

快速气相色谱法测定食用油中的未衍生化长链脂肪酸

孟 哲^{1,2}, 文大为¹, 廖一平¹, 刘虎威¹

(1. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871 ; 2. 邢台学院生化系, 河北 邢台 054001)

摘要 建立了利用短的微径色谱柱直接测定食用油中未衍生化长链脂肪酸的快速气相色谱方法。 $C_{12} \sim C_{22}$ 脂肪酸在 2 min 之内实现基线分离, 定量标准曲线的相关系数大于 0.988, 最低检测限 ($S/N=3$) 为 2.80 ~ 9.60 mg/L, 回收率为 74.5% ~ 86.5%。该方法快速、简便、准确, 分析通量大, 已成功地用于香油、色拉油及调和油等 3 种食用油中长链脂肪酸含量的测定。

关键词 快速气相色谱法 非衍生化 长链脂肪酸 食用油

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)02-0254-04 栏目类别 研究论文

Determination of Underivatized Long-Chain Fatty Acids in Edible Oils by Fast Gas Chromatography

MENG Zhe^{1,2}, WEN Dawei¹, LIAO Yiping¹, LIU Huwei¹

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China ;

2. Department of Biochemistry, Xingtai University, Xingtai 054001, China)

Abstract : A fast gas chromatography (GC) method with short micro-bore capillary column was developed for the determination of underivatized long-chain fatty acids (LCFAs) in edible oils. Baseline separation of eight kinds of LCFAs (dodecanoic acid, tetradecanoic acid, palmitic acid, oleic acid, stearic acid, eicosanic acid, erudic acid, behenic acid) was achieved within 2 min with high resolution performance. The linear correlation coefficients for underivatized LCFAs were higher than 0.988 and detection limits (at signal-to-noise of 3:1) were 2.80 – 9.60 mg/L. The method is easy and low-cost and has the ability to achieve an accurate determination of the LCFAs in three edible oils.

Key words : fast gas chromatography (FGC) ; underivatization ; long-chain fatty acids (LCFAs) ; edible oils

脂肪酸是油脂中最基本的组成, 在维持人体健康方面起着重要的作用。营养学和生物临床医学研究认为, 饮食中长链脂肪酸的组成及含量与各种疾病(如: 冠心病、心脑血管病和老年痴呆症等)的发病率成正相关性^[1-3]。快速、准确地分析食用油脂中长链脂肪酸的组成和含量对评价油脂的品质以及建议人们合理的饮食具有重要的意义。气相色谱(GC)已经成为测定脂肪酸甲酯的强有力工具, 而用于生物组织液、血浆、血清及细菌中微量脂肪酸甲酯或其异构体含量以及环境样品和深海鱼油中脂肪酸甲酯的其他测定方法也有报道, 如: 高效液相色谱法(HPLC)^[4-6]及气相色谱/质谱联用法(GC/MS)^[7,8]。近年来, 快速 GC 得到了很大的发展, 采用短的细内径毛细管柱、快速升温、尽可能小的进样宽度等是实现快速 GC 的重要手段。快速 GC 优于

传统 GC, 表现在相同的分析时间内增加了样品的分析通量, 而不损失分析的精密度和灵敏度。油脂中脂肪酸甲酯的快速 GC 测定已有报道^[9,10], 但更多文献^[11,12]关注于不同样品中脂肪酸的提取方法和寻找好的衍生化试剂。我们利用微径短柱的快速 GC 技术, 建立了未衍生化长链脂肪酸($C_{12:0} \sim C_{22:0}$ 和 $C_{18:1}, C_{22:1}$)的分析方法, 分析时间 2 min, 检测限为 mg/L 级。该方法简便、快速, 可用于多种食用油中长链脂肪酸的定量测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890 气相色谱仪(美国 Agilent 公司), 配火焰离子化检测器(FID); Agilent 6890/5973N 气相色谱/质谱联用仪(GC/MSD, 美国 Agilent 公

司)。恒温水浴锅(北京靖卫科技仪器厂)。8 种标准脂肪酸,其中 $C_{12:0} \sim C_{22:0}$ 购于天津四友生物医学技术公司(纯度大于 98%) ; $C_{18:1}$ 和 $C_{22:1}$ 购于 Sigma-Aldrich 公司(纯度大于 99%)。环己烷为色谱纯,其他试剂均为分析纯,购于天津四友生物医学技术公司。香油、色拉油、调和油均购于正规超市。

