

高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法测定棕榈油和动物脂肪甘油三酯

张东¹, 薛雅琳¹, 朱琳¹, 柴杰^{1,2}

(1. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037; 2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214222)

摘要:采用高效液相色谱-飞行时间质谱法对比分析棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯, 结果显示4种油脂的甘油三酯种类和含量均不相同。从棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂分别鉴定出16、19、15、13种甘油三酯, 三饱和脂肪酸甘油酯分别占9.13%、1.46%、13.75%及9.05%。棕榈油中PPO含量最高, 占34.41%, 其次是PLO+SLL、PPL和PPP。猪脂中含量较高的甘油三酯分别为OLS、PLO+SLL、POS及POO, 占总甘油三酯的67.65%; 牛脂中含量较大的甘油三酯为POS和OLS, 占40.17%, 其次为PPO、SSL及SOS; 羊脂中含量较大的甘油三酯为SSL、POO、SOS和POS, 占73.12%。同时, 采用主成分分析法对4种油脂进行了统计分析。

关键词:甘油三酯; 三饱和脂肪酸甘油酯; 液质联用; 主成分分析

中图分类号: TS 227 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2015)05-0072-05

Determination of triglyceride in palm oil and animal fats by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time of flying mass spectrometry

ZHANG Dong¹, XUE Ya-lin^{1,*}, ZHU Lin¹, CHAI Jie^{1,2}

(1. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi Jiangsu 214122)

Abstract: Triglycerides in palm oil and animal fats such as lard, beef tallow and suet were investigated by HPLC/Q-TOF. The results showed that the composition and content of triglycerides in each oil or fat were different. 16, 19, 15 and 13 triglycerides were identified in palm oil, lard, beef tallow and suet, respectively; in which the content of trisaturated glycerides were 9.13%, 1.46%, 13.75% and 9.05%, separately. PPO was the major triglyceride (34.41%) in palm oil, followed by PLO+SLL, PPL and PPP. OLS, PLO+SLL, POS and POO with content of 67.65% were the dominant triglycerides in lard. In beef tallow, the content of POS and OLS was 40.17%, the content of PPO, SSL and SOS was relatively high. SSL, POO, SOS and POS in suet was 73.12%. Meanwhile, 4 oils and fats were statistically analyzed using principal component analysis (PCA).

Key words: triglyceride (TG); trisaturated glyceride; high-performance liquid chromatography/quadrupole-time of flying mass spectrometry (HPLC-Q/TOF); principal component analysis

在油脂流通及消费领域, 一些不法商贩以次充好, 将低价值油脂添加到高价值油脂中, 或将餐厨回收油脂经过简单精炼后加入正常油脂中, 欺骗消费者, 而目前的检测手段尚不能很好的检测出来。甘油三酯是动植物油脂的主要成分, 其含量在98%以

上; 组成甘油三酯的脂肪酸种类以及其在甘油骨架上的位置决定了油脂的营养价值。并且, 各种油脂有着各自独特的甘油三酯特性^[1]。棕榈油是世界上产量最大和消费量最多的植物油脂之一, 而猪脂、牛脂和羊脂由于其较高含量的饱和脂肪酸被广泛用作起酥油和煎炸油; 因此研究它们的甘油三酯组成特性有着重要的意义。

甘油三酯的分析方法主要有高温气相色谱

收稿日期: 2015-03-26

基金项目: 粮食公益性行业科研专项(201313006-3)

作者简介: 张东, 1982年出生, 男, 硕士。

通讯作者: 薛雅琳, 1960年出生, 女, 教授级高级工程师。

法^[2]、薄层色谱法^[3]、银离子色谱法^[4-5]及高效液相色谱法(HPLC)^[6-10]等,其中HPLC方法尤其是反相HPLC法应用最为广泛。反相HPLC法分析甘油三酯时,通常采用示差折光检测器和蒸发光散射检测器。但由于物质定性需要标准品作对照,因此限制了这些检测器的应用^[11]。利用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS)对甘油三酯进行分析非常合适,它将高效液相色谱分离和高灵敏度质谱检测结合起来,成为分析此类混合物一种简捷手段,无需考虑对照品购买难的问题^[12-18]。本实验采用高效液相色谱—飞行时间质谱法对比分析棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯,并且利用主成分分析法对其进行区分,为油脂品质鉴定及油脂掺伪鉴别提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

