显, 肌醇含量随超声时间的延长而升高, 当超声时间到达 30 min 时, 肌醇含量达到最大, 当超声时间大于 30 min 时, 肌醇含量基本持平。因此, 确定超声时间为 30 min。

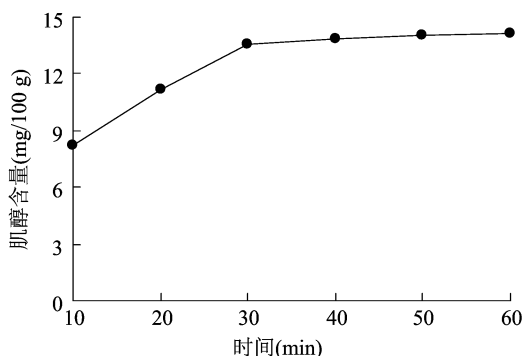


图3 不同超声时间对肌醇含量的影响

2.2 不同浓度的乙醇提取对肌醇含量的影响

试验以纯水、10% ~ 100% 乙醇(共 11 个浓度梯度)作为提取溶剂进行考察, 结果见图 4。结果表明, 不同浓度乙醇对藜麦中肌醇含量的影响较小, 总体看来, 随着乙醇浓度的升高肌醇的含量随之增加, 当乙醇浓度达到 70% 时, 从藜麦中提取的肌醇含量达到最大, 当乙醇浓度高于 70% 时, 肌醇的含量有明显的下降。因此, 选择 70% 乙醇作为提取溶剂。

2.3 硅烷化条件的考察

选择“1.2.2”节中的硅烷化试剂作为衍生化试剂, 按照“1.2.3”节的方法对藜麦进行前处理, 比较肌醇衍生物在气相色谱仪测得的峰面积, 考察硅烷化试剂用量、衍生温度和时间对藜麦中肌醇含量测

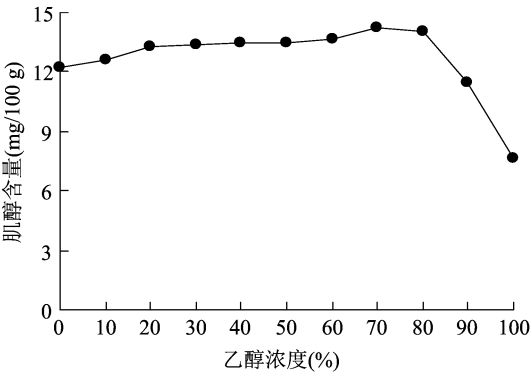


图4 不同浓度乙醇提取对肌醇含量的影响

定的影响。

2.3.1 衍生剂用量的考察 选取硅烷化试剂用量分别为 2、4、6、8、10 mL 肌醇进行衍生反应,于 80 ℃ 水浴中反应 20 min,再加入 5 mL 正己烷萃取肌醇衍生物后,上机测定,得到不同条件肌醇衍生物的峰面积响应,结果见图 5。结果显示,当硅烷化试剂用量为 4 mL 时,试样中的肌醇已经完全被衍生化,因此,选择衍生剂的用量为 4 mL。

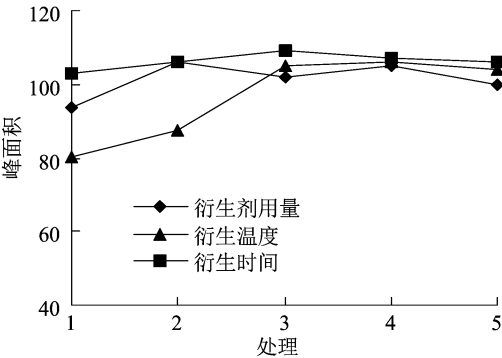


图5 不同硅烷化条件对肌醇含量的影响

2.3.2 衍生温度的考察 选择硅烷化试剂用量为 4 mL,选取衍生温度为 50、60、70、80、90 ℃,衍生反应时间为 20 min,结果见图 5。结果表明,衍生温度在 50、60 ℃ 时,肌醇衍生物的峰面积低于其他温度,70 ~ 90 ℃ 肌醇衍生物峰面积响应较高且无明显差别。有文献报道,肌醇衍生温度高于 80 ℃ 时,才生成化学结构稳定的六(三甲硅氧基)环己烷^[26],因此选择 80 ℃ 作为肌醇硅烷化衍生温度。