1.2 实验方法

1.2.1 快速 GC 的条件

色谱柱 :美国安捷伦公司的 DB-1 (10 m × 0.1 mm,0.1 μm)。程序升温 :220 ℃ 恒温 0.01 min,然后以 20 ℃/min 升温至 236 ℃,再以 5 ℃/min 升温至 238 ℃,最后以 120 ℃/min 升温至 280 ℃,恒温 1.4 min。载气 H_2 ;柱前压 :208 kPa,恒压模式 ;平均线速度 :48 cm/s ;进样口温度 :260 ℃ ;分流比 :150:1 ;进样量 :1 μL ;FID 温度 300 ℃。

1.2.2 GC/MS 条件

色谱柱 :HP-5MS (30 m × 0.25 mm,0.25 μm) ;载气 :He ;流速 :1.00 mL/min ;进样口温度 :260 ℃ ;分流比 :100:1 ;程序升温条件同“1.2.1”节所述。GC/MS 接口温度 :280 ℃ ;电子轰击电离源 (EI) 温度 :230 ℃ ;发射电流 :150 μA ;电子能量 :70 eV。

1.2.3 标准溶液的配制

准确称取各脂肪酸标准品,分别用环己烷配制质量浓度均为 5 g/L 的各脂肪酸标准溶液。移取不同体积的各脂肪酸标准溶液混合配制成混合脂肪酸标准溶液。

1.2.4 实际样品的制备

准确称取 0.587 4 g 的香油等样品,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 mL 的 6 mol/L NaOH 于 (90 ± 5) ℃ 恒温水浴中进行皂化反应并伴有振荡,30 min 后取出、冷却并加入 10 mL 水,以 6 mol/L HCl 约 20 mL 调节至脂肪酸凝聚析出水层 (pH < 1),取至滤纸上,风干。再准确称取风干后的脂肪酸 20 mg 以环己烷定容至 10 mL。

2 结果与讨论

2.1 快速 GC 条件的优化

在最佳色谱条件下,实现快速分离应满足各组分间的分离度 (R_s) 不低于 1.5,且分析时间最短。对于结构相近、沸点相近的物质的分离,色谱条件的优化尤为重要。对于未衍生化长链脂肪酸的分离,本实验考察了弱极性的 DB-5 (10 m × 0.1 mm,0.1 μm) 和前述非极性的 DB-1 两种不同的微径短柱。实验结果表明,选择非极性 DB-1 短柱能使各组分更好地达到基线分离,其峰形也更对称。由于各组

分的沸程分布宽且沸点高,因此实验中采用多级和快速的升温程序,同时维持较高的平均线速度 48 cm/s 以实现快速分析。从图 1 的分离结果可以看到,在“1.2.1”节所述最佳色谱条件下,在 2.0 min 内实现了 8 种未衍生化长链脂肪酸的基线分离。

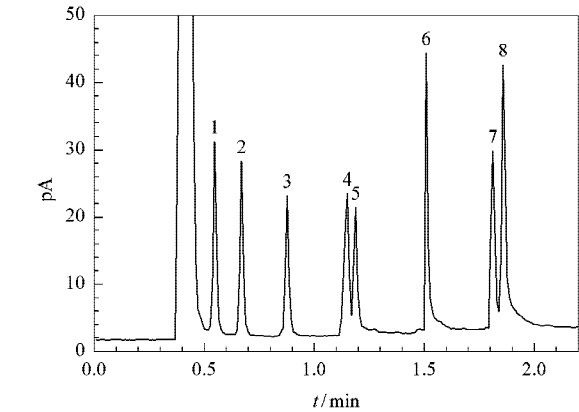


图 1 8 种未衍生化长链脂肪酸标准品的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of eight underivatized long-chain fatty acid standards
Peak identifications :1. dodecanoic acid ($C_{12:0}$) ;2. tetradecanoic acid ($C_{14:0}$) ;3. palmitic acid ($C_{16:0}$) ;4. oleic acid ($C_{18:1}$) ;5. stearic acid ($C_{18:0}$) ;6. eicosanoic acid ($C_{20:0}$) ;7. erucic acid ($C_{22:1}$) ;8. behenic acid ($C_{22:0}$) .

