

甘油酯的液相色谱分析

钟南京¹, 李琳², 李冰², 陆启玉³, 刘国琴^{2,3}

(1. 广东药学院食品学院, 广东中山 528458) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(3. 河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450052)

摘要: 对比了反相高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (RP-HPLC-ELSD) 和正相高效液相色谱-示差检测器 (NP-HPLC-RI) 两种检测方法对甘油醇解大豆油反应产物的检测, 结果显示两种方法均能定量分析产物中甘油一酯 (MAG)、甘油二酯 (DAG) 及甘油三酯 (TAG) 的相对含量; 采用了反相高效液相色谱-紫外检测器 (RP-HPLC-UV) 检测油酸甘油酯, 并分别建立了 1-油酸甘油酯 (1-O)、1,3-油酸甘油二酯 (1,3-OO) 和油酸甘油三酯 (OOO) 的标准曲线图, 各标准曲线的相关系数均大于 0.99。

关键词: 甘油酯; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测

文章编号: 1673-9078(2012)1-123-126

Determination of Glycerides by HPLC

ZHONG Nan-jing¹, LI Lin², LI Bing², LU Qi-yu³, LIU Guo-qin

(1.School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)(2.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)(3.School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou450052, China)

Abstract: In this paper, reverse phase HPLC-ELSD and normal phase HPLC-RI were used to determine the products from glycerolysis of soybean oil. The results indicated that the two methods were suitable for determination of the relative content of monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols (DAG) and triacylglycerols (TAG). Oleic acid glycerides were determined by reverse phase HPLC-UV, the standard curves of 1-monoolein (1-O), 1,3-diolein (1,3-OO) and triolein (OOO) were established, and the correlation coefficients were higher than 0.99.

Key words: glycerides; HPLC; ELSD

天然动植物油脂中其甘油三酯 (TAG) 组分复杂, 甘油酯 (指甘油一酯 MAG、甘油二酯 DAG 及 TAG) 的分析历来是一个研究的热点。目前甘油酯的分析方法主要有气相色谱法^[1]、液相色谱法和薄层扫描法。其中液相色谱法广泛应用于甘油酯的分析, 其在 TAG 的检测早在 30 多年前就有报道^[2]。该法所采用的检测器一般有紫外 (UV)、示差 (RI) 和蒸发光散射检测器 (ELSD), 当然定性各组分则常用质谱检测器 (MS)。UV 检测一般采用波长 205 nm, 甘油酯在高于 220 nm 的波长下几乎没有响应^[3]。饱和甘油酯在 205 nm 波长的吸收值很弱, 即不同物质由于分子结构的不同, 它们在同一波长之下的响应值也不同。因此采用 UV 定量检测天然油脂 (混合 TAG) 各组分需要标准物质进行校正, 而要获得各组分的标准样品不太现实, 所以很少采用 UV 检测器来定量检测天然油脂各组分。RI 和 ELSD 都是通用型检测器, 各物质间的相对定量可

收稿日期: 2011-11-03

作者简介: 钟南京 (1980-), 男, 博士, 讲师, 主要从事油脂改性方面研究工作

通讯作者: 李琳, 教授, 博士生导师

以根据它们之间的峰面积之比来实现, 但是 RI 检测器只能采用等梯度流动相分析, 这很大程度上限制了其应用, 尽管如此, 对于只需对甘油酯中 MAG、DAG 和 TAG 三者间的相对定量, 还是可以实现^[4]。ELSD 可以适合梯度洗脱, 检测的灵敏度也很高, 广泛应用于甘油酯的分析检测中。本研究采用反相 RP-HPLC-ELSD 以及正相 NP-HPLC-RI 检测甘油醇解大豆油反应的产物, 对比了两种方法的检测结果; 对于甘油醇解纯 TAG 反应的产物则采用 RP-HPLC-UV 进行检测, 并采用 RP-HPLC-ELSD 进行了对比。

1 实验部分

1.1 实验原料和试剂

精炼、脱色、脱臭 (Refined、Bleached、Deodour, 简称 RBD) 一级大豆色拉油, 益海嘉里有限公司 (上海) 提供; 三油酸甘油三酯 (OOO), 1-油酸甘油酯 (1-O), 1,3-油酸甘油二酯 (1,3-OO) 标准品均购于 sigma 公司; 乙腈、二氯甲烷、正己烷、异丙醇均为色谱纯。

1.2 RP-HPLC-ELSD 检测

高效液相色谱仪：四联泵 DIONEX P680HPLC Pump；进样器 DIONEX ASI-100 Automated Sample Injector；蒸发光散射检测器 Alltech ELSD2000ES；反相液相色谱柱 MERCK, C18 (250×4.6 mm, 5 μm)。