2.3.3 衍生时间的考察 选择衍生剂用量为 4 mL,衍生温度为 80 ℃,选取衍生时间为 5、10、20、30、40 min,结果见图 5。结果表明,随着衍生时间不断的增加,衍生物峰面积变化趋势不明显。综合考虑,确定衍生化试剂用量为 4 mL,衍生温度为 80 ℃,衍生时间为 20 min,该条件能满足藜麦中肌醇测定的衍生化反应。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

分别吸取 0.0、0.2、0.5、2.0、5.0、8.0、10.0 mL 肌醇标准工作溶液于旋转蒸发瓶中,按照“1.2.2”步骤操作,获得 0 ~ 20 μg/mL 肌醇标准系列溶液,在气相色谱条件下分析测定。以肌醇的浓度为横坐标(x),对应的峰面积为纵坐标(y),进行线性回归,以信号噪音比值(S/N)计算方法检出限(LOD)和方法定量限(LOQ),其中 3 倍 S/N 作为 LOD,10 倍 S/N 作为 LOQ,结果见表 1。

表 1 标准曲线、检出限(LOD)及定量限(LOQ)

| 化合物 | 线性回归方程 | r^2 | 检出限 (mg/100 g) | 定量限 (mg/100 g) |
|-----|----------------------|---------|-------------------|-------------------|
| 肌醇 | $y=9.958 1x-3.663 2$ | 0.999 6 | 0.5 | 1.5 |

2.4.2 精密度试验 称取 8 份藜麦样品,按本试验方法进行前处理和上机测定,结果见表 2。平均值为 13.2 mg/100 g, RSD 为 2.10%。

表 2 精密度测定结果

| 处理 | 测定结果 (mg/100 g) |
|-----------|--------------------|
| 1 | 13.4 |
| 2 | 13.0 |
| 3 | 12.9 |
| 4 | 13.6 |
| 5 | 13.2 |
| 6 | 13.1 |
| 7 | 13.4 |
| 8 | 12.8 |
| 平均值 | 13.2 |
| $RSD(\%)$ | 2.10 |

2.4.3 加标回收试验 采用标准添加法,在样品中添加 100、250、500 μg 3 个浓度梯度的肌醇进行加标回收试验,每次各浓度进行 3 个平行试验,并重复 3 次,计算加标回收率和批内、批间的 RSD 值,结果见表 3。由表 3 可知,方法回收率为 89.5% ~ 102.3%,批内和批间 RSD 值均小于 10%,表明该方法具有良好的准确性和重现性。

2.4.4 实际样品测定 采用本方法对超市购买的 5 种不同品牌藜麦的肌醇进行含量测定,肌醇的含量分别为 16.3、13.6、20.8、12.4、15.2 mg/100 g,采用该方法测定藜麦中的肌醇,能较好地进行目标物的定性和定量测定,可准确测定藜麦中的肌醇含量。

表 3 加标回收率测定结果

| 加标量 (μg) | 批次 | 回收率 (%) | | | | 批内 RSD (%) | 批间 RSD (%) |
|--------------------------|-----|---------|-------|-------|------|---------------|---------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 平均 | | |
| 100 | I | 92.3 | 100.7 | 95.8 | 96.3 | 4.4 | 3.7 |
| | II | 98.7 | 94.0 | 99.7 | 97.5 | 3.1 | |
| | III | 95.4 | 92.6 | 101.8 | 96.6 | 4.9 | |
| 250 | I | 95.8 | 91.4 | 98.2 | 95.1 | 3.6 | 3.8 |
| | II | 102.3 | 93.5 | 96.1 | 97.3 | 4.6 | |
| | III | 101.8 | 98.9 | 94.6 | 98.4 | 3.7 | |
| 500 | I | 90.7 | 95.2 | 96.8 | 94.2 | 3.4 | 4.3 |
| | II | 89.5 | 97.2 | 94.0 | 93.6 | 4.1 | |
| | III | 97.5 | 102.7 | 99.1 | 99.8 | 2.7 | |

