

3种色谱柱对37种脂肪酸的分离性能比较及鱼油脂肪酸检测

陈小燕, 王友升*, 李丽萍

(北京工商大学 北京市食品风味化学重点实验室, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京 100048)

摘 要: 利用气相色谱-质谱联用技术, 考察 HP-5、DB-Wax 和 SPB-50 三种不同极性色谱柱对 37 种脂肪酸甲酯(fatty acid methyl ester, FAME)混标的分离性能, 并对实际鱼油样品的脂肪酸进行检测。结果表明: 3 种色谱柱都能用于 FAME 的分析, 低碳数的物质最先出峰, 同碳数而饱和度不同的 FAME 在不同固定相上的出峰顺序不同; 与其他两种色谱柱相比, SPB-50 柱能分离出顺式和反式异构体以及有效分离 ω -3 与 ω -6 系列脂肪酸, 更适合检测复杂的 FAME 混合物样品, 特别是对顺式和反式脂肪酸以及 ω -3(如 EPA 和 DHA)和 ω -6 等功能性脂肪酸的检测有重要意义。

关键词: 脂肪酸甲酯; HP-5 柱; DB-Wax 柱; SPB-50 柱; 鱼油; 气相色谱-质谱联用

Comparison of Three Chromatographic Columns in Separation and Analysis of 37 Fatty Acids in Fish Oil

CHEN Xiao-yan, WANG You-sheng*, LI Li-ping

(Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Food Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The separation performance of columns with different polarities, including HP-5, DB-Wax and SPB-50 column, for 37 fatty acid methyl esters (FAMES) was compared by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that these columns allowed FAMES separation. The peaks of FAMES with less carbon atoms were separated earlier. FAMES with the same number of carbon atoms and different degree of saturation were separated in different orders on the stationary phases. SPB-50 column could separate *cis/trans*, ω -3 and ω -6 fatty acids more sufficiently and may be a more suitable column for complicated FAME sample analysis, especially for functional fatty acids.

Key words: fatty acid methyl ester (FAME); HP-5 column; DB-Wax column; SPB-50 column; fish oil; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0156-07

脂肪酸具有多种功能与营养价值, 以脂肪酸为原料的保健食品也已得到消费者越来越多的认可。不同种类的脂肪酸具有不同的生物活性, 如亚油酸及亚麻酸被公认为人体必需的脂肪酸, 二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)能降低 LDL-胆固醇、调节免疫与抗癌^[1]。然而, 由于脂肪酸种类很多, 具有从十二碳到二十二碳的碳链长度。按照饱和度的不同可将其分为饱和、单不饱和和多不饱和脂肪酸。在单不饱和脂肪酸中, 按照第一个双键距离甲基端数目的差异主要有

ω -3 系(包括 α -亚麻酸、EPA、DHA 等)和 ω -6 系(亚油酸、 γ -亚麻酸和花生四烯酸等)^[2]; 按照几何异构体的不同可分为顺式和反式脂肪酸, 若双键两侧的两个 H 原子位于碳链同侧则为顺式, 位于异侧则为反式^[3]。这些脂肪酸结构的相似性使检测具有很大难度。

目前气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用分析是对油脂中脂肪酸进行定性定量检测的重要手段。在 GC 分析前, 把脂肪酸衍生化成脂肪酸甲酯(fatty acid methyl ester, FAME)

收稿日期: 2011-06-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30901009); 北京市属高等学校人才强教计划项目(PHR20110882)

作者简介: 陈小燕(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: tychenxy_1987@126.com

* 通信作者: 王友升(1976—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wangys@th.btbu.edu.cn

可以得到可靠和重复性的数据^[4]。由于油脂中脂肪酸组成复杂,存在具有多种异构体,因此需要选用合适的色谱柱,使其按脂肪酸的碳数、不饱和度、顺反构象以及双键的位置对它们进行分离。应用较为广泛的是涂渍极性固定相色谱柱,如聚乙二醇或氰丙基聚硅氧烷固定相,李青等使用交联聚乙二醇(FFAP)色谱柱同时检测了保健食品中的15种脂肪酸^[5]。Omegawax™柱(聚乙二醇)和SP-2560(强极性氰丙基聚硅氧烷)等能最大程度地分离不同饱和度(尤其 ω -3和 ω -6)或顺反异构的脂肪酸甲酯^[6-7],但作为专用色谱柱,价格昂贵且应用范围窄。非极性色谱柱对于脂肪酸甲酯的分离常用于识别不同模式,MIDI全自动微生物鉴定系统通过Ultra 2非极性色谱柱分离短链脂肪酸来鉴定菌株^[8],而利用中等极性色谱柱对脂肪酸甲酯进行分离的文献报道较少。同时,由于化学结构的相似性,会遇到保留时间相近的脂肪酸甲酯,使分离出的单峰中可能有不只一个组分。为了确保结果可靠,可通过数学技术“解卷积”将色谱图中的重叠峰识别出来。自动质谱解卷积鉴定系统(automatic mass spectral deconvolution and identification system, AMDIS)能从GC-MS数据中自动进行解卷积处理,从共物流掩盖质谱中鉴定出信号很低的物质^[9-10]。

本实验拟比较非极性HP-5柱、极性DB-Wax柱和中等极性SPB-50柱这3种不同固定相色谱柱对脂肪酸甲酯分离的性能,并运用SPB-50柱分析复杂的鱼油样品,为食品中脂肪酸的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鱼油软胶囊 美国Kirkland Signature公司。

