

亚麻籽油中不同构型反式亚麻酸的气相色谱测定方法

欧锦强¹, 宋志华², 邵琳雅², 黄健花², 王兴国², 唐俊军³

(1. 江苏翼邦生物技术有限公司, 江苏 常州 213200; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122;
3. 江苏幸福门粮油有限公司, 江苏 泰州 225400)

摘要:为了定量分析亚麻籽油中 α -亚麻酸(ALA)顺反异构体,采用SLB-IL111色谱柱,对气相色谱法测定反式亚麻酸(TALA)的分析条件(载气流速和升温程序)进行优化,并对所建立的方法进行评价。结果表明:载气流速选择0.3 mL/min;升温程序为60℃保持5 min,以20℃/min升温至175℃保持15 min,以1℃/min升温至180℃保持28 min,以0.2℃/min升温至185℃保持40 min;该方法可实现9c,12t,15t-C18:3和9t,12c,15t-C18:3的较好分离,分离度为0.9,其余各TALA的分离度在1.6~8.7之间;所建立的方法重复性好,测定加热亚麻籽油样时各异构体日间相对标准偏差(RSD)为3.16%~5.65%,日内RSD为2.00%~4.13%,检出限为0.678 2~0.879 0 mg/L,定量限为2.260 6~2.930 1 mg/L;各ALA异构体含量与峰面积之间线性关系良好,相关系数均为0.999 8。综上,所建立的方法可用于亚麻籽油中8种不同构型ALA顺反异构体的定量分析。

关键词:亚麻籽油; α -亚麻酸反式异构体;气相色谱法;重复性;检出限;定量限;线性范围

中图分类号:TS222+.1;TQ645.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969-(2022)09-0136-05

Gas chromatographic determination method of *trans*-linolenic acid with different configurations in linseed oil

OU Jinqiang¹, SONG Zhihua², SHAO Linya², HUANG Jianhua²,
WANG Xingguo², TANG Junjun³

(1. Wing Biotech. (Jiangsu) Co., Ltd., Changzhou 213200, Jiangsu, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 3. Jiangsu Xingfumen Grain and Oil Co., Ltd., Taizhou 225400, Jiangsu, China)

Abstract: In order to quantitatively analyze the *cis*- and *trans*- isomers of α -linolenic acid (ALA) in linseed oil, the analytical conditions (carrier gas flow rate and temperature program) for the determination of *trans*-linolenic acid (TALA) by gas chromatography were optimized on the SLB-IL111 column, and the established method was evaluated. The results showed that the optimal carrier gas flow rate was 0.3 mL/min, and the chromatographic column was initially heated at 60℃ for 5 min, then ramped at 20℃/min to 175℃ and held for 15 min, ramped at 1℃/min to 180℃ and held for 28 min, finally ramped at 0.2℃/min to 185℃ and held for 40 min. The method established had effective separation of 9c, 12t, 15t-C18:3 and 9t, 12c, 15t-C18:3 with a separation degree of 0.9. The separation degree of the other TALA ranged from 1.6 to 8.7. The method was reproducible and the relative standard deviation (RSD) of inter-day repetition of each isomer in heated linseed oil was

3.16%~5.65%, and the RSD of intra-day was 2.00%~4.13%. The detection limit was 0.678 2~0.879 0 mg/L, and the limit of quantification was 2.260 6~2.930 1 mg/L. The linear relationship between the content of each

收稿日期:2021-08-17;修回日期:2022-03-23

作者简介:欧锦强(1978),男,工程师,硕士,主要从事油脂加工、检测、油料综合利用等方面的科研工作(E-mail:228239616@qq.com)。

ALA isomer and the peak area was good, and all the correlation coefficient was 0.999 8. In conclusion, the established method can be used for the quantitative analysis of 8 different isomer of ALA in linseed oil.

