

气相色谱法测定配方奶粉中的脂肪酸和反式脂肪酸

刘冬豪

(广州市食品工业卫生检测所, 广东广州 510410)

摘要: 建立同时测定配方奶粉中脂肪酸和反式脂肪酸的气相色谱分析方法。样品中的脂肪酸和反式脂肪酸经乙酰氯-甲醇甲酯化处理后, 用气相色谱仪测定, 采用 HP-88 色谱柱分离定性, 以十一碳酸甘油三酯为内标进行定量。结果表明: 顺-反异构体脂肪酸分离效果较好, 脂肪酸和反式脂肪酸的回收率在 97.2%~104.6% 之间, 相对标准偏差小于 3.5%, 检出限为 5 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 气相色谱; 脂肪酸; 反式脂肪酸; 内标法; 乙酰氯甲醇

文章编号: 1673-9078(2012)6-716-719

Determination of *Cis* and *Trans* Fatty Acids in Formula Powders by GC

LIU Dong-hao

(Guangzhou Institute of Food Industry Hygiene Inspection, Guangzhou 510410, China)

Abstract: A internal standard method to determine *cis*- and *trans*- fatty acids in formula powders by gas chromatography was developed. Samples were methyl esterized with acetyl chloride-MeOH, and analyzed by GC on a HP-88 column with FID as detector and triundecanoin as the internal standard. The results showed that *cis*- and *trans*- fatty acids in formula powders were well separated by this method. The recoveries, relative standard deviation and the detection limit of the GC method were 97.2%~104.6%, less than 3.5% and 5 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Key words: gas chromatography; fatty acids; *trans* fatty acids; internal standard method; acetyl chloride-MeOH.

脂肪酸包括饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、反式脂肪酸。脂肪酸的生理功能各异, Omega-3 脂肪酸具有促进视网膜、大脑和神经系统发育, 降低人体心血管疾病和炎症发生的作用^[1-2]; 月桂酸和豆蔻酸有极强的升高人体胆固醇和破坏血管内膜作用^[3]; 反式脂肪酸能升高人体血清中低密度脂蛋白(LDL)胆固醇和胰岛素水平, 增加患心血管疾病和 II 型糖尿病的危险, 影响 δ -6 脱饱和酶功能, 影响人体正常生长发育, 美国 FDA 规定自 2006 年 1 月起须在食品营养标签中标注反式脂肪酸含量^[4-5]; 我国已经在婴儿配方食品和婴幼儿高蛋白谷物辅助食品中对月桂酸、豆蔻酸和反式脂肪酸作了限量规定^[6-7]。

配方奶粉是特殊人群的重要营养来源, 脂肪含量高且来源广泛, 包括乳脂、植物油、鱼油、藻油等, 加工和储存过程中影响因素较多, 潜在质量安全风险较高, 分析研究配方奶粉脂肪酸组成及其含量水平具有重要的意义。目前, 我国标准对配方奶粉中具有相同检验原理的脂肪酸和反式脂肪酸分别采用不同的检验方法, 样品前处理方法各不相同, 不利于脂肪酸定性和检验资源利用的最大化。本文以十一碳酸甘油三酯为内标, 采用乙酰氯-甲醇甲酯化法同时测定配方奶粉中重要脂肪酸和反式脂肪酸, 该法操作简单、稳定、

快捷, 可满足日常产品配方开发和质量安全把关的需要。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Agilent 7890A 气相色谱仪(配氢火焰离子化检测器); BP221S 电子天平; HH-4 数显恒温水浴锅; HSC-12 氮吹仪; TGL-10B 高速台式离心机; 螺口玻璃管(带有聚四氟乙烯做内垫的螺口盖); 乙酰氯甲醇溶液(体积分数为 10%); 60 g/L 碳酸钠溶液; 正己烷: 色谱纯; 37 种脂肪酸甲酯标准溶液(10 mg/mL), 内标物十一碳酸甘油三酯标准品(纯度 \geq 99%), 单个脂肪酸甲酯标准, 均购于美国 Supelco 公司。以上试剂除特殊说明外均为分析纯, 实验用水为超纯水。

1.2 样品制备

准确称取 0.5 g 样品于干燥螺口玻璃管中并加入 0.5 mL 十一碳酸甘油三酯标准溶液(1 mg/mL), 分别加入 4.5 mL 正己烷和 6 mL 10% 乙酰氯甲醇溶液, 充氮气后旋紧螺旋盖, 振荡混合后放置 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 期间每隔 20 min 振摇一次, 取出冷却至室温。将样液转移至离心管, 分别用 3 mL 碳酸钠溶液清洗玻璃管三次, 合并碳酸钠溶液, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行测定^[8]。

