

文章编号: 1000-5862(2015)02-0162-04

超高效合相色谱-质谱法 测定大豆油中5种脂肪酸含量

林春花

(江西师范大学国家单糖化学合成工程技术研究中心 江西 南昌 330027)

摘要: 建立了大豆油中5种脂肪酸的超高效合相色谱-质谱(UPC²-MS)分析方法,这5种脂肪酸分别为棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸。待测物经皂化反应后,用正己烷溶解,经ACQUITY UPC² BEH 2-EP色谱柱分离,以CO₂-甲醇/乙腈(体积比为1:1)为流动相进行梯度洗脱,通过质谱检测器测定、外标法定量。方法的最低检出限为0.07 mg·L⁻¹,脂肪酸的加标回收率为90.50%~105.38%,相对标准偏差为0.81%~2.93%。结果表明,该方法灵敏度高、分离效果好、测定结果准确。

关键词: 超高效合相色谱-质谱法; 大豆油; 脂肪酸; 未衍生化

中图分类号: O 657.63 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.02.10

0 引言

大豆油是一种优良食用植物油^[1]。天然油脂中所含的脂肪酸以16~18碳脂肪酸为主,此外还含有少量的12~14碳以及更少量的20~24碳脂肪酸。研究表明,脂肪酸链中C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3这5种脂肪酸含量的变化会直接影响到油脂的性质和质量,而且不同的脂肪酸具有不同的营养价值^[2-3]。由于同一种类但来自不同产地或是不同采收期的大豆油所含脂肪酸的组份也会有一定的差异,因此建立一种快速、准确地分析大豆油中脂肪酸组成和含量的方法具有重要意义^[4]。

目前,有关脂肪酸的测定方法主要包括气相色谱法^[2-3, 5-9]和液相色谱法^[10-11],但这些方法一般都要对样品进行前处理——脂肪酸衍生化^[12]。衍生化不仅操作繁琐耗时,而且衍生化反应是否完全等因素直接影响产物的准确测定。近年来,也出现了采用全2维气相色谱^[4]、快速气相色谱^[13]和超高效液相色谱-蒸发光散射法^[14]直接分析未衍生化脂肪酸的文献报道。但是,这些方法都有一定的局限性。超高效合相色谱技术是Waters公司于2012年推出的一种基于超临界流体色谱技术原理发展而来的分离技术^[15],该技术的流动相主要以超临界CO₂为主,具

有粘度低、分离效率高、绿色环保的优势。本文建立了大豆油中5种脂肪酸的超高效合相色谱-质谱分析方法,为脂肪酸的检测提供了一种新的技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPC²系统(美国Waters公司),配Waters SQD2质谱检测器。METTLER TOLEDO AL204型电子天平(瑞士METTLER公司)。SK 1200H型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司);PURELAB Ultra MK 2型超纯水仪(英国ELGA公司)。5种脂肪酸标准品:棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)均购自Sigma Aldrich公司(纯度大于99%)。正己烷、甲醇和乙腈为色谱纯。实验用水为超纯水。3种市售大豆油。

1.2 混合标准溶液的配制

分别准确称取0.010 g各种脂肪酸标样,分别用正己烷定容至10 mL容量瓶中,配制成质量浓度为1 g·L⁻¹的单一标准品溶液。再用正己烷溶液制备成质量浓度为100 mg·L⁻¹的混合标准溶液,再稀释成系列标准工作溶液。

收稿日期: 2014-11-10

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAE07B00)资助项目。

作者简介: 林春花(1979-),女,江西新余人,助理研究员,硕士,主要从事色谱分析和精细化学品的研究。

1.3 样品制备

称取 10 g 左右大豆油置于 100 mL 烧瓶中,加入 20 g 质量分数为 20% 的 KOH 溶液进行皂化,加冷凝管于 100 ℃ 油浴中反应 8 h,停止加热.待反应液冷却后,加入 10 mL 2 mol · L⁻¹ 的 H₂SO₄ 溶液进行酸化,卸下烧瓶,转入分液漏斗,静置分层,上层用蒸馏水洗涤至中性,加入无水 Na₂SO₄ 进行干燥,即得脂肪酸样品.称取 0.025 g 左右的该脂肪酸样品于 250 mL 容量瓶中,用正己烷定容,溶液经有机膜过滤后直接进行 UPC² 系统分析.