2.2 GC/MSD 对非衍生化脂肪酸的定性

为了确证各个流出的色谱峰是要测定的脂肪酸,采用 Agilent 6890/5973N GC/MSD 系统 (配有 HP-5MS 色谱柱) 对各标准长链脂肪酸进行了确认。图 2 是在“1.2.2”节所述实验条件下得到的各长链脂肪酸标准品的总离子流色谱图。利用 GC/MSD 工作站的峰纯度检验可知各组分无分解现象 ;以质谱的 NIST98 标准谱图库对各色谱峰进行检索,确定各长链脂肪酸在该谱图库中的出峰顺序与快速 GC 色谱分离的出峰顺序完全一致。表 1 给出了各种脂肪酸的一级质谱数据。

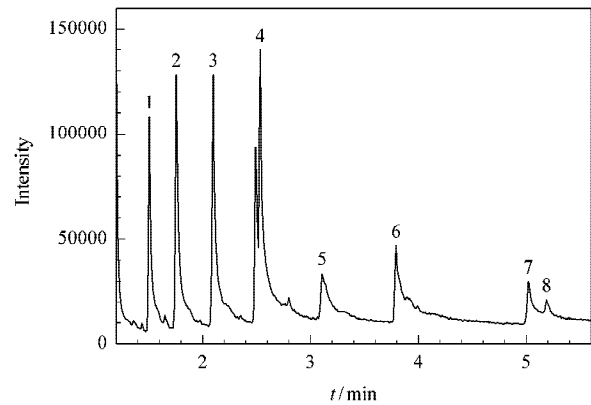


图 2 8 种未衍生化长链脂肪酸标准品的总离子流色谱图
Fig. 2 Total ion current chromatogram of eight underivatized long-chain fatty acid standards
For peak identifications, see Fig. 1.

表 1 8 种未衍生化长链脂肪酸的线性关系、检测限和一级质谱数据

Fatty acid	Linear equation	Linear range/(mg/L)	<i>r</i>	Detection limit/(mg/L)	[M + 1] ⁺ (<i>m/z</i>)
C _{12:0}	<i>Y</i> = 0.0625 <i>X</i> - 0.159	10.00 - 1200	0.989	2.80	201
C _{14:0}	<i>Y</i> = 0.0698 <i>X</i> - 0.303	10.00 - 1200	0.999	2.80	228
C _{16:0}	<i>Y</i> = 0.0901 <i>X</i> - 0.869	10.00 - 1200	0.988	2.80	256
C _{18:1}	<i>Y</i> = 0.0514 <i>X</i> - 2.467	40.00 - 1200	0.994	9.60	280
C _{18:0}	<i>Y</i> = 0.09654 <i>X</i> - 0.818	10.00 - 1200	0.993	3.20	284
C _{20:0}	<i>Y</i> = 0.0926 <i>X</i> - 1.462	10.00 - 1200	0.994	3.20	312
C _{22:1}	<i>Y</i> = 0.0658 <i>X</i> - 1.260	10.00 - 1200	0.994	3.20	336
C _{22:0}	<i>Y</i> = 0.102 <i>X</i> - 1.289	10.00 - 1200	0.997	4.00	340

Y:peak area ;*X*:mass concentration, mg/L.

2.3 实验方法的建立与评价

2.3.1 标准曲线和检测限

在“1.2.1”节所述的优化条件下,以各未衍生化长链脂肪酸组分的峰面积对其相应的质量浓度作图,得到各脂肪酸的标准曲线,其线性回归方程见表1,线性相关系数为0.988 ~ 0.999,表明线性关系良好。按照3 倍信噪比的原则计算的检测限也列于表1 中。

2.3.2 精密度和回收率

对食用油实际样品进行日内和日间试验,每个

样品重复测定5 次。所得长链脂肪酸保留时间的平均相对标准偏差(RSD)均小于0.3%(见表2),表明在同样的色谱分离条件下可以用保留时间进行定性分析。峰面积的日内和日间的平均相对标准偏差均小于10% 和13%(见表2),表明该方法的重现性和稳定性较好,可以用于常规分析。

