

LC-MS/MS 法测定农产品中甾醇类物质

LCMSMS-728

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用建立了农产品中植物甾醇的分析方法。6 种甾醇组分在 20 min 内完成分析，在 0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，使用内标法定量，线性关系良好。加标回收和精密度实验测试表明，方法重现性好 ($\text{RSD} < 5\%$)，回收率高 ($> 80\%$)，是用于测定植物甾醇的一种简便、低成本、高效且易于操作的技术。

关键词： 液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 植物甾醇 农产品

技术特点：

- ❖ 满足 GB/T 39995-2021 《甾醇类物质的测定》标准要求并具有更宽线性范围。
- ❖ 相比于 GCMS 方法，LC-MS/MS 法无需衍生，前处理更便捷。

植物甾醇是植物细胞的重要组分，农产品中，植物油是植物甾醇含量较为丰富的食品之一。甾醇被誉为“生命的钥匙”，具有十分重要的生理功能，如：保持生物内环境稳定，控制糖原和矿物质的代谢，调解应激反应，还可以拮抗胆固醇、预防心血管疾病等。

植物甾醇的分析方法很多，如：气相、气质法，但由于甾醇类物质沸点很高，如果不经衍生化，样品容易在色谱升温过程中分解，提取液直接进样重现性差，衍生化法又增加了前处理步骤，操作繁琐。而液相色谱-

串联质谱 (LC-MS/MS) 法不仅检测灵敏度高，还可通过二级选择离子获得很高的选择性，是非挥发性成分定性、定量测定的有效手段，同时采用 LC-MS/MS 法可不经衍生生化直接测定植物中的游离甾醇含量，与衍生化气相色谱法相比，样品前处理大大简化，被广泛应用。

GB/T 39995-2021 《甾醇类物质的测定》采用配 APCI 源的 LC-MS/MS 进行甾醇测定，本实验参考该标准建立了农产品中甾醇类物质的高效液相色谱 - 串联质谱检测方法，可为相关从业人员提供参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40A	自动进样器：	SIL-40C XR
输液泵：	LC-40D XR x2	质谱仪：	LCMS-8045
柱温箱：	CTO-40C	在线脱气机：	DGU-405
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.99		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：C18 柱 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.7 μm)
 流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液，B 相 --0.1% 甲酸甲醇
 流速：0.3 mL/min
 柱温：40°C
 进样体积：2 μL
 洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 80%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.01	Pumps	Pump B Conc.	80
20.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源	: APCI (+)	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	接口温度	: 350°C
干燥气	: 氮气 5.0 L/min	DL管温度	: 200°C
碰撞气	: 氩气	加热模块温度	: 200°C
MRM参数	: 见表 2		

表 2 MRM 优化参数

序号	化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	菜籽甾醇	474-67-9	381.45	69.05*	-14	-30	-12
				255.60	-28	-12	-28
2	岩藻甾醇	17605-67-3	395.35	161.20*	-28	-22	-30
				297.10	-30	-14	-30
3	羊毛甾醇	79-63-0	409.40	191.25*	-30	-12	-13
				109.10	-30	-30	-20
4	豆甾醇	83-48-7	395.40	83.10*	-15	-21	-16
				55.00	-15	-40	-25
5	菜油甾醇	474-62-4	383.40	161.30*	-12	-20	-16
				135.30	-27	-23	-29
6	β-谷甾醇	83-46-5	397.40	161.00*	-15	-26	-15
				81.00	-15	-38	-15
7	6-酮胆甾烷醇	1175-06-0	385.40	367.35*	-12	-13	-13
				159.20	-28	-24	-16

* 表示定量离子

1.3 校准品及样品制备

分别称取适量标准品，用无水乙醇溶解，配制成 2 mg/mL 的单标储备液。各移取 1 mL 的单标储备液，用无水乙醇定容至 10 mL，配制成浓度为 200 μg/mL 的混合标准中间液。移取 50 μL 6-酮胆甾烷醇标准储备液，用无水乙醇定容至 10 mL，配制成内标物中间液。准确移取适量混合标准中间液，加入内标物中间液，使用无水乙醇配制成 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 μg/mL 系列浓度的混合标准工作液，内标 6-酮胆甾烷醇的质量浓度为 1 μg/mL。

1.4 样品前处理

称取 0.2 g 样品（精确至 0.01 g）于具塞离心管中，加入适当内标物中间液，加入 35 mL 无水乙醇，加盖后涡旋 1 min，超声提取 20 min，8000 r/min 离心 5 min，移取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，供测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准品溶液的 MRM 色谱图