1.4 实验条件

1.4.1 UPC² 色谱条件 采用 ACQUITY UPC² BEH 2-EP 色谱柱;系统背压为 13.8 MPa;色谱柱温度为 50 ℃;样品室温度为 10 ℃;流动相分别为超临界 CO₂(流动相 A) 和甲醇:乙腈(体积比 1:1,流动相 B);进样量为 1 μL;柱流速为 0.8 mL · min⁻¹;流动相梯度洗脱程序见表 1.

1.4.2 MS 条件 离子源为 ESI⁻;毛细管电压为 2.0 kV;锥孔电压为 40 V;源温度为 150 ℃;脱溶剂

气温度为 500 ℃;脱溶剂气体流速为 850 L · h⁻¹;锥孔气体流速为 40 L · h⁻¹;SIR 离子 *m/z* 分别为 255.42、283.48、281.46、279.45、277.43.

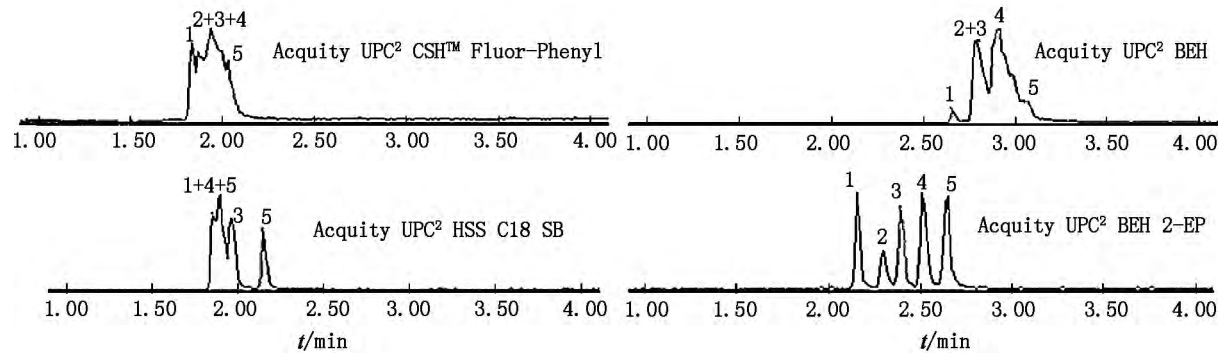
表 1 梯度洗程序

时间/min	A/%	B/%	曲线
初始	98	2	初始
2	96	4	6
3	96	4	6
4	90	10	6
5	98	2	6

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

本实验首先考察不同填料的色谱柱对脂肪酸分离的影响,选择了 4 款差异明显的色谱柱进行测定,分别为 UPC² BEH、BEH 2-EP、HSS C18 SB 和 CSHTM Fluoro-Phenyl.从图 1 实验结果可见,ACQUITY UPC² BEH 2-EP 色谱柱能够对 5 种脂肪酸产生有效的分离.



峰号: 1. 棕榈酸; 2. 硬脂酸; 3. 油酸; 4. 亚油酸; 5. 亚麻酸.

图 1 不同色谱柱对 5 种脂肪酸分离效果的影响

2.2 流动相中助溶剂的选择

本实验考察了 3 种不同有机溶剂甲醇、乙腈、甲醇:乙腈(体积比 1:1)对 5 种脂肪酸的分离影响.结果表明,3 种助溶剂对脂肪酸的洗脱能力为:甲醇 > 甲醇:乙腈(体积比 1:1) > 乙腈;而选择性也存在差异,其中甲醇:乙腈(体积比 1:1)和乙腈分离效果相当,但乙腈保留时间相对较长.综合洗脱能力和分离效果考虑,本实验最终采用甲醇:乙腈(体积比 1:1)作流动相.

