

反相超效液相色谱-质谱联用分离分析食用油中的甘油三酯

何榕 山晓琳 董方圆 许旭*

(上海应用技术学院 化学与环境工程学院,上海 201418)

摘 要 采用反相超效液相色谱-质谱联用的方法分离分析食用油中的甘油三酯。使用总长 40 cm 的串联超效 C₁₈ 色谱柱 (10 cm + 15 cm + 15 cm),以乙腈-异丙醇 (50:50, V/V) 为流动相,流速 0.2 mL/min,柱温 25°C,在大约 74 MPa 的高柱压下分离,APCI 离子化-质谱检测。食用油以异丙醇溶解后直接进样。实现了对食用油中甘油三酯组分的更精细区分,获得了玉米油、大豆油、花生油、葵花籽油、稻米油、橄榄油和芝麻油等市售食用油中甘油三酯组成的谱图。结果显示,甘油三酯在相同食用油中的组成相似,而在不同食用油中的组成存在差异。采用本方法,通过差异的色谱峰可直接识别出大豆油中掺入的 5% 猪油。本方法为识别掺假食用油提供了有价值的途径。

关键词 反相超效液相色谱-质谱联用; 甘油三酯; 食用油

1 引言

三脂肪酸甘油酯(甘油三酯)由 1 个甘油分子与 3 个脂肪酸分子结合成酯而成,是食用油的主要成分。根据碳链的长度以及不饱和度,脂肪酸的种类可高达 800 余种。动物及植物油脂主要集中在含有 0~3 个双键的 C₈~C₂₆ 的直链脂肪酸,同时由于结合位置的不固定,导致了甘油三酯的种类相较脂肪酸更趋向于复杂多样^[1]。但常见动物油和植物油中主要存在的仅是含有 C₁₆ 和 C₁₈ 的甘油三酯,如脂肪酸为棕榈酸(C_{16:0},P)、硬脂酸(C_{18:0},S)、油酸(C_{18:1},O)、亚油酸(C_{18:2},L)、亚麻酸(C_{18:3},Ln)的甘油三酯。其它脂肪酸的甘油三酯含量普遍较低。

目前,在世界范围内广泛存在着食用油掺杂的问题,在中国尤以地沟油掺杂问题备受关注^[2~4],甘油三酯作为食用油的主要成分,对其进行分离分析是一个值得关注的研究方向。高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)在分离分析甘油三酯方面具有独特的优势,不同的液相色谱柱可以对甘油三酯形成不同程度的分离,高灵敏质谱检测器为分离后的定性识别与定量分析提供了重要条件。目前,用于分析甘油三酯的质谱离子源有 ESI 与 APCI 两种离子源。ESI 源适用于检测中等极性以及强极性的化合物,在使用 ESI 源时可利用多级质谱通过将甘油三酯分子打碎后得到的子离子峰,获得对甘油三酯更好的定性分析结果^[5,6]。通常使用 ESI 源时需要在流动相中加入盐类才会有好的离子化效果^[7~9]。APCI 源适用于弱极性化合物的检测,甘油三酯在 APCI 源中主要形成 3 种类型的碎片离子:酰基离子(RCO)⁺、单酰基甘油离子(M+H-RCOOH-RCO)⁺和二酰基甘油离子(M+H-RCOOH)⁺。根据这些碎片离子峰的特征,可以确定甘油三酯的结构^[10~13]。

本实验使用串联长柱建立了超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)分析食用油中甘油三酯组成的方法。与普通的 HPLC 分离相比,本方法可以简便地对食用油中的甘油三酯实现更精细的分离分析,从而可根据不同食用油之间甘油三酯的精细差异,区分常见食用油,并可检测掺入少量猪油的大豆油。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LCMS 2020 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括脱气机、两个 LC-30AD 泵、CTO-30A 柱温箱、SIL-30AC 自动进样器、SPD-M20A 二极管阵列检测器及使用 APCI 源的质谱检测器。数据分析软件