Key words: linseed oil; *trans* isomers of α -linolenic acid; gas chromatography; repeatability; detection limit; quantification limit; linear range

亚麻籽油是宁夏、甘肃、内蒙古等地区居民的日常烹饪用油^[1]。亚麻籽油富含 α -亚麻酸(ALA),其不饱和度高,在脱臭、烹饪等高温加工使用过程中,易形成反式脂肪酸(TFA)。研究发现,不同的TFA对健康的影响不同^[2],即使同种TFA,不同构型对健康的影响也不同,比如反式 α -亚麻酸(TALA),不同构型呈现不一样的健康影响^[3-4],某些构型的TALA可在生物体内转化为反式EPA而表现出一定的生理功能^[5]。因此,有必要对亚麻籽油所含的不同构型TALA展开研究。

TALA有7种不同的构型,分别为9*t*,12*c*,15*c*-C18:3、9*c*,12*t*,15*c*-C18:3、9*c*,12*c*,15*t*-C18:3、9*c*,12*t*,15*t*-C18:3、9*t*,12*t*,15*c*-C18:3、9*t*,12*c*,15*t*-C18:3和9*t*,12*t*,15*t*-C18:3,不同构型的TALA之间结构差异小、分离定量难。气相色谱(GC)是测定TFA的最有效方法,其利用不同构型脂肪酸在色谱柱上保留时间的不同而实现分离和测定。相关研究采用不同的毛细管色谱柱进行TALA的测定,结果发现:60 m的BPX-70色谱柱无法有效分离 γ -亚麻酸与TALA,影响各TALA的定量^[6];100 m的CP-Sil88色谱柱成功分离了亚油酸顺反异构体以及部分TALA^[7],但无法分离9*t*,12*c*,15*t*-C18:3和9*t*,12*t*,15*c*-C18:3^[8];100 m的SP-2560色谱柱虽然改善了各TALA之间的分离度,但仍未达到有效分离^[9]。姜帆^[10]的方法是现有报道中TALA分离较好的,其采用200 m的SLB-IL111色谱柱成功分离了大部分的TALA,但仍未实现9*c*,12*t*,15*t*-C18:3和9*t*,12*c*,15*t*-C18:3的有效分离,而且该方法仅针对加热三亚麻酸甘油三酯标准品中的TALA,所测样品脂肪酸组成相对简单,不存在其他脂肪酸的干扰,而实际食用油样品的脂肪酸较之更加复杂。

本文以体系更复杂的加热亚麻籽油为分析对象,以SLB-IL111为色谱柱,优化气相色谱分析条件,以实现TALA的有效分离,建立适用于实际油样不同构型TALA的测定方法,并对方法进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

亚麻籽油,由宁夏君星坊食品科技有限公司提供,在200℃加热14 h,用于GC测定条件的优化;ALA甲酯顺反异构体混合标准品(各种不同构型ALA甲酯的总质量浓度为10 mg/mL),美国Sigma公司;十一烷酸甲酯标准品、正己烷(色谱纯)以及四氢呋喃(色谱纯),百灵威科技有限公司;其余试剂均为分析纯,中国上海国药集团化学试剂有限公司。

7820A气相色谱仪,美国安捷伦公司;SLB-IL111色谱柱(200 m×0.25 mm×0.20 μ m),Supelco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ALA甲酯顺反异构体混合标准溶液的配制

用移液管移取质量浓度为10 mg/mL的ALA甲酯顺反异构体混合标准品250 μ L于5 mL容量瓶中,用色谱纯正己烷定容,配制成0.5 mg/mL的混标稀释液,再从混标稀释液中吸取2.5 mL于5 mL容量瓶中并定容,配制成0.25 mg/mL的混合标准溶液,以此类推配制质量浓度为0.031 25 mg/mL的ALA甲酯顺反异构体混合溶液。

1.2.2 样品处理

按文献[1]的方法对样品进行甲酯化,并加入十一烷酸甲酯作为内标定量。

1.2.3 气相色谱分析

GC条件:SLB-IL111色谱柱(200 m×0.25 mm×0.20 μ m),进样口温度230℃,检测器温度250℃,载气为氮气,分流比60:1,进样量1 μ L。

