



中华人民共和国国家标准

GB/T 39995—2021

甾醇类物质的测定

Determination of sterols

2021-04-30 发布

2021-11-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
甾醇类物质的测定
GB/T 39995—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2021年4月第一版

*

书号: 155066 • 1-67034

版权专有 侵权必究

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：中国测试技术研究院生物研究所、中国计量大学、四川大学、惠州市食品药品检验所、北京工商大学、浙江省检验检疫科学技术研究院、河北省食品检验研究院、北京萨姆博科技有限公司。

本文件主要起草人：冯德建、张雅芬、李延芳、吴微、叶子弘、黄秀丽、王晓琴、马爱进、李怀平、俞晓平、黄超群、叶善蓉、周李华、崔海峰、许益鹏、申屠旭萍、李翼、陈丽、吴娟、贾英民、张岩、郝帅。

甾醇类物质的测定

1 范围

本文件规定了甾醇类物质的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于猪油、菜籽油、核桃、山楂、油麦菜、葛根、大米、小麦、黑青豆中游离态的胆甾烷醇、菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、岩藻甾醇、羊毛甾醇、豆甾烷醇、麦角甾醇含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 15687 动植物油脂 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

甾醇类物质 sterols

一类含环戊烷骈多氢菲碳架结构的化合物。

4 原理

样品经无水乙醇回流提取，提取液过 0.22 μm 尼龙滤膜后供液相色谱-质谱/质谱仪测定，标准曲线内标法定量。

5 试剂或材料

除非另有说明，本方法使用的试剂均为分析纯。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 甲醇：色谱纯。

5.2 无水乙醇：色谱纯。

5.3 甾醇标准品：胆甾烷醇、菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇、岩藻甾醇、羊毛甾醇、豆甾烷醇、麦角甾醇、6-酮胆甾烷醇，化合物信息参见附录 A 中表 A.1，纯度均 $\geq 93\%$ 。

5.4 内标储备液：准确称取适量 6-酮胆甾烷醇标准品（精确至 0.01 mg），用无水乙醇溶解并配制成质量浓度为 500 mg/L 的内标储备溶液，于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存备用，有效期为 1 个月。

5.5 内标工作溶液：准确移取内标储备液 2.0 mL 于 1000 mL 容量瓶中，加无水乙醇稀释并定容至刻度，混匀，配制成质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 内标工作溶液，现配现用。

5.6 甾醇单一标准储备液：分别准确称取适量的甾醇标准品（精确至 0.01 mg），用无水乙醇溶解并配制

成质量浓度均为 500 mg/L 的甾醇单一标准储备溶液,于 0℃~4℃下避光保存备用,有效期为 1 个月。

5.7 甾醇混合标准溶液:分别准确移取各甾醇单一标准储备液 2.0 mL 于 50 mL 具塞离心管中,于 40℃ 下氮气吹干,准确加入 10 mL 内标工作溶液复溶,混匀,配制成质量浓度均为 100 mg/L 的甾醇混合标准溶液,现配现用。

5.8 甾醇混合标准工作溶液:准确移取适量甾醇混合标准溶液,用内标工作溶液稀释配制成质量浓度分别为 20 mg/L、10 mg/L、5 mg/L、2.5 mg/L、1.0 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L 的系列甾醇混合标准工作溶液,现配现用。

5.9 0.22 μm 尼龙滤膜。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-质谱/质谱仪(LC-MS/MS):配大气压化学离子源(APCI)。

6.2 分析天平:感量为 0.000 1 g、0.01 g 和 0.01 mg。

6.3 涡旋混匀器。

6.4 回流冷凝装置。

6.5 氮吹仪。

6.6 粉碎机。

6.7 匀浆机。

6.8 离心机。

7 样品

7.1 猪油、菜籽油

按 GB/T 15687 的规定进行制备。

7.2 核桃、山楂、大米、小麦、油麦菜、葛根、黑青豆

取核桃、山楂、大米、小麦、黑青豆等有代表性干制样品约 1 kg,用粉碎机粉碎,混匀,制备好的试样均分成两份,装入洁净的盛样容器内,密封并标识,于 0℃~4℃下避光保存,尽快测定。

取油麦菜、葛根等有代表性新鲜样品约 1 kg,用匀浆机制成匀浆,制备好的试样均分成两份,装入洁净的盛样容器内,密封并标识,现制现用。

8 试验步骤

8.1 试样处理

8.1.1 猪油、菜籽油

称取试样 0.4 g(精确至 0.001 g)于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 70 mL 内标工作溶液(5.5),称重,充分混匀后放入回流冷凝器中,加热并保持提取液微沸,30 min 后停止加热并冷却至室温,用无水乙醇(5.2)补足失重,混匀,吸取 5 mL 提取液于 8 000 r/min 下离心 5 min,取 2 mL 上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜,待测。