2015-04-01 收稿; 2015-06-09 接受

本文系上海市自然科学基金(No. 15ZR1440800)资助项目

* E-mail: xuxu3426@sina.com

采用 LabSolution software (version 5.53)。

三油酸甘油三酯、乙腈(HPLC 级)、异丙醇(HPLC 级) 均购自国药集团化学试剂有限公司。食用油样品除猪油为自制外, 其它均购自本地超市。

2.2 实验方法

2.2.1 样品及其准备 (1) 液体样品 移取 10 μL 样品溶于 1000 μL 异丙醇中, 浓度为 1% (V/V), 直接进样。(2) 固体样品 称取 0.5 g 溶解于 50 mL 正己烷中, 浓度为 1% (w/V), 直接进样。

2.2.2 色谱与质谱条件 液相色谱条件: Thermo Synchronis C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) 与两根月旭 Ultimate UHPLC XB- C_{18} (150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱串联。流速为 0.2 mL/min, 流动相为乙腈-异丙醇(50: 50, V/V) 等度洗脱。进样量为 1 μL 。

质谱条件: APCI 电离源, 正离子电离模式, 质荷比(m/z) 范围 300 ~ 1050, 雾化气流速 2.5 L/min, 干燥气流速 5 L/min, APCI 温度 250 $^{\circ}\text{C}$, DL 温度 250 $^{\circ}\text{C}$, Heat 温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 检测器电压 1.05 kV。

3 结果与讨论

3.1 实验条件优化

使用单根 C_{18} 超效柱(Thermo Synchronis C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)) 玉米油的 LC-MS 分离总离子流谱图见图 1A。其中有 6 个甘油三酯的峰, 根据所得到的质谱图, 推测出其主要的甘油三酯类型为峰 1 为 LLLn; 峰 2 可能包括 LnSLn/LOLn/LLL; 峰 3 包括 PLL/POL/OLL, 峰 4 包括 POL/SLnO/OOL/SLL; 峰 5 为 POO/PLS/OOO/SLO/SLnS; 峰 6 为 SOO/SSL/POS。不同碳当量数(为碳数减去两倍双键数) 的甘油三酯得到了很好的分离, 但根据峰 2, 3, 4, 5, 6 可以推测, 多种拥有相同碳当量数而双键数不同的甘油三酯依然无法分离。改用 3 根 C_{18} 超效色谱柱串联分离玉米油得到的色谱图见图 1B, 原先未完全分离的峰 2, 3, 4, 5, 6 又分离出多个甘油三酯的峰。

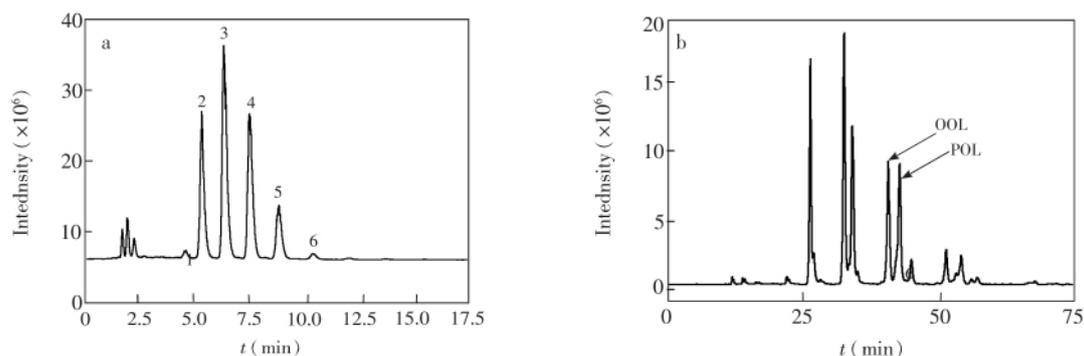


图 1 C_{18} 超效柱对玉米油(A: 单根色谱柱, B: 3 根色谱柱) 分离后的总离子流图

Fig. 1 TIC chromatogram of corn oil by C_{18} Chromatographic column (A: one column, B: three columns)

