

银离子固相萃取-气相色谱法检测乳脂肪中的反式脂肪酸

李蕊¹, 徐小民², 李亚利¹, 宋国良², 韩见龙², 任一平^{2*}

(1. 温州医学院检验医学院与生命科学院, 浙江 温州 325035;

2. 浙江省疾病预防控制中心理化检验所, 浙江 杭州 310051)

摘要:建立了分离反式油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)的银离子固相萃取-气相色谱(Ag⁺-SPE/GC)方法,并应用于乳脂肪中反式脂肪酸的检测。采用自制的银离子固相萃取柱对样品进行预分离,总脂肪酸甲酯化后上样,依次经9 mL 甲苯-正己烷(体积比5:95)、8 mL 甲苯-正己烷(体积比17:83)、6 mL 甲苯-乙酸乙酯(体积比17:83)、10 mL 甲苯-乙酸乙酯(体积比30:70)洗脱并分别收集洗脱液,采用气相色谱分别进行检测。结果显示除了反式亚麻酸的回收率为69.9%~101.0%、相对标准偏差(RSD)为11.0%~18.1%外,其余的反式脂肪酸的回收率均为88.4%~107.2%、RSD为1.2%~11.9%。该方法通过特异性固相萃取的方法对样品进行前处理,较好地避免了样品中顺式及饱和脂肪酸对反式脂肪酸检测的干扰。

关键词:银离子固相萃取;气相色谱法;反式脂肪酸;乳脂肪

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2010)12-1168-05

Determination of *trans* fatty acid C18:1, C18:2 and C18:3 isomers in milk fat by silver ion solid phase extraction-gas chromatography

LI Rui¹, XU Xiaomin², LI Yali¹, SONG Guoliang², HAN Jianlong², REN Yiping^{2*}

(1. School of Medical Laboratory Science and School of Life Science, Wenzhou Medical College,

Wenzhou 325035, China; 2. Physical and Chemical Testing Department,

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

Abstract: A method for the determination of *trans* fatty acids C18:1, C18:2 and C18:3 in milk fat was developed by silver ion solid phase extraction-gas chromatography (Ag⁺-SPE/GC). The fatty acid methyl esters derived from total milk fat were loaded onto an Ag⁺-SPE cartridge, and then eluted with 9 mL of toluene-hexane (5:95, v/v), 8 mL of toluene-hexane (17:83, v/v), 6 mL of toluene-ethyl acetate (17:83, v/v) and 10 mL of toluene-ethyl acetate (30:70, v/v) in sequence. The fraction from each step was analyzed by GC. The average recoveries of *trans* fatty acids ranged from 88.4% to 107.2% with the relative standard deviations (RSDs) from 1.2% to 11.9% except *trans* linolenic acid with the recoveries from 69.9% to 101.0% and the RSDs from 11.0% to 18.1%. Comparing with the traditional methods, the developed approach can avoid the interference of *cis* and saturated fatty acids. The method was successfully applied to analyze dairy products. Satisfactory results were shown.

Key words: silver-ion solid phase extraction (Ag⁺-SPE); gas chromatography (GC); *trans* fatty acids; milk fat

反式脂肪酸(*trans* fatty acids, TFAs)是一种具有反式构型的不饱和脂肪酸,主要存在于反刍动物(牛、羊)脂肪、乳及乳制品中;植物油脂在氢化、精炼和食品加工过程中也会转化形成多种反式脂肪

酸^[1,2]。研究表明,食品中的TFAs会加速动脉硬化,导致心血管疾病^[3-6];还会影响必需脂肪酸的吸收,抑制人类早期的生长发育^[7];此外还可以提高胰岛素抗性,引起II型糖尿病^[8]。但TFAs中的11

* 通讯联系人:任一平,教授,主要研究方向为卫生检验及食品营养因子分析。Tel:(0571)87115261, E-mail:renyiping@263.net.
收稿日期:2010-09-09

位反式油酸(C18:1-11t)在人体内可代谢为有益的共轭亚油酸^[9],这表明并非所有的 TFAs 都对健康不利。因此建立一种能够准确检测各种反式脂肪酸的方法十分必要。