8.1.2 核桃、山楂、大米、小麦、油麦菜、葛根、黑青豆

称取试样 1.0 g(精确至 0.001 g)于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 70 mL 内标工作溶液(5.5),称重,充

分混匀后放入回流冷凝器中,加热并保持提取液微沸,30 min 后停止加热并冷却至室温,用无水乙醇(5.2)补足失重,混匀,吸取 5 mL 提取液于 8 000 r/min 下离心 5 min,取 2 mL 上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜,待测。

8.2 测定

8.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下所示:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,1.8 μm ,3.0 mm \times 150 mm,或同等性能的色谱柱;
- b) 流动相:流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速:0.5 mL/min;
- d) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:5 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%
0	20	80
15	0	100
30	0	100
30.1	20	80
40	20	80

注:不同型号仪器可做适当调整。

8.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下所示:

- a) 离子源:大气压化学离子源(APCI);
- b) 扫描方式:正离子模式;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 干燥气、雾化气、碰撞气均为高纯氮气;使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求,参考条件参见附录 B;
- e) 喷雾电压、源内碎裂电压、碰撞气能量等参数应优化至最佳灵敏度,参考条件参见附录 B。

注:不同型号仪器可做适当调整。

8.2.3 定性测定

在相同试验条件(见 8.2.1、8.2.2)下进行样品测定时,如果样品中待测物质的保留时间与标准工作溶液中对应的保留时间一致(变化范围在 $\pm 2.5\%$ 以内),且样品谱图中被测组分监测离子的相对丰度和标准品的相对丰度一致,允许偏差不超过表 2 规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的相对偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

8.2.4 定量测定

在相同试验条件(8.2.1、8.2.2),将甾醇系列混合标准工作溶液由低到高浓度依次进样分析,以被测物和内标物的定量离子峰面积之比为纵坐标,以被测物浓度为横坐标,绘制内标标准工作曲线,用内标标准工作曲线对样品进行定量,应使样品溶液中各被测物的响应值在仪器测定的线性范围内,如果含量超过标准工作曲线范围,应稀释到合适浓度后再进样分析。在上述条件下,各甾醇类物质的参考保留时间参见附录 B 中表 B.1,多反应监测图参见附录 C。

8.3 平行试验

按 8.1 和 8.2 的规定对同一试样进行两次平行测定。

9 试验数据处理

样品中待测物含量的计算见式(1):

$$X = \frac{\rho \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中被测组分含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ —— 从内标标准工作曲线上得到的被测组分溶液质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V —— 试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的质量,单位为克(g)。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留两位小数。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

11 其他

本方法测定 9 种甾醇的定量限参见表 A.1。

附 录 A

(资料性)

甾醇化合物信息及定量限

甾醇化合物信息及定量限见表 A.1。

表 A.1 甾醇化合物信息及定量限

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量	定量限/(mg/kg)	
						猪油、菜籽油	核桃、山楂、葛根、油麦菜、大米、小麦、黑青豆
1	麦角甾醇	Ergosterol	57-87-4	$C_{28}H_{44}O$	396.7	3.50	0.70
2	菜籽甾醇	Brassicasterol	474-67-9	$C_{28}H_{46}O$	398.7	3.50	0.70
3	岩藻甾醇	Fucosterol	17605-67-3	$C_{29}H_{48}O$	412.7	3.50	0.70
4	羊毛甾醇	Lanosterol	79-63-0	$C_{30}H_{50}O$	426.7	3.50	0.70
5	胆甾烷醇	β -Cholestanol	80-97-7	$C_{27}H_{48}O$	388.7	3.50	0.70
6	豆甾醇	Stigmasterol	83-48-7	$C_{29}H_{48}O$	412.7	140.00	28.00
7	菜油甾醇	Campesterol	474-62-4	$C_{28}H_{48}O$	400.7	3.50	0.70
8	β -谷甾醇	β -Sitosterol	83-46-5	$C_{29}H_{50}O$	414.7	3.50	0.70
9	豆甾烷醇	Stigmastanol	19466-47-8	$C_{29}H_{52}O$	416.7	35.00	7.00
10	6-酮胆甾烷醇	6-Ketocholestanol	1175-06-0	$C_{27}H_{46}O_2$	402.7	—	—