37种脂肪酸甲酯混标 美国Sigma公司;正己烷、甲基叔丁基醚、甲醇(均为色谱纯) 北京化学试剂公司;氢氧化钠、氯化钠、浓盐酸均为分析纯。

衍生化试剂 :15g氢氧化钠,50mL甲醇及50mL蒸馏水;试剂 :65mL 6mol/L盐酸,55mL甲醇;试剂 :50mL正己烷,50mL乙醚;试剂 :0.36g氢氧化钠,30mL蒸馏水;试剂 :饱和氯化钠溶液。

QP2010 plus型气相色谱-质谱联用仪 日本岛津公司;磁力搅拌装置、SPB-50色谱柱(30m × 0.25mm, 0.25 μ m) 美国Supelco公司;恒温水浴锅;电子分析天平;振荡器;HP-5(30m × 0.32mm, 0.25 μ m)、DB-Wax(30m × 0.25mm, 0.25 μ m)色谱柱 美国Agilent公司。

1.2 方法

1.2.1 鱼油样品脂肪酸的衍生化

脂肪酸的衍生化参考MIDI全自动微生物鉴定系统方法^[8]。

皂化:取一定量的鱼油样品于15mL玻璃瓶中,加入1.0mL试剂 ,拧紧盖子,沸水浴30min;甲基化:加入2.0mL试剂 ,拧紧盖子(80 ± 1) 水浴10min,快速冷却;萃取:加入1.25mL试剂 ,拧紧盖子,搅拌20min,弃下层水相;基本洗涤:加入3.0mL试剂 ,拧紧盖子,搅拌5min,移出约2/3体积的有机相,用于GC-MS检测。

1.2.2 GC-MS分析条件

色谱条件:进样口温度250 ,载气He;对色谱柱HP-5,柱流量1.25mL/min,进样量1 μ L,程序升温为50 (2min),5 /min上升至270 ;对色谱柱DB-Wax,柱流量1mL/min,进样量1 μ L,程序升温为50 (1min),25 /min到200 ,再以3 /min到230 (18min);对色谱柱SPB-50,柱流量1mL/min,进样量为0.5、1、1.5、2 μ L,程序升温为50 (1min),25 /min到175 ,再以4 /min到270 (5min)。

质谱条件:接口温度250 ,电离方式EI,离子源温度220 ,电子能量70eV,扫描质量范围为 m/z 60 ~ 500。

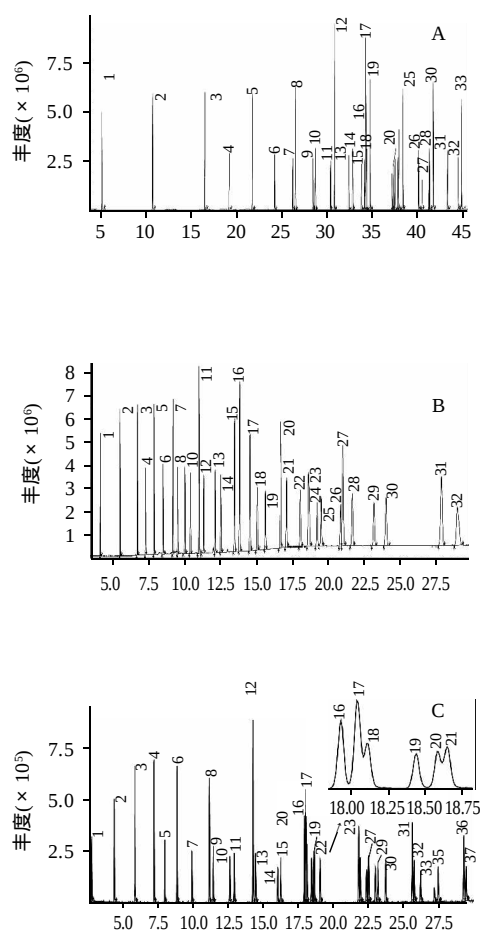
1.2.3 GC-MS定性分析

GC-MS得到的各个色谱峰经Nist 05谱库检索和AMDIS软件处理后,根据质谱的匹配程度并参考Sigma-Aldrich/Supelco脂肪酸甲酯分析应用手册等相关文献对色谱峰进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

对于气相色谱分析,色谱柱选择是分析的关键。按极性的不同,色谱柱可分为非极性、弱极性、中等极性和极性。同种样品在不同极性的色谱柱上会表现出不同的色谱动力学行为而引起分析数据出现差异。本实验选用非极性HP-5柱、极性DB-Wax柱和中等极性SPB-50柱对37种脂肪酸甲酯混标样品进行分离,分流比为50:1时,得到的色谱图见图1。图1a中,HP-5柱对37种FAME混标的检测结果共有33个峰,除了23[#]和24[#]、28[#]和29[#]峰外,其余相邻色谱峰的分离度均大于1,达到了基本分离。图1b中,DB-Wax柱检测出32个峰,除了26[#]和27[#]峰外,其余相邻峰的分离度均大于1.5,达到了完全分离。图1c中,在SPB-50柱上共检测到37个峰,除17[#]和18[#]、20[#]和21[#]、25[#]和26[#]、26[#]和27[#]峰外,其余峰均达到基本分离。经GC-MS定性得到各个峰的物质名称及其出峰顺序见表1。