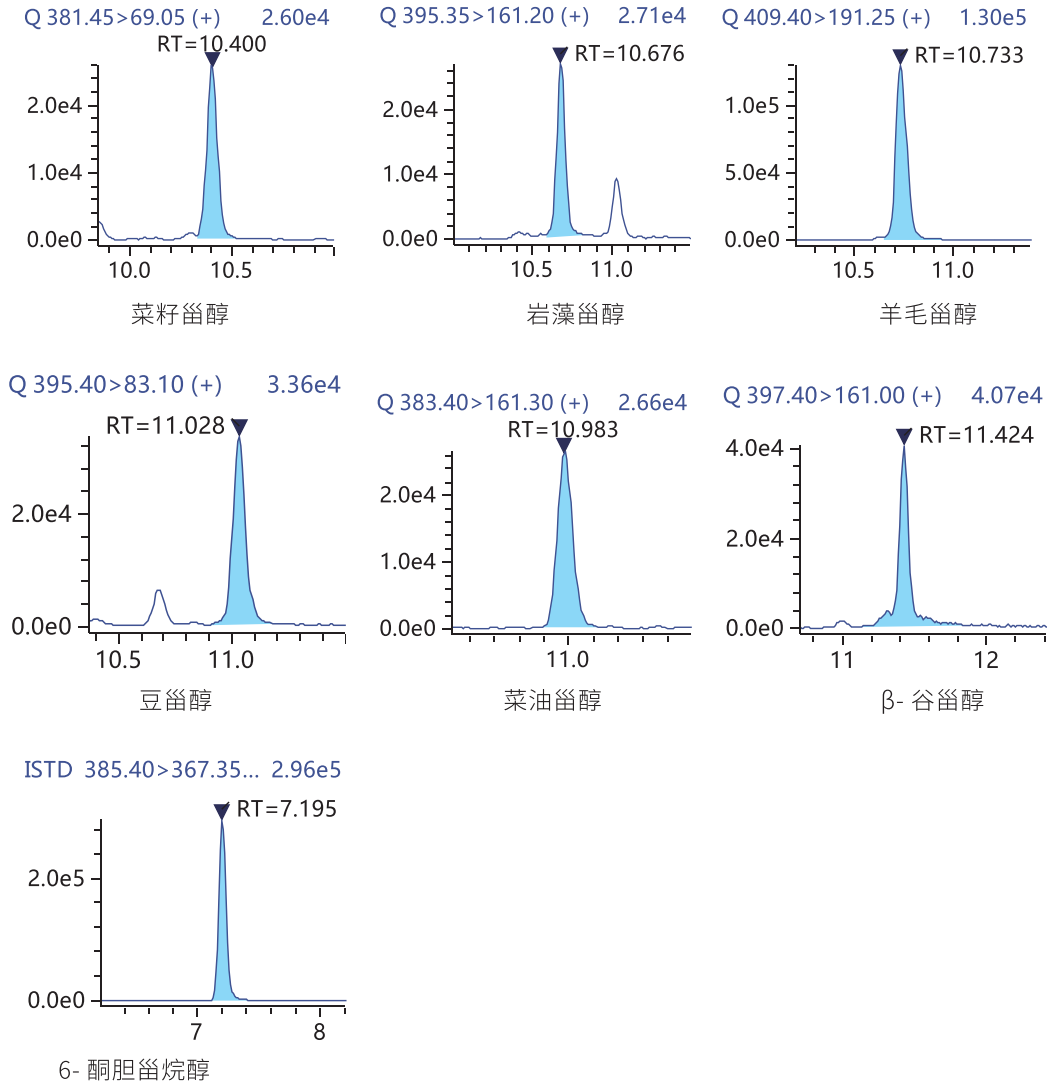
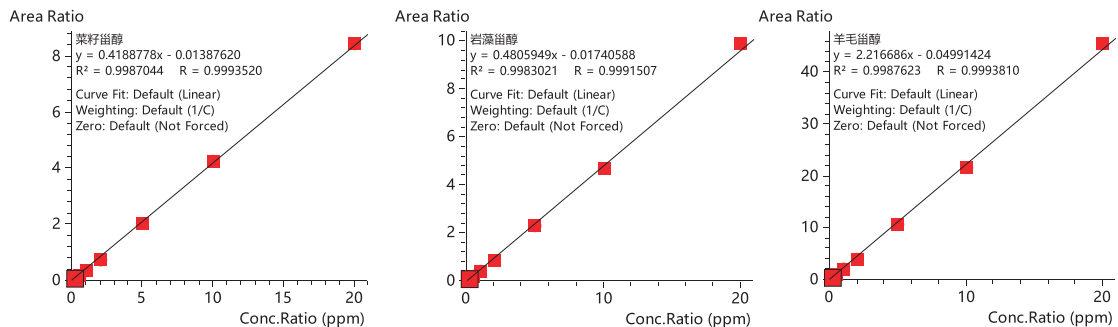


