

毛细管气相色谱法测定乳脂中的 *cis-9 trans-11*-共轭亚油酸

王小静¹, 沈向真¹, 韩航如², 赵茹茜¹, 陈杰¹

(1. 南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要 :建立了测定乳脂中 *cis-9, trans-11*-共轭亚油酸(CLA)的毛细管气相色谱方法。样品经正己烷-异丙醇提取、甲醇-甲醇钠甲酯化后,进行气相色谱分析;采用程序升温,以保留时间定性,外标法定量。采用该方法测得共轭亚油酸的回收率为 100.26%,相对标准偏差(RSD)为 1.9%($n=6$),检测限为 1 mg/L。该方法样品用量少,前处理简单,建立的实验条件准确可靠,不仅可以用来测定 *cis-9, trans-11*-CLA 的含量,而且对于乳制品中所含的其他脂肪酸的分析测定也具有指导意义。

关键词 :毛细管气相色谱法; *cis-9, trans-11*-共轭亚油酸; 乳脂

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)06-0645-03 栏目类别 :研究论文

Analysis of *cis-9, trans-11*-Conjugated Linoleic Acid in Milk Fat by Capillary Gas Chromatography

WANG Xiaojing¹, SHEN Xiangzhen¹, HAN Hangru², ZHAO Ruqian¹, CHEN Jie¹

(1. Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural

University, Nanjing 210095, China; 2. National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm

Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract : Conjugated linoleic acid (CLA) is a term representing a mixture of positional and geometric isomers of octadecadienoic acid with a conjugated double bond system. Conjugated linoleic acid has attracted a great deal of interest among nutritionists because it is a natural fat component that appears to have a number of health improvement properties. The *cis-9, trans-11*-CLA is the major CLA isomer found in dairy products accounting for 75% to 90% of the total CLA in milk fat. A capillary gas chromatographic method equipped with a flame ionization detector for the analysis of the *cis-9, trans-11*-CLA in milk fat was developed. The *cis-9, trans-11*-CLA was extracted with hexane-isopropanol, methylated with methanol-sodium methylate and *cis-9, trans-11*-CLA was separated and quantified using gas chromatography. Retention time of the peaks was used for qualitative analysis, while external standard method was used for quantitative analysis. The recovery of the *cis-9, trans-11*-CLA was 100.26%. The relative standard deviation was 1.9% ($n=6$). This method presented is advantageous for high precision, high sensitivity analysis with smaller sample size and simpler pretreatment. It would be of significance for analyzing the contents of other fatty acids in the milk and milk products.

Key words : capillary gas chromatography (CGC); *cis-9, trans-11*-conjugated linoleic acid (CLA); milk fat

共轭亚油酸(CLA)是指一系列含有共轭双键、但位置和空间构型不同的十八碳二烯酸同分异构体的混合物,在 20 世纪 80 年代中期由 Pariza 等^[1-3]首先从研磨的牛肉中发现,以后相继在不同的牛肉和牛奶制品中检测到。天然来源的共轭亚油酸主要

存在于反刍动物的肉品和乳制品中,以 *cis-9, trans-11*-CLA 为主,约占总 CLA 的 75% ~ 90%^[4]。大量研究表明,CLA 具有抗肿瘤、降低脂肪积累、抗动脉粥样硬化、增强机体免疫力、预防糖尿病等多种生理功能,对人体健康具有十分重要的意义^[5]。随着

收稿日期 2005-12-15

第一作者:王小静,女,博士研究生,助理研究员, E-mail: wxjdy@163.com.

通讯联系人:沈向真,男,副教授, Tel (025)84396961, Fax (025)84398669, E-mail: xzshen@njau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371040).

CLA 异构体生理功能的发现和对其不断深入的研究,CLA 异构体的分析测定技术已受到越来越广泛的关注。脂肪酸的常用分析方法是将其衍生为易挥发的甲酯等酯化物,采用高效液相色谱(HPLC)^[6-7]、气相色谱(GC)^[8-9]或气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[10-11]进行分离测定。目前,国内 CLA 的研究还处于起步阶段,仅见使用 CPWAX 52CB 毛细管柱(30 m × 0.53 mm i. d.),尚未见使用 100 m 长毛细管柱的气相色谱法测定乳脂中 CLA 的报道。本研究建立了应用毛细管气相色谱-氢火焰离子化检测器(GC-FID)进行乳脂中 *cis*-9, *trans*-11-CLA 测定的方法,采用极性非常强的脂肪酸甲酯测定专用毛细管柱^[12],使 CLA 异构体能更好地分离,提高了检测方法的灵敏度,可准确、快速、简便地测定乳脂中的 *cis*-9, *trans*-11-CLA。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪,Agilent 7683 自动进样器,分流/不分流进样口,火焰离子化检测器,HP 化学工作站,GCD-300A 氢气发生器,Hettich 高速冷冻离心机。

cis-9, *trans*-11-CLA 甲酯(纯度 99%,美国 Matreya, Inc),正己烷(纯度 95%,高效液相色谱(HPLC)级,TEDIA Inc),甲醇(HPLC 级),异丙醇、甲醇钠、硫酸钠、乙酸甲酯、无水氯化钙、草酸、乙醚,均为国产分析纯试剂。