附录 B

(资料性)

液相色谱-质谱/质谱参数参考条件

参考质谱条件如下:

- a) 离子源:大气压化学离子源(APCI);
- b) 扫描方式:正离子模式;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 干燥气、雾化气、碰撞气均为高纯氮气;
- e) 雾化气压力:0.14 MPa(20 psi);
- f) 离子喷雾电压:3 000 V;
- g) 电晕针电流:4 μ A;
- h) 干燥气温度:350 $^{\circ}$ C;
- i) 雾化器温度:350 $^{\circ}$ C;
- j) 干燥气流速:5.0 L/min;
- k) 定量离子对、定性离子对、碰撞气能量和源内碎裂电压见表 B.1。

表 B.1 10 种甾醇的保留时间、监测离子对、碰撞气能量和源内碎裂电压

序号	中文名称	保留时间/min	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	碰撞气能量/V	源内碎裂电压/V
1	麦角甾醇	16.64	379.4/69.0	379.4/69.0;379.4/125.0	25;10	125
2	菜籽甾醇	17.39	381.4/69.0	381.4/147.0;381.4/69.0	25;35	115
3	岩藻甾醇	17.87	395.5/81.0	395.5/81.0;395.5/147.0	40;30	95
4	羊毛甾醇	18.15	409.4/109.0	409.4/109.0;409.4/149.0	30;25	120
5	胆甾烷醇	18.20	371.4/81.1	371.4/81.1;371.4/109.0	40;25	110
6	豆甾醇	18.32	411.3/109.0	411.3/109.0;411.3/139.0	25;10	100
7	菜油甾醇	18.36	383.4/161.1	383.4/161.1;383.4/95.1	20;40	130
8	β -谷甾醇	19.16	397.5/161.0	397.5/161.0;397.5/135.1	25;25	100
9	豆甾烷醇	19.98	399.5/81.1	399.5/81.1;399.5/149.0	40;20	105
10	6-酮胆甾烷醇	13.13	385.3/367.4	385.3/367.4;385.3/159.2	10;25	160

注:所列参数是在 Agilent 6460 质谱仪上完成的,列出试验用仪器型号仅供参考,标准使用者可采用不同厂家或型号的仪器。

附录 C

(资料性)

