

毛细管气相色谱法测定植物油脂肪酸组成初探

王江蓉^{1,2}, 周建平¹, 刘荣², 邓志坚², 黄力²

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128) (2. 湖南国家粮油质量监测中心, 湖南 长沙 410005)

摘要: 本研究通过参考文献, 直接使用常见油料植物种子制备纯油甲酯进行分析, 探讨了快速制备甲酯的试剂选择及用量, 强极性和弱极性的两种不同类型毛细管柱的最佳色谱分析条件, 并将测定的主要脂肪酸含量与国家标准进行比较, 结果较为一致, 而且平行测定的相对标准偏差表明方法有较好的精密度和重复性。本论文所测 ECL 值与文献标准值对照, 差别很小, 说明本实验操作系统是稳定和可靠的, 本研究试图得到一种能够检测大批量样品的简单、快速、准确的植物油脂肪酸组成分析方法。

关键词: 植物油; 脂肪酸组成; 毛细管气相色谱法; 最佳色谱条件

中图分类号: TS225.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0084-04

Preliminary Research on the Measurement of Fatty Acid Composition of the Vegetable Oil by Capillary Column Chromatography

WANG Jiang-rong^{1,2}, ZHOU Jiang-ping¹, LIU Rong², DENG Zhi-jian², HUANG Li²

(1. College of Food Sciences and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128 China)

(2. National grain and oil quality monitoring center of Hunan Province, Changsha 410005, China)

Abstract: Pure methyl esters were prepared using common oil plant seeds and the fatty acid composition of the achieved oil was measured by capillary column chromatography. The kinds and dosage of reagents for fast preparation of the methyl esters were investigated and the chromatographic conditions using two kinds of capillary columns were optimized. Under the determined conditions, the fatty acid contents in the oil were in accord with the national standards. Compared the standards values with ECL values, the method was steady and credible, because the difference of comparison was little. This simple, fast, accurate method was suitable for determining fatty acid composition of samples in large quantities.

Key words: vegetable oil; fatty acids ingredient; capillary column chromatography; optimized chromatographic parameters

目前最常用的脂肪酸组成分析方法是气相色谱法。气相色谱可利用其色谱柱将脂肪酸甲酯按碳原子数, 或不饱和键的数量多少来进行分离和测定。通常采用二乙二醇丁二酸酯 (DEGS)、二乙二醇己二酸酯 (DEGA) 或 1,4-丁二醇丁二酸酯 (BDS) 为固定液的填充柱^[1-2]。但由于填充柱的柱效不高, 且分析时间长, 如硬脂酸、油酸等组分往往分离效果不佳^[3]。近年来毛细管气相色谱法的应用越来越广泛, 因为毛细管柱的柱径小, 柱较长, 因而柱效高, 能使脂肪酸组分在柱内进行反复分配, 并得以完全分离, 因此本研究采用毛细管气相色谱法测定。对油脂的脂肪酸组成分析时, 先应制备出脂肪酸甲酯, 以降低沸点, 提高其稳定性, 然后进行气相色谱分析^[4-5]。通常气相色谱分析应先测定标准品, 再测定样品, 通过与标准品

收稿日期: 2007-06-01; 改回: 2007-08-30

作者简介: 王江蓉(1970-), 女, 在职研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工

通讯作者: 周建平(1955-), 男, 教授, 硕士生导师

进行比较来进行定性及定量分析, 但由于脂肪酸甲酯标样十分昂贵, 且不易保存, 本研究通过参考文献, 直接使用常见油料植物种子制备甲酯进行初步分析, 考察了快速制备甲酯的试剂选择及用量, 极性和非极性的两种不同类型毛细管柱的最佳色谱分析条件, 并将测定的主要脂肪酸含量与国家标准进行比较, 结果较为一致。通过本分析初步建立一种简单、快速、准确的植物油脂肪酸组成分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料: 油菜籽、大豆、花生、油茶籽