目前国内外检测反式脂肪酸的方法包括红外吸收光谱法(IR)^[10,11]、毛细管电泳法(CE)^[12,13]、银离子高效液相色谱法(Ag⁺-HPLC)^[14,15]、反相高效液相色谱法(RP-HPLC)^[16]、银离子薄层色谱法(Ag⁺-TLC)^[1,17,18]、气相色谱法(GC)^[19-24]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[25,26]等。其中 GC 法较为常用,但单独使用该方法时,即使用 100 m 长的专用色谱柱对乳脂肪中的 TFAs 进行检测,也很难避免其中的顺式及饱和脂肪酸对 TFAs 检测的干扰,使检测结果产生较大的偏差。我们根据 Ag⁺与顺式脂肪酸双键间存在微弱作用力,且随双键数量增多作用力增强的原理,采用自制的银离子固相萃取(Ag⁺-SPE)柱预分离与 GC 检测相结合的方法对样品中 TFAs 进行检测。通过对洗脱条件的不断探索和优化,基本上消除了顺式及饱和脂肪酸产生的干扰,达到了准确检测反式脂肪酸的目的。同时与 Ag⁺-TLC 法相比,本文建立的方法具有操作简单、污染小等优点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GC-6890N 气相色谱仪,配有氢火焰离子化检测器(美国 Agilent 公司);Varian CP-Sil 88 色谱柱(100 m × 250 μm × 0.20 μm)(美国 Varian 公司);超纯水(Sartorius Stedim arium 61215-611 超纯水系统,USA);混合型阳离子交换填料(PCX,天津艾杰尔科技公司);C18 填料(美国 Supelco 公司);甲醇、甲苯、正己烷、乙酸乙酯(HPLC 级,美国 TEDIA 公司);氯化钠、硝酸银、氢氧化钾均为分析纯,氯化钠经过 600 °C 烘烤 4 h 后得到 2 mol/L 盐酸甲醇溶液。脂肪酸标准品:6 位反式油酸(C18:1-6t)、9 位反式油酸(C18:1-9t)、C18:1-11t、9 位顺式油酸(C18:1-9c)和亚油酸(C18:2)的 4 种异构体混合标准品,亚麻酸(C18:3)的 8 种异构体混合标准品(美国 Sigma 公司)。

标准储备液和标准工作液的配制:分别称取 10.0 mg 标准品,用正己烷溶解并定容于 10 mL 棕色容量瓶中,配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液,于 -20 °C 下保存。取各标准储备液适量,用正己烷稀释配制所需浓度的混合标准工作液,密封,于 4 °C 下保存备用。

样品来源:乳制品样品均购自超市。

1.2 样品预处理

1.2.1 乳脂肪的提取

按照国家标准方法^[20]进行提取。

1.2.2 乳脂肪的皂化和甲酯化

准确称取 10 mg 前述提取的乳脂肪,加入 0.7 mL 1 mol/L 的氢氧化钾-甲醇溶液,混匀,置于 60 °C 水浴中振荡 3 min;待冷却至室温后加入 1 mL 2 mol/L 的盐酸-甲醇溶液,混匀,置于 50 °C 烘箱中反应 15 min;待冷却至室温后加入 3 mL 饱和 NaCl 溶液及 1 mL 正己烷,混匀,于 4 000 r/min 速率下离心 5 min,上清液(正己烷相)待净化。

1.3 银离子交换柱的制备与活化

称取 PCX 填料和 C18 填料各 0.3 g 混匀,装入空柱管(600 mg/3 mL)中制备固相萃取柱。依次用 3 mL 甲醇、5 mL 水洗柱,加入 1.5 mL 0.1 mol/L 的 AgNO₃ 溶液,流干后再用 3 mL 水洗去过量的 AgNO₃ 溶液。依次用 2 mL 甲醇、乙酸乙酯、正己烷淋洗,活化固相萃取柱。

1.4 样品净化

取 1.2.2 节甲酯化后的正己烷溶液 0.2 mL 上样,依次用甲苯-正己烷(体积比 5:95)9 mL、甲苯-正己烷(体积比 17:83)8 mL、甲苯-乙酸乙酯(体积比 17:83)6 mL、甲苯-乙酸乙酯(体积比 30:70)10 mL 洗脱并分别收集洗脱液,于 45 °C 下用氮气吹干,加入 0.2 mL 正己烷溶解并定容,待测定。

