

检测分析

超高效合相色谱串联四级杆飞行时间质谱 快速分析植物油的甘油三酯组成

张星河, 齐策, 陶冠军, 韦伟, 金青哲, 王兴国

(江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏无锡 214122)

摘要:采用超高效合相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPC²-Q-TOF-MS)技术分析了11种植物油的甘油三酯组成。这些植物油中,O-L-L为葵花籽油(22.27%±1.87%)、菜籽油(21.07%±1.76%)、玉米油(19.84%±1.35%)、米糠油(19.37%±0.87%)、芝麻油(17.55%±0.82%)中含量最高的甘油三酯;O-O-O在花生油(18.25%±0.69%)和橄榄油(39.37%±0.10%)中的含量最高;大豆油中含量最高的甘油三酯是L-L-L(22.16%±1.71%),亚麻籽油中是O-Ln-Ln(21.85%±0.18%),稻米油中是O-L-P(18.58%±1.02%),以及棕榈油中是O-P-P(25.05%±0.73%)。O-O-L与S-L-L等ECN值相同的甘油三酯实现了分离,且含量微少的甘油三酯组成也得到了鉴定。

关键词:超高效合相色谱;质谱;甘油三酯;快速分析

中图分类号:O657;TS227

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)11-0127-06

Rapid analysis of triglyceride composition in vegetable oils by ultra performance convergence chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry

ZHANG Xinghe, QI Ce, TAO Guanjun, WEI Wei, JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: The compositions of triglycerides in eleven kinds of vegetable oils were analyzed by ultra performance convergence chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPC²-Q-TOF-MS). Among these vegetable oils, O-L-L contents were the highest in sunflower seed oil (22.27%±1.87%), rapeseed oil (21.07%±1.76%), corn oil (19.84%±1.35%), rice bran oil (19.37%±0.87%) and sesame oil (17.55%±0.82%), while O-O-O content was the highest in peanut oil (18.25%±0.69%) and olive oil (39.37%±0.10%). The triglyceride with the highest content in soybean oil, linseed oil, rice oil and palm oil were L-L-L (22.16%±1.71%), O-Ln-Ln (21.85%±0.18%), O-L-P (18.58%±1.02%) and O-P-P (25.05%±0.73%), respectively. Triglycerides with the same ECN value, such as O-O-L and S-L-L, were isolated. The contents of trace triglyceride were also identified.

Key words: ultra performance convergence chromatography; mass spectrometry; triglyceride; rapid analysis

收稿日期:2018-03-01;修回日期:2018-06-30

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2017YFD0400600);
2016年度无锡市科技发展指导性计划(医疗卫生)(CSZ0N1614)

作者简介:张星河(1993),女,在读硕士,研究方向为人乳脂
营养(E-mail)zhangxinghe_wx@163.com。

通信作者:齐策,工程师(E-mail)ceqi@jiangnan.edu.cn。

甘油三酯是食用油脂中的主要存在形式,在天然油脂中的含量达95%~98%。越来越多的证据表明,甘油三酯中脂肪酸的位置在其营养价值、理化性能、风味的呈现和在食品体系中的稳定性

等方面有重要的影响作用。与脂肪酸相比,甘油三酯更加稳定,也更能反映油脂本身的性质^[1],因此甘油三酯类化合物的分离分析方法研究已成为油脂化学、油脂营养及油脂工业等研究领域的核心和关键。

在现有的甘油三酯分离分析方法中,常用的有非水反相色谱法(NARP-HPLC)^[2]、主要用于分析相对饱和的甘油三酯混合物的高温气相色谱法(GC)^[3]、用于分析同分异构体组成的离线二维色谱法^[4]、以及与质谱联用直接测定甘油三酯成分的超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS),这些方法显示了能够准确分析甘油三酯的潜力,但仍有局限性,如分析时间长和分离效果不好等。

超高效合相色谱(UPC²)是一种融合了超高效液相色谱(UPLC)技术优势的超临界流体色谱(SFC),其主要流动相是超临界流体二氧化碳(CO₂),比液相色谱(LC)所使用的液体流动相以及GC所使用的载气有更多突出的优点。CO₂单独使用或与少量共溶剂共同使用作为流动相,流体黏度小,比高效液相色谱(HPLC)中所使用的液体流动相扩散率更高、更有利于传质,可在更低的温度下实现分离^[5],此外这种流动相的使用大大减少了有机溶剂的使用,是一种绿色环保的新型方法^[6]。通过对系统压力、温度以及流动相密度的调节可以实现复杂混合物、特别是非极性或极性较小的组分的分析^[7]。与质谱联用于分析时无需标准品,利用特征碎片离子即可进行分子结构分析,且具有灵敏度高、稳定性高和重现性好等优点^[8]。目前在甘油三酯的分析中应用较少。