1.3 色谱条件

收稿日期: 2012-02-22

作者简介: 刘冬豪(1981-), 男, 工程师, 主要从事食品标准与检验工作

色谱柱: HP-88 (60 m×0.25 mm×0.20 μm); 柱温 120 °C(5 min) →6 °C/min→170 °C→2 °C/min→210 °C →4 °C/min→220 °C(4min); 进样口 270 °C; FID 检测器 270 °C; 氦气(99.999%); 载气流速: 2 mL/min; 进样方式: 分流, 分流比 30:1; 进样量: 1 μL。

1.4 样品测试

取 1 μL 样液注入气相色谱仪, 在上述色谱条件下测定试样的响应值(峰面积), 经过与标准溶液谱图比较响应值得到试样中脂肪酸的含量。样品中单个脂肪酸含量按以下公式计算:

$$X_i = \frac{A_i}{A_{C11}} \times \frac{C_{C11} \times V_{C11} \times 1.0067}{m} \times 100 \times F_i \times F_{FAMEi-FAi}$$

式中, X_i : 样品中脂肪酸 i 的含量, 10^2 mg/g; A_i : 样品中脂肪酸甲酯 i 的峰面积; A_{C11} : 样品中加入的内标物十一碳酸甲酯峰面积; C_{C11} : 十一碳酸甘油三酯的浓度, mg/mL; V_{C11} : 样品中加入十一碳酸甘油三酯的体积, mL; 1.0067: 十一碳酸甘油三酯转化为十一碳酸甲酯的转换系数; m : 样品的质量, g; F_i : 脂肪酸甲酯 i 的响应因子; $F_{FAMEi-FAi}$: 脂肪酸甲酯转换为脂肪酸的转换系数, 参照 GB/T22223-2008 附录 C^[9]。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法选择

油脂中脂肪酸测定通常需要甲酯化处理, 常用的方法有三氟化硼法、三甲基氢氧化硫法、酯交换法、盐酸-甲醇法、乙酰氯-甲醇甲酯化法等。三氟化硼法操作较为复杂, 需要大量有机试剂, 提取脂肪后再进行甲酯化反应, 前处理时间长, 不适合批量样品; 酯交换法只能使样品中甘油酯部分生成甲酯, 游离脂肪酸及其盐不被氢氧化钾酯化^[10]; 盐酸-甲醇法需要配制氯化氢甲醇溶液, 试剂准备工作比较麻烦。针对配方奶粉中可能含有游离脂肪酸和使用脂肪酸包埋技术, 本文以十一碳酸甘油三酯为内标, 采用乙酰氯-甲醇甲酯化法同时检测配方奶粉中脂肪酸和反式脂肪酸, 该法对含淀粉类样品不需要加淀粉酶水解, 对脂肪酸以包埋形式添加的样品提取效果更好^[11], 可部分补偿欲测组分在样品前处理时的损失, 提高定量分析的精度。

2.2 色谱条件的选择

对脂肪酸甲酯的分析使用涂渍极性固定相色谱柱, 聚乙二醇或氰丙基聚硅氧烷固定相可以按脂肪酸碳数、不饱和度、顺反构象以及双键位置进行分离^[12]。由于配方奶粉脂肪酸构成复杂, 乳脂、植物油、鱼油、藻油等均为配方奶粉脂肪来源, 本文采用高极性 HP-88 色谱柱进行分离, 并采用氦气作为色谱载气, 使顺-反异构体脂肪酸分离效果更好。

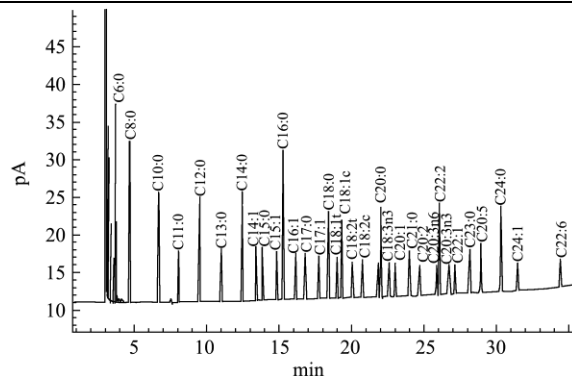


图 1 重要脂肪酸和反式脂肪酸的色谱图

Fig.1 Gas chromatogram of *cis*- and *trans*- fatty acids

2.3 校正因子的测定

分别取脂肪酸甲酯混合标准溶液和各单个脂肪酸甲酯标准溶液注入气相色谱仪, 测定标准溶液的响应值(峰面积), 根据各脂肪酸甲酯的浓度, 计算脂肪酸甲酯 i 对内标十一碳酸甲酯的响应因子 F_i , 结果见表 1。

表 1 脂肪酸甲酯的响应因子(相对于十一碳酸甲酯)