OOL: rac-1,2-dioleoyl-3-linoleoyl-glycerol; ROL: rac-1-palmitoyl-2-oleoyl-glycerol

由图 1B 可见, 在玉米油中共分离出了 13 个峰, 其中 9 个较大的峰可以根据其质谱图推测出其甘油三酯的结构, 分别为: LLL, OLL, PLL, OOL, POL, PPL, OOO, POO, PPO。

考察流动相、温度以及流速对玉米油分离和柱压的影响(表 1)。增加流动相中异丙醇的量可以减小保留时间, 但分离(R_s 为 OOL 与 POL 两峰之间的分离度) 变差, 系统的压力也较大; 当流动相为 40% 异丙醇时, 分离度很好且压力也较低, 但出峰时间太长。温度增高, 保留变小, 但分离度下降, 显示降低温度有益于甘油三酯的分离。由于常温条件(25 $^{\circ}\text{C}$) 下可以实现很好的分离, 故本实验选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 。增大流速有利分离, 但流速在 0.25 mL/min 时压力已达 95 MPa, 因而流速选择 0.2 mL/min。

综上所述, 本实验选用 UPLC 的实验条件为: 流动相为 50% 异丙醇、流速 0.2 mL/min、柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 此时分离度约为 3.82, 系统压力约为 74 MPa。

实验中, 质谱条件 APCI 温度、DL 温度及 Heat 温度的改变对结果有较大影响, 升高 APCI 源温度时,

信噪比很差; 温度降低则会不出峰。本实验直接选取仪器自动调谐后的 APCI 温度、DL 温度以及 Heat 温度进行实验。

表1 不同条件下玉米油中 OOL 和 POL 的保留时间、分离度以及系统压力

Table 1 Retention time, resolution and pressure of OOL and POL in corn oil under different conditions

条件 Condition	保留时间 Retention time (min)		分离度 Resolution (R_s)	压力 Pressure (MPa)
	OOL	POL		
柱温 Column temperature ^a (°C)	15	57.47	4.52	88
	20	53.11	3.78	78
	25	49.65	3.82	74
	30	42.07	3.22	67
	40	32.86	1.82	59
	50	26.15	1.79	52
流速 Flow rate ^b (mL/min)	0.1	75.37	3.47	33
	0.15	56.18	3.46	55
	0.2	49.65	3.82	74
	0.25	35.82	4.65	95
流动相 Mobile phase (异丙醇的比例 Ratio of isopropanol) ^c	40%	63.97	9.59	55
	50%	49.65	3.82	74
	60%	24.16	2.35	88

注: a, 流速 0.2 mL/min 流动相为 50% 的异丙醇; b, 柱温 25°C 流动相为 50% 的异丙醇; c, 柱温 25°C 流速 0.2 mL/min。

a, Flow rate is 0.2 mL/min, mobile phase is 50% isopropanol; b, Column temperature is 25°C, mobile phase is 50% isopropanol; c, Column temperature is 25°C, flow rate is 0.2 mL/min.

3.2 重复性、线性关系与检出限

使用 1% (V/V) 三油酸甘油酯样品, 按 2.2 节进行操作, 并分别重复 5 次, 计算得到 1% (V/V) 三油酸甘油酯组分峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 4.9%。

使用 2.2 节方法分别配制浓度为 0.05% ~ 1% (V/V) 的三油酸甘油酯样品进行分析, 得到峰面积-浓度的线性方程为 $y = 1.07 \times 10^7 + 2.06 \times 10^8 x$, 相关系数 0.9987。以 0.01% (V/V) 三油酸甘油酯为样品分析得到的信噪比 (S/N) 为 5.48, 显示本方法对三油酸甘油酯的检测限低于 0.01% (V/V)。