A. HP-5 柱; B. DB-Wax 柱; C. SPB-50 柱。

图 1 37 种脂肪酸甲酯在不同极性柱上的色谱图

Fig.1 TIC profile of 37 FAMES on HP-5, DB-Wax, and SPB-50

2.1.1 非极性 HP-5 柱对 37 种脂肪酸甲酯的分离情况

利用 AMDIS 对 HP-5 柱上的 GC-MS 数据(图 1A)进行

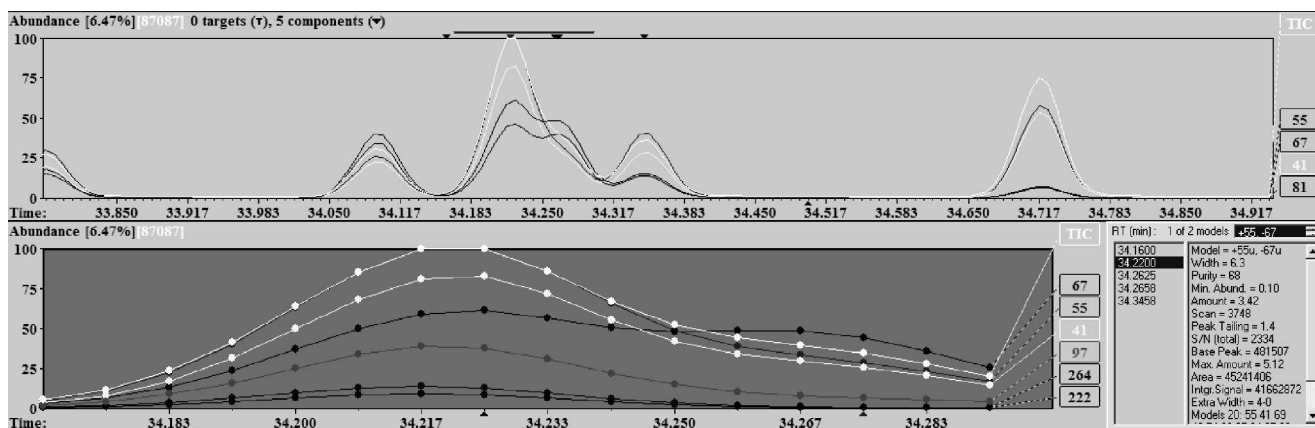
处理得到图 2。从图 2A 可以看出, m/z 67 的碎片离子峰与 m/z 55、41、97、222、264 的离子峰的峰型不同, 前者有两个峰尖, 后者则有一个峰尖, 且 m/z 55、41 的离子峰与 m/z 97、222、264 的离子峰的峰型虽相同, 但保留值不同, 前者峰值在保留时间 34.225min 处, 后者峰值在 34.217min 处, 这说明单峰 34.15 ~ 34.31min 处 (17[#] 峰) 有 3 个组分共流出。在图 2B 中, m/z 55 的单质量数离子峰线的峰尖与 m/z 67、81 这两条峰尖对齐叠加的单质量数离子峰线的峰尖是错开的, 表明 37.82 ~ 37.96min 处 (23[#] 峰) 有重叠峰且为两个不同的组分。

经鉴定, 17[#] 峰处, 反式 9,12- 十八碳二烯酸甲酯 ($C_{18:2n6t}$)、顺式 9- 十八碳烯酸甲酯 ($C_{18:1n9c}$) 与 α - 亚麻酸甲酯 ($C_{18:3n3}$) 在 34.23min 处未达到分离; 顺式 11- 二十碳烯酸甲酯 ($C_{20:1}$) 与顺式 11,14,17- 二十碳三烯酸甲酯 ($C_{20:3n3}$) 在 37.90min 处共同洗脱出来(表 1)。可见, HP-5 柱不能分离 ω -3 系列脂肪酸 ($C_{18:3n3}$ 和 $C_{20:3n3}$)。而顺式 9,12- 十八碳二烯酸甲酯 ($C_{18:2n6c}$) 在 34.11min 处单独分离, 反式 9- 十八碳烯酸甲酯 ($C_{18:1n9t}$) 在 34.36min 处单独分离。另外, 丁酸甲酯 ($C_{4:0}$) 峰被溶剂切除时间覆盖, 未在图谱上显示出来。

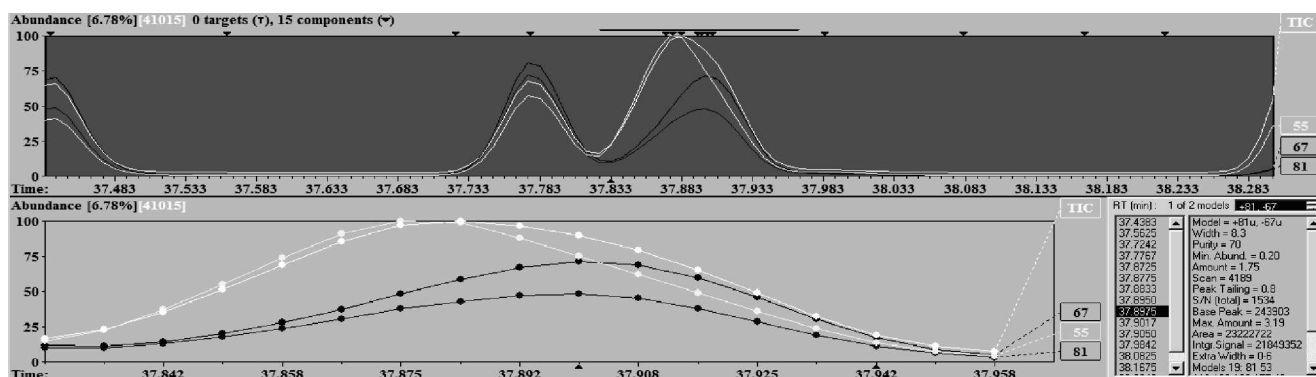
从表 1 可以看出, 非极性色谱柱上 FAME 的出峰顺序为按照碳数由低到高的顺序出峰, 同一碳数的 FAME, 不饱和的先出峰, 不饱和度越大, 出峰越早; 顺式与反式异构体相比, 顺式先出峰。