本文采用超高效合相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPC²-Q-TOF-MS)分析了几种常见植物油大豆油、花生油、葵花籽油、菜籽油、亚麻籽油、玉米油、稻米油、米糠油、芝麻油、特级初榨橄榄油和棕榈油的甘油三酯组成,可为植物油甘油三酯分离分析方法提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆油、花生油、葵花籽油、菜籽油、亚麻籽油、玉米油、稻米油、米糠油、芝麻油、特级初榨橄榄油、棕榈油共11种常见植物油均为市售。

正己烷、乙醇、乙腈均为色谱纯,美国TEDIA高纯溶剂有限公司;超临界CO₂(纯度≥99.999%),无锡市远通气体有限公司。

超高效合相色谱(UPC²),美国Waters公司;四级杆-飞行时间质谱仪(Q-TOF-MS),美国

Waters公司;AB304-S型电子天平。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

样品于4℃保存,实验前取出。每种样品分别称取约25 mg于100 mL容量瓶中,加入正己烷溶解并定容,使溶液质量浓度约为0.25 mg/mL。

1.2.2 甘油三酯分析鉴定

采用超高效合相色谱(UPC²)串联四级杆飞行时间质谱仪(Q-TOF-MS)对样品进行分析。参考Gao^[6]、Tu^[9]等的实验条件,得到优化后的甘油三酯鉴定方法。

色谱条件:Acquity UPC² BEH-2EP色谱柱(150 mm × 3.0 mm, 1.7 μm, Waters, USA);柱温50℃;进样器温度20℃;背压13 790 kPa;洗脱液A为超临界CO₂(纯度≥99.99%),洗脱液B为乙腈-乙醇(体积比50:50),梯度洗脱;流动相流速为0.8 mL/min;进样体积为1 μL。优化后的梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	流速/(mL/min)
0	99.8	0.2	0.8
2	99.7	0.3	0.8
10	99.5	0.5	0.8
15	99.2	0.8	0.8
22	99.0	1.0	0.8
25	95.0	5.0	0.8
27	99.8	0.2	0.8
30	99.8	0.2	0.8

质谱条件:采用电喷雾电离源正离子(ESI⁺)MS^E扫描模式,扫描相对分子质量为100~1 200 Da;脱溶剂气体为氮气,气体流量为700 L/h,碰撞气体为氩气;离子源温度和溶剂温度分别为100℃和450℃;毛细管电压为3 kV,锥孔电压为25 V,锥气流量为20 L/h;低碰撞能量为6 eV,高碰撞能量范围为20~40 eV;采用亮氨酸脑啡肽(0.2 ng/μL)为外标物对目标离子进行精确质量锁定(每30 s),在正离子模式下亮氨酸脑啡肽(*m/z*)为556.277 1。

1.2.3 数据处理

原始数据用MassLynx V4.1(Waters, USA)进行分析,采用OriginPro 9.0软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 甘油三酯的质谱分析