3.3 食用油样品的分析

3.3.1 不同厂家玉米油的分析 图 2 显示了不同厂家玉米油的分析结果。从图 2 可见, 相同的玉米油拥有相似的甘油三酯类型和含量, 仅在某些峰的面积上存在细微差别。

3.3.2 不同种类食用油的分析 不同种类的食用油之间显示出一些明显的差异, 如图 2 的玉米油与图 3 中的花生油、葵花籽油、稻米油、橄榄油和芝麻油, 以及图 4 中大豆油的谱图。不同种类食用油之间在甘油三酯得到精细分离后存在明显区别, 其中橄榄油与其它食用油之间的区别最为明显, 而大豆油与玉米油之间的区别最小。

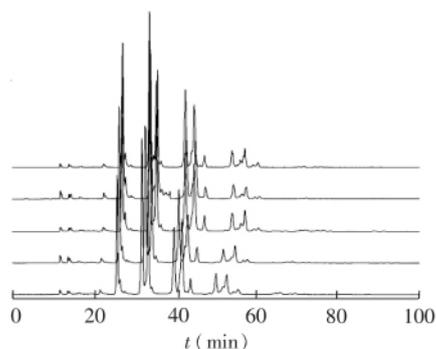


图2 不同厂家玉米油的分析结果

Fig. 2 TIC chromatograms of different corn oils

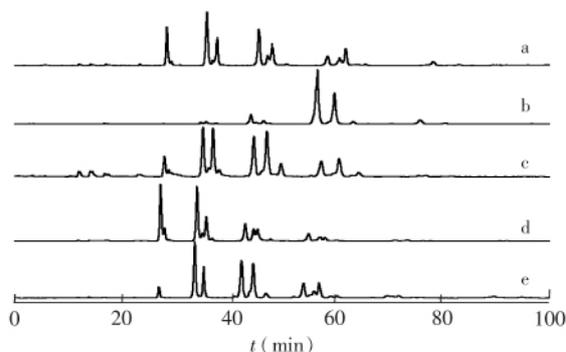


图3 不同类型食用油(a: 花生油, b: 葵花籽油, c: 稻米油, d: 橄榄油, e: 芝麻油)的分析结果

Fig. 3 TIC chromatograms of different oils (a: peanut oil; b: sunflower seed oil; c: rice oil; d: olive oil; e: sesame oil)

放大玉米油和大豆油的总离子流谱图进行比较(图4)。可以看出,大豆油在保留时间 22 和 29 min 左右有两个峰明显大于玉米油相应位置的峰,其峰强度相差超过 10 倍。在 27 min 附近(图中虚线),玉米油有两个峰,而大豆油有 5 个峰;在 35 min 左右,玉米油和大豆油有相似的 4 个峰;在 42~50 min,玉米油和大豆油都有明显的 4 个峰,但 45 min 的峰具有不同的面积(图中大豆油该峰的保留时间有少量延迟)。因此,可以通过保留时间在 22 和 29 min 的峰识别两种相似的食用油。其它差异较大的食用油可以更容易地在图 2、图 3 和图 4 中识别出特征。这为不同食用油的区分和识别提供了条件。

