

GC-MS 法检测婴儿配方奶粉甘油三酯中 Sn-2 位棕榈酸

林 曼¹, 陈历俊², 董学艳², 闵伟红¹, 姜铁民^{2,*}

(1. 吉林农业大学食品学院, 吉林长春 130000;

2. 北京三元食品股份有限公司国家母婴乳品健康工程技术研究中心, 北京 100163)

摘要: 研究建立一种高效、准确测定婴儿配方奶粉甘油三酯中 Sn-2 位棕榈酸含量的方法。采用国际标准化委员会 (ISO)14156 的方法提取脂肪, 利用猪胰脂酶专一水解甘油三酯 Sn-1, 3 位脂肪酸, 通过氨基固相萃取柱法分离水解产物中单甘油酯, 甲酯化后用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 检测 Sn-2 位棕榈酸。结果表明用氨基固相萃取柱法取代传统薄层层析法分离单甘油酯不仅操作简单, 分离效果好, 而且回收率高, 测定结果准确, GC-MS 法检测 3 种婴儿配方奶粉中 Sn-2 位棕榈酸占总棕榈酸的含量分别为 40.5%、40.3% 和 40.8%, 添加回收率范围为 91.7%~98.5%, RSD 为 1.56%, 重现性良好, 完全适用于婴儿配方奶粉甘油三酯 Sn-2 位棕榈酸含量的检测。

关键词: 婴儿配方奶粉, Sn-2 位棕榈酸, 氨基固相萃取柱 (SPE), 气相色谱-质谱联用 (GC-MS)

Determination of palmitic acid in the Sn-2 position in infant formulas by GC-MS

LIN Man¹, CHEN Li-jun², DONG Xue-yan², MIN Wei-hong¹, JIANG Tie-min^{2,*}

(1. School of Fermentation Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130000, China;

2. National maternal and infant health dairy researching center of Beijing Sanyuan Foods Co.Ltd., Beijing, 100163, China)

Abstract: To establish a highly efficient and accurate determination of Sn-2 palmitic acid in triglycerides of infant formulas. Lipids of milk powder were extracted by the method of ISO14156. The Sn-1, 3 fatty acids in the triglycerides were specially hydrolyzed by pancreatic lipase. The 2-monoglyceride was separated and prepared by solid phase extraction (SPE), and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results showed that the content of palmitic acid esterified at the Sn-2 position was 40.5%, 40.3%, 40.8%. The average spike recoveries for palmitic acid were 91.7%~98.5%, and the relative standard deviation was 1.56%. The developed method was proved to be simple, precise, accurate and reliable, thereby being suitable for the determination of Sn-2 palmitic acid in infant formulas.

Key words: infant formulas; Sn-2 palmitic acid; solid phase extraction (SPE); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)11-0281-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.11.049

母乳是足月新生儿最理想、最安全的食物, 是婴儿配方乳粉的黄金标准^[1-2]。母乳中含有 3%~5% 的脂肪, 其中甘油三酯占 98% 以上, 它们为婴儿提供 40%~60% 的能量和必需脂肪酸^[3]。母乳脂肪具有特殊的组成和结构, 其中含量最高的饱和脂肪酸是棕榈酸, 是人体最重要的产能脂肪酸, 占母乳脂肪的 20%~25%, 其中 70% 以上棕榈酸分布在 Sn-2 位上^[4-6]。WHO 提倡在婴儿出生后至少 6 个月内进行母乳喂养, 以满足婴儿生长发育的需要, 提高免疫

力, 降低感染传染性疾病的机率, 但是受客观因素影响, 部分母亲选择奶粉喂养。国际一些大型婴幼儿配方乳粉生产企业已经相继推出含母乳脂肪类似物的产品, 如荷兰纽迪西亚乳制品公司的 Nutrilon Omneo 奶粉, 产品标示富含高 Sn-2 位棕榈酸油脂, 能够有效防止婴儿便秘腹泻, 有利于钙质吸收。Loders Crocklaan (Univer) 公司取得生产人乳脂替代品的专利, 产品为 Betapol™, 现在正在进行商业化生产。