在香油中定量加入混合脂肪酸的标准品,按照“1.2.4”节所述方法制备,所得各脂肪酸的回收率结果见表2。本方法的回收率范围为74.5% ~ 86.5%,可满足实际样品测定的需要。

表 2 本方法的精密度和回收率(*n* = 5)

Table 2 Precisions and recoveries of the method (*n* = 5)

Fatty acid	RSD of retention time/%	RSD of peak area/%		Real sample concentration/(mg/L)	Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%
		intra-day	inter-day				
C _{12:0}	0.22	6.2	8.5	—	63.0	48.9	77.6
C _{14:0}	0.08	8.7	9.7	—	63.0	46.9	74.5
C _{16:0}	0.13	7.2	10.5	87.43	63.0	141.9	86.5
C _{18:1}	0.16	4.3	12.2	1183.24	217.0	1348.84	76.3
C _{18:0}	0.18	4.8	11.1	86.55	72.0	146.45	83.2
C _{20:0}	0.20	6.4	10.5	23.60	72.0	80.8	79.5
C _{22:1}	0.24	8.0	11.4	30.79	90.0	107.29	85.0
C _{22:0}	0.19	5.6	12.0	61.25	72.0	123.45	86.3

— :the content of the long-chain fatty acid is lower than the detection limit.

2.4 实际样品的测定

用所建立的方法对市场上的香油、色拉油和调

和油产品进行了样品处理和快速 GC 分离测定,图3 为香油、色拉油和调和油的色谱图。每个样品重

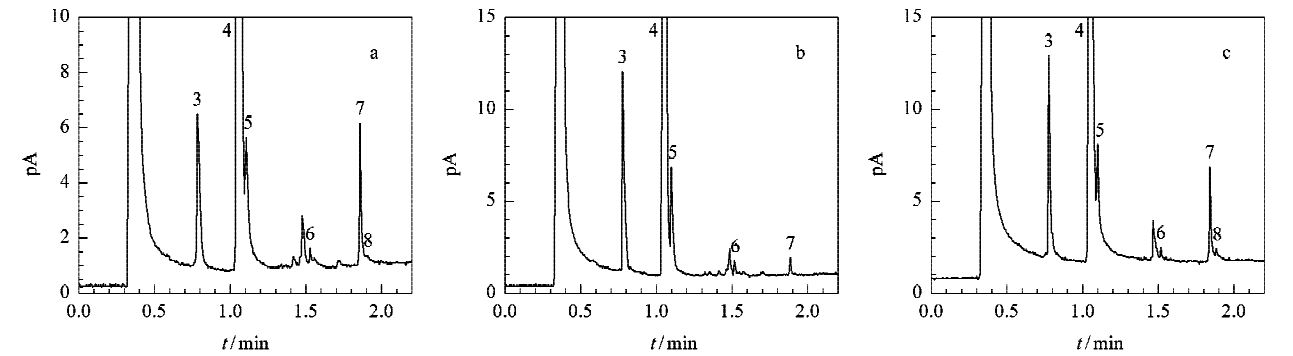


图 3 3 种食用油样品中未衍生化长链脂肪酸的快速 GC 分离图

Fig. 3 Chromatograms of underivatized long-chain fatty acids in three edible oils

a. Balm ;b. Salad oil ;c. Mix oil.

Peaks :3. palmitic acid ;4. oleic acid ;5. stearic acid ;6. eicosanic acid ;7. erucic acid ;8. behenic acid.

复测定 5 次,根据色谱峰的平均保留时间进行峰的鉴定,根据每个组分的标准工作曲线进行定量计算,结果见表 3。食用油中含量较高的主要脂肪酸为 C_{18:1} 和 C_{16:0},还含有少量的 C_{18:0} 和 C_{20:0} 以及微量的 C_{22:1} 和 C_{22:0}。

表 3 实际样品的分析结果						
Table 3	Analytical results of three real samples					
Sample	mg/g					
	Palmitic acid	Oleic acid	Stearic acid	Eicosanic acid	Erucic acid	Behenic acid
Balm	43	58	43	12	15	30
Salad oil	78	61	79	17	—	14
Mix oil	87	73	93	19	58	17

— : not detected.