1.5 色谱条件

柱温升温程序:起始温度为 60 °C,保持 2 min,以 15 °C/min 速率升温至 100 °C,再以 4 °C/min 速率升温至 230 °C,保持 18 min;进样口和检测器温度:230 °C;H₂ 流速:40 mL/min;空气流速:400 mL/min;载气(N₂):1.0 mL/min;分流比 5:1,进样量 1 μL。

2 结果与讨论

2.1 洗脱条件的优化

通过洗脱溶剂浓度和体积的正交试验,最终确定洗脱条件依次为:a.用甲苯-正己烷(体积比为 5:95)9 mL 洗脱,洗脱物为饱和脂肪酸和反式油酸(C18:1 t);b.用甲苯-正己烷(体积比为 17:83)8 mL 洗脱,洗脱物为顺式油酸(C18:1 c)和反式亚油酸(C18:2 t);c.用甲苯-乙酸乙酯(体积比为 17:83)6 mL 洗脱,洗脱物为顺式亚油酸(C18:2 c)和反式亚麻酸(C18:3 t);d.用甲苯-乙酸乙酯(体积比为 30:70)10 mL,洗脱物为顺式亚麻酸(C18:3

c)。顺、反式油酸、亚油酸和亚麻酸混合标准溶液的洗脱结果见图 1。

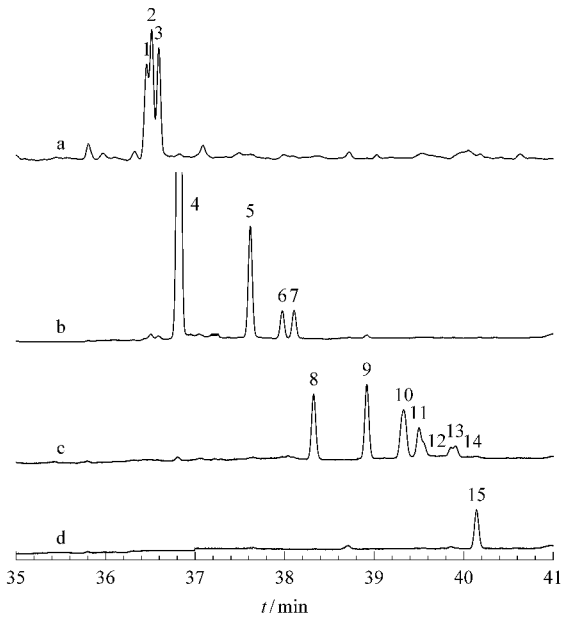


图 1 脂肪酸甲酯混合标准物经 Ag^+ -SPE 柱洗脱分离的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of fatty acid methyl ester (FAME) standards separated by an Ag^+ -SPE cartridge

a. eluted with 9 mL of toluene-hexane (5:95, v/v); b. eluted with 8 mL of toluene-hexane (17:83, v/v); c. eluted with 6 mL of toluene-ethyl acetate (17:83, v/v); d. eluted with 10 mL of toluene-ethyl acetate (30:70, v/v).

Peaks : 1. C18:1-6t; 2. C18:1-9t; 3. C18:1-11t; 4. C18:1-9c; 5. C18:2-9t, 12t; 6 and 7. C18:2 t; 8. C18:2-9c, 12c; 9. C18:3-9t, 12t, 15t; 10-14. C18:3 t; 15. C18:3-9c, 12c, 15c.

2.2 线性范围和检出限

在选定的色谱条件下,对一系列质量浓度的混合标准溶液进行分析。以峰面积(y)对标准工作液中被测组分的质量浓度(x , mg/L)作图,其线性方程、线性相关系数及线性范围见表 1。

表 1 5 种反式脂肪酸的线性回归方程、相关系数(r^2)及线性范围
Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r^2) and linear ranges of 5 *trans* fatty acids

Analyte	Regression equation	r^2	Linear range/ (mg/L)
C18:1-6t	$y = 2.6743x + 0.9750$	0.998	5 - 150
C18:1-9t	$y = 2.9078x + 1.3981$	0.997	5 - 150
C18:1-11t	$y = 3.3969x - 0.6032$	0.998	5 - 150
C18:2-9t, 12t	$y = 2.4956x + 1.2164$	0.997	5 - 150
C18:3-9t, 12t, 15t	$y = 2.5684x + 1.2861$	0.996	5 - 150

y : peak area; x : mass concentration, mg/L.