2.3 色谱柱温度和系统背压的选择

本实验考察了不同柱温(40 ℃、50 ℃和 60 ℃)和系统背压(12.4、13.8 和 15.2 MPa)对 5 种脂肪

酸的分离影响.结果表明,随着柱温的升高和背压的降低,各个脂肪酸的保留时间有所增加.当柱温为 60 ℃时,软脂酸和亚麻酸的展宽明显,峰形拖尾,且过高的背压易使系统压力过高.综合考虑分离效果与分析效率,最终确定柱温为 50 ℃,系统背压为 13.8 MPa.

2.4 线性范围、相关系数、检出限及回收率

分别配制 0.5、5.0、25.0、50.0 和 100.0 mg · L⁻¹ 的混合标准溶液,在优化的色谱条件下进行检测,以峰面积(*Y*)对质量浓度(*X*, mg · L⁻¹)进行线性回归,得到线性回归方程.向已知含量的样品中分别添加 5 种成分的脂肪酸标准品,设置 3 个添加水平,每个加标水平重复测定 5 次,测定结果并计算加

标回收率和精密度. 按信噪比 $S/N \geq 3$,计算得到分析方法的检出限. 结果见表 2. 由表 2 可知 5 种脂肪酸在 $0.5 \sim 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.998$) ,回收率为 $89.30\% \sim 105.38\%$, RSD 为 $0.78\% \sim 2.93\%$,检出限为 $0.07 \sim 0.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,可满足实际样品测定的需要.

表 2 5 种脂肪酸的线性范围、相关系数、检出限及回收率的结果

序号	脂肪酸	线性方程	线性相关系数 (R^2)	检出限/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	本底值/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	加入值/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收 率/%	$RSD/\%$ $n=5$
1	C16: 0	$Y=1.323 \times 10^4 X+1.932 \times 10^2$	0.999 7	0.09	10.42	3.5	97.71	2.65
						10.5	98.48	1.91
						30	100.40	2.39
2	C18: 0	$Y=8.083 \times 10^3 X+5.477 \times 10^3$	0.999 0	0.26	3.76	1.3	105.38	2.85
						3.8	103.42	1.66
						12.0	101.00	2.21
3	C18: 1	$Y=1.615 \times 10^4 X+1.351 \times 10^3$	0.999 7	0.13	21.50	7.2	98.33	1.95
						21.5	99.67	0.78
						64.5	98.82	1.52
4	C18: 2	$Y=1.804 \times 10^4 X+5.047 \times 10^3$	0.999 8	0.11	54.78	5.5	100.91	1.85
						11.0	99.73	0.97
						21.9	98.95	1.73
5	C18: 3	$Y=2.177 \times 10^4 X-7.898 \times 10^3$	0.998 5	0.07	6.87	2.0	90.50	2.93
						7.0	94.71	1.72
						20.6	97.72	2.56

Y: 峰面积; X: 质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.5 实际样品分析

采用本方法对市售的 3 种大豆油样品进行检测,从表 3 可见 3 种大豆油所含棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等 5 种脂肪酸的比例有不同,但

总体来讲都以亚油酸为主,同时亚麻酸含量相对较高.文献[16]报道亚麻酸是大豆油豆腥味的主要来源,本研究的结果进一步证明了这一结论.

表 3 实际样品检测结果

	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$				
样品	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	亚麻酸
1 [#] 大豆油	10.42	3.76	21.50	54.78	6.87
2 [#] 大豆油	8.05	4.58	23.33	53.05	8.32
3 [#] 大豆油	9.69	5.29	21.11	55.08	6.31

3 结论

本文通过对色谱柱、色谱柱温度和系统背压等条件的优化和考察,建立了超高效合相色谱-质谱法测定大豆油中 5 种脂肪酸的含量. 本方法是一种“三高一低”便捷、低廉的分析方法,也为合相色谱技术在油脂相关分析领域的进一步应用和研究提供了参考.