图 1 6 种甾醇标准品溶液 (0.2 μg/mL) 和内标 6-酮胆甾烷醇 (1 μg/mL) 的 MRM 色谱图

2.2 校准曲线、检出限和定量限

按照 1.2 项下分析条件, 对系列浓度的混合标准工作液进行样分析, 内标法定量。以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 绘制校准曲线如图 2 所示。6 种标准物质在校准曲线浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.999。使用 1.3 中配置的最低浓度点标准溶液进行分析甾醇物质最低定量限 ($S/N=10$, LOQ 表示) 计算, 结果如表 3 所示。



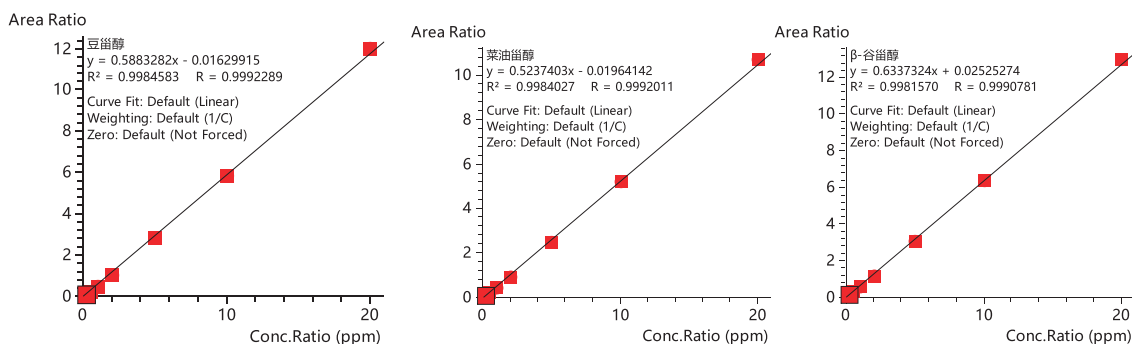


图 2 标准品溶液校准曲线

表 3 校准曲线、定量限信息

序号	化合物	校准曲线	相关系数 r	定量限 (µg/mL)
1	菜籽甾醇	Y=0.4188778X-0.01387620	0.9994	0.032
2	岩藻甾醇	Y=0.4805949X-0.01740588	0.9992	0.036
3	羊毛甾醇	Y=2.216686X-0.04991424	0.9994	0.008
4	豆甾醇	Y=0.5883282X-0.01629915	0.9992	0.056
5	菜油甾醇	Y=0.5237403X-0.01964142	0.9992	0.029
6	β-谷甾醇	Y=0.6337324X+0.02525274	0.9991	0.061

2.3 精密度

0.2 µg/mL 的标准溶液连续测定 6 次，考察仪器精密度，所得结果见表 4。结果显示，保留时间的 RSD 分别为 0.03% ~ 0.04% 之间，峰面积的 RSD 分别为 1.04% ~ 3.93% 之间，仪器精密度良好。

表 4 精密度考察结果 (n=6)

序号	化合物	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1	菜籽甾醇	0.03	2.56
2	岩藻甾醇	0.04	2.61
3	羊毛甾醇	0.03	1.74
4	豆甾醇	0.03	3.91
5	菜油甾醇	0.04	1.04
6	β-谷甾醇	0.04	3.57

2.4 实际样品测定

采购市售菜籽油样品 1 份，按照 1.4 样品前处理方式及 1.2 分析条件进行测定，平行测定 3 次，测定结果见表 5。

表 5 样品测定结果 (n=3)

序号	化合物	实测浓度 (mg/kg)	RSD (%)
1	菜籽甾醇	397.19	2.37
2	岩藻甾醇	129.85	1.85

3	羊毛甾醇	N.D.	N.D.
4	豆甾醇	102.43	1.54
5	菜油甾醇	882.70	3.24
6	β -谷甾醇	1525.07	3.57
	SUM	3037.24	

N.D. 表示未检出。

2.5 回收率

取菜籽油样品，加入适量混合标准中间液和内标物中间液，使得加标浓度为 875 mg/kg，平行 3 份，按照 1.4 样品前处理方式处理，上机测定，扣减基质样品含量后计算回收率。结果如表 5 所示，加标回收率在 83.6%~113.8% 之间。

表 6 加标回收率结果 (n=3)

序号	化合物	回收率 (%)	RSD (%)
1	菜籽甾醇	113.8	0.26
2	岩藻甾醇	104.6	1.40
3	羊毛甾醇	95.5	1.68
4	豆甾醇	104.7	0.29
5	菜油甾醇	104.1	1.38
6	β -谷甾醇	83.6	1.53

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用建立了农产品中植物甾醇的分析方法。使用内标法定量，在 0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，线性相关系数大于 0.999。0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准溶液连续六针进样，保留时间 RSD < 0.04%，峰面积的 RSD < 3.93%，且加标回收率良好。该方法灵敏度高，专属性强，适用于农产品、食用油中的植物甾醇分析，可为相关检测人员提供参考。

岛津应用云