2.1.2 极性 DB-Wax 柱对 37 种脂肪酸甲酯的分离情况

利用 AMDIS 处理 DB-Wax 柱上 GC-MS 数据(图 1B)得到图 3。从图 3A 可看出, m/z 67、79 的碎片离子峰和 m/z 74 的离子峰的峰型和保留值不同, 说明 23[#] 峰有 2 个组分流。同理, 在图 3B 中, 32[#] 峰有两个不同组分重叠峰。经质谱鉴定与文献查阅, 13.85min 时, 顺式和反式 9- 十八碳烯酸甲酯 ($C_{18:1n9c}$ 和 $C_{18:1n9t}$) 一起洗脱出来, 该保留时间下的峰面积是这两种物质的总峰面



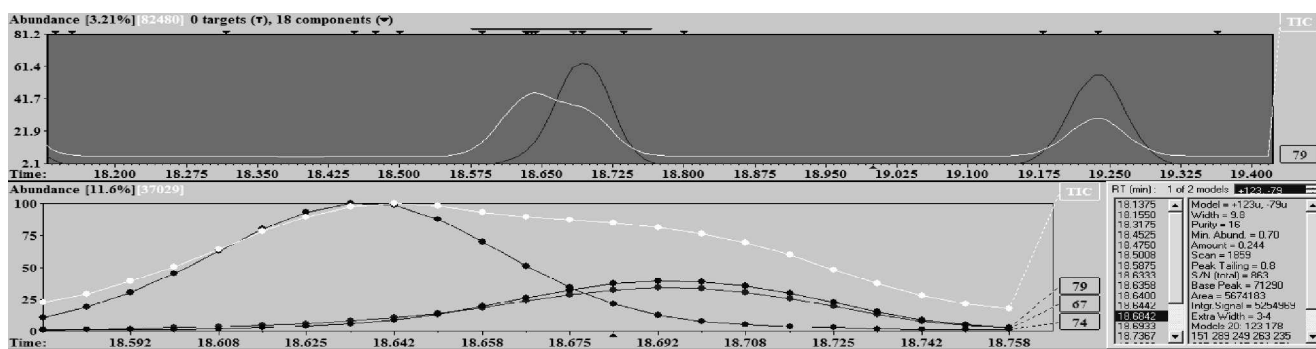
A. 保留时间 34.15 ~ 34.31min (上图为总离子色谱以及单个离子的色谱, 下图为特征最强的组分离子色谱图)



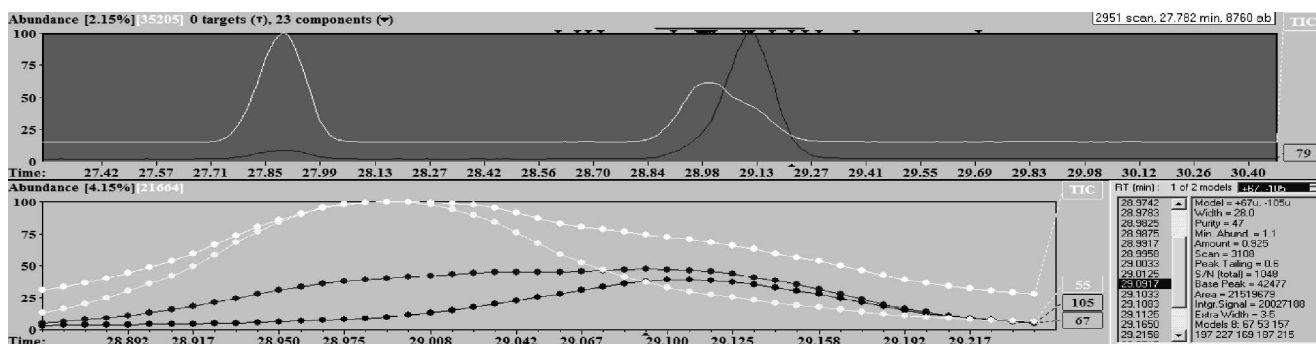
B. 保留时间 37.82 ~ 37.96min (上图为总离子色谱以及单个离子的色谱, 下图为特征最强的组分离子色谱图)

图 2 HP-5 柱上 GC-MS 色谱图的 AMDIS 分析结果

Fig.2 AMDIS analysis of the GC-MS chromatogram of 37 FAMES on HP-5



A. 保留时间 18.55 ~ 18.78min (上图为总离子色谱以及单个离子的色谱, 下图为特征最强的组分离子色谱图)



B. 保留时间 28.83 ~ 29.27min (上图为总离子色谱以及单个离子的色谱, 下图为特征最强的组分离子色谱图)

图 3 DB-Wax 柱上脂肪酸甲酯的 GC-MS 色谱图的 AMDIS 分析结果

Fig.3 AMDIS analysis of the GC-MS chromatogram of 37 FAMES on DB-Wax chromatogram.