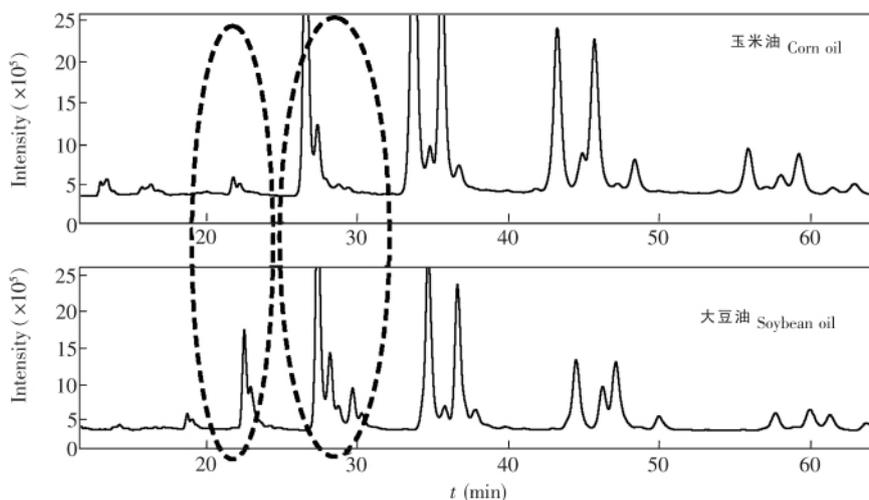


图 4 玉米油和大豆油总离子流图比较

Fig. 4 TIC chromatograms of corn oil and soybean oil

实际上,动物油具有与植物更大的甘油三酯组分差异。图 5c 100% 猪油的分析谱图与图 2~图 4 中的各种植物油存在很大的差异。

因此,可以认为,在对甘油三酯组分 UPLC-MS 精细分离的情况下,相同食用油之间甘油三酯组分的分布和含量差异不大,而不同食用油之间则存在可供识别的差异,其中动物油与植物油之间的差异很大。推测这种甘油三酯之间的差异可能与食用油来源的种属差异及其存在的酯酶差异有关。

3.4 玉米油/大豆油中掺杂猪油的检测

考虑到泔水油和劣质动物油两类地沟油中均会存在掺入动物油的情况,本研究利用动物油与植物油之间的明显差异,以常用的玉米油以及大豆油中加入不同比例的猪油为样品,采用 2.2 节的方法对其进行分离分析,结果见图 5。峰 B 和 E 在猪油中具有特征性,在玉米油和大豆油中通过比较峰 A 和 B 之间的高度比,选择峰高比 $A/B = 1.0$ 为指标,可以识别掺杂 10% 猪油。而通过比较玉米油中峰 C 和 E 的高度以及大豆油中 D 和 E 的高度,选择峰高比 $C/E = 1.0$ 和峰高比 $D/E = 1.0$ 为指标,在掺杂 5% 猪油时仍可看出与不含猪油的大豆油存在差异。

选取 100% 玉米油中峰 A 和峰 B 的峰高的比值 A/B 、以及峰 C 和峰 E 的峰高比值 C/E ,大豆油中同样选择 A/B 、以及峰 D 和峰 E 的峰高比值 C/E ,计算的数据见表 2。在玉米油中掺杂了猪油以后,无论是 A/B 还是 C/E 都会相应增加,且 C/E 增加的更多。豆油在掺杂了猪油后,同样的 A/B 和 D/E 也是有相应的增加, D/E 增加的幅度也更大。因此,通过选择“峰高比为 1.0”这个指标,可实现 10% 猪油

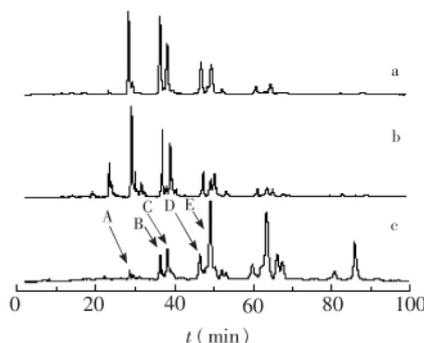


图 5 玉米油和大豆油存在不同含量猪油的分析谱图

Fig. 5 Chromatograms of corn oil and soybean oil containing different content lard

a. 10% 猪油 + 90% 玉米油; b. 5% 猪油 + 95% 玉米油; a. 100% 猪油。

a. 10% Lard + 90% Corn oil; b. 5% Lard + 95% Corn oil; c. 100% Lard.