ELSD 参数：漂移管温度 85 °C，氮气流速 2.0 L/min。梯度洗脱条件见表 1，检测柱温 40 °C。

表 1 RP-HPLC-ELSD 梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of RP-HPLC-ELSD

时间/min	流速/ (mL/min)	乙腈/ (V/V, %)	二氯甲烷/ (V/V, %)	水/ (V/V, %)
0	1.0	80	0	20
2	1.0	80	0	20
12	1.0	100	0	0
20	1.0	70	30	0
26	1.0	70	30	0
35	1.0	30	70	0
37	1.0	30	70	0
39	1.0	100	0	0
42	1.0	100	0	0

1.3 NP-HPLC-RI 检测

高效液相色谱仪：二联泵 WATERS 515 HPLC Pump；示差检测器 (RI) Waters 2410；正相液相色谱柱 phenomenex, C18 (250×4.6 mm; 5 μm)。

采用正己烷/异丙醇=10/1 流动相等梯度洗脱，流动相流速 1.0 mL/min，柱温 35 °C，示差检测器检测，面积归一化法定量。

1.4 RP-HPLC-UV 检测

高效液相色谱仪及色谱柱与 1.2 相同，紫外检测器 DIONEX, PDA-100 二极管阵列，检测波长 205~220 nm，梯度洗脱条件见表 2。

表 2 RP-HPLC-UV 梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution conditions of RP-HPLC-UV

时间 /min	流速/ (mL/min)	乙腈/ (V/V, %)	正己烷/异丙醇 =4/5 (V/V, %)	水/ (V/V, %)
0	1.0	70	0	30
10	1.0	100	0	0
12	1.0	50	50	0
22	1.0	50	50	0
23	1.0	100	0	0
24	1.0	70	0	30
28	1.0	70	0	30

标准品的配置：精确分别称取一定量的 1-O、1,3-OO、OOO 标准品，采用正己烷/异丙醇=4/5 的溶剂分别配置成 2.5 mg/mL 浓度范围之内的一系列浓

度，以备标准曲线的制作所用。

2 结果与讨论

2.1 RP-HPLC-ELSD 与 NP-HPLC-RI 检测甘油醇解大豆油反应产物

采用反相 C18 柱 HPLC 分析甘油酯时，物质的出峰顺序受其极性影响，极性大的物质先被洗脱出来。甘油酯的极性由其分子结构决定：在羟基数目不同的情况下，首先根据羟基数目判断，极性大小顺序 MAG>DAG>TAG，这是因为 MAG、DAG 和 TAG 分子的羟基数分别为 2、1 和 0；在羟基数目相同的情况下，甘油酯的极性则主要由其组成的脂肪酸性质所确定，脂肪酸碳链越长，极性越小，同时脂肪酸链的不饱和度越高，其极性越大。目前，甘油酯的极性判断可以采用等碳数法 (ECN, Equivalent Carbon Number), $ECN=CN-2DB$ ，其中 CN 指甘油酯的酰基碳原子数，DB 是指双键数^[2,3,5]。而采用正相 C18 柱 HPLC 分析甘油酯时，物质的出峰顺序恰好与反相情况相反。

图 1 是 RP-HPLC-ELSD 色谱图，图 2 是 NP-HPLC-UV 色谱图，表 3 是对应于图 2 各色谱峰对应物及峰面积信息，图 1 和图 2 测试的是同一个样品。

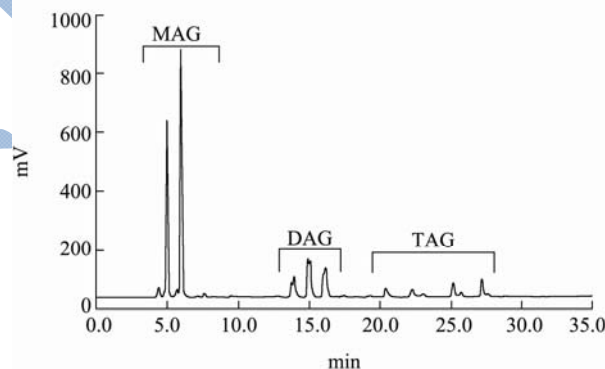


图 1 RP-HPLC-ELSD 色谱图

Fig.1 RP-HPLC-ELSD chromatography of Glycerides

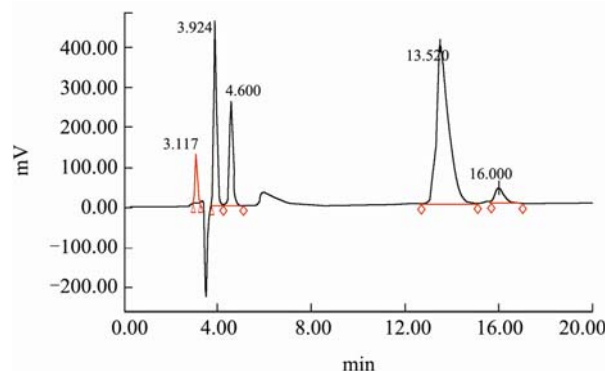


图 2 NP-HPLC-UV 色谱图

Fig.2 NP-HPLC-UV chromatography of glycerides

表3 图2中 NP-HPLC-RI 色谱图各峰对应物及峰面积

Table 3 The compounds corresponding to the HPLC peaks and the peak areas in Fig.2