积; 顺式和反式 9,12-十八碳二烯酸甲酯($C_{18:2n6c}$ 和 $C_{18:2n6t}$) 在 14.58min 时共同洗脱出来; 然而这两个保留时间处的峰经 AMDIS 处理后未显示有重叠峰, 可能因为顺式和反式物质的质谱图差异很小, 导致色谱峰完全重叠, 经解卷积后仍无法区分。二十一烷酸甲酯($C_{21:0}$)和顺式 8, 11,14-二十碳三烯酸甲酯($C_{20:3n6}$)在 18.64min 时一起洗脱出来; 以及 28.99min 时, 二十四碳烯酸甲酯($C_{24:1}$)和二十二碳六烯酸甲酯($C_{22:6ns}$)共同洗脱。可见, 尽管 DB-Wax 柱能很好地分离 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸, 但却不能分离

$C_{20:3n6}(\omega-6)$ 和 $C_{22:6n3}(\omega-3)$ 。除 $C_{21:0}$ 外, 其余都是按照碳数从低到高依次出峰; 同一碳数的 FAME 饱和的先出峰, 不饱和的后出峰, 不饱和度越高, 出峰越晚; 顺式与反式不能在该色谱柱上分离。

2.1.3 中极性 SPB-50 柱对 37 种脂肪酸甲酯的分离情况

从表 1 可以看出, 在 SPB-50 色谱柱上, 37 种 FAME 均达到了先后分离。经 AMDIS 处理后单峰未出现重叠峰。结合表 1 和图 1C 可以看出, 顺式和反式 9-十八碳烯酸甲酯(17[#] 峰和 18[#] 峰)先后洗脱出来, 顺式和反式 9,12-十

表 1 3 种不同极性色谱柱对 FAME 的分离情况

Table 1 Summary of identification of fatty acid methy esters on HP-5, DB-Wax, and SPB-50

HP-5 柱			DB-Wax 柱			SPB-50 柱		
峰号	保留时间/min	FAME	峰号	保留时间/min	FAME	峰号	保留时间/min	FAME
		C _{4:0}			C _{4:0}	1 [#]	2.81	C _{4:0}
1 [#]	5.17	C _{6:0}	1 [#]	4.18	C _{6:0}	2 [#]	4.41	C _{6:0}
2 [#]	10.75	C _{8:0}	2 [#]	5.54	C _{8:0}	3 [#]	5.88	C _{8:0}
3 [#]	16.51	C _{10:0}	3 [#]	6.76	C _{10:0}	4 [#]	7.25	C _{10:0}
4 [#]	19.20	C _{11:0}	4 [#]	7.32	C _{11:0}	5 [#]	8.01	C _{11:0}
5 [#]	21.76	C _{12:0}	5 [#]	7.90	C _{12:0}	6 [#]	8.89	C _{12:0}
6 [#]	24.19	C _{13:0}	6 [#]	8.53	C _{13:0}	7 [#]	9.94	C _{13:0}
7 [#]	26.21	C _{14:1}	7 [#]	9.23	C _{14:0}	8 [#]	11.19	C _{14:0}
8 [#]	26.50	C _{14:0}	8 [#]	9.56	C _{14:1}	9 [#]	11.46	C _{14:1}
9 [#]	28.43	C _{15:1}	9 [#]	10.05	C _{15:0}	10 [#]	12.64	C _{15:0}
10 [#]	28.70	C _{15:0}	10 [#]	10.44	C _{15:1}	11 [#]	12.95	C _{15:1}
11 [#]	30.36	C _{16:1}	11 [#]	11.02	C _{16:0}	12 [#]	14.29	C _{16:0}
12 [#]	30.80	C _{16:0}	12 [#]	11.35	C _{16:1}	13 [#]	14.47	C _{16:1}
13 [#]	32.39	C _{17:1}	13 [#]	12.16	C _{17:0}	14 [#]	16.06	C _{17:0}
14 [#]	32.81	C _{17:0}	14 [#]	12.55	C _{17:1}	15 [#]	16.26	C _{17:1}
15 [#]	33.80	C _{18:3n6}	15 [#]	13.50	C _{18:0}	16 [#]	17.95	C _{18:0}
16 [#]	34.11	C _{18:2n6c}	16 [#]	13.85	C _{18:1n9t}	17 [#]	18.06	C _{18:1n9c}
		C _{18:1n9c}			C _{18:1n9c}	18 [#]	18.13	C _{18:1n6c}
17 [#]	34.23	C _{18:2n6t}	17 [#]	14.58	C _{18:2n6t}	19 [#]	18.45	C _{18:2n6c}
		C _{18:3n3}			C _{18:2n6c}	20 [#]	18.60	C _{18:3n6}
18 [#]	34.36	C _{18:1n9t}	18 [#]	15.09	C _{18:3n6}	21 [#]	18.66	C _{18:2n6t}
19 [#]	34.73	C _{18:0}	19 [#]	15.64	C _{18:3n3}	22 [#]	19.06	C _{18:3n3}
20 [#]	37.13	C _{20:5}	20 [#]	16.70	C _{20:0}	23 [#]	21.81	C _{20:0}
21 [#]	37.25	C _{20:4n6}	21 [#]	17.13	C _{20:1}	24 [#]	21.93	C _{20:1}
22 [#]	37.45	C _{20:3n6}	22 [#]	18.08	C _{20:2}	25 [#]	22.36	C _{20:2}
23 [#]	37.79	C _{20:2}	23 [#]	18.64	C _{20:3n6}	26 [#]	22.49	C _{20:3n6}
		C _{20:1}			C _{21:0}	27 [#]	22.59	C _{20:4n}
24 [#]	37.90	C _{20:3n3}	24 [#]	19.23	C _{20:4n6}	28 [#]	23.00	C _{20:3n3}
25 [#]	38.35	C _{20:0}	25 [#]	19.53	C _{20:3n3}	29 [#]	23.18	C _{20:5}
26 [#]	40.05	C _{21:0}	26 [#]	20.88	C _{20:5}	30 [#]	23.72	C _{21:0}
27 [#]	40.44	C _{22:6n3}	27 [#]	21.02	C _{22:0}	31 [#]	25.64	C _{22:0}
28 [#]	41.21	C _{22:2}	28 [#]	21.68	C _{22:1n9}	32 [#]	25.77	C _{22:1n9}
29 [#]	41.27	C _{22:1n9}	29 [#]	23.20	C _{22:2}	33 [#]	26.22	C _{22:2}
30 [#]	41.69	C _{22:0}	30 [#]	24.03	C _{23:0}	34 [#]	27.20	C _{22:6n3}
31 [#]	43.27	C _{23:0}	31 [#]	27.88	C _{24:0}	35 [#]	27.47	C _{23:0}
32 [#]	44.42	C _{24:1}	32 [#]	28.99	C _{24:1}	36 [#]	29.29	C _{24:0}
33 [#]	44.79	C _{24:0}			C _{22:6n3}	37 [#]	29.46	C _{24:1}