4 参考文献

[1] 穆同娜,孙婷,吴燕涛,等. 3 种食用植物油中不饱和脂肪酸含量调查 [J]. 粮油食品科技, 2011, 3(19): 36-

38.
[2] 曾建立,杜泽学,陈艳凤. 气相色谱分析未衍生化脂肪酸及其甲酯 [J]. 石油炼制与化工, 2012, 43(7): 104-109.
[3] 蒋秀琴,刘立成,赵福忠,等. 常见植物油脂肪酸含量的分析 [J]. 饲料博览, 2010(3): 27-30.
[4] 郑月明,冯峰,国伟,等. 全 2 维气相色谱-四极杆质谱法检测植物油脂中脂肪酸 [J]. 色谱, 2012, 11(30): 1166-1171.
[5] 朱笃,徐曲. 青箱籽油脂肪酸组成的分析 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2002, 26(2): 110-112.
[6] 回瑞华,候冬岩,李铁纯,等. 棉籽油中脂肪酸不同的酯化方法与气相色谱-质谱分析 [J]. 质谱学报, 2005, 26(2): 90-92.
[7] 徐桂转,梁新,苏惠,等. 利用气相色谱分析生物柴油中

- 脂肪酸甲酯含量研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (28): 12090-12091.
- [8] Ghiaci M, Aghabarari B, Gil A. Production of biodiesel by esterification of natural fatty acids over modified organo-clay catalysts [J]. Fuel, 2011, 90(11): 3382-3389.
- [9] 巫淼鑫, 鄢国英, 韩瑛, 等. 6种食用植物油及其生物柴油中脂肪酸成分的比较研究 [J]. 中国油脂, 2003, 28 (12): 65-67.
- [10] 张大华, 李丽霞. 液相色谱法测定生物柴油中多种脂肪酸甲酯 [J]. 粮食与油脂, 2007(12): 41-43.
- [11] Wood R, Lee T. High-performance liquid chromatography of fatty acids: Quantitative analysis of saturated, monoenoic, polyenoic and geometrical isomers [J]. Journal of Chromatography A, 1983, 254: 237-246.
- [12] 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(6): 64-66.
- [13] 孟哲, 文大为, 廖一平, 等. 快速气相色谱法测定食用油中的衍生化长链脂肪酸 [J]. 色谱, 2007, 25(2): 254-257.
- [14] 李一哲, 包桂蓉, 王华. 超高效液相色谱法测定生物柴油中的11种脂肪酸及其甲酯 [J]. 色谱, 2008, 26(4): 494-498.
- [15] 徐永威, 孙庆龙, 黄静, 等. Waters ACQUITY UPC² 仪器结构和性能特点 [J]. 现代仪器, 2012, 18(5): 45-48.
- [16] 邹洁, 赵维佳, 汪海峰, 等. 大豆油中掺伪棕榈油的检测方法研究 [J]. 中国油脂, 2009, 34(04): 73-76.

The Detection of Five Fatty Acids in Soybean Oil by Ultra Performance Convergence Chromatography-Mass Spectrometry

LIN Chunhua

(National Monosaccharide Chemical Synthesis Engineering Research Center, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330027, China)

Abstract: The 5 fatty acids in soybean oil were analyzed using ultra-performance convergence chromatography, including palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid. The sample was dissolved by *n*-hexane after saponification reaction. The fatty acids were separated on the column of ACQUITY UPC² BEH 2-EP by gradient elution with carbon dioxide and $V(\text{methano}) : V(\text{acetonitrile}) = 1:1$ system, and finally detected by MS detector. The limits of detection of target compounds in the method were $0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The recoveries were from 90.50% to 105.38% at three spiked levels with the relative standard deviations lower than 3.0%. The method, with high sensitivity, good separation effect and high recovery, was successfully used to detect the underivatization fatty acids in soybean oil.

Key words: ultra-performance convergence chromatography-mass spectrometry; soybean oil; fatty acids; underivatization

(责任编辑: 刘显亮)