1.2 优化的色谱条件

Supelco SP2560 脂肪酸甲酯测定专用毛细管柱(100 m × 0.25 mm i. d. × 0.20 μm;Supelco Inc,Bellefonte,PA)。程序升温方法:初始温度为 150 ℃,保持 5 min 后以 2 ℃/min 的速率升至 175 ℃,保持 15 min 后以 7 ℃/min 的速率升至 200 ℃,保持 20 min 后以 5 ℃/min 的速率升至 220 ℃,保持 25 min;总运行时间为 85 min。载气为氦气(He)(纯度 99.999%,BOC 公司),流量 1.1 mL/min;氢气(H₂)流量 40 mL/min;空气流量 450 mL/min。进样口和 FID 的温度为 250 ℃,进样量 1.0 μL,分流比 20:1。

1.3 标准溶液的配制

准确称取 *cis*-9, *trans*-11-CLA 甲酯标准品 25 mg 置于 10 mL 容量瓶中,用正己烷定容,振荡摇匀,即得 2.5 g/L 的标准储备液。用正己烷逐级稀释至所需要的浓度。

1.4 样品前处理

取新鲜奶样离心(8 000 r/min,25 min,8 ℃)

后,取 300 mg 乳脂于试管中,加入 5.4 mL 正己烷-异丙醇(体积比为 3:2)溶液混匀,静置分离二相。取上层有机相,经无水硫酸钠干燥后,用氮气吹干。取提取后的油脂 40 mg,溶于 2 mL 正己烷中,加入 40 μL 乙酸甲酯混匀,然后加入 40 μL 甲酯化试剂(甲醇-甲醇钠,体积比为 1.75:0.4)混匀并放置 10 min,最后加入 60 μL 中止剂(1 g 草酸加至 30 mL 乙醚中配成),放置 1 h 后离心(2 600 r/min,5 min,5 ℃),取上清液供测定用。

1.5 定性和定量分析

在上述优化的色谱条件下测定 *cis*-9, *trans*-11-CLA 标准品和乳脂样品,以保留时间定性,以外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析结果

在上述优化的色谱条件下,*cis*-9, *trans*-11-CLA (1.25 g/L)标准溶液和乳脂样品中的 CLA 都达到基线分离,结果见图 1。

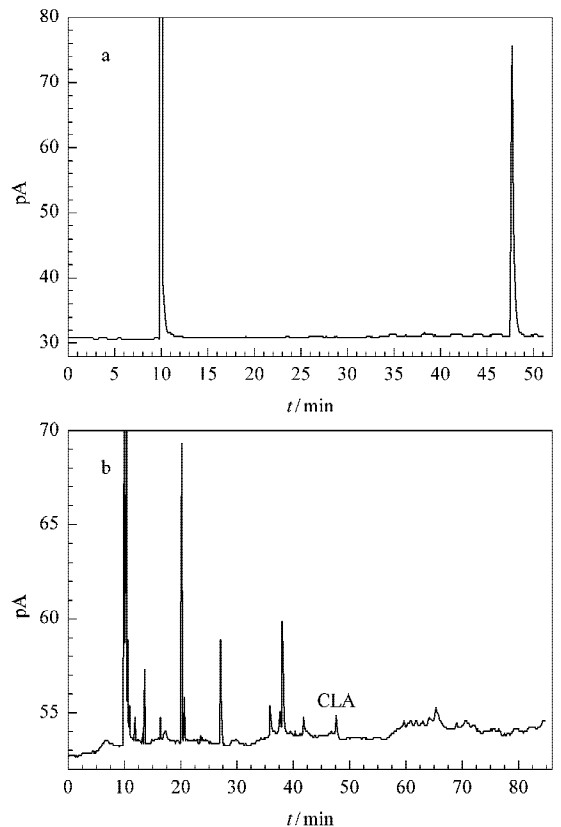


图 1 (a) *cis*-9, *trans*-11-CLA 标准品和 (b) 乳脂样品的气相色谱图

Fig.1 Chromatograms of (a) *cis*-9, *trans*-11-CLA standard and (b) a milk fat

2.2 线性范围与检测限^[13]