试剂: 金属钠、NaCl、KOH, CH₃OH 溶液、苯、石油醚、乙醚溶液 (试剂均为分析纯)。

1.2 仪器及测试条件

HP6890 气相色谱仪; FID 氢火焰检测器; 10 μ L 微量进样器; SGE 公司 AC20 石英玻璃毛细管柱 (柱

长 30 m, 柱径 0.25 mm, 液膜厚度 0.22 μm); Agilent 公司 HP-5 石英玻璃毛细管柱 (柱长 30 m, 柱径 0.25 mm, 液膜厚度 0.25 μm)。

载气 N_2 (纯度 99.999%); 分流比 50:1; 燃气 H_2 : 40 mL/min; Air: 400 mL/min, 进样口: 260 $^\circ\text{C}$; 检测器: 260 $^\circ\text{C}$ 。

1.3 试验方法

1.3.1 植物种子脂肪酸的快速甲酯化^[4-6]

将植物种子干燥后, 取 200 mg 左右, 研碎后放入 10 mL 具塞试管中, 加入萃取液 3 mL, 浸提 15 min 后, 再加入衍生催化溶液 1 mL, 振摇后置于 50 $^\circ\text{C}$ 水浴约 15 min, 取出后沿管壁加入 5% NaCl 溶液使有机层上升至试管上部, 静置分层后, 取上层清液 1 μL 作气相色谱分析。

1.3.2 不同色谱柱色谱分析条件的优化选择

不同色谱柱由于性质的差异, 在同一色谱分析条件下不一定能达到同样的分析效果, 因此必须根据所选择的色谱柱分离目标化合物的具体情况选择仪器分析条件。

1.3.3 色谱峰的确定原则

采用常见油料植物种子进行甲酯化, 在没有甲酯标样的情况下, 根据文献报道的脂肪酸组成含量情况及脂肪酸甲酯在色谱图上的出峰规律, 即脂肪酸甲酯色谱峰按碳原子数目增加的次序出现, 如碳原子数目相同, 则按饱和度增加的次序出现, 来推测定性^[1,5]。

1.3.4 等效链长值 (ECL) 的测定^[7-9]

采用与文献相同的色谱条件, 色谱柱为 AC20 柱 (25 m \times 0.25 mm \times 0.22 μm); 柱温 175 $^\circ\text{C}$; 进样器温度 250 $^\circ\text{C}$; 检测器温度 250 $^\circ\text{C}$; 载气 N_2 ; 载气流速 1.0 mL/min; 检测器 FID; 分流比 1:50; 进样量 1 μL , 测定样品各色谱峰校正保留时间, 用下列公式计算 ECL 值, 将计算的 ECL 值与文献资料的标准值比较, 判断 1.3.3 推测定性的可靠性。

$$ECL = Z + 2 \times \frac{\lg(t'_{R,i} / t'_{R,z})}{\lg(t'_{R,z+2} / t'_{R,z})}$$

其中: Z - 饱和脂肪酸标准品的碳原子数; t'_R - 校正保护

时间 ($t'_{R,z+2}$) $t'_{R,i}$) $t'_{R,z}$); i - 未知峰

1.3.5 精密度试验

将菜籽制备的甲酯溶液平行测定 6 次, 以组分 1、组分 7 为例计算含量和保留时间的相对标准偏差

(RSD)。

1.3.6 甲酯溶液的稳定性试验

甲酯溶液易受温度、光照而氧化发生降解, 依据国标方法^[10]的要求, 甲酯溶液应尽快分析, 如必要可在惰性气体保护下或加入一定浓度的抗氧化剂防止甲酯的自动氧化, 但对一般实验室而言, 不备有安瓿瓶充惰性气体保护的装置, 而加入抗氧化剂的浓度和比例也不清楚, 为此进行对照品溶液的稳定性实验, 即将测定后的对照品溶液密封保存于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中, 分别对 10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d 保存的样品溶液进行含量测定, 确定甲酯溶液可以存放的时间。

2 结果与讨论

表 1 常见植物油主要脂肪酸组成 (单位: %)

脂肪酸	花生油 ^[11]	豆油 ^[11]	菜籽油 ^[11]	油茶籽油 ^[12]
棕榈酸	8.0~14.0	8.0~13.5	1.5~6.0	7.0~11.0
硬脂酸	1.0~4.5	2.5~5.4	0.5~3.1	
油酸	35.0~67.0	17.7~28.0	8.0~60.0	74.0~87
亚油酸	13.0~43.0	49.8~59	11.0~23.0	7.0~14.0
亚麻酸	0~0.3	5.0~11.0	5.0~13.0	
花生一烯酸	0.7~1.7	0.1~0.6	3.0~15.0	
芥酸	0~0.3	0~0.3	3.0~60.0	