甘油酯	保留时间/min	峰面积	峰面积/(相对含量)
TAG	3.117	1654171	7.21
Sn-1,3-DAG	3.924	3680014	16.04
Sn-1,2-DAG	4.600	2117614	9.23
Sn-1-MAG	13.520	14359856	62.59
Sn-2-MAG	16.000	1131077	4.93

根据表3, 可计算 MAG、DAG 及 TAG 间的相对含量:

$$\text{MAG}(\%) = 62.59\% + 4.93\% = 67.52\%$$

$$\text{DAG}(\%) = 16.04\% + 9.23\% = 25.27\%$$

$$\text{TAG}(\%) = 7.21\%$$

表4 RP-HPLC-ELSD 与 NP-HPLC-RI 检测结果对比

Table 4 Comparison of the test results by RP-HPLC-ELSD and NP-HPLC-RI

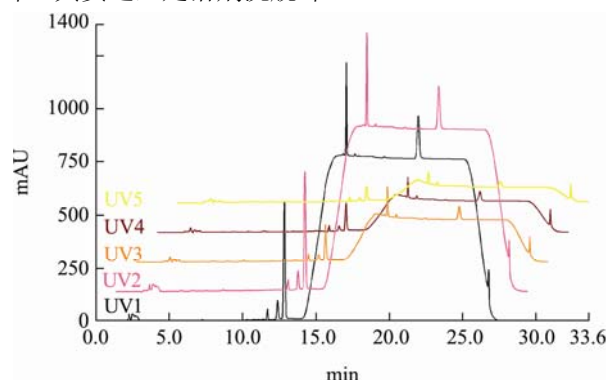
组分	RI 检测含量/%	ELSD 检测含量/%	标准偏差
MAG	67.52	64.47	2.16
DAG	25.27	24.65	0.44
TAG	7.21	10.89	2.60

表4对比了 RP-HPLC-ELSD 和 NP-HPLC-RI 检测结果。从偏差结果可以看出, 两者没有太大的差别, 均可适于定量检测。但是必须看到, RI 检测不能采用梯度洗脱, 所以, RI 不能将混合组分进一步分离, 例如要将不同脂肪酸组成的 MAG 分开, 则不能采用 RI, 此时可以采用 ELSD 检测, 因为 ELSD 可以采用梯度洗脱。

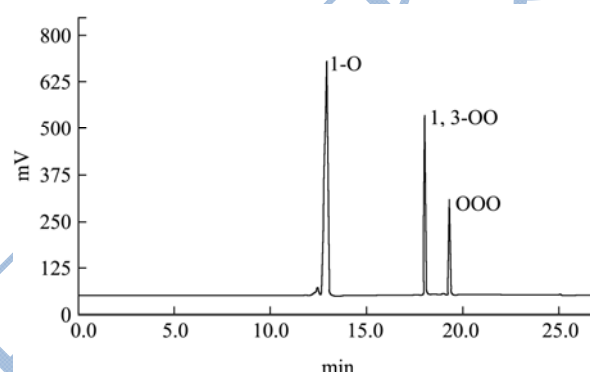
2.2 RP-HPLC-UV 检测甘油醇解 OOO 反应产物

对于组成简单的甘油酯而言, 其检测普遍采用 UV 检测器, 因为几乎所有的液相色谱仪均配备有 UV 检测器, 而 ELSD 及 RI 则未必能配备有, 此外, UV 检测的灵敏度往往会更高一些。本研究采用了 RI 检测甘油醇解 OOO 反应产物 (油酸甘油酯), 同时采用 ELSD 检测进行对比。图3 (a) 是反应产物的液相色谱图, UV1、UV2、UV3 和 UV4 分别表示吸收波长为 205、210、212 和 220 nm。从图中可以看出, 它们在不同的波长之下其吸收强度不同, 其中以 205 nm 吸收最强。同时也可以看出, 流动相背景在 205 nm 有吸收, 导致基线不平, 呈梯形状。这是因为本研究分析条件采用了梯度洗脱, 各流动相间在该波长下的吸收不同所致。尽管如此, 这不会影响其组分的定量, 因为各峰的面积很容易积分出来。图3 (b) 是反应产物的 HPLC-ELSD 图谱, 由于 ELSD 检测可以排除流动相的干扰, 所以其基线非常平整。对比图3 可验证