八碳二烯酸甲酯(19[#]峰和 21[#]峰)先后洗脱出来,虽然顺式和反式未达到完全的基线分离,但与前两种色谱柱相比有了很大改善。 ω -6 和 ω -3 系列物质也得到了很好的分离。

SPB-50 柱上, FAME 按照碳数从低到高依次出峰;除了 C_{18:3n6} 和 C_{18:2n6t} 以及 C_{20:3n3} 和 C_{20:4n6} 外,同一碳数的 FAME,饱和的先出峰,不饱和的后出峰,不饱和度越高,出峰越晚;顺式与反式中顺式先出峰。

综合 3 种色谱柱对 FAME 的分离结果,可知中性 SPB-50 柱的分离效果最好。

2.2 不同进样量的影响

考察 SPB-50 色谱柱分离 37 种 FAME 时不同进样量与

峰面积的相关性。以分流比为 75:1 进样,进样量分别为 0.5、1、1.5、2 μ L,以各个物质的峰面积 y 为纵坐标、进样量 $x(\mu$ L) 为横坐标进行线性回归,结果见表 2。

从表 2 可以看出,在满足气相仪器要求的进样量范围内,进样量与物质峰面积呈良好的线性关系。

2.3 鱼油样品的测定

取 40 μ L 的鱼油胶囊样品,经衍生化后立即使用 SPB-50 色谱柱对其进行 GC-MS 分析,得到进样量为 1 μ L 时的色谱图(图 4)。经 MS 谱库检索及与标品的保留时间对照后得到 11 种脂肪酸,经峰面积归一化后,各个物质及其相对含量见表 3。

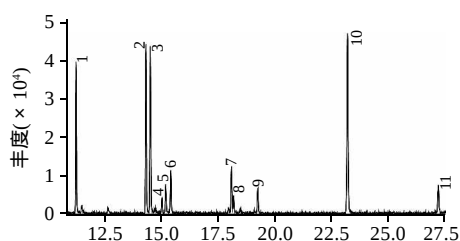


图4 鱼油样品的脂肪酸分析的色谱图

Fig.4 TIC profile of fatty acid methyl esters in fish oil

表3 鱼油样品的脂肪酸组成

Table 3 Identification results of fatty acids in fish oil

峰号	保留时间/min	FAME	相对含量/%	化学式
1 [#]	11.22	肉豆蔻酸甲酯(C _{14:0})	13.80	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
2 [#]	14.32	棕榈酸甲酯(C _{16:0})	18.14	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
3 [#]	14.51	棕榈油酸甲酯(C _{16:1})	18.67	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
4 [#]	15.03	未知	1.61	
5 [#]	15.19	十六碳二烯酸甲酯(C _{16:2})	2.91	C ₁₇ H ₃₀ O ₂
6 [#]	15.41	十六碳三烯酸甲酯(C _{16:3})	5.30	C ₁₇ H ₂₈ O ₂
7 [#]	18.09	顺式 9-十八碳烯酸甲酯(C _{18:1n9c})	5.76	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
8 [#]	18.19	反式 9-十八碳烯酸甲酯(C _{18:1n9t})	2.09	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
9 [#]	19.26	α-亚麻酸甲酯(C _{18:3n3})	3.16	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
10 [#]	23.23	二十碳五烯酸甲酯(C _{20:5} , EPA)	24.29	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
11 [#]	27.24	二十二碳六烯酸甲酯(C _{22:6n3} , DHA)	4.27	C ₂₃ H ₄₀ O ₂

由表3可知,鱼油样品中至少含有11种脂肪酸,多由C₁₄~C₂₂的长链脂肪酸组成,其中,不饱和脂肪酸含量为68.06%、饱和脂肪酸含量为31.94%,与样品实

际含量(出厂标定含量)有些差异,可能是某些饱和脂肪酸未检出。而检测到的ω-3脂肪酸包括α-亚麻酸、EPA和DHA,其含量占31.72%,这与样品实际的ω-3含量(30%)相符。EPA、棕榈油酸、棕榈酸和肉豆蔻酸的含量分别为24.29%、18.67%、18.14%和13.80%,远超过其余脂肪酸,是鱼油脂肪酸的主要组分,其中EPA含量最高。