2.3 方法的重复性和回收率

在 1.2.1 节提取的乳脂肪样品中添加混合标准溶液,进行 3 个浓度水平的添加回收试验,按 1.2.2 节所述方法对样品进行处理,重复试验 6 次,考察方

法的回收率和重现性,结果见表 2。除了反式亚麻酸外,其余脂肪酸的回收率均为 88.4% ~ 107.2%,相对标准偏差(RSD)为 1.2% ~ 11.9%,说明本方法具有良好的精密度与准确度。

表 2 乳脂肪中 5 种反式脂肪酸的加标回收率和相对标准偏差($n = 6$)

Table 2 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of 5 *trans* fatty acids in milk fat ($n = 6$)

Analyte	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
C18:1-6t	ND	5.00	4.82	96.4	7.6
		10	10.45	104.5	4.9
		20	21.44	107.2	2.2
C18:1-9t	16.80	5	21.22	88.4	5.7
		10.00	26.74	99.4	7.8
		20.00	37.08	101.4	2.5
C18:1-11t	55.50	5.00	60.04	90.8	6.5
		10.00	65.67	101.7	6.8
		20.00	76.40	104.5	2.6
C18:2-9t, 12t	ND	15.00	14.10	94.0	11.9
		30.00	30.75	102.5	4.8
		60.00	61.68	102.8	1.2
C18:3-9t, 12t, 15t	ND	10.00	10.10	101.0	13.5
		20.00	13.98	69.9	18.1
		40.00	34.96	87.4	11.0

ND: not detected.

2.4 乳脂肪样品的检测

总脂肪含量为 2 mg 的乳脂肪经 Ag^+ -SPE 柱预分离后的 GC 分离色谱图见图 2。4 步洗脱结果显示,顺、反式脂肪酸异构体的色谱峰得到了较好的分离,达到了准确测定反式脂肪酸含量的目的。

对 10 种乳制品中反式脂肪酸含量的检测结果见表 3。方法 1 为本实验所采用的方法,即将总脂肪酸甲酯经 Ag^+ -SPE 柱分离后用 GC 进行检测,分离情况见图 2a ~ d,将图 2a、b、c 中 C18:1 t、C18:2 t、C18:3 t 区域内的组分计为反式脂肪酸。方法 2 为国家标准方法(GB 5413.36-2010),检测结果见图 2 中总脂肪的谱图,并将其中 C18:1 t、C18:2 t 区域内的组分计为反式脂肪酸。从表 3 的检测结果可以看出,两种检测方法得到的结果存在一定的差异:首先,方法 2 对大多数样品中 C18:1 t 的检测结果偏低。从图 2a 的结果不难看出,未过 Ag^+ -SPE 柱前,C18:1-11t 后的反式油酸与顺式油酸的色谱峰存在部分重叠的现象,同时图 2b 中也有部分顺式油酸(C18:1-6 ~ 8c)包含在反式油酸的色谱峰内,从而造成了两者检测结果的差异。其次,两种方法对 C18:2 t 的测定结果差异较为明显,其原因主要是

现有的色谱柱对反式亚油酸的分离能力有限,不能很好地将饱和脂肪酸及顺式亚油酸与反式亚油酸完全分离,导致方法 2 的检测结果偏高。此外,普通色谱柱对 γ -C18:3 和反式亚麻酸的分离较难达到满意

的效果,而经 Ag^+ -SPE 柱预分离后可使其分离效果较为理想,实现了对反式亚麻酸的准确定量,从而更全面地反映出乳脂肪中 TFAs 的含量,使反式脂肪酸的检测方法更具有科学性。