UV 检测的有效性, 因为 UV 图谱中还有一些小的杂峰, 其实这些是溶剂洗脱峰。



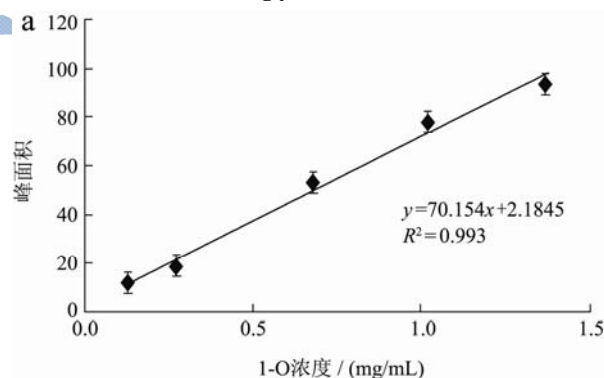
(a) 紫外检测



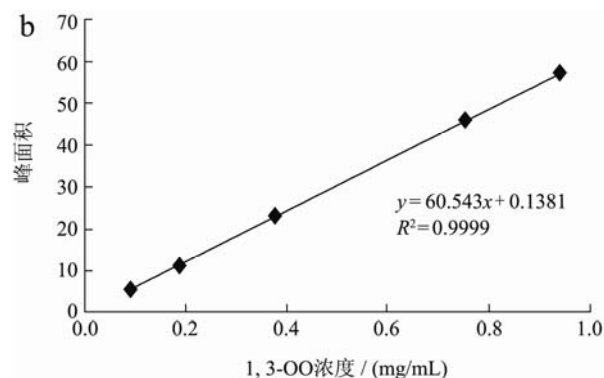
(b) 蒸发光散射检测

图3 甘油酯的紫外检测 (a) 和蒸发光散射检测 (b)

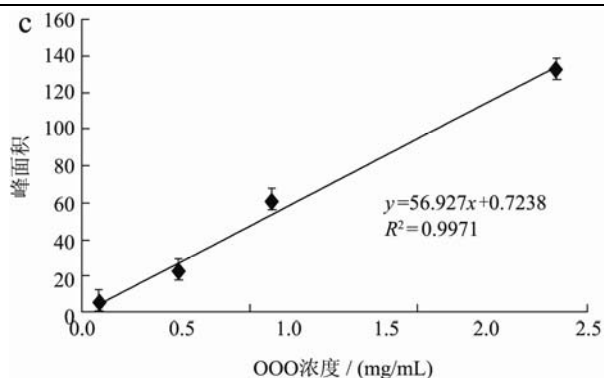
Fig.3 RP-HPLC-UV(a) and HPLC-ELSD chromatography of glycerides



(a) 1-O 标准曲线图



(b) 1,3-OO 标准曲线图



(c) OOO 标准曲线图

图4 不同化合物的标准曲线

Fig.4 Calibration curves of different compounds

图4 (a)、(b)、(c) 分别是 1-O、1,3-OO 和 OOO 的标准曲线图, 可看出, 其相关系数 R^2 均达到 0.99 以上, 并且标准偏差小, 故可以适合于定量分析。

3 结论

3.1 对于脂肪酸组成简单的甘油酯的检测, 可采用 UV 检测, 波长宜采用 205 nm, 1-O、1,3-OO 和 OOO 标准曲线的相关系数 R^2 均达到 0.99 以上, 并且标准偏差小, 可以适合于定量分析;

3.2 对于脂肪酸组成较复杂的甘油酯的检测, 可采用

ELSD 检测或 RI 检测, 采用面积归一法定量, 两者检测结果并无太大的区别, 但是 RI 检测因为不能采用梯度洗脱, 所以无法将混合组分进一步进行分离。

参考文献

- [1] 孔浩辉,陈翠玲,汪军霞,等.三乙酸甘油酯检测方法的研究[J].现代食品科技,2010,26(2):215-217
- [2] Lin J T, Woodruff C L, McKeon T A. Non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography of synthetic triacylglycerols and diacylglycerols [J]. J. Chromatogr. A., 1997, 782: 41-48
- [3] Holčapek M, Jandera P, Fischer J, et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods [J]. J. Chromatogr. A., 1999, 858: 13-31
- [4] Mu H, Kalo P, Xu X, et al. Chromatographic methods in the monitoring of lipase-catalyzed interesterification [J]. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 2000, 102(3): 202-211
- [5] Nicola G D, Pacetti M, Polonara F, et al. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography [J]. J. Chromatogr. A., 2008, 1190: 120-126