3 结论

本研究建立的测定长链脂肪酸的快速 GC 方法可以对植物油等实际样品中的长链脂肪酸不经衍生化而直接进行定量分析。与传统的 GC 和 HPLC 方法相比,不需复杂的样品衍生化过程,在 2 min 内可实现 8 种长链脂肪酸的基线分离。该方法的回收率、灵敏度和重现性都能满足实际样品分析的要求。所测食用油中脂肪酸的含量与文献[8-10]报道的结果相符。

参考文献：

[1] Butler W R. Anim Reprod Sci, 2000, 60 :449

[2] Hoffmann M M, Scharnagl H, Köster W, Winkler K, Wieland H, März W. Clin Chim Acta, 2001, 303 :41

[3] Briard V, Leconte N, Michel F, Michalski M C. Eur J Lipid Sci Tech, 2003, 105 :677

[4] Ai J. Food Chem, 1997, 45 :1 278

[5] Zhao X E, Li Y L, Suo Y R, Shi Y W, Chen X M, Zhang H F, Sun X J, You J M. Chinese Journal of Analytical Chemistry (赵先恩, 李玉林, 索有瑞, 石运伟, 陈向明, 张海峰, 孙学军, 尤进茂. 分析化学), 2006, 34(2) :150

[6] Zhao X E, Suo Y R, Ding C X, Zhu F, Sun J, Zhao W C, Sun X J, You J M. Chinese Journal of Chromatography (赵先恩, 索有瑞, 丁晨旭, 朱芳, 孙菁, 赵文臣, 孙学军, 尤进茂. 色谱), 2006, 24(5) :456

[7] Bo H B, Wang X, Zhai Z D, Li Y M, Chen L R. Chinese Journal of Chromatography (薄海波, 王霞, 翟宗德, 李永民, 陈立仁. 色谱), 2006, 24(2) :181

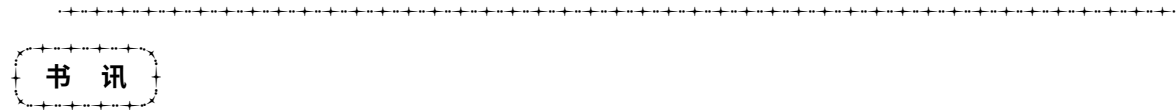
[8] He X Q, Xu D Y, Luo M Z, Lan Y B. Journal of Instrumental Analysis (何小青, 许德英, 罗美中, 蓝勇波. 分析测试学报), 2005, 24(1) :25

[9] Mondello L, Tranchida P Q, Costa R, Casilli A, Dugo P, Cotroneo A, Dugo G. J Sep Sci, 2003, 26 :1 467

[10] Mondello L, Casilli A, Tranchida P Q, Costa R, Chiofalo B, Dugo P, Dugo G. J Chromatogr A, 2004, 1 035 :237

[11] Rezanka T, Votruba J. Anal Chim Acta, 2002, 465 :273

[12] Stoll C, Lühs W, Zarhloul M K, Friedt W. Eur J Lipid Sci Tech, 2005, 107 :244



色谱技术丛书

色谱柱技术(第二版)

刘国詮、余兆楼 编著

出版日期：2006 年 1 月 页数：320 页 定价：¥38.00 元

本书是《色谱技术丛书》中的一册。作为分离的场所和工具,色谱柱性能的优劣从根本上决定了分离效果的好坏。本书从色谱的基本理论入手,进而分类介绍气相色谱柱和液相色谱柱技术。全书共 8 章,其中以较多的篇幅介绍了高效液相色谱的填料和色谱柱,对这一领域的新进展亦有所涉及。为给读者在实际工作中提供方便,还择要收集、介绍了一些主要的商品色谱柱,供有关人员选用色谱柱时参考。

本书可供从事气相色谱和液相色谱分析工作的技术人员、大中专院校相关专业的师生以及从事色谱柱开发研制的技术人员参考。

化学工业出版社

购书热线：(010) 64518888, 64518899 (传真)

售后服务：(010) 64518899

地址 北京市东城区青年湖南街 13 号

电子邮件：a64518888@yahoo.com.cn

读者服务部：(010) 64518811

邮编：100011