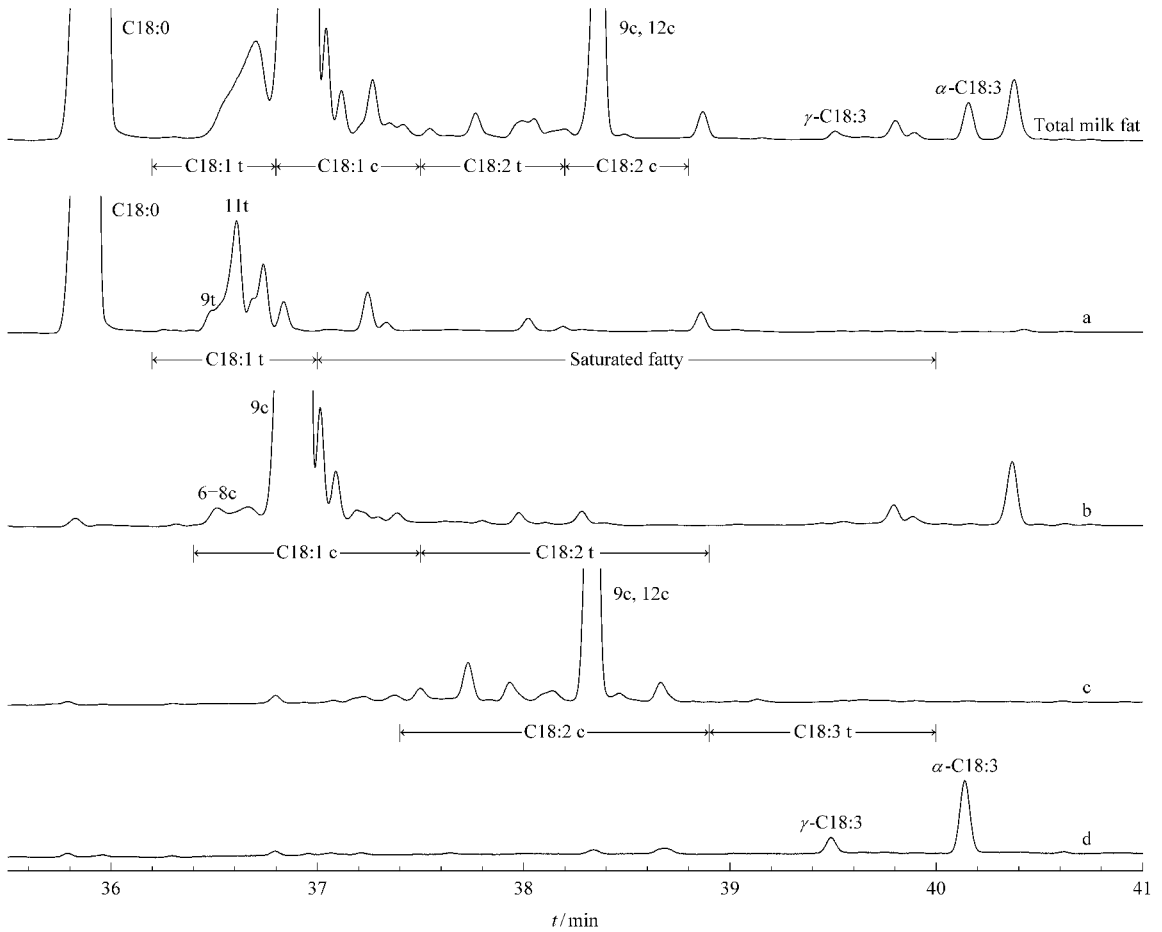


图 2 乳脂肪经 Ag^+ -SPE 洗脱分离前后的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of FAMES from total milk fat and the fractions isolated by an Ag^+ -SPE cartridge

Fractions eluted with (a) 9 mL of toluene-hexane (5:95, v/v), (b) 8 mL of toluene-hexane (17:83, v/v), (c) 6 mL of toluene-ethyl acetate (17:83, v/v) and (d) 10 mL of toluene-ethyl acetate (30:70, v/v).

表 3 两种方法测定乳脂肪中 TFAs 的比较

Table 3 Comparison of the two methods for the determination of TFAs in milk fat

Sample	Method 1			Method 2		
	C18:1 t	C18:2 t	C18:3 t	C18:1 t	C18:2 t	C18:3 t
1	26.72	2.14	0.91	16.24	6.87	-
2	15.35	1.74	0.45	14.44	3.70	-
3	11.26	1.8	0.47	12.76	4.42	-
4	22.09	2.37	0.48	17.94	4.43	-
5	17.82	1.69	0.49	18.03	3.85	-
6	24.61	2.69	0.78	17	4.66	-
7	13.81	2.71	2.11	10.49	3.34	-
8	29.03	2.97	2.14	19.15	7.74	-
9	26.5	3.06	0.73	15.6	7.54	-
10	23.53	1.89	0.58	17.35	3.82	-

Method 1: the method described in the text; Method 2: GB 5413.36-2010, which doesn't involve in the determination of C18:3 t.