在上述GC条件下,将标准品测试液和样品测试液注入气相色谱仪中进行测定,以标准品保留时间对照法对样品的色谱峰进行定性,以内标法进行定量。样品中单个脂肪酸含量的计算见公式(1)。

$$X_i = F_i \times \frac{A_i}{A_{11}} \times \frac{C_{11} \times V_{11}}{m} \times F \times 100 \quad (1)$$

式中: X_i 为样品中脂肪酸的含量,g/100 g; A_i 为脂肪酸甲酯的峰面积; A_{11} 为十一烷酸甲酯的峰面

积; C_{11} 为十一烷酸甲酯的质量浓度, mg/mL; V_{11} 为十一烷酸甲酯的添加量, mL; F 为脂肪酸甲酯转换成脂肪酸的转换系数, 即脂肪酸 i 的分子质量与脂肪酸 i 甲酯的分子质量之比值; m 为样品的质量, mg; F_i 为脂肪酸甲酯的相对校正因子, 按公式(2)进行计算。

$$F_i = \frac{A_{11}}{A_{s_i}} \times \frac{C_{s_i}}{C_{11}} \quad (2)$$

式中: A_{11} 为十一烷酸甲酯的峰面积; A_{s_i} 为混合标准品中脂肪酸甲酯的峰面积; C_{11} 为十一烷酸甲酯的质量浓度, mg/mL; C_{s_i} 为混合标准品中脂肪酸甲酯的浓度, mg/mL。

2 结果与讨论

2.1 GC 条件的优化

2.1.1 载气流速的确定

在升温程序(60 °C 保持 5 min, 以 20 °C/min 升温至 175 °C 保持 15 min, 以 1 °C/min 升温至 185 °C, 再以 0.2 °C/min 升温至 186 °C, 保持 80 min) 固定的条件下, 以 ALA 甲酯顺反异构体混合标准溶液为分析对象, 以 $9c, 12t, 15t - C18:3$ 和 $9t, 12c, 15t - C18:3$ 的分离度(R)为评价指标, 进行载气流速的优化, 结果见表 1。

表 1 载气流速对 $9c, 12t, 15t - C18:3$ 和 $9t, 12c, 15t - C18:3$ 甲酯分离度的影响

载气流速/(mL/min)	R
0.6	0.69
0.5	0.75
0.3	0.81

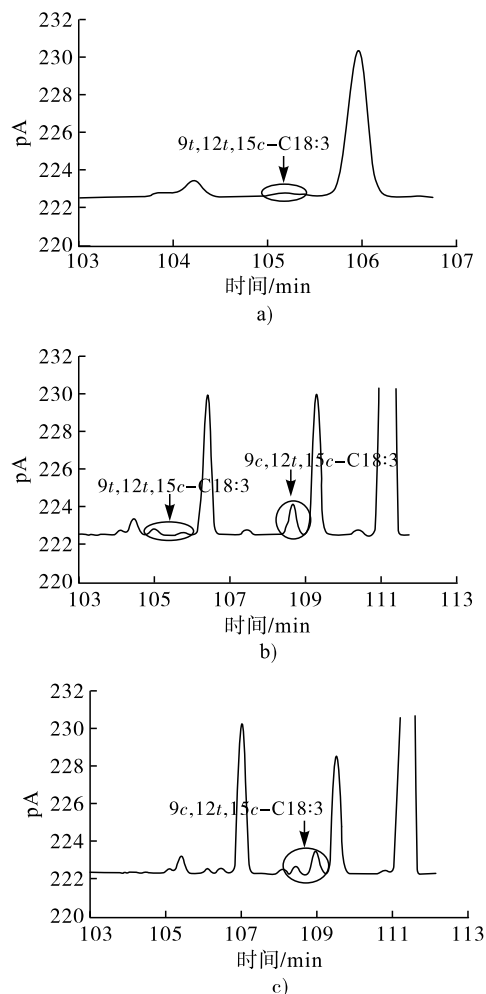
由表 1 可知, 随着载气流速的降低, $9c, 12t, 15t - C18:3$ 和 $9t, 12c, 15t - C18:3$ 的分离度提高, 但是载气流速过慢会造成峰展宽以及分析时间的大幅增加, 因此在保证分离度的基础上, 综合评估选取 0.3 mL/min 的载气流速。