3 结论与讨论

3.1 样品前处理方法的选择

本研究分别比较了不同超声时间、不同浓度乙醇提取和不同硅烷化衍生条件,结果以 70% 乙醇超声提取 30 min,衍生剂用量为 4 mL 在 80 ℃ 条件下衍生 20 min,肌醇的提取效率最高,衍生后上机测定的峰面积最大。

3.2 测定方法的选择

目前,有关文献报道的肌醇检测方法中,高碘酸钾氧化法适用于肌醇含量较高样品的检测,微生物法步骤繁琐,检测周期长,液相色谱法一般采用示差折光检测器和蒸发光散射检测器,该方法灵敏度低,且检测器类型不太常见,应用受到一定限制,液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法和气相色谱-质谱/质谱法灵敏度高,选择性好,但仪器价格昂贵,很多实验室不具备检测条件。

本研究建立了藜麦中肌醇的气相色谱测定方法,该方法检出限低、定量准确、灵敏度高、重复性好,可消除杂质对目标物的影响,各项技术指标均能满足日常藜麦分析检测要求,可为藜麦中肌醇测定提供可靠的检测方法依据。

参考文献:

- [1]任贵兴,杨修仕,么 杨. 中国藜麦产业现状[J]. 作物杂志, 2015(5):1-5.
- [2]陈树俊,胡 洁,庞震鹏,等. 藜麦营养成分及多酚抗氧化活性的研究进展[J]. 山西农业科学,2016,44(1):110-114,122.
- [3]申瑞玲,张文杰,董吉林,等. 藜麦的营养成分、健康促进作用及其在食品工业中的应用[J]. 中国粮油学报,2016,31(9):150-155.
- [4]宋 雨,邹 亮,赵江林,等. 苦荞萌发过程中 D-手性肌醇含量

变化的探究[J]. 食品科技,2016,41(2):80-83.

- [5]李玉丹,黄河勋,周洋洋,等. GC-MS 法同时检测南瓜果实肌醇类和单、双糖类物质的研究[J]. 食品科技,2017,42(5):279-283.
- [6]夏 涛,刘华奇,李玉灵,等. 长角豆中肌醇的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(24):10112-10114.
- [7]肖家欣,彭抒昂,何华平. 柑橘果实发育成熟中果肉游离糖、肌肌醇及钾含量的变化[J]. 中国农学通报,2005,21(6):255-258,279.
- [8]郭会灿,王素娟,郭 英. 肌醇的研究进展[J]. 河北化工,2008,31(7):5-7.
- [9]孙灵霞,陈锦屏. 肌醇生产、应用研究及前景展望[J]. 粮食与油脂,2004(11):6-8.
- [10]Bennett M, Onnebo S M, Azevedo C, et al. Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(5):552-564.
- [11]Chakraborty A, Kim S, Snyder S H. Inositol pyrophosphates as mammalian cell signals[J]. Science Signaling, 2011, 4(188):re1.
- [12]中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准:GB 14880-2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [13]迟云超,张相育,于桂云. 高碘酸钾氧化法测肌醇和甘油含量[J]. 哈尔滨科学技术大学学报,1994,17(2):94-98.
- [14]张楚富,林清华,梁 会,等. 高碘酸钠氧化法测定肌醇含量[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1996,8(2):255-257.
- [15]中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中肌醇的测定:GB 5009.270-2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [16]范 迪,张梦悦,杨 燕,等. 微生物法测定食品中的肌醇含量[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(13):3474-3478.
- [17]戴传波,李建桥,李健秀. 示差折光检测法检测肌醇含量[J]. 食品工业科技,2007,28(4):222-223.
- [18]黄传峰,张会亮,房子舒,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定功能饮料中肌醇的含量[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(4):1064-1070.
- [19]廖燕芝,黄 辉,梁 锋. 气相色谱法测定婴幼儿配方食品中肌醇的衍生方法的比较[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(17):4639-4644.