棕榈原油、猪脂、牛脂和羊脂(均为精炼):市售。

正己烷、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、丙酮(色谱级):赛默飞世尔公司。

1.2 主要仪器

1200系列高效液相色谱仪串联6510型四极杆飞行时间质谱仪:美国安捷伦公司;AB304-S型电子天平:瑞士梅特勒—托利多公司;Knifetec 1095型水分磨:瑞典福斯公司;0.2 μm尼龙过滤膜:天津津腾公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

样品存于4℃冷柜,实验前取出。称取约100 mg油脂于100 mL容量瓶中,加入正己烷溶解,用正己烷定容,使溶液浓度约为1 mg/mL。经0.2 μm尼龙过滤膜过滤后备用。

1.3.2 高效液相色谱—飞行时间质谱(HPLC/Q-TOF)分析条件^[19]

液相部分:ZORBAX SB-C18保护柱(4.6 mm×12.5 mm,5 μm),ZORBAX SB-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温40℃;流动相:A相为正己烷:二氯甲烷(1:1),B相为丙酮:乙腈(5:95);洗脱条件:0~20 min,20% A;20~35 min,20%~80% A;35~45 min,20% A;流速为0.6 mL/min;进样量5 μL。

质谱部分:采集模式:APCI+,采集范围:m/z

150~1 000;干燥气温度:350℃;干燥气流速:10 L/min;气化器温度:350℃;毛细管电压:3.5 kV;电晕电流:10 μA。

1.4 数据处理

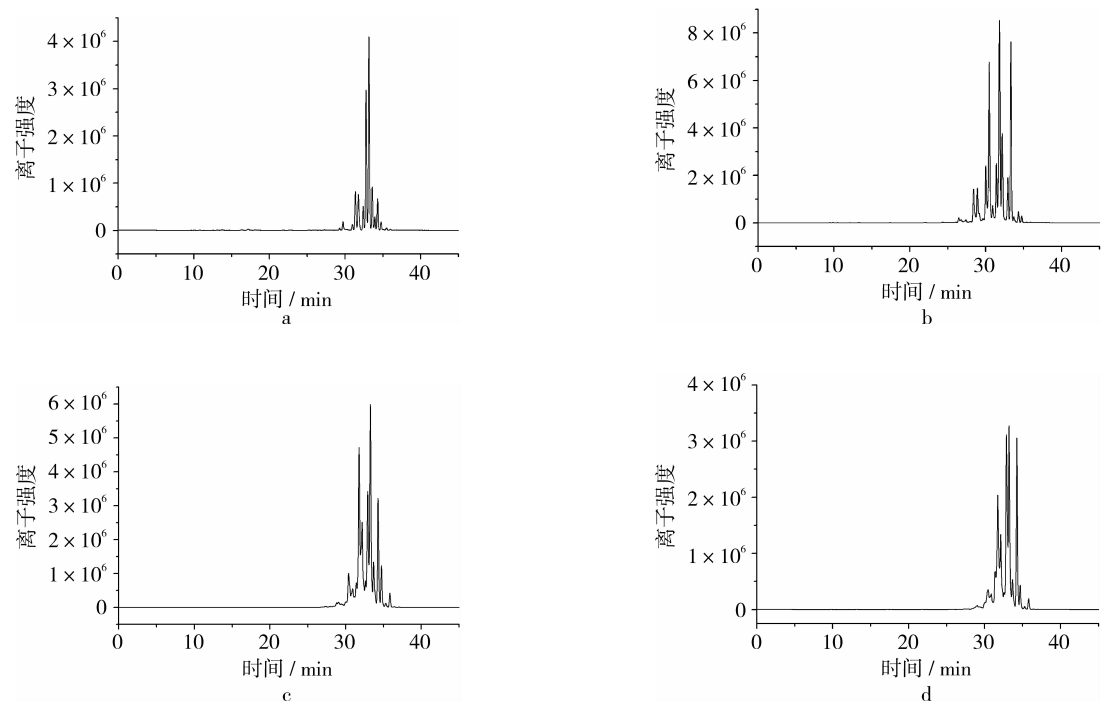
数据处理采用SPSS软件(版本16.0)。甘油三酯含量显著性差异采用One-Way ANOVA检验;实验采用主成分分析法(PCA)对棕榈油和3种动物脂肪进行区别。