2010 年, 中华人民共和国卫生部第一号公告明

收稿日期: 2015-12-14

作者简介: 林曼 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 乳制品检测, E-mail: 15210766546@sina.cn。

* 通讯作者: 姜铁民 (1971-), 硕士, 教授级高工, 研究方向: 乳品生物技术, E-mail: jiang515910@126.com。

基金项目: 十二五国家科技支撑计划 (2013BAD18B04); 北京市科技计划 (D141100004814001)。

确了 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-Dioleoyl-2-palmitoyl triglyceride, C52:2, 简称 OPO) 扩大使用范围及使用量, 旨在模仿母乳构成和脂肪结构的特性, 提高 Sn-2 位棕榈酸相对含量。因此, 亟待建立婴儿配方奶粉 Sn-2 位棕榈酸含量的检测方法^[7-8]。目前, 用薄层层析法分离脂肪水解产物, 衍生后利用气相色谱进行分析, 是最常见的 Sn-2 位脂肪酸检测方法^[4,9-10], 此方法不仅操作复杂, 耗时耗力, 而且检测结果受硅胶层析板质量、展开剂组成、显色方法影响很大。本文采用氨基固相萃取柱法替代薄层层析法分离甘油单酯, 快速衍生后用 GC-MS 法检测 Sn-2 位棕榈酸的含量, 以建立方便、准确测定婴儿配方奶粉甘油三酯中 Sn-2 位棕榈酸含量的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

3 种不同品牌的婴儿配方奶粉 购于大型超市; 猪胰酯酶(30~90 units/mg) Sigma 公司; 氨基固相萃取柱(500 mg/6 mL) Agela 公司; 薄层层析硅胶板(100 mm×200 mm, 厚度 0.20~0.25 mm) 青岛海洋化工有限公司; 37 种脂肪酸甲酯标准品(≥99%, 10 mg/mL)、棕榈酸甘油三酯(≥98%, 1 g) Aladdin 公司; 去离子水; 其他试剂为色谱纯。

GC-MS 系统 TRACE1300-ISQ-LT 系统; 超声清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; 恒温水浴锅 余姚市东方电工仪器厂; 涡旋振荡器 SCILOGEX 公司; 高速冷冻离心机; Sigma 公司; 氮吹仪 天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪提取方法 采用 ISO14156(IDF172) 规定的方法提取婴儿配方奶粉脂肪^[11]。

1.2.2 猪胰酯酶水解脂肪 向提取的脂肪中加入 2 mL 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.8)、0.5 mL 0.05% (m/v) 胆酸钠溶液、0.2 mL 2.2% (m/v) CaCl₂ 溶液, 充分混匀后加入 20 mg 猪胰脂酶, 涡旋振荡 1 min 后, 在 40 °C 的振荡水浴锅中反应 2 min, 恒温环境下剧烈振荡 2 min, 分两次加入 10 mL 无水乙醚, 4000 r/min 离心 5 min, 合并醚层, 氮吹至恒重, 正己烷复容。

1.2.3 Sn-2 位单甘油酯的制取 氨基固相萃取柱分离法: 取氨基固相萃取柱(500 mg, 6 mL), 分两次加入 4 mL 正己烷, 活化萃取柱。加入脂肪酸溶液, 弃去流出液; 分 4 次加入 8 mL 正己烷-乙酸乙酯淋洗液(v/v = 85:15), 弃去淋洗液; 分 4 次加入 8 mL 二氯甲烷-甲醇洗脱液(v/v = 2:1), 收集洗脱液, 氮气吹干。