3 讨论与结论

不同色谱柱本身的固定相不同,按照所分离目标物的极性与其沸点对其进行分离^[11]。从3种色谱柱对37种脂肪酸甲酯的分离结果来看,C₄(丁酸)到C₁₇(十七烷酸)脂肪酸在3种色谱柱上都有很好的分离效果。都是低碳数的物质最先出峰,同碳数而饱和度不同的脂肪酸在不同固定相上的出峰顺序不同,非极性柱上不饱和的先出峰,不饱和度越大,出峰越早;极性和中极性柱上不饱和的后出峰,不饱和度越高,出峰越晚,中极性柱上C_{18:3n3}和C_{18:2n6t}、C_{20:3n3}和C_{20:4n6}除外,这与已有的报道^[12]基本相符合。

然而,本研究的结果表明,顺式和反式异构体脂肪酸在HP-5柱上虽未共同洗脱,但顺式C_{18:1}、反式C_{18:2}和α-亚麻酸共同洗脱出来;DB-Wax色谱柱不能分离出顺式和反式异构体,顺/反式C_{18:1}以及顺/反式C_{18:2}均在同一时间洗脱出来;而SPB-50柱能先后分离出顺式和反式脂肪酸,虽然顺/反式C_{18:1}以及顺/反式C_{18:2}都没能达到完全的基线分离,但与前两种柱子相比,已经有了明显改善。HP-5柱不能分离ω-3系列脂肪酸(C_{18:3n3}和

表2 SPB-50色谱柱分离37种FAME时进样量与峰面积的线性关系

Table 2 Linear relationship between sample volume and peak area of 37 FAMES on SPB-50 column

峰号	FAME	回归方程(n = 4)	R ²	峰号	FAME	回归方程(n = 4)	R ²
1 [#]	C _{4:0}	y = 211965x - 11749	0.9885	20 [#]	C _{18:3n6}	y = 548503x - 208037	0.9865
2 [#]	C _{6:0}	y = 378722x - 48147	0.9929	21 [#]	C _{18:2n6t}	y = 480989x - 137714	0.9956
3 [#]	C _{8:0}	y = 519224x - 70032	0.9951	22 [#]	C _{18:3n3}	y = 43521x - 152581	0.9966
4 [#]	C _{10:0}	y = 651113x - 128546	0.9920	23 [#]	C _{20:0}	y = 840080x - 310845	0.9950
5 [#]	C _{11:0}	y = 269899x - 39380	0.9963	24 [#]	C _{20:1}	y = 453148x - 142752	0.9880
6 [#]	C _{12:0}	y = 680547x - 127038	0.9975	25 [#]	C _{20:2}	y = 376641x - 144213	0.9936
7 [#]	C _{13:0}	y = 300260x - 73441	0.9970	26 [#]	C _{20:3n6}	y = 584295x - 256550	0.9795
8 [#]	C _{14:0}	y = 789327x - 234657	0.9925	27 [#]	C _{20:4n6}	y = 372897x - 99431	0.9936
9 [#]	C _{14:1}	y = 388675x - 101057	0.9979	28 [#]	C _{20:3n3}	y = 362201x - 113614	0.9955
10 [#]	C _{15:0}	y = 300301x - 51183	0.9920	29 [#]	C _{20:5}	y = 428505x - 140924	0.9951
11 [#]	C _{15:1}	y = 680547x - 127038	0.9975	30 [#]	C _{21:0}	y = 481333x - 181066	0.9959
12 [#]	C _{16:0}	y = 345877x - 97863	0.9992	31 [#]	C _{22:0}	y = 93202x - 342878	0.9944
13 [#]	C _{16:1}	y = 100000x - 490006	0.9937	32 [#]	C _{22:1n9}	y = 499647x - 183767	0.9933
14 [#]	C _{17:0}	y = 367559x - 83114	0.9958	33 [#]	C _{22:2}	y = 370389x - 138277	0.9941
15 [#]	C _{17:1}	y = 295372x - 91031	0.9990	34 [#]	C _{22:6n3}	y = 180192x - 62335	0.9969
16 [#]	C _{18:0}	y = 832394x - 294202	0.9959	35 [#]	C _{23:0}	y = 410232x - 133782	0.9975
17 [#]	C _{18:1n9c}	y = 100000x - 294047	0.9987	36 [#]	C _{24:0}	y = 856082x - 297206	0.9964
18 [#]	C _{18:1n9t}	y = 522355x - 164882	0.9967	37 [#]	C _{24:1}	y = 485473x - 182913	0.9964
19 [#]	C _{18:2n6c}	y = 445176x - 159174	0.9980				