2 结果与分析

2.1 甘油三酯测定结果

甘油三酯在反相色谱上按等价碳原子数(ECN)由小到大依次流出,甘油三酯脂肪酰基碳数之和减去2倍的甘油三酯中双键数为等价碳原子数。根据脂肪酸在甘油骨架上的分布,可将甘油三酯分为aaa型、aab型(又可分为aab型和aba型异构体)和abc型(a、b、c分别代表不同的脂肪酸,aaa型即表示甘油骨架上有三个相同的脂肪酸,aab型即表示有两个相同的脂肪酸,而abc型即表示3个脂肪酸均不同)。由于从sn-2位上断裂一个脂肪酸要比从sn-1和sn-3位断裂一个脂肪酸所需的能量要大^[11]。因此可通过APCI质谱图中各种碎片离子峰丰度和质量数规律,判断甘油三酯分子量、脂肪酸组成等。在本实验的条件下,甘油三酯的APCI质谱图中同时存在信号强度较大的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和失去1个脂肪酸的碎片离子峰 $[M+H-脂肪酸]^+$ 。

采用液质连用对棕榈油及三种常见动物脂肪甘油三酯进行分析,结果见图1,总共得到22个色谱流出峰,对其进行了定性,以面积归一化法确定各甘油三酯的相对百分含量。棕榈油和猪脂、牛脂、羊脂甘油三酯组成及含量均不相同,见表1。从棕榈油中共鉴定出16种甘油三酯,其中三饱和脂肪酸甘油酯占9.13%;猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯分别为19、15、13种,三饱和脂肪酸甘油酯分别占1.46%、13.75%、9.05%。对于实验中鉴定的三饱和脂肪酸甘油酯(包括PPP、PPS、PSS、SSS),猪脂中未发现PPP,而棕榈油和猪脂中未发现SSS。而作者在此之前研究了几种常见植物油甘油三酯,其中均未发现三饱和脂肪酸甘油酯^[20-21]。这是由于棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂中有较高比例的饱和脂肪酸^[22-23],发现其饱和脂肪酸含量分别占总脂肪酸的50%、34.2%~39.7%、44.0%~



a 棕榈油;b 猪脂;c 牛脂;d 羊脂。

图 1 棕榈油和三种动物脂肪的 HPLC - Q/TOF 总离子流图

表 1 棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯测定结果 (n = 3)

序号	保留时间/min	甘油三酯/%	[M + H] ⁺	ECN	棕榈油	猪脂	牛脂	羊脂
1	24.329	LLLn	877.72	40	0.00 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
2	26.451	LLL	879.74	42	0.09 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.18 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
3	26.744	LOLn	879.74	42	0.00 ± 0.00 ^a	0.51 ± 0.01 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
4	27.365	PLLn	853.73	42	0.00 ± 0.00 ^a	0.49 ± 0.04 ^b	0.24 ± 0.02 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
5	28.401	LLO	881.75	44	0.53 ± 0.11 ^b	3.96 ± 0.18 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
6	28.911	PLL	855.73	44	1.97 ± 0.06 ^b	4.11 ± 0.15 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
7	29.154	POLn	855.73	44	0.00 ± 0.00 ^a	0.97 ± 0.06 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
8	30.013	LOO	883.77	46	1.06 ± 0.07 ^b	6.68 ± 0.28 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
9	30.467	PLO + SLL	857.75,883.77	46	7.56 ± 0.33 ^c	17.71 ± 0.69 ^d	5.47 ± 0.06 ^b	3.80 ± 0.07 ^a
10	30.909	PPL	831.74	46	7.49 ± 0.18 ^c	2.38 ± 0.10 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
11	31.423	OOO	885.79	48	0.00 ± 0.00 ^a	6.02 ± 0.08 ^d	2.80 ± 0.01 ^b	4.71 ± 0.16 ^c
12	31.525	OLS	885.79	48	4.05 ± 0.08 ^b	23.11 ± 0.34 ^d	18.76 ± 0.40 ^c	0.00 ± 0.00 ^a
13	31.778	POO	859.77	48	23.32 ± 0.67 ^d	10.11 ± 0.22 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	16.78 ± 0.04 ^c
14	32.131	PPO	833.78	48	34.41 ± 1.07 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	13.89 ± 0.22 ^c	9.75 ± 0.24 ^b
15	32.612	PPP	807.76	48	7.13 ± 0.27 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	2.31 ± 0.04 ^c	1.48 ± 0.03 ^b
16	32.928	SSL	887.80	50	2.69 ± 0.45 ^a	4.89 ± 0.17 ^b	12.61 ± 0.23 ^c	20.81 ± 0.35 ^d
17	33.329	POS	861.99	50	5.92 ± 0.22 ^a	16.72 ± 0.46 ^b	21.40 ± 0.61 ^d	19.46 ± 0.56 ^c
18	33.711	PPS	835.79	50	1.54 ± 0.08 ^b	0.74 ± 0.07 ^a	5.81 ± 0.05 ^d	3.83 ± 0.07 ^c
19	34.333	SOS	889.85	52	0.61 ± 0.03 ^a	1.20 ± 0.02 ^b	10.71 ± 0.18 ^c	16.07 ± 0.20 ^d
20	34.754	PSS	863.82	52	0.46 ± 0.13 ^a	0.72 ± 0.04 ^b	4.17 ± 0.06 ^d	2.56 ± 0.06 ^c
21	35.27	SOA	917.84	54	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.58 ± 0.04 ^c	0.40 ± 0.01 ^b
22	35.804	SSS	891.85	54	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.46 ± 0.03 ^c	1.18 ± 0.04 ^b