表 2 试验选用植物种籽的主要脂肪酸组成测定结果 (单位: %)

脂肪酸	花生油	豆油	菜籽油	油茶籽油
棕榈酸	11.06	11.70	3.60	8.82
硬脂酸	4.25	5.26	1.41	2.10
油酸	44.72	22.68	26.84	80.50
亚油酸	33.08	50.18	14.56	8.58
亚麻酸	0.04	7.55	8.12	-
花生一烯酸	0.89	0.24	10.11	-
芥酸	0.09	-	31.89	-

2.1 本文通过实验发现使用不同的两种萃取液和两种衍生催化溶液对测定结果影响不大, 无统计学意义。甲酯化完成以后, 文献中提到的大多是加蒸馏水使有机层上浮, 取上层清液作气相色谱分析, 但我们通过实验发现, 加蒸馏水易发生乳化浑浊, 而加 5% NaCl 溶液比较合适, 不会发生此现象。

2.2 最优化色谱条件选择

2.2.1 毛细管规格的选择, 本文选用了 30 m 中长柱, 它能分离 10~50 个组份的样品, 柱内径选用的 0.25 mm 最常用的内径规格。它较高的柱效, 负荷量较低, 必须分流进样或无分流进样, 用于复杂多组份样品分析。液膜厚度选用的一般商品柱标准液膜厚: 0.22~0.25 μm 。毛细管型号选择了 AC20 和 HP-5, AC20

是一种聚乙二醇-TPA 改性的极性毛细管色谱柱, 等同于 Carbowax20M、DB-Wax、HP-20M、AT-Wax、PEG-20M; HP-5 是一种弱极性固定相(5%)-二苯基聚硅氧烷共聚物色谱柱。

表 3 AC20 毛细管色谱柱的 ECL

脂肪酸	t'_R	$Lg t'_R$	ECL(calculated)	ECL(Carbowax 20M)	ECL(standard)
14:0	3.327	0.522	-	-	14.00
16:0	7.117	0.852	-	-	16.00
16:1n-7	7.747	0.889	16.22	16.25	16.25
18:0	15.237	1.183	-	-	-
18:1n-7	17.056	1.232	18.24	18.25	18.23
18:2n-6	19.672	1.294	18.58	18.60	18.58
18:3n-6	21.176	1.325	18.86	-	18.85
18:3n-3	24.023	1.381	19.15	19.21	19.18
*	24.851	1.395	19.26	-	-
20:0	30.447	1.484	-	-	-
20:1n-7	32.909	1.517	20.22	20.25	20.22
*	33.525	1.525	20.28	-	-
20:3n-9	37.925	1.579	20.63	20.68	20.66
20:4n-3	47.492	1.677	21.28	21.43	21.37
22:0	64.282	1.808	-	-	-
22:1	69.074	1.839	22.19	-	22.04
24:0	77.638	1.890	-	-	-

注: *表示未找到归宿。

2.2.2 仪器分析条件的选择, 既要保证各组分出峰完全、有效分离, 又要尽量缩短分析时间, 满足日常快速分析的需要, 经反复实验本文确定使用 HP-5 毛细管柱时程序升温条件为: 180 °C、6 °C、230 °C (1 min) 8 °C、260 °C (2 min), 能够在 14.5 min 之内完成分析, 并且各组分能够较好分离。使用 AC-20 毛细管柱程序升温条件为: 180 °C、12 °C、230 °C (1 min) 8 °C、250 °C (2 min), 能够在 10 min 之内完成分析, 而且峰形更好。针对毛细管色谱柱的特点, 对进样模式的选择进行了对比, 发现在不分流模式进样, 组分不能得到有效的分离, 峰形较差, 将会影响定性及定量分析, 因此必须采用分流模式进样, 对分流比的确定也进行了实验, 分别使用分流比 50:1、100:1、150:1 进行测定, 发现分流比为 100:1、150:1 时有含量较小的峰丢失, 只能检测到 7 个组分, 但用分流比 50:1 时可检测到 11 个组分, 因此为了准确定量我们认为选用分流比 50:1 比较合适。