薄层层析分离法^[11]: 玻璃点样毛细管将脂肪溶液点在距离薄层板底边 15 mm 处, 点样后干燥 5 min, 展开剂为正己烷: 乙醚: 甲酸 = 70:30:1 (v:v:v), 层析结束后将层析板放入到碘蒸气中显色, 用微型刮铲刮下单甘油酯谱带(R_f 值约 0.035), 加入 10 mL 乙醚分两次提取脂肪, 离心后取出有机层, 氮气吹干。

1.2.4 脂肪酸甲酯化 方法一^[12]: 加入 5 mL 甲苯,

6 mL 乙酰氯-甲醇溶液, 75 °C 水浴振荡 2.5 h。冷却至室温, 将反应液移至 50 mL 离心管中, 用 6.0 mL 碳酸钠溶液分 2 次清洗顶空瓶, 合并清洗于离心管中, 4000 r/min 离心 5 min, 吸取 1 mL 上次清液于进样瓶, 检测前于 -20 °C 下保存。

方法二^[13]: 加入 5.0 mL 0.5 N 的盐酸-甲醇溶液, 2 mL 正己烷, 2 mL 甲醇, 在 80 °C 下水浴 2 h, 冷却后加入 2 mL 去离子水, 4000 r/min 离心 5 min, 取 1.0 mL 上层清液于进样瓶, 检测前于 -20 °C 下保存。

方法三: 加入 4.0 mL 1 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液, 剧烈振荡 4 min, 加入 1 mL 去离子水和 2 mL 正己烷, 充分混匀后于 4000 r/min 离心 5 min, 取 1.0 mL 上层清液于进样瓶中, 检测前于 -20 °C 下保存。

1.2.5 GC 参数 色谱柱: HP-88 气相色谱柱(100 m×0.250 mm, 0.20 μm); 进样口温度: 200 °C; 恒流流速模式: 1 mL/min; 进样量: 1 μL; 分流比: 10:1; 载气: N₂; 柱温箱升温程序如表:

表 1 柱温箱升温程序

Table 1 Temperature raising procedure of column temperature box

项目	温度 (°C)	保留时间 (min)	速率 (°C/min)
Initial	60.0	5.00	
1	160.0	0.00	8.0
2	200.0	5.00	4.0
3	240.0	5.00	3.0

1.2.6 MS 参数 电子轰击离子源: EI; 离子源温度: 280 °C; 四级杆温度: 150 °C; 质谱接口温度: 240 °C; 四级杆质量扫描范围: 35~400 amu。采用面积归一法对脂肪酸定量。

1.2.7 数据分析 所有数据取平行实验的平均值, 采用 SPSS, EXCEL 软件进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 单甘油酯分离方法确定

以同一次提取的 2 号奶粉脂肪为实验原料, 加入棕榈酸三甘酯标准品溶液, 对比研究了氨基固相萃取柱分离法和薄层层析法对单甘油酯的分离效果。结果如表 2, 经过氨基固相萃取柱法分离的单甘油酯衍生后进行 GC-MS 分析算得回收率为 91.7%~98.5%, RSD 值为 1.56%, 经过薄层层析法分离的单甘油酯衍生后进行 GC-MS 分析得回收率为 81.2%~86.7%, RSD 值为 3.62%。韩瑞丽等^[14] 利用 HPLC-ELSD 法分离脂肪水解产物中单甘油酯, 衍生后进行 GC-MS 分析回收率为 83.3%~85.1%。表明氨基固相萃取柱法不仅操作简便, 而且准确度更高。

表 2 SPE 法和 TLC 法数据对比

Table 2 The comparison between SPE and TLC

方法	Sn-2 位棕榈酸含量 (%)	回收率范围 (%)	RSD (%)
SPE 法	40.3	91.7~98.5	1.56
TLC 法	38.8	81.2~86.7	3.62

表4 回收率及精密度实验($n=5$)Table 4 Recoveries and precision of palmitic acid($n=5$)