2.1.2 升温程序的确定

在载气流速 0.3 mL/min 条件下, 以加热亚麻籽油为试样, 考察不同升温程序对试样中 ALA 甲酯顺反异构体分离的影响, 结果如图 1 所示。

由图 1 可见, 加热亚麻籽油的脂肪酸组成复杂, 升温程序不合适时, 油样中 TALA 的分离测定受到影响, 如图 1a 中 $9t, 12t, 15c - C18:3$ 、图 1b 中的 $9c, 12t, 15c - C18:3$ 均受到了其他脂肪酸的干扰。这可能是因为 180 °C 的温度梯度对于分离 $9t, 12t, 15c - C18:3$ 干扰物质比较有效, 但会使得与 $9c, 12t, 15c - C18:3$ 保留时间相近的脂肪酸后移, 从而干扰后者

的分离。因此, 进一步调整升温程序, 使 $9c, 12t, 15c - C18:3$ 的干扰解除, 见图 1c。

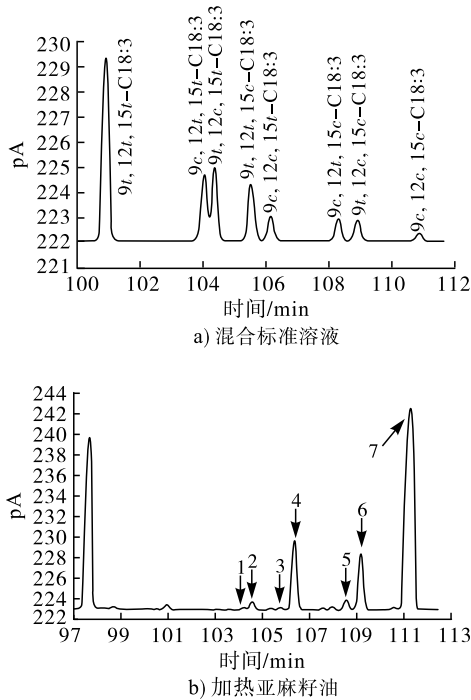


注: a) 升温程序为 60 °C 保持 5 min, 以 20 °C/min 升温至 175 °C 保持 15 min, 以 1 °C/min 升温至 185 °C, 以 0.2 °C/min 升温至 186 °C 保持 80 min; b) 升温程序为 60 °C 保持 5 min, 以 20 °C/min 升温至 175 °C 保持 15 min, 以 1 °C/min 升温至 180 °C 保持 30 min, 以 1 °C/min 升温至 185 °C 保持 60 min; c) 升温程序为 60 °C 保持 5 min, 以 20 °C/min 升温至 175 °C 保持 15 min, 以 1 °C/min 升温至 180 °C 保持 28 min, 以 0.2 °C/min 升温至 185 °C 保持 40 min

图 1 不同升温程序加热亚麻籽油中 ALA 甲酯顺反异构体的气相色谱图

将图 1c 的条件用于 ALA 甲酯顺反异构体混合标准溶液及加热亚麻籽油的分析, 结果如图 2 所示。

根据图 2a 计算相邻两峰的分离度, 结果如表 2 所示。由表 2 可见, $9c, 12t, 15t - C18:3$ 和 $9t, 12c, 15t - C18:3$ 的分离度达到 0.9, 接近 1.0, 两者基本分离, 其他 ALA 甲酯顺反异构体均实现完全分离 ($R > 1.5$)。由图 2b 可见, 加热亚麻籽油中不含有 $9t, 12t, 15t - C18:3$, 其余 ALA 甲酯顺反异构体实现良好分离。



注:b)中峰1~7依次为 $9c,12t,15t-C18:3$ 、 $9t,12c,15t-C18:3$ 、 $9t,12t,15c-C18:3$ 、 $9c,12c,15t-C18:3$ 、 $9c,12t,15c-C18:3$ 、 $9t,12c,15c-C18:3$ 、 $9c,12c,15c-C18:3$