2.3 定性及定量分析

比较表 1 和表 2 的测定结果, 再根据脂肪酸甲酯

在色谱图上的出峰规律(见图 1), 即脂肪酸甲酯色谱峰按碳原子数目增加的次序出现, 如碳原子数目相同, 则按饱和度增加的次序出现, 我们可以推测出组分 1 至组分 7 分别是棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生一烯酸、芥酸, 在用 AC20 毛细管柱测定的色谱图上顺序出峰(图 1), 但在用 HP-5 毛细管柱测定的色谱图上出峰顺序有部分改变(图 2)。等效链长值(equivalent chain length, ECL)定性法是 Miwa 及同事于 1960 年首先提出的^[9], 它的理论与色谱理论中的 Kovats 保留指数很相似。对于一定色谱条件下, 脂肪酸甲酯的碳数与校正保留时间的对数成线性关系。

饱和酸、一烯酸、二烯酸等系列都各成直线关系, 且互相平行。对于缺少 GC-MS 设备和缺乏脂肪酸标准品的实验室, 采用 ECL 值定性, 可快速简便地判断脂肪酸的组成, 并得出脂肪酸的出峰顺序。本论文所测 ECL 值经与文献标准值^[7-8]对照, 差别很小, 说明本实验操作系统是稳定和可靠的。

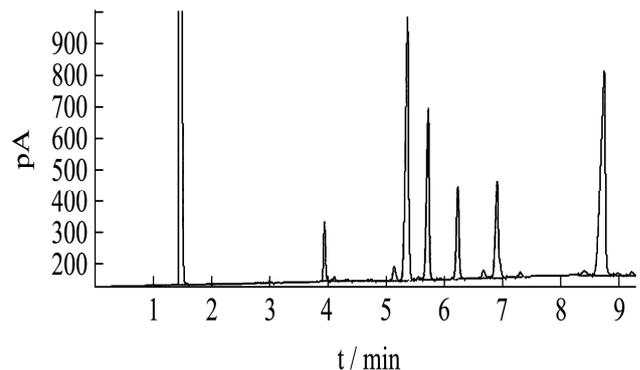


图 1 脂肪酸甲酯在 AC 20 柱色谱图上的出峰规律

注: 1. 棕榈酸; 2. 硬脂酸; 3. 油酸; 4. 亚油酸; 5. 亚麻酸; 6. 花生一烯酸; 7. 芥酸。

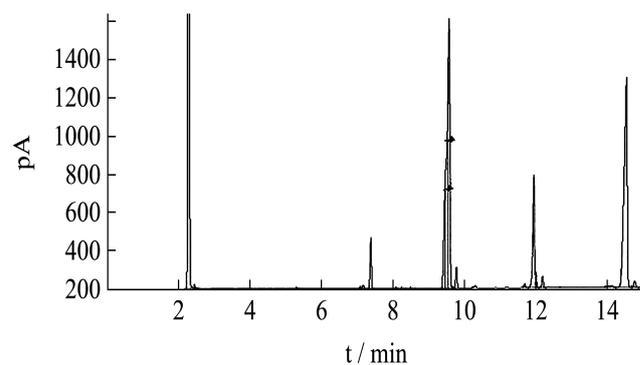


图 2 使用 HP-5 柱菜籽油脂脂肪酸甲酯色谱图

由于各脂肪酸为同系物, 它们的校正因子相近, 如不需精确结果可直接用峰面积归一化法进行定量, 据此比较表 2 的各组分结果与表 1 提供的参考值是比较吻合的。

2.4 方法的精密度(重复性)

表4 菜籽的平行测定结果(以油酸、芥酸为例)