Table 1 The response factors of fatty acid methyl esters and internal standard C11:0 methyl ester

序号	脂肪酸甲酯 i	响应因子 F_i	序号	脂肪酸甲酯 i	响应因子 F_i
1	C4:0	1.52	20	C18:2n6c	0.91
2	C6:0	1.18	21	C18:3n6	0.91
3	C8:0	1.09	22	C20:0	0.88
4	C10:0	1.02	23	C18:3t	0.91
5	C11:0	1.00	24	C18:3n3	0.92
6	C12:0	0.97	25	C20:1	0.89
7	C13:0	0.96	26	C21:0	0.88
8	C14:0	0.94	27	C20:2	0.90
9	C14:1n5	0.94	28	C20:3n6	0.92
10	C15:0	0.93	29	C22:0	0.87
11	C15:1n5	0.94	30	C20:3n3	0.93
12	C16:0	0.91	31	C20:4n6	1.01
13	C16:1n7	0.94	32	C22:1n9	0.92
14	C17:0	0.93	33	C23:0	0.87
15	C17:1n7	0.91	34	C22:2n6	0.91
16	C18:0	0.90	35	C20:5n3	0.91
17	C18:1n9t	0.88	36	C24:0	0.86
18	C18:1c	0.90	37	C24:1n9	0.87
19	C18:2t	0.94	38	C22:6n3	0.92

2.4 方法检出限

在上述色谱条件下测定脂肪酸甲酯和反式脂肪酸甲酯浓度相应值的线性关系。以十一碳酸甲酯为例(图 2), 考察线性范围和计算最低检出限。以峰面积 Y 对含量 X 作标准曲线, 在 2~120 ng/μL 范围内, 回归方程为

$Y=5.803 \times 10^{-1}X+0.0234$, 回归系数为 $R=0.99986$ 。十一碳酸在样品取样量为0.5 g、最终定容体积5 mL、进样体积1 μ L时, 检出限为0.3 mg/100 g。各脂肪酸甲酯i对内标十一碳酸甲酯的响应因子 F_i 在0.86~1.52之间, 检出限范围在0.3 mg/100 g~0.5 mg/100 g之间, 考虑到不同仪器间的差异, 从方法适应性出发, 本法检出限确定为0.5 mg/100 g(S/N=3)。

2.5 回收率及精密度试验

在配方奶粉中添加脂肪酸甲酯混合标准溶液进行回收试验, 设置4个添加水平, 按照上述色谱操作条件对重要脂肪酸进行测试。脂肪酸回收率在97.2%~104.6%之间, 相对标准偏差小于3.5%, 达到

表2 不同添加水平的脂肪酸回收率和相对标准偏差 %

Table 2 Recoveries and RSDs of fatty acids with different concentration added

脂肪酸	添加水平 1		添加水平 2		添加水平 3		添加水平 4		相对标准偏差/%
	加标量 (10^{-2} mg/g)	回收率 /%	加标量 (10^{-2} mg/g)	回收率 /%	加标量 (10^{-2} mg/g)	回收率 /%	加标量 (10^{-2} mg/g)	回收率 /%	
月桂酸(C12:0)	4	98.7	12	101.3	40	99.3	120	100.1	1.1
豆蔻酸(C14:0)	4	100.3	12	102.0	40	98.3	120	100.2	1.5
反式脂肪酸 (C18:1t)	2	103.4	6	102.7	20	97.4	60	100.3	2.7
亚油酸(C18:2)	2	102.2	6	103.1	20	97.4	60	100.3	2.5
亚麻酸(C18:3)	2	100.7	6	103.0	20	97.8	60	100.2	2.1
花生四烯酸 (C20:4)	2	98.3	6	100.0	20	99.7	60	100.6	1.0
DHA (C22:6)	2	97.3	6	104.6	20	97.2	60	100.3	3.5

2.6 实际样品测定

运用本文所建立的方法, 对7种市场上销售的配方奶粉样品中重要脂肪酸进行测定, 测定结果见表3。由表3可知, 样品6中亚油酸、亚麻酸含量比标称数

分析要求, 见表2。

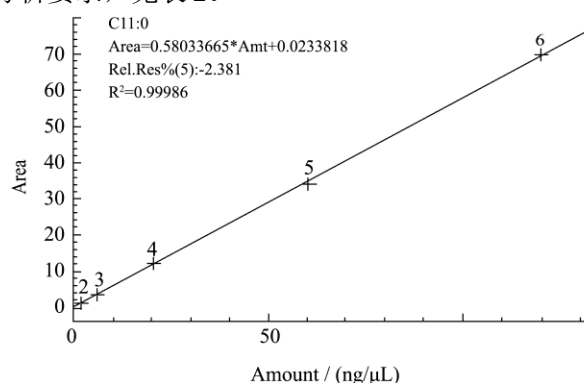


图2 十一碳酸甲酯校正曲线图

Fig.2 Calibration curve of heneicanoic acid methyl ester

据明显偏低, 其他样品的脂肪酸含量标称符合预包装食品营养标签的要求; 不同配方奶粉之间的重要脂肪酸含量差异较大, 这可能是针对不同消费人群而采用的不同产品配方。

表3 配方奶粉中重要脂肪酸的测定结果 (10^{-2} mg/g)