掺杂玉米油的识别以及5%猪油掺杂大豆油的识别。因此,根据对不同食用油品种差异的研究,可通过建立特定食用油中掺入其它食用油的鉴别方法,实现对掺假食用油的准确识别。

表2 掺杂不同浓度的猪油后玉米油和大豆油的A/B, C/E, D/E峰指标

Table 2 Indicators of peak height ratio (A/B, C/E, D/E) of different content of lard in corn oil and soybean oil

掺杂不同浓度猪油的玉米油和大豆油 Different content of lard in corn oil and soybean oil	峰指标 Indicators of peak		
	A/B	C/E	D/E
100% 玉米油 100% Corn oil	1.32	1.11	N/A
90% 玉米油 + 10% 猪油 90% Corn oil + 10% lard	1.09	0.95	N/A
80% 玉米油 + 20% 猪油 80% Corn oil + 20% lard	0.97	0.82	N/A
50% 玉米油 + 50% 猪油 50% Corn oil + 50% lard	0.77	0.52	N/A
100% 大豆油 100% Soybean oil	1.08	N/A	1.06
95% 大豆油 + 5% 猪油 95% Soybean oil + 5% lard	1.05	N/A	1.09
90% 大豆油 + 10% 猪油 90% Soybean oil + 10% lard	1.01	N/A	0.93
80% 大豆油 + 20% 猪油 80% Soybean oil + 20% lard	0.91	N/A	0.76
50% 大豆油 + 50% 猪油 50% Soybean oil + 50% lard	0.76	N/A	0.51
100% 猪油 100% Lard	0.53	0.35	0.31

4 结论

采用3根超高效色谱柱串联的方法,使用UPLC-MS,在高柱压下对食用油中的甘油三酯进行了分析。有文献提出增大柱压有利于脂类化合物分离^[14],本研究将3根色谱柱串联,也在高柱压的条件下获得了较好分离,由原来单根色谱柱的6个峰改进到串联后的13个峰,使拥有同分异构的部分甘油三酯也得到了分离。通过对不同厂家及不同种类食用油的分析,显示同种食用油之间的差别很小,而不同种类的食用油之间差异明显。对掺杂猪油的分析结果显示,5%猪油掺杂大豆油可以被识别。

References

- ZHU Tao-Hua, FAN Lu, QIAN Xiang-Ming, WANG Yan, JING Yin-Cheng. *Chinese Oil and Fat*, **2011**, 36(5): 59-63
朱桃花, 范璐, 钱向明, 王艳, 井银成. *中国油脂*, **2011**, 36(5): 59-63
- CAO Wen-Ming, XUE Bin, YANG Bo-Tao, DING Dan-Hua, SUN Xi-Hua. *Grain Science and Technology and Economy*, **2011**, 36(1): 41-44
曹文明, 薛斌, 杨波涛, 丁丹华, 孙禧华. *粮食科技与经济*, **2011**, 36(1): 41-44
- JIN Jing, WANG Long-Xing, CHEN Ji-Ping, TIAN Yu-Zeng, ZOU Li-Li, ZHANG Bao-Qin, WANG Shu-Qiu, WANG Xing-Fu. *Chinese Journal of Chromatography*, **2012**, 30(11): 1100-1107
金静, 王龙星, 陈吉平, 田玉增, 邹黎黎, 张保琴, 王淑秋, 王幸福. *色谱*, **2012**, 30(11): 1100-1107
- HU Jun, WEI Fang, DONG Xu-Yan, LV Xin, LI Guang-Ming, CHEN Hong. *Journal of Instrumental Analysis*, **2012**, 31(6): 749-756
胡珺, 魏芳, 董绪燕, 吕昕, 李光明, 陈洪. *分析测试学报*, **2012**, 31(6): 749-756
- Gao X L, Zhang Q, Meng D, Isaacs G, Zhao R, Fillmore T L, Chu R K, Zhou J, Tang K, Hu Z, Moore R J, Smith R D, Katze M G, Metz T O. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402(9): 2923-2933
- Bird S S, Marur V R, Sniatynski M J, Greenberg H K, Kristal B S. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(17): 6648-6657
- Zeb A. *Chem. Phys. Lipids*, **2012**, 165(5): 608-614
- Zeb A, Murkovic M. *Euro. J. Lipid Sci. Technol.*, **2010**, 112(8): 844-851
- Segall SD, Ataz W E, Raslam D S, Jham G N, Takahashi J A. *J. Agr. Food Chem.*, **2005**, 53(25): 9650-9655
- Eanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dachà M, Dugo P, Mondello L. *J. Agr. Food Chem.*, **2011**, 59(9): 13043-13049
- Lisa M, Holcapek M, Boháč M. *J. Agr. Food Chem.*, **2009**, 57(18): 6888-6898
- Dugo P, Beccaria M, Faway N, Donato P, Cacciola F, Mondello L. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1259: 227-236
- Vichi S, Cortés-Francisco N, Caixach J. *J. Mass Spectrom.*, **2012**, 47(9): 1177-1190