崔莉,李莹,冯进,等. 热激联合牛蒡抗热保护剂对益生菌奶粉中益生菌喷雾干燥活性的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(10):166-169.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.10.031

热激联合牛蒡抗热保护剂对益生菌奶粉中益生菌 喷雾干燥活性的影响

崔莉,李莹,冯进,柴智

(江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:提高益生菌抗热性的研究一直是工业化喷雾干燥生产益生菌奶粉的热点与难点,研究益生菌 FM-LP-4 的热激预处理条件,优化菌体经热激预处理后使用牛蒡复合抗热保护剂的喷雾干燥工艺。结果表明,适宜进行热激的益生菌培养时间段为 10~11 h,最适热激温度为 55℃,热激时间为 25 min。喷雾干燥的最优工艺为:出口温度 80℃,进口温度 170℃,进料速率 0.8 L/h,此时活菌数为 4.64×10^9 CFU/mL。热激菌体加牛蒡复合抗热保护剂经优化的喷雾干燥工艺获得益生菌奶粉,其中益生菌活菌数比对照提高约 1 个数量级。

关键词:牛蒡;益生菌;热激;喷雾干燥;奶粉

中图分类号:TS252.51 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)10-0166-04

中国已经赶超日本、美国成为全球第一大奶粉消费国。随着人们营养保健意识的不断提高和消费观念的转变,具有营养保健功能的高端乳制品日益成为新的消费引擎。益生菌奶粉为含有益生菌的奶粉,具有改善人体肠道宿主环境的作用。目前,我国市场上高档的功能性益生菌乳制品已出现,然而,大多以发酵乳的形式出现,需冷链运输,且保质期短。功能性益生菌奶粉的研制,突破了运输壁垒,扩大消费区域,具有广阔的市场化前景。

益生菌奶粉常采用将奶粉和冻干益生菌粉混合的方法制备,冷冻干燥的高成本是其瓶颈。若能

采用喷雾干燥 1 次制备益生菌奶粉,则有望大幅降低成本。喷雾干燥过程对益生菌带来脱水、氧化和热损伤,造成活菌数大量下降。有学者提出,多种方法来提升喷雾干燥益生菌的活性,主要有加强对细胞结构的保护、提升益生菌的外界应激抗性,优化喷雾干燥参数,筛选应用抗热保护剂等^[1]。益生菌在外界应激下会生成应激蛋白用于修复受损细胞,提升菌体应激抗性。热激处理是利用上述特性,通过模拟外界应激条件以增加菌体对应激环境的耐受能力,是一种较常用的提升菌体耐热能力的途径。

喷雾干燥抗热保护剂的筛选已成为相关学者关注热点,合适的保护剂能有效提高益生菌在干燥、储藏和体内消化过程等严苛环境下的存活率。Chaikham 等研究发现,益生元(菊糖、木糖和低聚果糖等)对益生菌的耐热性有保护作用^[2]。牛蒡块根富含菊糖、酚酸、黄酮、牛蒡苷及多种维生素等营养

收稿日期:2020-06-11

基金项目:江苏省苏北科技专项(编号:XZ-SZ201836)。

作者简介:崔莉(1978—),女,内蒙古鄂尔多斯人,博士,副研究员,从事营养功能食品加工关键技术研究。E-mail:clisu1@163.com。

通信作者:李莹,博士,副研究员,从事食品营养与健康研究。E-mail:hijoly@163.com。

[20]安彦新,郭金,王秀伟,等. 人血浆肌醇气相色谱质谱联用检测方法的优化及应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,25(10):28-31,83.

[21]中华人民共和国卫生部. 保健食品中肌醇的测定:GB/T 5009.196—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003

[22]招启文,张可冬,陈晓,等. 气相色谱-质谱联用测定固体运动饮料中肌醇的含量[J]. 食品工业,2017,38(7):286-288.

[23]曾静,时逸吟,张孝刚,等. 固相萃取-气相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中肌醇含量[J]. 检验检疫学刊,2014,24(2):40-

43,34.

[24]侯建霞,汪云,程宏英,等. 毛细管电泳电化学检测分离测定荞麦中的手性肌醇和肌醇[J]. 分析测试学报,2007,26(4):526-529.

[25]王波,刘阿静,王彦淳,等. 在线渗析-双柱串联离子色谱法直接检测婴幼儿乳粉中的肌醇[J]. 分析试验室,2015,34(2):212-215.

[26]黄伟雄,梁富荣. 肌醇硅烷化反应的质谱研究[J]. 华南预防医学,2002,28(6):52-53.