注:P - 棕榈酸;O - 油酸;S - 硬脂酸;L - 亚油酸;Ln - 亚麻酸;A - 二十碳酸;LLLn - 二亚油酸亚麻酸甘油酯;LLL - 三亚油酸甘油酯;LOLn - 亚油酸油酸亚麻酸甘油酯;PLLn - 棕榈酸亚油酸亚麻酸甘油酯;LLO - 二亚油酸油酸甘油酯;PLL - 二亚油酸棕榈酸甘油酯;POLn - 棕榈酸油酸亚麻酸甘油酯;LOO - 二油酸亚油酸甘油酯;PLO - 棕榈酸亚油酸油酸甘油酯;SLL - 二亚油酸硬脂酸甘油酯;PPL - 二棕榈酸亚油酸甘油酯;OOO - 三油酸甘油酯;OLS - 油酸亚油酸硬脂酸甘油酯;POO - 二油酸棕榈酸甘油酯;PPO - 二棕榈酸油酸甘油酯;PPP - 三棕榈酸甘油酯;SSL - 二硬脂酸亚油酸甘油酯;POS - 棕榈酸油酸硬脂酸甘油酯;PPS - 二棕榈酸硬脂酸甘油酯;SOS - 二硬脂酸油酸甘油酯;PSS - 二硬脂酸棕榈酸甘油酯;SOA - 硬脂酸油酸二十碳酸甘油酯;SSS - 三硬脂酸甘油酯。

结果以平均值 $\pm$ SD表示,同一行不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

50.8%和55.1%;而常见植物油如大豆油、菜籽油和花生油等饱和脂肪酸不超过总脂肪酸的25%。因此,可以通过分析某种植物油中的三饱和脂肪酸甘油酯,确定该油脂中是否混入棕榈油或动物脂肪(猪脂、牛脂和羊脂)。根据4种脂肪三饱和脂肪酸甘油酯,可以推断牛脂硬度最高,其次是棕榈油和羊脂,硬度最低的为猪脂,与文献结果一致^[24]。

对比分析棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯,发现棕榈油中PPO含量最高,占34.41%,其次是PLO+SLL、PPL和PPP。而在大豆油、芝麻油、菜籽油和葵花籽油中未检出PPO,橄榄油中PPO含量较高,为2.01%^[21,25]。猪脂中含量较高的甘油三酯分别为OLS、PLO+SLL、POS及POO,占总甘油三酯的67.65%,上述甘油三酯在大豆油中仅为10.82%^[21]。牛脂中含量较大的甘油三酯为POS和OLS,占40.17%,其次为PPO、SSL及SOS;羊脂中含量较大的甘油三酯为SSL、POO、SOS和POS,占73.12%。并且在牛脂和羊脂中均检出约1%的SSS。在常见植物油中^[20-21],POS含量通常不超过1%,OLS含量不超过5%,POO在花生油和橄榄油中含量较高(>10%)。