样号	HP-5 30 m×0.25 mm×0.25 μm				AC20 30 m×0.25 mm×0.22 μm			
	棕榈酸		芥酸		棕榈酸		芥酸	
	组分1含量 /%	保留时间 /min	组分7含量 /%	保留时间 /min	组分1含量 /%	保留时间 /min	组分7含量 /%	保留时间 /min
1	3.52	7.378	30.54	14.538	3.36	3.941	31.61	8.743
2	3.44	7.372	31.81	14.544	3.62	3.942	31.57	8.735
3	3.45	7.374	32.00	14.563	3.58	3.939	31.95	8.732
4	3.49	7.373	31.75	14.559	3.54	3.938	32.04	8.729
5	3.44	7.372	31.85	14.553	3.60	3.935	31.89	8.731
6	3.36	7.370	31.76	14.541	3.61	3.935	31.86	8.731
均值	3.45	7.373	31.62	14.550	3.55	3.938	31.82	8.734
标准偏差	0.0544	0.0027	0.5361	0.0102	0.0981	0.0029	0.1889	0.0051
相对标准偏差%	1.5770	0.0368	1.6951	0.0700	2.761	0.0748	0.5936	0.0578

由表4结果可以看出,两种不同极性的毛细管色谱柱测定的脂肪酸含量是接近的,而且其定量相对标准偏差和定性(保留时间)的相对标准偏差都符合色谱定性及定量分析的允许相对标准偏差范围(定性相对标准偏差小于1%,定量相对标准偏差小于5%)^[13]。结果表明,方法具有较好的精密度和重复性。

2.5 甲酯溶液的稳定性

封存甲酯溶液时,瓶内不要有残余空气,即用小进样瓶完全装满甲酯溶液,不用充氮气和用安瓿瓶,密封保存于4℃冰箱中,经实验我们发现在测定的试验日期范围内都是有效的,因此对于普通植物油制备的甲酯只要保管得好,在较长时间范围内仍是保持稳定的。

3 总结

通过本研究,探讨强极性和弱极性的两种不同类型毛细管柱的最佳色谱分析条件,借助文献标准ECL值帮助定性,并将测定主要脂肪酸含量与国家标准所提供的含量范围进行比较,结果较为吻合,且平行测定的相对标准偏差表明方法有较好的精密度和重复性。利用本研究结果,可不必用昂贵的甲酯标样来摸索最佳色谱条件,在已取得最佳色谱条件下直接用纯甲酯标样验证即可,因此可节约实验经费。在进行批量样品间脂肪酸组成的比较时,测定近似结果即能满足需要,因此同时初步得到了一种能够检测大批量样品的简单、快速、准确的植物油脂肪酸组成分析方法。

本文的研究中,油料种子中脂肪酸组成的定量结果是在未用标样的情况下测得,仅以国家标准所提供

的含量范围进行判别,因此其结果只是近似值。如果测定单个样品中的脂肪酸组成实际含量,还是应该通过测定甲酯标样,来精确定量。

参考文献

- [1] 韩国麟.油脂化学[M].河南科技出版社,1995,250-251
- [2] GB/T 17377-1998 动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析
- [3] 余珠花,喻玖宏.填充柱气相色谱法测油脂脂肪酸组成条件的优化[J].武汉工业学院学报,2004,23(4):57-59
- [4] 王肇慈.粮油食品品质分析(第二版)[M].北京:中国轻工业出版社,2000
- [5] 杨培慧,郑志雯,赵秋香,等.食用植物油脂肪酸的高分辨气相色谱分析[J].中国油脂,2003,28(7):48-50
- [6] 肖昌珍,吴渝,甘东生,等.食用植物油掺伪检测[J].中国油料作物学报,1999,21(1):63-66
- [7] 徐秀兰,胡磊军,吴梧桐.脂肪酸的分析方法研究[J].药物生物技术,1998,5(3):161-165
- [8] Christie W.W. Equivalent chain-length of methyl ester derivative of fatty acids on gas chromatography[J]. J Chromatogr,1988,447:305-314
- [9] T.K.Miwa, K.L.Mikolajczak, F.R Earle, et al. Gas chromatographic characterization of fatty acid. Anal Chem,1960, 32(13):1739
- [10] GB/T 17376-1998 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备
- [11] GB 1534(5/6)-2003 花生油、大豆油、菜籽油
- [12] GB 11765-2003 油茶籽油
- [13] 气相色谱方法及应用[M].化学工业出版社,2000