编号	本底值(mg/100 g)	添加量(mg/100 g)	理论值(mg/100 g)	检测值(mg/100 g)	回收率(%)	RSD(%)
1		3000	9250	8770	93.4~98.5	2.34
2	6250	6000	12250	11340	94.2~98.4	1.56
3		12000	18250	17063	91.7~96.3	2.24

2.2 甲酯化方法确定

分别采用乙酰氯法、盐酸-甲醇法及酯交换法对 Sn-2 位棕榈酸进行甲酯化,结果发现三种方法都能将 Sn-2 位棕榈酸甲酯化,如表 3 所示棕榈酸峰面积和峰高基本一致,说明棕榈酸的酯化程度相同。但是乙酰氯-甲醇溶液配制时具有一定危险性,反应过程中易发生试管炸裂。盐酸-甲醇法反应时间长达 2 h,反应温度高达 80 ℃,容易引起多不饱和脂肪酸裂解。而酯交换法不仅反应条件温和,在常温下完成酯化反应,而且操作简单,反应时间最短,仅为 4 min,有利于下一步的分析。因此,选择酯交换法作为 Sn-2 位棕榈酸甲酯化方法。

表3 三种甲酯化方法比较($n=3$)Table 3 The comparison of three methyl esterification methods($n=3$)

甲酯化方法	峰面积		峰高	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
乙酰氯法	1116429783.20	1.47	280462983.19	1.64
盐酸-甲醇法	1037288261.70	3.54	290382948.20	3.27
酯交换法	1089075235.60	1.54	269638004.99	1.83

2.3 色谱条件选择

在优化的色谱条件下进行色谱分析,图 1 为样品脂肪酸衍生后的色谱图,可见采用 HP-88 气相色谱柱分析甘油三酯中脂肪酸组分,可以将所有脂肪酸色谱峰完全分离开,分流比为 10:1 时,脂肪酸峰型良好,无拖尾峰,基线平稳,棕榈酸响应值高。采用面积归一化法对标准溶液浓度作图,建立标准曲线。确定棕榈酸的保留时间为 29.84 min,回归方程为 $y = 3.39643 \times 10^6 + 6.52896 \times 10^6 X$, $R^2 = 0.9994$,线性关系良好。

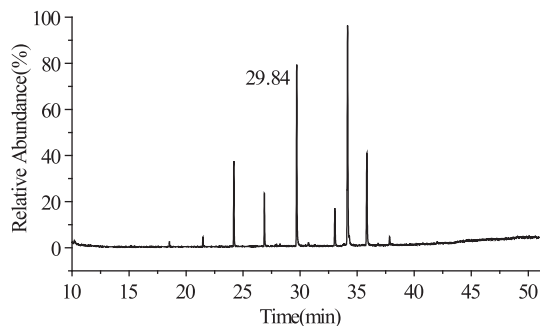


图1 GC-MS 法检测样品色谱图

Fig.1 GC-MS Chromatogram of sample

2.4 GC-MS 法回收率与精密度实验

以同一次提取的奶粉脂肪为实验原料,加入 3

个不同水平的棕榈酸三甘酯标准品溶液,水解后经过氨基固相萃取柱分离单甘油酯,衍生后用 GC-MS 分析,每个实验做 5 个平行,结果如表 4 所示,添加标准品的回收率范围为 91.7%~98.5%,准确性高。

2.5 重现性实验

将 3 个不同品牌婴儿配方乳粉送到中国检验检疫科学研究院综合检测中心检测 Sn-2 位棕榈酸占总棕榈酸百分含量,对比本实验利用氨基固相萃取柱法制备单甘油酯,GC-MS 法检测 Sn-2 位棕榈酸相对含量,结果如表 5,中国检科院与氨基固相萃取柱法分离单甘油酯三种方法检测结果基本一致,方法的重现性良好,说明本实验方法准确、可靠。