C_{20:3n3}) ; 尽管 DB-Wax 能很好地分离 α - 亚麻酸和 γ - 亚麻酸, 但却不能分离 C_{20:3n6}(ω -6) 和 C_{22:6n3}(ω -3) ; 而 ω -6 和 ω -3 系列物质在 SPB-50 柱上均得到了很好的分离。可见, 中等极性 SPB-50 柱对复杂混合物的脂肪酸分离很有用, 特别是对顺式和反式脂肪酸以及 ω -3 (如 EPA 和 DHA) 和 ω -6 等功能性脂肪酸的检测有重要意义, 因此它可以超越非极性色谱柱更好地检测脂肪酸, 同时也可以在一定程度上取代脂肪酸甲酯分析专用 GC 色谱柱 (如 SP-2560 和 Omegawax 柱等)。已有研究者运用 SPB-50 色谱柱分离粗咖啡豆^[13]、鲳鲈^[14]、贝类^[15]中的脂肪酸, 取得了较好的效果, 而 SPB-50 柱对顺式和反式异构体以及 ω -3 和 ω -6 脂肪酸可以有效分离的报道尚未见。

使用 SPB-50 色谱柱对鱼油样品中脂肪酸进行分析, 检测出了顺式和反式 C_{18:1n9} 异构体, 以及 α - 亚麻酸、EPA 和 DHA 这 3 种 ω -3 系列脂肪酸, 验证了 SPB-50 柱能有效分离顺 / 反式异构体及 ω -3 等功能性脂肪酸的结论。曹淑兰等^[16]运用非极性 Ultra 色谱柱检测出了鱼油中的油酸、亚麻酸、EPA 和 DHA, 但没有分离出顺式和反式油酸。马亭等^[17]运用强极性 HP-innowax 聚乙二醇色谱柱分析了深海鱼油中的 α - 亚麻酸、 γ - 亚麻酸、EPA 和 DHA 以及多种油酸, 但没有检测出顺 / 反异构体。另外结果表明, EPA、棕榈油酸、棕榈酸和肉豆蔻酸是鱼油的主要脂肪酸组分, 这与文献报道^[14,18]结果基本一致。

总之, 3 种不同极性固定相都能用于脂肪酸甲酯的分析, 对 C₄(丁酸) ~ C₁₇(十七烷酸) 都有很好的分离效果。DB-Wax 色谱柱不能分离顺式和反式异构体, HP-5 柱上顺式和反式异构体未共同洗脱, 但会与其他物质共同洗脱出来, 而 SPB-50 柱能先后分离出顺式和反式异构体。HP-5 柱和 DB-Wax 柱均不能有效分离 ω -3 与 ω -6 系列脂肪酸, 而在 SPB-50 柱上这种分离得到改善。因此, 与其他两种色谱柱相比, SPB-50 柱能有效的分离 37 种 FAME, 更适合检测复杂的 FAME 混合物样品, 如鱼油, 特别是对顺式和反式脂肪酸以及 ω -3 (如 EPA 和 DHA) 和 ω -6 等功能性脂肪酸的检测有重要意义。

参考文献 :

- [1] 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 25.
- [2] 张永刚, 印遇龙, 黄瑞林, 等. 多不饱和脂肪酸的营养作用及其基因表达调控[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 273-277.
- [3] 宋伟, 杨慧萍, 沈崇钰, 等. 食品中的反式脂肪酸及其危害[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 500-504.
- [4] 余珠花. 气相色谱法中油脂脂肪酸衍生化方法及其选择[J]. 粮食加工, 2004, 29(6): 64-66.
- [5] 李青, 方赤光, 崔勇, 等. 保健食品中多种脂肪酸同时检测技术研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(4): 732-734.
- [6] RISÉ P, MARANGONI F, MARTIELLO A, et al. Fatty acid profiles of blood lipids in a population group in Tibet: correlations with diet and environmental conditions[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2008, 17(1): 80-85.
- [7] 陶健, 蒋炜丽, 王晖, 等. SP-2560 毛细管柱拆分 9- 十八碳烯酸甲酯顺反异构体的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(1): 117-119.
- [8] SASSER M. MIDI Technical Note[®] 101: Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acids methyl esters (GC-FAME)[M]. Newark, DE: MIDI Inc., 2001.
- [9] 许大年, 刘石磊. 色谱 - 质谱自动处理与鉴定系统 -AMDIS 简介[J]. 现代科学仪器, 2002(6): 42-44.
- [10] Van ASTEN A. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21(9/10): 698-708.
- [11] 姚倩, 李章万, 张强, 等. 大口径毛细管气相色谱检查药物中残留溶剂的方法研究[J]. 色谱, 2001, 19(2): 141-143.
- [12] 夏静芬, 钱国英, 贾永红. 气相色谱 - 质谱对三种硅藻脂肪酸组成的测试规律性分析[J]. 分析试验室, 2007, 26(增刊 1): 342-345.
- [13] NIKOLOVA-DAMYANOVA B, VELIKOVAA R, JHAMB G N. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil[J]. Food Research International, 1998, 31(6/7): 479-486.
- [14] 张少宁, 徐继林, 侯云丹, 等. 卵形鲳鲈不同组织器官脂肪酸组成含量的比较[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 192-195.
- [15] 李海英, 徐继林, 严小军. 16 种贝类脂肪酸和甾醇组成分析[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(1): 48-54.
- [16] 曹淑兰, 关紫烽, 蔡云萍, 等. 深海鱼油、海豹油脂肪酸组份的分析研究[J]. 质谱学报, 1998, 20(1): 70-75.
- [17] 马亭, 陈文锐, 胡国昌, 等. 深海鱼油中脂肪酸的分析[J]. 分析化学, 1999, 27(4): 415-418.
- [18] DING Yangjun, ZHAO Xianen, ZHU Fang, et al. Identification of long-chain unsaturated fatty acid in deep-sea fish oil by liquid chromatography/mass spectrometry/atmospheric pressure chemical ionization[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35(3): 375-381.