采用1.2.2方法测定11种植物油的甘油三酯,图1为大豆油(图1A)、花生油(图1B)、稻米油(图1C)、棕榈油(图1D)的甘油三酯总离子流图。

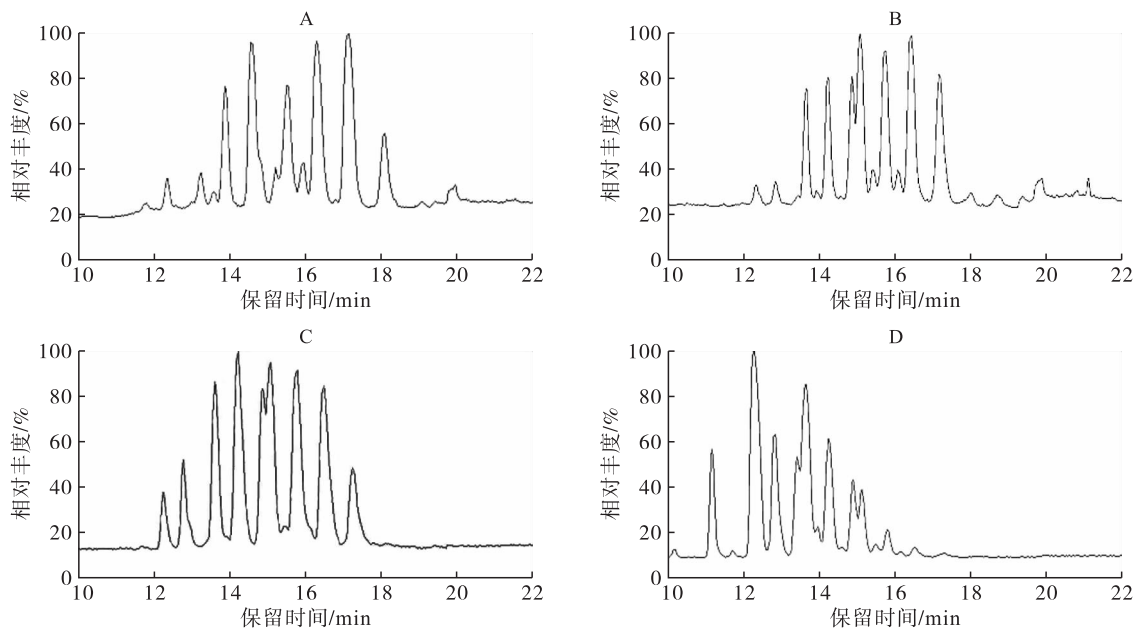


图1 大豆油(A)、花生油(B)、稻米油(C)、棕榈油(D)的甘油三酯UPC²-Q-TOF-MS总离子流图

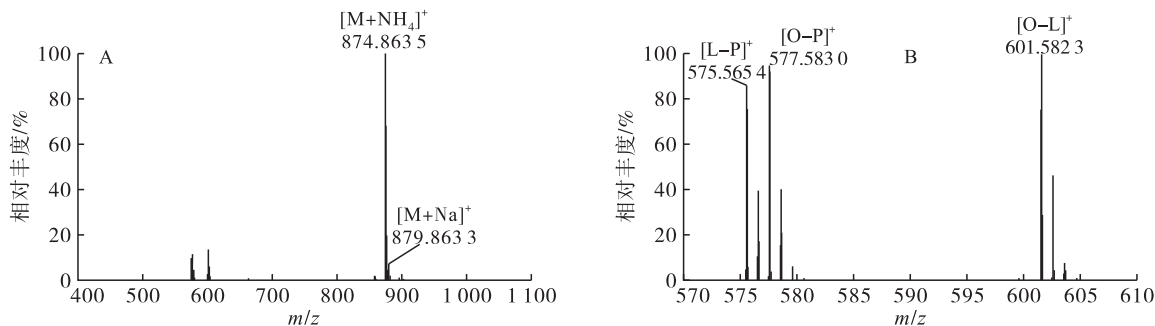


图2 大豆油甘油三酯O-L-P的低能量状态(A)与高能量状态(B)质谱图

由图1可以看出,在30 min之内色谱峰得到了完全分离,且色谱峰分离度良好。质谱的分析中采用MS^E技术,可以在一次进样全扫描中通过高低能量转换同时得到样品的母离子和对应子碎片离子的精确质量数据^[10]。ESI源正离子模式下,甘油三酯以[M+NH₄]⁺离子和[M+Na]⁺离子存在,且[M+NH₄]⁺信号强度远高于[M+Na]⁺,故选择[M+NH₄]⁺做二级质谱。甘油三酯鉴定过程是首先观察ESI⁺模式下MS^E的低能量总离子流图中准分子离子峰[M+NH₄]⁺的值,初步判断该分子离子峰的相对分子质量。然后由高能量状态下对应的碎片离子[M-FA+H]⁺的值,计算脂肪酸的相对分子质量,最终判断得到甘油三酯的种类。以大豆油中第6个色谱峰为例,低能量状态下(见图2A)的准分子离子峰[M+NH₄]⁺为m/z 874.8635, [M+Na]⁺为m/z 879.8633,高能量状态下(见图2B)的3个碎片离子峰[M-FA+H]⁺分别为m/z 575.5654、577.5830、601.5823,计算得到脂肪酸(FA)的值为282、280、256,分别对应脂肪酸亚油酸、油酸和棕榈酸。有学者对甘油三酯的二级碎片离子的信号丰度