表5 Sn-2 位棕榈酸占总棕榈酸的百分含量(%)

Table 5 The proportion of Sn-2 palmitic acid in total palmitic acid(%)

样品编号	本实验室 SPE 法	中国检科院
1	40.5	40.6
2	40.3	40.5
3	40.8	41.1

3 结论

本文建立了一种用氨基固相萃取柱分离水解产物中单甘油酯,酯交换法衍生后,用 GC-MS 法分析婴儿配方奶粉甘油三酯中 Sn-2 位棕榈酸的检测方法。该方法用氨基固相萃取柱法取代薄层层析法制备纯化单甘油酯,大大缩短样品的前处理时间,操作简单、准确度高。选择酯交换法衍生 Sn-2 位棕榈酸,不仅酯化程度高,而且反应条件温和,GC-MS 法检测脂肪酸精密度高,重现性良好,完全适用于婴儿配方奶粉中 Sn-2 位棕榈酸的检测。本实验对于婴幼儿配方奶粉中 Sn-2 位棕榈酸的测定,为今后更深入研究结构脂肪在配方乳粉中的应用,研发更母乳化的母乳替代品提供参考。

参考文献

- [1] 李静,邓泽元.不同母乳营养成分的比较[J].中国乳品工业,2005,33(8):45-47.
- [2] López-López A, López-Sabater M C, Campoy-Folgozo C, et al. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2002, 56(12):1242-1254.
- [3] 何川.人乳脂的脂肪酸分布及人工构造方法[J].食品科技,2001(5):11-14.
- [4] 覃小丽,杨博,王永华.人初乳脂肪酸组成及 sn-2 位脂肪酸分布的研究[J].食品工业科技,2010,31(5):81-85.
- [5] 商允鹏,生庆海,王贞瑜,等.三酰甘油 Sn-2 位上棕榈酸

(下转第 288 页)

续表

样品	阴离子	本底(mg/kg)	加标(mg/kg)	测定值(mg/kg)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
甲醇	F ⁻	4.60	4	8.54	98.50	2.52
			8	11.98	92.25	2.61
			20	21.86	86.30	2.43
			4	11.84	96.50	2.70
			8	16.28	103.75	2.11
			20	28.40	102.10	2.01
	Cl ⁻	7.98	4	11.84	96.50	2.70
			8	16.28	103.75	2.11
			20	28.40	102.10	2.01
			5	13.94	91.20	3.00
			10	19.60	102.22	2.71
			25	35.12	102.96	1.55
SO ₄ ²⁻	9.38	5	30.88	100.80	3.27	
		25	51.90	104.24	2.37	
		50	76.86	102.04	2.10	
		5	30.88	100.80	3.27	
		25	51.90	104.24	2.37	
		50	76.86	102.04	2.10	

3 结论

本实验采用离子色谱法对酒精和甲醇中氟离子、氯离子、硫酸根离子和硝酸根离子进行分析测试研究,试样中加入 0.5 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液利用水浴将其蒸至近干后定容至刻度,样品前处理过程简单易操作。采用 AS15-HC 阴离子色谱柱、40 mmol/L 氢氧化钠溶液淋洗液;电导检测器、100 mA 抑制器电流,23 min 内可完成分离检测。通过优化色谱条件,建立了一种简便、准确度高、重现性好、抑制电流低,且采用等度淋洗即可得到很好分离的新方法。该方法对国产离子色谱也具有很强的适用性,为国家制定酒精、甲醇中阴离子限量标准提供参考,同时也为酒精和甲醇生产加工过程中无机阴离子含量控制提供技术支撑。