3 结论

建立了一种 Ag^+ -SPE 柱预分离与 GC 结合检测乳脂肪中反式脂肪酸的方法,与仅使用专用色谱柱对样品中反式脂肪酸进行分析的 GC 方法相比,本实验通过特异性固相萃取的方法对样品进行前处理,较好地避免了样品中顺式及饱和脂肪酸对反式脂肪酸的干扰,达到了准确检测乳脂肪中反式脂肪酸含量的目的。同时该方法不仅能准确检测样品中反式 C18:1、C18:2 的含量,也能实现对反式 C18:3 含量的测定,较为全面地反映了乳脂肪中反式脂肪酸的含量。该方法的优点是操作简单、准确度高,但也不可避免地造成了检测时间的增加,实际操作时可以根据检测的准确度要求选择使用该方法。

参考文献：

- [1] Marekov I , Panayotova S , Tarandjiiska R. *J Liq Chromatogr Related Technol* , 2009 , 32(9) : 1183
- [2] Chen Y , Zhang Q L , Lin C , et al. *Cereal and Food Industry* (陈宜 , 张青龄 , 林丛 , 等. 粮食与食品工业) , 2009 , 16(5) : 25
- [3] Willett W C. *Atherscler Suppl* , 2006 , 7 : 5
- [4] Su H , Yu J H. *Chinese Journal of Cardiology* (苏海 , 俞建华. 中华心血管病杂志) , 2007 , 35(6) : 586
- [5] Mozaffarian D , Aro A , Willett W C. *Eur J Clin Nutr* , 2009 , 63 : S5
- [6] Sun Q , Ma J , Campos H , et al. *Circulation* , 2007 , 115 : 1858
- [7] Innis S M. *Atherscler Suppl* , 2006 , 7 : 17
- [8] Risérus U. *Atherscler Suppl* , 2006 , 7 : 37
- [9] Adlof R O , Duval S , Emken E A. *Lipids* , 2000 , 35(2) : 131
- [10] Juanéda P , Ledoux M , Sébédio J L. *Eur J Lipid Sci Technol* , 2007 , 109 : 901
- [11] Mossoba M M , Seiler A , Kramer J K G , et al. *J Am Oil Chem Soc* , 2009 , 86 : 1037
- [12] Castro P M D , Barra M M , Ribeiro M C C , et al. *J Agric Food Chem* , 2010 , 58 : 1403
- [13] Otieno A C , Mwangela S M. *Anal Chim Acta* , 2008 , 624 : 163
- [14] Dance L J E , Doran O , Hallett K , et al. *Eur J Lipid Sci Technol* , 2010 , 112 : 188
- [15] Müller A , Düsterloh K , Ringseis R , et al. *J Sep Sci* , 2006 , 29 : 358
- [16] Tsuzuki W , Ushida K. *Lipids* , 2009 , 44(4) : 373
- [17] Wolff R L , Bayard C C , Fabien R J. *Am Oil Chem Soc* , 1995 , 72(12) : 1471
- [18] Liu D M , Deng Z Y , Li J , et al. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (刘东敏 , 邓泽元 , 李静 , 等. 分析试验室) , 2008 , 27(12) : 6
- [19] Ledoux M , Laloux L , Wolff R L. *Analysis* , 2000 , 28(5) : 402
- [20] GB 5413. 36-2010
- [21] Han J H , Kozui H , Yang Y X , et al. *Acta Nutrimenta Sinica* (韩军华 , 洪水宏之 , 杨月欣 , 等. 营养学报) , 2008 , 30(3) : 303
- [22] Kramer J K G , Hernandez M , Cruz-Hernandez C , et al. *Lipids* , 2008 , 43 : 259
- [23] Delmonte P , Rader J. *Anal Bioanal Chem* , 2007 , 389(1) : 77
- [24] Liu W H , Inbaraj B S , Chen B H. *Food Chem* , 2007 , 104(4) : 1740
- [25] Kandhro A , Sherazi S T H , Mahesar S A , et al. *Food Chem* , 2007 , 109(1) : 207
- [26] Hauff S , Vetter W. *J Agric. Food Chem* , 2010 , 58 : 707