图2 亚麻籽油及混合标准溶液的ALA甲酯顺反异构体气相色谱图

表2 ALA甲酯顺反异构体相邻两峰的分离度

ALA甲酯顺反异构体	R
$9t,12t,15t-C18:3$	143.3
$9c,12t,15t-C18:3$	8.7
$9t,12c,15t-C18:3$	0.9
$9t,12t,15c-C18:3$	3.3
$9c,12c,15t-C18:3$	1.7
$9c,12t,15c-C18:3$	6.0
$9t,12c,15c-C18:3$	1.6
$9c,12c,15c-C18:3$	5.4

注:表中分离度为后一种物质与前一种物质的数据

综上所述,确定亚麻籽油中TALA的GC测定升温程序为:60℃保持5 min,以20℃/min升温至175℃保持15 min,以1℃/min升温至180℃保持28 min,以0.2℃/min升温至185℃保持40 min。

2.2 测定方法的考察

2.2.1 重复性

按2.1确定的气相色谱条件,分析ALA甲酯顺反异构体混合标准溶液、加热亚麻籽油的TALA含量,在1 d内测定5次以计算日内重复性,再连续测定5 d以计算日间重复性,且保持每天测定的时间点相同,结果见表3。

由表3可见:ALA甲酯顺反异构体混合标准溶

液的日内相对标准偏差为1.77%~4.17%、日间相对标准偏差为3.87%~4.93%;加热亚麻籽油样的日内相对标准偏差为2.00%~4.13%,日间相对标准偏差为3.16%~5.65%。可见方法的重复性好,满足定量分析要求。

表3 混合标准溶液和油样的日内、日间重复性

ALA甲酯顺反异构体	日内RSD/%		日间RSD/%	
	标准溶液	油样	标准溶液	油样
$9t,12t,15t-C18:3$	2.74	-	4.85	-
$9c,12t,15t-C18:3$	1.77	2.95	4.93	5.65
$9t,12c,15t-C18:3$	3.78	2.00	4.84	3.16
$9t,12t,15c-C18:3$	2.94	4.13	4.89	4.90
$9c,12c,15t-C18:3$	4.17	2.40	3.87	3.81
$9c,12t,15c-C18:3$	3.89	3.53	4.01	4.71
$9t,12c,15c-C18:3$	4.14	3.04	4.73	4.05
$9c,12c,15c-C18:3$	2.71	2.76	4.37	4.21

注:RSD为相对标准偏差;-表示该种ALA甲酯反式异构体未检出

2.2.2 检出限和定量限

针对本实验所用仪器以及分析条件,分别以信噪比(S/N)的3、10倍作为仪器检出限和定量限。根据ALA甲酯顺反异构体混合标准溶液中各ALA甲酯异构体的质量浓度和峰面积,计算各ALA甲酯顺反异构体的检出限和定量限,结果见表4。

表4 ALA甲酯各顺反异构体的

ALA甲酯顺反异构体	检出限和定量限	
	检出限	定量限
$9t,12t,15t-C18:3$	0.754 8	2.516 0
$9c,12t,15t-C18:3$	0.797 9	2.659 8
$9t,12c,15t-C18:3$	0.751 2	2.504 0
$9t,12t,15c-C18:3$	0.806 1	2.687 1
$9c,12c,15t-C18:3$	0.879 0	2.930 1
$9c,12t,15c-C18:3$	0.810 4	2.701 2
$9t,12c,15c-C18:3$	0.869 0	2.896 6
$9c,12c,15c-C18:3$	0.678 2	2.260 6

由表4可见,各ALA甲酯顺反异构体的检出限在0.678 2~0.879 0 mg/L,而定量限在2.260 6~2.930 1 mg/L。

2.2.3 线性范围

将系列不同质量浓度的ALA甲酯顺反异构体混合标准溶液进行GC分析,并对各ALA甲酯顺反异构体的质量浓度与其峰面积进行线性拟合,得到线性方程和相关系数,结果见表5。