10 种甾醇的 LC-MS/MS 多反应监测图

10 种甾醇的 LC-MS/MS 多反应监测图见图 C.1~图 C.10。

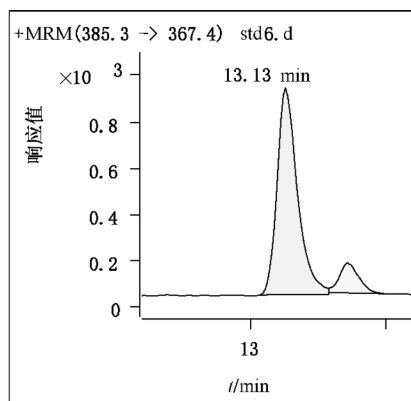


图 C.1 6-酮胆甾烷醇的 MRM 图

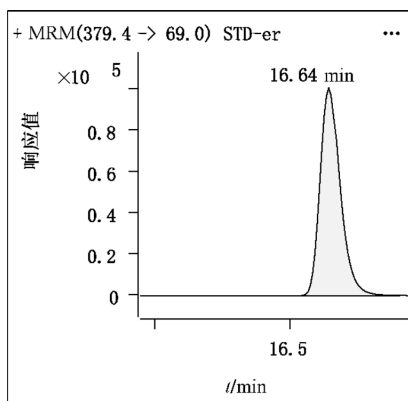


图 C.2 麦角甾醇的 MRM 图

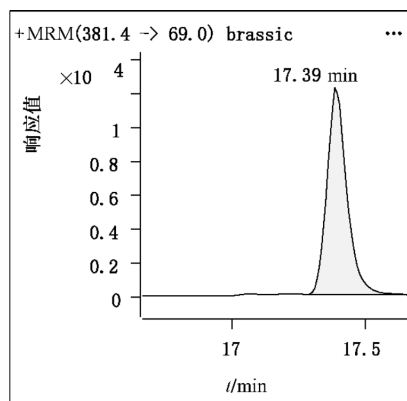


图 C.3 菜籽甾醇的 MRM 图

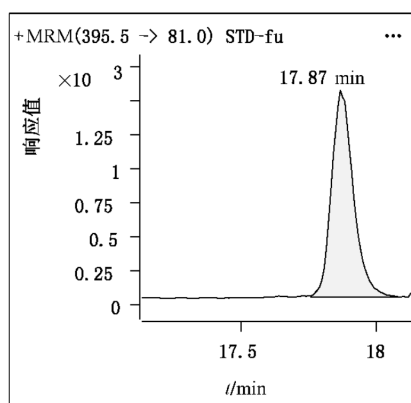


图 C.4 岩藻甾醇的 MRM 图

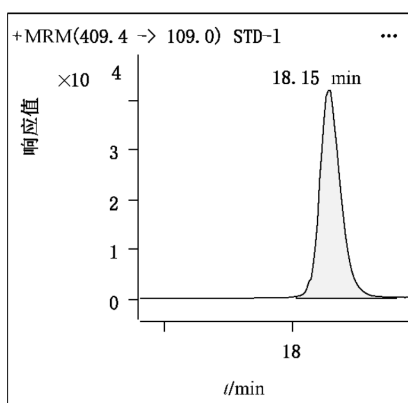


图 C.5 羊毛甾醇的 MRM 图

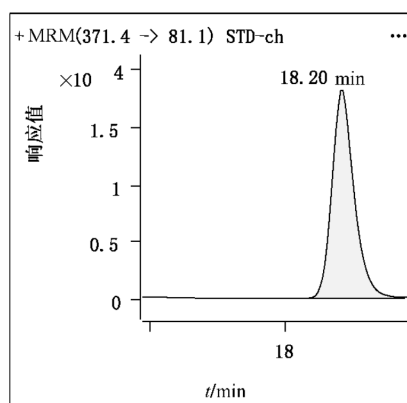


图 C.6 胆甾烷醇的 MRM 图

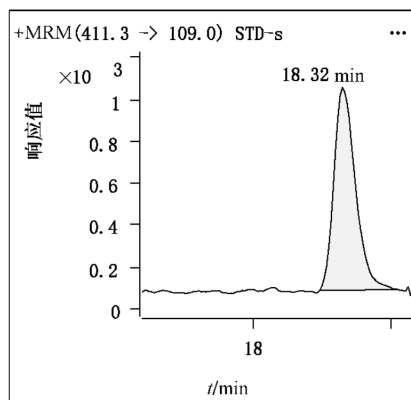


图 C.7 豆甾醇的 MRM 图

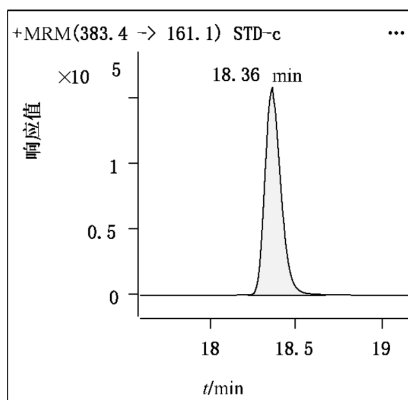
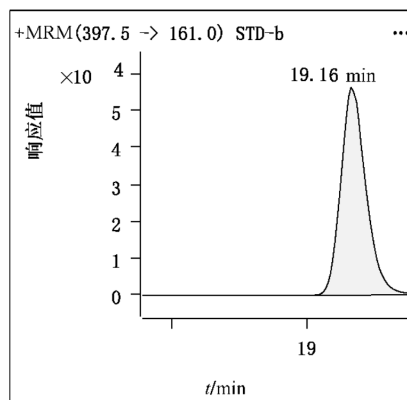


图 C.8 菜油甾醇的 MRM 图

图 C.9 β -谷甾醇的 MRM 图

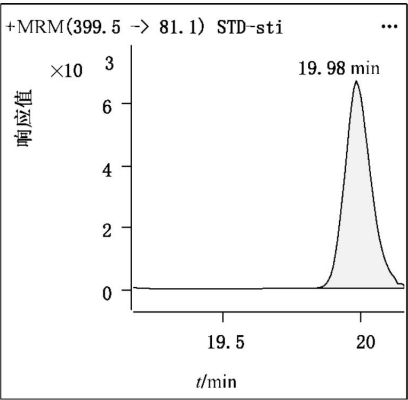
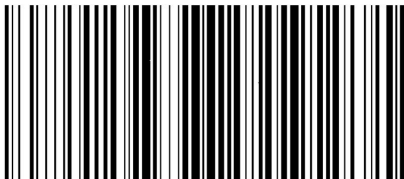


图 C.10 1-辛醇的 MRM 图



GB/T 39995-2021



码上扫一扫 正版服务到

版权专有 侵权必究

*

书号:155066 • 1-67034