Separation of Triacylglycerols in Edible Oil by Reversed Phase Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy

HE Rong, SHAN Xiao-Lin, DONG Fang-Yuan, XU Xu*

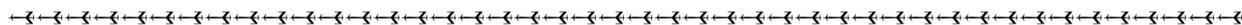
(School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract A reversed phase ultra performance liquid chromatography–mass spectrometric method was developed for the separation and analysis of triglycerides in edible oils. The samples were separated by using three ultra performance C₁₈ columns in series with a total length of 40 cm (10 cm + 15 cm + 15 cm) at high pressure with acetonitrile–isopropanol (50: 50, V/V) as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min and at column temperature of 25°C, and detected by APCI ionization–mass spectrometry. The edible oil sample was dissolved in isopropanol and injected in LC–MS directly. The triglycerides in edible oils were distinguished to their better fine components which included corn oil, peanut oil, sunflower seed oil, rice oil, olive oil, sesame oil and soybean oil. The chromatograms of different edible oils showed that the same kind of edible oil was composed of similar triglyceride composition and content, while the different kind of edible oils differed. The experimental result showed that the method could be use for identifying 5% lard adulterated in soybean oil. The method suggests a significant research way for identifying adulteration in edible oil.

Keywords Reversed phase ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry; Triglycerides; Edible oil

(Received 1 April 2015; accepted 9 June 2015)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai, China (No. 15ZR1440800)



2016 年《分析实验室》征订启事

国内统一刊号: CN11–2017/TF

邮发代号: 82–431

国外代号: M848

国际 CODEN 码: FENSE4

国际标准刊号: ISSN 1000–0720

广告经营许可证: 京西工商广字第 0441 号

《分析实验室》是中文核心期刊,月刊,大 16 开,128 页,国内外公开发行。

《分析实验室》1982 年创刊,目前已成为我国著名的分析化学专业刊物。影响遍及冶金、地质、石油化工、环保、药物、食品、农业、商品检验和海关等社会各行业及各学科领域。《分析实验室》以突出创新性和实用性为办刊宗旨,作者来自全国各行业的生产、科研第一线;已被列为全国中文核心期刊、中国科技论文统计用期刊、美国“CA 千种表”中我国化学化工类核心期刊、中国学术期刊(光盘版)和中国期刊网全文数据库等国内外多家检索数据库、文摘收录,影响因子连续多年列化学类前列。本刊常设“研究报告”、“研究简报”、“仪器装置与设备”等栏目。“定期评述”栏目系统发布特邀知名专家学者撰写的国内外分析化学各领域的综合评述,连续跟踪学术发展前沿。

每期定价 25 元,全年 12 期,300 元。全国各地邮局征订,邮发代号 82-431。漏订的读者可直接与编辑部联系。

编辑部地址: 北京新街口外大街 2 号

邮编: 100088。电话: 010–82013328; E-mail: analysislab@263.net; ana-info@263.net