进行对比,发现其中一些规律,sn-1位FA和sn-3位FA对应的碎片丰度基本一致,并且高于sn-2位FA对应碎片的丰度^[11],因此碎片离子m/z 575.5654为sn-2位脂肪酸的中性丢失片段,m/z 577.5830、601.5823分别为sn-1/3位脂肪酸的中性丢失片段,所以该甘油三酯的组成为O-L-P。

2.2 11种植物油的甘油三酯组成

经UPC²-Q-TOF-MS检测后,11种植物油的甘油三酯组成见表2,含量计算方法为面积归一化法。

由表2可以看出,与其他学者用HPLC、UPLC所得到的结果相比,UPC²的分离效果更佳,一些ECN值(当量碳原子数)相同的甘油三酯也得到了分离。与洪颖^[12]、Zeb^[13]、Lā-Sa^[14]等的结果相比,大豆油、葵花籽油、玉米油、芝麻油中的O-O-O与S-L-O,玉米油和米糠油中的O-O-L与S-L-L等实现了分离,此外一些含量微少的甘油三酯组成也得到了鉴定,如大豆油中的S-O-P(0.19%±0.08%)、S-L-P(0.94%±0.18%)、L-Ln-Ln(0.64%±0.05%),菜籽油中的E-O-O(0.46%±

0.16%)、Eo-L-L(0.46% ± 0.11%)，棕榈油中的P-M-P(0.40% ± 0.05%)、P-S-M(0.25% ± 0.02%)、S-O-S/E-O-P(0.43% ± 0.04%)、S-L-L(0.27% ± 0.06%)等，因此UPC²-Q-TOF-MS测定甘油三酯的方法是分离效果更好的一种新型方法。

由表2还可以看出，植物油的饱和脂肪酸一般分布在sn-1/3位，不饱和脂肪酸在sn-2位，符合植物油甘油三酯脂肪酸分布的一般规律^[15]。这些植物油中，O-L-L在多种植物油中含量都为最高，其中葵花籽油中为22.27% ± 1.87%，菜籽油中为21.07% ± 1.76%，玉米油中为19.84% ± 1.35%，米糠油中为19.37% ± 0.87%，芝麻油中为17.55% ± 0.82%；花生油和橄榄油中O-O-O的含量最高，含量分别为18.25% ± 0.69%、39.37% ± 0.10%；大豆油中含量最高的甘油三酯是L-L-L(22.16% ± 1.71%)，亚麻籽油中是O-Ln-Ln(21.85% ± 0.18%)，稻米油中是O-L-P(18.58% ± 1.02%)，以及棕榈油中是O-P-P(25.05% ± 0.73%)。

3 结 论

用超高效合相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPC²-Q-TOF-MS)技术分析了11种植物油的甘油三酯组成，用质谱的准分子离子和碎片离子信息推断出甘油三酯的类型并用面积归一化法计算其相对含量。结果表明UPC²-Q-TOF-MS技术应用超临界流体作为流动相，分离效果更好，并且缩短了分离时间，还具有绿色环保、灵敏度高、稳定性好的优点。大豆油、葵花籽油、玉米油、芝麻油中的O-O-O与S-L-O，玉米油和米糠油中的O-O-L与S-L-L等ECN值相同的甘油三酯也得到了分离，此外一些含量微少的甘油三酯组成也得到了鉴定。在这些植物油中，O-L-L为葵花籽油、菜籽油、玉米油、米糠油和芝麻油中含量最高的甘油三酯，花生油和橄榄油中O-O-O的含量最高，大豆油中含量最高的甘油三酯是L-L-L，亚麻籽油中是O-Ln-Ln，稻米油中是O-L-P，以及棕榈油中是O-P-P。这些可为植物油甘油三酯分离分析方法提供新的理论依据。

参考文献:

[1] SALIU F, MODUGNO F, ORLANDI M, et al. HPLC-APCI-MS analysis of triacylglycerols (TAGs) in historical pharmaceutical ointments from the eighteenth century[J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(6):1785-1800.
[2] BUCHGRABER M, ULBERTH F, EMONS H, et al. Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques

[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2010, 106(9):621-648.
[3] BLANKSBY S J, MITCHELL T W. Advances in mass spectrometry for lipidomics[J]. Annu Rev Anal Chem, 2010, 3(1):433-465.
[4] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Model for human milk fat substitute evaluation based on triacylglycerol composition profile[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(1):167-175.
[5] 袁野. 沃特世超高效合相色谱再次重新定义色谱分离科学[J]. 分析化学, 2012, 10(4):674.
[6] GAO B, LUO Y, LU W, et al. Triacylglycerol compositions of sunflower, corn and soybean oils examined with supercritical CO₂ ultra-performance convergence chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Food Chem, 2017, 218:569-574.
[7] GRAND-GUILLAUME P A, VEUTHEY J L, GUILLARME D. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds[J]. J Chromatogr A, 2012, 1266(6):158-167.
[8] 胡珺, 魏芳, 董绪燕, 等. 食用油甘油三酯质谱分析方法的研究进展[J]. 分析测试学报, 2012, 31(6):749-756.
[9] TU A, DU Z, QU S. Rapid profiling of triacylglycerols for identifying authenticity of edible oils using supercritical fluid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with chemometric tools[J]. Anal Methods, 2016, 8(21):4226-4238.
[10] 李双. 海洋微藻中甘油三酯的液质分析[D]. 浙江宁波:宁波大学, 2014.
[11] FAUCONNOT L, HAU J, AESCHLIMANN J M, et al. Quantitative analysis of triacylglycerol regioisomers in fats and oils using reversed-phase high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(2):218-224.
[12] 洪颖. 食用油脂甘油三酯组成特征及HPLC测定方法研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2015.
[13] ZEB A, MURKOVIC M. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2010, 112(8):844-851.
[14] LÅ-SA M, LYNEN F, HOLCAPEK M, et al. Quantitation of triacylglycerols from plant oils using charged aerosol detection with gradient compensation[J]. J Chromatogr A, 2007, 1176(1/2):135-142.
[15] HOLCAPEK M, JANDERA P, ZDERADICKA P, et al. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 1010(2):195-215.

续表 2

保留时间/min	[M + NH ₄] ⁺	甘油三酯	相对含量/%													
			大豆油	花生油	葵花籽油	菜籽油	亚麻籽油	玉米油	稻米油	米糠油	芝麻油	橄榄油	棕榈油			
16.807	930.890 1	E-0-L	0.90 ± 0.09													
16.807	898.813 4	O-L-L	20.04 ± 1.27	17.25 ± 1.27	22.27 ± 1.87	21.07 ± 1.76		19.84 ± 1.35	16.81 ± 0.64	19.37 ± 0.87	17.55 ± 0.82	2.79 ± 0.06	0.67 ± 0.11			
16.968	898.813 4	S-L-Ln					1.26 ± 0.22									
17.318	896.803 6	L-L-L/L-O-Ln					8.54 ± 0.14									
17.469	896.934 6	L-Ln-O			11.68 ± 0.57											
17.516	896.803 6	L-L-L	22.16 ± 1.71	11.11 ± 0.13	22.55 ± 1.46			18.93 ± 1.35	5.13 ± 0.22	16.32 ± 1.07	14.32 ± 0.43		0.37 ± 0.04			
17.516	960.953 2	Do-O-O		0.96 ± 0.12												
17.754	896.803 6	S-Ln-Ln						4.61 ± 0.05								
18.149	926.996 5	E ₀ -L-L				0.46 ± 0.11										
18.173	894.812 6	O-Ln-Ln						21.85 ± 0.18								
18.173	894.812 6	L-L-Ln/O-Ln-Ln				3.81 ± 0.26										
18.342	894.923 5	L-L-Ln	7.35 ± 0.79	0.26 ± 0.00						0.59 ± 0.10		4.88 ± 0.51				
18.445	958.936 3	Do-O-L		0.85 ± 0.06												
19.145	956.920 3	Do-L-L		0.61 ± 0.03												
19.145	988.986 3	Ig-O-O		0.37 ± 0.00												
19.441	892.923 5	L-Ln-Ln	0.64 ± 0.05													
19.466	986.970 1	Ig-O-L		0.33 ± 0.04												
19.639	890.814 9	Ln-Ln-Ln														
19.644	984.955 9	Ig-L-L		0.23 ± 0.02												

注: M, C14:0; P, C16:0; Po, C16/1; S, C18:0; O, C18:1; L, C18:2; Ln, C18:3; E, C20:0; Eo, C20:1; Do, C22:0; Ig, C24:0。