参考文献

- [1] 郭龔茹,朱岩,叶明立.离子色谱法测定啤酒中的无机阴离子和阳离子[J].食品科学,2006,27(4):174-176.
- [2] 龚殿婷,李凤华,樊占国,等.光电比浊法测定硼酸中的氯[J].材料与冶金学报,2008,03(3):68-72.
- [3] 佟琦,高丽华.莫尔法与自动电位滴定法测定水中氯离子含量的比较[J].工业水处理,2008(11):69-71.
- [4] 侯艳文,刘峰.阴离子交换色谱中淋洗液流速对测定灵敏度影响的讨论[J].色谱,1998,16(4):347-350.
- [5] 李睿姝,于泓,高微,等.硅胶整体柱离子对色谱快速分析

(上接第 283 页)

- [6] Jiménez MJ, Esteban L, Robles A, et al. Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 51(3):172-179.
- [7] 刘臻,河光华,俞晓军,等.母乳脂肪特点与结构脂肪的研究应用(四)[N].中国食品学报,北京:2010-04-20.
- [8] 戴智勇,张岩春,刘跃辉,等.婴幼儿配方乳粉中蛋白质,脂肪及碳水化合物的调整[J].中国乳业,2011(4):58-61.
- [9] 袁晓武,邓泽元,李静等.胰脂酶法测定食用油甘油三酯中脂肪酸的位置分布[J].食品科学,2009,29(11):544-547.

碘离子[J].分析实验室,2010,29(3):85-88.

- [6] 魏益华,张金艳,戴廷灿,等.离子色谱法测定地沟油和食用油中氯离子含量[J].食品科学,2011,12(12):213-215.
- [7] 杨博锋,汤志旭,高昕.食品塑料包装材料中单体和添加剂及其检测技术[J].食品工业科技,2012,14(14):392-395.
- [8] 沈敏,冯睿,陈浩,等.离子色谱法同时测定降水中的 9 种阴离子[J].分析科学学报,2007,23(3):334-336.
- [9] 商荣宁,张锦梅.离子色谱法测定食品添加剂磷酸二氢钙中的阴离子[J].中国食品卫生杂志,2013,25(1):49-52.
- [10] 郭宏利,郁鸯,赵申,等.离子色谱法测定分子筛废水中六亚甲基亚胺的含量[J].分析实验室,2013,11(11):26-30.
- [11] Maya F, Estela J S, Cerda V. Spectrophotometric determination of chloride in waters using a multisyringe flow injection system[J]. Talanta, 2008, 74(5):1534-1538.
- [12] 史亚利,刘京生,蔡亚歧,等.直接进样离子色谱法测定磷酸试剂中痕量无机阴、阳离子[J].分析测试学报,2005,24(3):128-130.
- [13] 侯艳文,牟世芬,侯小平,等.阴离子交换色谱中淋洗液流速对测定灵敏度影响的讨论[J].色谱,1998,16(4):347-350.
- [14] 林太凤,郑大威,张淑芬,等.功能饮料中功能因子及其检测方法的研究进展[J].食品工业科技,2013,21(21):394-399.
- [15] 潘丙珍,刘青,庞世琦,等.离子色谱法测定酒中的有机酸和无机阴离子[J].现代食品科技,2013,4(4):876-880.

- [10] 刘亚东,宋秋,支潇,等.马奶和成熟母乳甘油三酯中脂肪酸组成及分布[J].食品工业科技,2012,33(3):171-174.
- [11] International Organization for Standardization (ISO). 14156 Milk and milk products - Extraction methods for lipids and liposoluble[S]. Switzerland, 2001-12-01.
- [12] 彭飞进,杨卫花.GC-MS 法测定婴幼儿配方奶粉中 DHA 和亚油酸含量[J].食品科学,2011(14):261-263.
- [13] 李宪瑾,范晓,韩丽君,等.中国黄、渤海常见大型海藻的脂肪酸组成[J].海洋与湖沼,2002,33(2):215-224.
- [14] 韩瑞丽,马健,张佳程,等.HPLC-ELSD 与 GC-MS 法测定牛乳甘油三酯 sn-2 位脂肪酸组成[J].分析测试技术与仪器,2009(3):30-33.