2.2 主成分分析结果

主成分分析法(PCA)是多元统计中的一种数据挖掘技术。它利用降维的方法将多个变量转换为少数几个互不相关的新变量,从而排除众多化学信息中共存的重叠信息。数据标准化处理是主成分分析法能否成功的重要因素,本实验采用因子分析程序对原始数据标准化处理后进行主成分分析。分析过程中舍去了LLL_n、LLL、LOL_n、PLL_n、LLO、PLL和POL_n,这是由于这几种甘油三酯含量较低或仅存在某一种油脂中。

采用SPSS软件中的主成分分析功能对棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯进行分析。以15种甘油三酯作为变量进行分析。从碎石图(图2)可以看出,三个主成了解释了所有变量。但根据累计贡献类大于80%~85%的原则,选取了两个主成分(92.120%),第一主成了解释了56.936%的变量,第二主成了解释了35.184%的变量(图3),从图3可以看出,PPS、SOA、SOS、SSS、SSL、PSS和POS对第一主成分贡献较大,而第二主成分代表了PPO及

PPP,说明4种油脂的主要差异在于以上几种甘油三酯的不同。图4显示牛脂和羊脂分布较为集中,而棕榈油、猪脂能够明显区分,两者与牛脂和羊脂也能够明显区分开来。

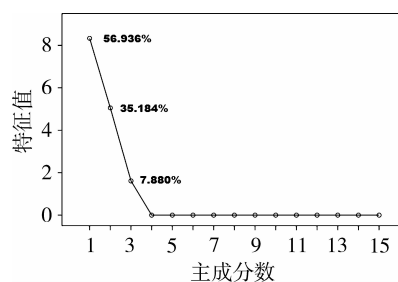


图2 主成分分析碎石图

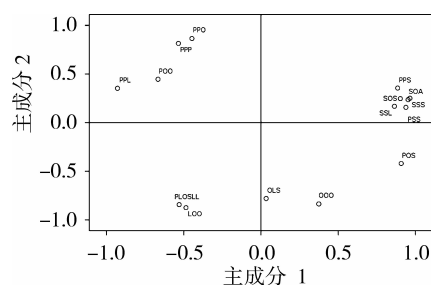


图3 棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂主成分分析载荷图

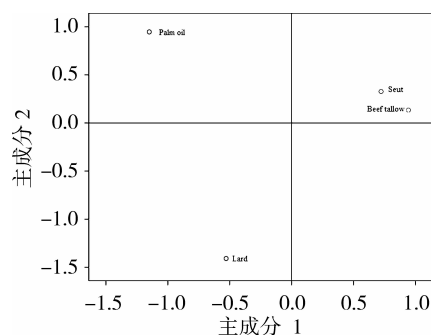


图4 棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂主成分分析得分图

3 结论

采用高效液相色谱—飞行时间质谱法对比分析棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂甘油三酯非常有效可行。实验证实4种油脂的甘油三酯种类和含量均不相同。从棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂分别鉴定出16、19、15、13种甘油三酯,三饱和脂肪酸甘油酯分别占9.13%、1.46%、13.75%、9.05%。发现棕榈油中PPO含量最高,占34.41%,其次是PLO+SLL、PPL和PPP。猪脂中含量较高的甘油三酯分别为OLS、PLO+SLL、POS及POO,占总甘油三酯的67.65%;

牛脂中含量较大的甘油三酯为 POS 和 OLS, 占 40.17%, 其次为 PPO、SSL 及 SOS; 羊脂中含量较大的甘油三酯为 SSL、POO、SOS 和 POS, 占 73.12%。由于实验采用 APCI 电离源, 分子碎片少且规律性较好, 根据这些碎片信息可以推断脂肪酸类型, 从而进一步推断甘油三酯类型。

实验还采用主成分分析法研究分析了 4 种油脂, 选取了两个主成分 (92.120%), 第一主成分解释了 56.936% 的变量, 第二主成分解释了 35.184% 的变量。PPS、SOA、SOS、SSS、SSL、PSS、POS、PPO 及 PPP 可做为棕榈油、猪脂、牛脂和羊脂特征甘油三酯。该研究可为甘油三酯结构信息研究及油脂掺伪鉴别提供基础。

参考文献:

- [1] 朱桃花, 范璐, 钱向明, 等. HPLC 分析植物油脂甘油三酯结构组成的研究现状[J]. 中国油脂, 2011, 36(5): 59-63.
- [2] 王丽丽, 汪勇, 胡长鹰, 等. 高温气相色谱分析甘油酯的研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(7): 75-79.
- [3] 孟祥河, 章银军, 毛忠贵. 甘油酯的分析方法[J]. 中国油脂, 2004, 29(1): 44-46.
- [4] Adlof R, List G. Analysis of triacylglycerol isomers by silver-ion high-performance liquid chromatography. Effect of column temperature on retention times[J]. Journal of high resolution chromatography, 2004, 1046(1-2): 109-113.
- [5] Plattner R D, Spencer G F, Kleiman R. Triglyceride separation by reverse phase high performance liquid chromatography[J]. Journal of American oil chemists society, 1977, 54(11): 511-515.
- [6] Plattner R D, Payne-Wahl K. Separation of triglycerides by chain length and degree of unsaturation on silica HPLC columns[J]. Lipids, 1979, 14(2): 152-153.
- [7] Plattner R D. High performance liquid chromatography of triglycerides: controlling selectivity with reverse phase columns[J]. Journal of American oil chemists society, 1981, 58(5): 638-642.
- [8] El-Handy A H, Perkins E G. High performance reversed phase chromatography of natural triglyceride mixtures: critical pair separation[J]. Journal of American oil chemists society, 1981, 58(9): 867-872.
- [9] Rocha J M, Kalop P J, Ollilainen V, et al. Separation and identification of neutral cereal lipids by normal phase high-performance liquid chromatography, using evaporative light-scattering and electrospray mass spectrometry for detection[J]. Journal of chromatography A, 2010, 1217(18): 3013-3025.
- [10] Adlof R. Analysis of triacylglycerol and fatty acid isomers by low-temperature silver-ion high performance liquid chromatography with acetonitrile in hexane as solvent: limitations of the methodology[J]. Journal of chromatography A, 2007, 1148(2): 256-259.
- [11] 刘书成, 章超桦, 洪鹏志, 等. 液质联用技术在油脂分析中应用[J]. 粮食与油脂, 2006(9): 10-13.
- [12] Sjövall O, Kuksis A, Marai L et al. Elution factors of synthetic oxotriacylglycerols as an aid in identification of peroxidized natural triacylglycerols by reversed phase high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry[J]. Lipids, 1997, 32(11): 1211-1218.
- [13] Byrdwell W C, Emeken E A. An analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Lipids, 1995, 30(2): 173-175.
- [14] Nef W E, Byrdwell W C. Soybean oil triacylglycerol analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of oil and fat industry, 1995, 72(10): 1185-1191.
- [15] Laakso P, Voutilainen P. Analysis of triacylglycerols by silver-ion high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Lipids, 1996, 31(12): 1311-1322.
- [16] Mu H, Høy C E. Application of atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry in identification of lymph triacylglycerols[J]. Journal of chromatography B, 2000, 748(2): 425-437.
- [17] Holcapek M, Jandera P Z, 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]. Journal of chromatography A, 2003, 1010(2): 195-215.
- [18] Byrdwell W C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids[J]. Lipids, 2001, 36(4): 327-346.
- [19] AOCS official method Ce5b-89. Triglycerides in vegetable oil by HPLC[S].
- [20] 张东, 龙伶俐, 薛雅琳, 等. 基于高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法的大豆油甘油三酯组成特性分析[J]. 中国油脂, 2012, 37(12): 81-84.
- [21] 张东, 龙伶俐, 薛雅琳, 等. 液质联用分析常见植物油甘油三酯[J]. 粮油食品科技, 2012, 20(6): 33-37.
- [22] St. John L C, Young C R, Knabe D A, et al. Fatty acid profiles and sensory and carcass traits of tissues from steers and swine fed an elevated monounsaturated fat diet[J]. Journal of animal science, 1987, 64: 1441-1447.
- [23] Monahan F J, Buckley D J, Morrissey P A, et al. Influence of dietary fat and α -tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork[J]. Meat science, 1992, 31: 229-241.
- [24] Hui Y H. 贝雷: 油脂化学与工艺学(第五版 第一卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [25] 皇甫志鹏, 薛雅琳, 刘元法, 等. 甘油酯指纹图谱相似度在芝麻油掺混检测中的应用[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(2): 117-122. 宗