Table 3 The contents of important fatty acids in formula milk powders (mg/100g)

样品 编号	月桂酸(C12:0)		豆蔻酸(C14:0)		反式脂肪酸(C18:1t)		亚油酸(C18:2)		亚麻酸(C18:3)		花生四烯酸(C20:4)		DHA(C22:6)	
	标示值	实测值	标示值	实测值	标示值	实测值	标示值	实测值	标示值	实测值	标示值	实测值	标示值	实测值
1	-	1916	-	737	-	161	3060	3246	382	402	70	79	40	43
2	-	1973	-	770	-	171	3000	10727	300	1194	34	81	8	44
3	-	2380	-	876	-	171	3700	3516	450	456	80	98	50	56
4	-	2743	-	984	-	196	3285	4115	400	493	70	97	40	79
5	-	2446	-	960	-	160	3400	3416	425	453	80	94	50	60
6	-	72	-	259	-	52	100	70	25	13	-	108	50	49
7	-	2281	-	846	-	208	3700	3698	450	440	80	98	50	67

3 结论

3.1 本文以十一碳酸甘油三酯为内标, 采用乙酰氯-甲醇甲酯化法同时测定配方奶粉中脂肪酸和反式脂肪

酸, 该法统一脂肪酸和反式脂肪酸样品前处理技术, 对含淀粉类样品不需要加淀粉酶水解, 对脂肪酸以包埋形式添加的样品提取效果更好, 内标法可部分补偿欲测组分在样品前处理时的损失, 提高定量分析的精

度。方法采用高极性 HP-88 色谱柱和氦气,使顺-反异构体脂肪酸分离效果更好,各脂肪酸甲酯浓度相应值具有良好的线性关系,脂肪酸和反式脂肪酸的回收率在 97.2%~104.6%之间,相对标准偏差小于 3.5%,检出限为 5.0 $\mu\text{g/g}$ 。

3.2 本文所建立的方法简单、稳定、快捷,可以满足配方奶粉中重要脂肪酸和反式脂肪酸的日常检测要求,为配方奶粉脂肪酸营养安全研究和标签标识管理工作提供支持,同时对其他样品中的脂肪酸和反式脂肪酸同时检测也具有一定的参考价值。当然,配方奶粉中的牛乳脂类是已知最为复杂的脂类,虽然脂肪酸浓度超过 1%的只有 13 种,但已鉴定出含有 400 多种不同脂肪酸^[13],研究人员需要根据不同检测目的选择不同技术手段,如极性更强、柱子更长的色谱柱,以达到更好的分离效果。

参考文献

- [1] 陈银基,周光宏,徐幸莲.n-3 多不饱和脂肪酸对疾病的预防与治疗作用[J].中国油脂,2006,31(9):31-34
- [2] 郝颖,汪之和.EPA、DHA 的营养功能及其产品安全性分析[J].现代食品科技,2006,22(3):180-183
- [3] 黄兴旺,任国谱.婴幼儿配方奶粉中脂类风险物质的理论分析[J].中国乳品工业,2010,38(6):26-28
- [4] 宋志华,单良,王兴国.反式脂肪酸分析方法的研究进展[J].粮油加工,2006,11:51-53
- [5] 赖晓英,武德银,伍飏,等.反式脂肪酸的危害及其检测方法[J].现代食品科技,2007,23(2):73-75
- [6] GB 10765-2010,食品安全国家标准 婴儿配方食品[S].
- [7] GB 10769-2010,食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品[S].
- [8] GB 5413.27-2010,食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定[S].
- [9] GB/T 22223-2008,食品中总脂肪、饱和脂肪(酸)、不饱和脂肪(酸)的测定 水解提取-气相色谱法[S].
- [10] GB/T 17376-2008,动植物油脂 脂肪酸甲酯制备[S].
- [11] 黄菲菲,韩奕奕,陈美莲.乳与乳制品中脂肪酸测定方法的比较研究[J].乳业科学与技术,2010,2:63-65
- [12] Frank David,Pat Sandra,Allen K. Vickers.脂肪酸甲酯分析色谱柱的选择[Z].安捷伦科技有限公司,2005
- [13] Owen R.Fennema 著,王璋,许时婴,等译.食品化学(第三版)[M].北京:中国轻工业出版社,2003,4