将 *cis*-9, *trans*-11-CLA 标准品配制成 0.004, 0.02, 0.1, 0.5, 2.5 g/L 系列标准溶液,分别进样,

计算不同质量浓度下的峰面积。以峰面积 Y 对其质量浓度 X (g/L) 进行线性回归分析,得到线性回归方程和相关系数分别为 $Y = 653.32X - 0.55$, $r^2 = 0.9999$, 线性范围为 $0.004 \sim 2.5$ g/L。最低检测限(以信噪比为 3 计)为 1 mg/L。

2.3 回收率测定

取 0.5 mL 样品液(*cis-9 trans-11*-CLA 的质量浓度为 0.392 g/L)6 份,分别加入 *cis-9 trans-11*-CLA 标准液(质量浓度为 0.5 g/L)0.5 mL,置于具塞试管中,作为加标样品液。将上述样品溶液按“1.4”节所述方法处理,按“1.2”节所述色谱条件测定,测得 *cis-9 trans-11*-CLA 的平均加标回收率($n = 6$)为 100.26%, 相对标准偏差(RSD)为 1.9%。

2.4 样品测定

应用所建立的方法,对 8 份不同奶样乳脂中 *cis-9 trans-11*-CLA 的含量进行测定,结果依次为:1.17, 0.54, 0.42, 0.68, 0.91, 0.83, 1.04 和 1.55 mg/g。

2.5 讨论

天然和人工合成的物质中含有多种 CLA 异构体,为了深入研究它们的含量和功能,必须建立高质量的分析方法。由于 CLA 不稳定很易转变成其他异构体,所以在测定前必须对样品进行甲酯化处理。一般而言,酸催化甲酯化方法在酯化过程中易产生其他异构体和含甲氧基反应产物,这些产物影响脂肪酸的分析,因此不太适合脂肪酸甲酯的制备;此外,升高温度及酯化反应时间也影响甲酯化产物^[10-11,14]。为此我们采用以甲醇钠-甲醇为甲酯化试剂的方法进行甲酯化^[15],取得了理想的结果。在进行 GC 分析时所选用的色谱柱的类型和长度均对分析结果有很大的影响。为了得到较好的分离效果,在共轭亚油酸分析中,采用 SP-2560 这一极性非常强的脂肪酸甲酯测定专用毛细管柱是非常必要的^[10,12]。采用本方法能够成功地分离、测定 *cis-9*,

trans-11-CLA;目前,本实验室已将此方法应用于课题中实际奶样测定的研究,说明所建立的实验条件准确可靠。

总之,采用毛细管气相色谱-氢火焰离子化检测器测定乳脂中的 *cis-9 trans-11*-共轭亚油酸的方法具有样品前处理简单、耗用试剂少、灵敏度及回收率高、重现性好等诸多特点。该方法不仅可以测定分析 *cis-9 trans-11*-CLA 的含量,而且对于乳制品中的其他脂肪酸含量的测定也具有指导意义,很适宜推广应用。

参考文献:

- [1] Pariza M W, Ashoor S H, Chu F S, Lund D B. *Cancer Lett*, 1979, 7(2/3):63
- [2] Pariza M W, Hargraves W A. *Carcinogenesis*, 1985, 6:591
- [3] Ha Y L, Grimm N K, Pariza M W. *Carcinogenesis*, 1987, 8:1881
- [4] Kelsey J A, Corl B A, Collier R J, Bauman D E. *J Dairy Sci*, 2003, 86:2588
- [5] Whigham L D, Cook M E, Atkinson R L. *Pharm Res*, 2000, 42(6):503
- [6] Adlof R O, Menzel A, Dorovska-Taran V. *J Chromatogr A*, 2002, 953:293
- [7] Adlof R O. *J Chromatogr A*, 2004, 1033:369
- [8] Ma Lijing, Zhou Maoxing, Feng Yu. *Chinese Journal of Chromatography* (马利静,周卯星,冯瑜. 色谱), 2004, 22(1):84
- [9] Lu Jie, Huang Kai, Zang Ning, Li Junfang, Zhang Min, Wang Yong. *Chinese Journal of Chromatography* (卢洁,黄凯,臧宁,李俊芳,张敏,王崑. 色谱), 2005, 23(2):193
- [10] Seppänen-Laakso T, Laakso I, Hiltunen R. *Anal Chim Acta*, 2002, 465:39
- [11] Roach J A G, Mossoba M M, Yurawecz M P, Kramer J K G. *Anal Chim Acta*, 2002, 465:207
- [12] Christie W W. *Lipid Technol*, 2000, 12:64
- [13] Chen Huiming, Wang Chao, Wang Xing. *Chinese Journal of Chromatography* (陈会明,王超,王星. 色谱), 2004, 22(3):224
- [14] de la Fuente M A, Luna P, Juárez M. *Trends Anal Chem*, 2006, 25(9):1016
- [15] Christie W W. *J Lipid Res*, 1982, 23:1072