由表5可见,各ALA甲酯顺反异构体均与峰面积在一定质量浓度范围呈良好的线性相关性,相关系数均为0.999 8,完全满足定量分析的要求。

表5 ALA 甲酯顺反异构体质量浓度(x)与峰面积(y)的线性关系

ALA 甲酯顺反异构体	线性方程	相关系数	质量浓度范围/(mg/L)
9 <i>t</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>t</i> -C18:3	$y = 3\ 520.30x + 6\ 275.30$	0.999 8	11.6 ~ 193.8
9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>t</i> -C18:3	$y = 3\ 520.00x + 2\ 429.00$	0.999 8	4.5 ~ 75.0
9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i> -C18:3	$y = 3\ 520.10x + 2\ 558.60$	0.999 8	4.4 ~ 77.3
9 <i>t</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>c</i> -C18:3	$y = 3\ 518.50x + 2\ 202.90$	0.999 8	4.4 ~ 64.9
9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i> -C18:3	$y = 3\ 517.60x + 987.61$	0.999 8	2.1 ~ 28.2
9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>c</i> -C18:3	$y = 3\ 517.30x + 895.22$	0.999 8	1.8 ~ 25.8
9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i> -C18:3	$y = 3\ 517.20x + 875.87$	0.999 8	1.8 ~ 25.3
9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i> -C18:3	$y = 3\ 519.60x + 330.43$	0.999 8	0.7 ~ 9.6

3 结 论

气相色谱法可实现亚麻籽油中 ALA 各顺反异构体的定量分析,各异构体的分离度在 0.9 ~ 8.7 之间。方法重复性好,测定加热亚麻籽油样时各异构体日间 RSD 在 3.16% ~ 5.65%、日内 RSD 在 2.00% ~ 4.13%,检出限在 0.678 2 ~ 0.879 0 mg/L,定量限在 2.260 6 ~ 2.930 1 mg/L,各异构体含量与峰面积之间线性关系良好,相关系数均为 0.999 8。

参考文献:

- [1] 邵琳雅,耿聪,黄健花,等.不同煎炸温度下亚麻籽油中 α -亚麻酸的反式异构化及其分布情况[J].中国油脂,2020,45(11):84-87.
- [2] ROBERTS T L, WOOD D A, RIEMERSMA R A, et al. *Trans* isomers of oleic and linoleic acids in adipose tissue and sudden cardiac death[J]. *Lancet*, 1995, 345(8945): 278-282.
- [3] WOLFF R L, COMBE N A, ENTRESSANGLES B, et al. Preferential incorporation of dietary *cis*-9, *cis*-12, *trans*-15 18:3 acid into rat cardiolipins[J]. *BBA - Mol Cell Biol*, 1993, 1168(3):285-291.
- [4] BRETRILLON L, CHARDIGNY J M, NOËL J P, et al. Desaturation and chain elongation of [1-¹⁴C] mono-*trans* isomers of linoleic and α -linolenic acids in perfused rat liver[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(11):2228-2236.
- [5] CHARDIGNY J M, SÉBÉDIO J L, JUANÉDA P, et al. Effects of *trans* *n*-3 polyunsaturated fatty acids on human platelet aggregation[J]. *Nutr Res*, 1995, 15(10):1463-1471.
- [6] VINGERING N, LEDOUX M. Use of BPX-70 60-m GC columns for screening the fatty acid composition of industrial cookies[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2009, 111(7):669-677.
- [7] KRAMER J K G, CRUZ-HERNANDEZ C, DENG Z, et al. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(6):1137S-1145S.
- [8] LI A, HA Y, WANG F, et al. Determination of thermally induced *trans*-fatty acids in soybean oil by attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography analysis[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(42):10709-10713.
- [9] TSUZUKI W. Inconsistencies in a highly polar capillary gas chromatography column and necessity of column performance checks for *trans* fatty acid measurement[J]. *J AOAC Int*, 2012, 95(6):1740-1743.
- [10] 姜帆. α -亚麻酸热致异构反式产物分离鉴定及形成途径解析[D].北京:中国农业科学院农产品加工研究所,2017.

·公益广告·

适度加工, 营养更丰富!

《中国油脂》宣

