

# 荧光衍生与高效液相色谱结合简易灵敏分析牛奶中的长链游离脂肪酸

刘苗 译 秦立虎 校

(西安市奶牛育种中心, 西安 710075)

**摘要** 本文介绍了一种脂肪酸检测方法,该方法使用高效液相色谱(HPLC)可同时对牛奶中饱和或不饱和脂肪酸进行高灵敏检测,包括月桂酸(十二烷酸),肉豆蔻酸(十四烷酸),棕榈酸(十六烷酸),硬脂酸(十八烷酸),棕榈油酸(十六碳烯酸),油酸(十八碳烯酸)和亚油酸(十八碳二烯酸)。脂肪酸首先被 2-(哌啶基)乙磺酸-2-(2-萘氧)乙基酯(NOEPES)进行荧光衍生,其萘氧乙基衍生物通过反向 HPLC 进行等度洗脱分离,并用荧光检测器进行监测( $\lambda_{ex} = 235\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 350\text{nm}$ )。牛奶中的脂肪酸用甲苯进行萃取,并直接被用于 NOEPES 衍生,无需替换溶剂。脂肪酸的含量通过标准加入法进行测定。该方法只需很少量的牛奶样品(10 $\mu\text{L}$ )即可完成分析测试。

**关键词** 长链游离脂肪酸;乳制品;高效液相色谱;荧光光谱

## 1 引言

食物中的脂肪酸对人体健康方面有着重要的作用。高饱和脂肪酸饮食被与心血管系统慢性疾病有关。相反,适量摄入不饱和脂肪酸对慢性心脏疾病的预防有良好的效果。因此,食品中脂肪酸含量的分析对饮食与健康是十分重要的。

游离脂肪酸由于不含有发色基团或荧光基团,因此无法用紫外分光光度计或荧光仪直接进行痕量水平检测。荧光导向衍生与液相色谱组合的分析方法已有大量文献报道,并广泛应用于各种样品中脂肪酸或羧酸的分析。我们已经开发出多种荧光试剂,在这项研究中,用 2-(哌啶基)乙磺酸-2-(2-萘氧)乙基酯(NOEPES)对牛奶中的脂肪酸进行荧光标记衍生,通过高效液相色谱分离,荧光检测,实现了牛奶中长链游离脂肪酸简单灵敏的分析。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与溶液

十二烷酸(C12:0),十四烷酸(C14:0),

十六烷酸(C16:0),十八烷酸(C18:0),十六烯酸(C16:1),十八烯酸(C18:1),十八碳二烯酸(C18:2),和十七烷酸(C17:0,内标,IS,用于分析校准)均购自 Sigma 公司(圣路易斯,密苏里州)。18-冠-6 醚(18-冠-6)和 1-(4-(2-苯基乙基)苄基)萘(用于稳定性试验的额外内标)购自 TCI 公司(日本东京)。其它试剂均为分析级。NOEPES(本实验室合成)和 18-冠-6 溶液用甲苯配制;硫酸和磷酸溶液用水制备。液体牛奶样品全部来自国内企业,购于高雄(台湾)当地零售商。

### 2.2 液相色谱条件

Waters 高效液相系统(配有 U6K 进样器,717 自动进样室,510 型泵,474 荧光检测器,746 集成器)。色谱柱:Symmetry C<sub>8</sub> 柱(150 $\times$ 3.9mm,5 $\mu\text{m}$ ),Waters 公司;流动相:甲醇-水(92:8,V/V);流速:0.7mL/min。柱洗脱液由荧光检测器监测( $\lambda_{ex} = 235\text{nm}$ , $\lambda_{em} = 350\text{nm}$ )。

2.3 牛奶中长链游离脂肪酸的萃取和衍生  
液态牛奶样品均来自台湾当地的食品

公司。牛奶和添加乳(作为标准加入样本)中长链游离脂肪酸的提取采用一种改进方法。向每支装有或者不装有参照长链脂肪酸以及内标(190 $\mu$ L)的 10mL 试管中加入 10 $\mu$ L 牛奶。长链脂肪酸被分为 4 种不同的浓度加入到每个带有内标 15.0  $\mu$ M(长链脂肪酸浓度的内标)的试管中。长链脂肪酸内标(C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C16:1, C18:1, C18:2, 和内标 C17:0)是通过将标准样品溶解在混合溶剂异丙醇-磷酸(2M)(5:1, v/v)中制得。向标准加入样品和非添加样品(190 $\mu$ L 的混合溶剂 + 10 $\mu$ L 牛奶)中加入 200 $\mu$ L 甲苯。漩涡振荡 30s 后,依次加入 600 $\mu$ L 水和 200 $\mu$ L 甲苯溶液,再次漩涡振荡 2min。在离心力 1800g 下,将混合物离心 5 min。各取 200 $\mu$ L 甲苯相,用于下列衍生。各取 200 $\mu$ L 甲苯提取物转移到含有 300 $\mu$ L NOEPES (12mM)、100 $\mu$ L 18-冠醚-6 (20mM),以及约 10mg 碳酸钾甲苯溶液的

10mL 螺纹试管中。将反应物在 95 $^{\circ}$ C 下振荡 30min。待溶液冷却后,取 300 $\mu$ L 溶液转移至另一试管中,用 1.0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1.0 M)溶液漩涡振荡洗涤 30s。各取 100 $\mu$ L 甲苯相用等体积的甲醇稀释以增强其与流动相的相容性。将所得的样品溶液用于 HPLC 分析。

### 3 结果与讨论

图 1 所示为 NOEPES 对脂肪酸的衍生反应以及过量 NOEPES 的清除,这使得在该研究中合成的长链脂肪酸衍生物能够更清楚地显示在色谱图中(图 2)。图 2 中长链脂肪酸衍生物是由快原子轰击质谱(FABMS)进行确定的。其中长链脂肪酸衍生物是通过扩大的长链脂肪酸的衍生量进行合成,并通过薄层色谱(TLC)法分离获得。快原子轰击质谱(FABMS)是由 MS VG Quattro 5002 质谱仪获得,采用 FAB 模式(硝基苄醇作为基质),加速能量为 10kV。

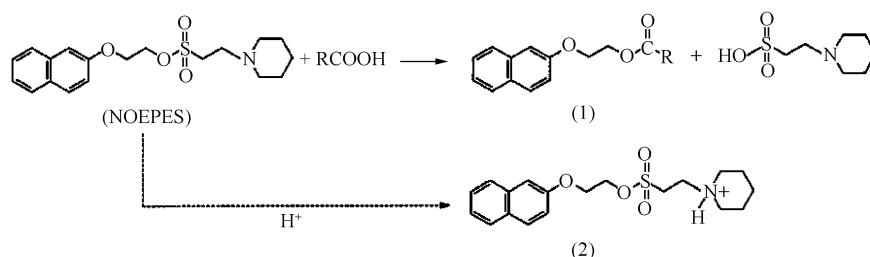


图 1 用 NOEPES 对长链脂肪酸(RCOOH)进行衍生(实线), 过量 NOEPES 通过质子化进行清除(虚线)。

质谱图显示了不饱和脂肪酸衍生物的分离子峰( $M^+$ )和准分离子峰( $MH^+$ ),同时伴有相当于丢失一个萘氧基片段的碎片峰( $M - 143$ )和( $MH - 143$ ),即,  $m/z$ 370 和 227(C12:0),  $m/z$ 398 和 255(C14:0),  $m/z$ 426 和 283(C16:0),  $m/z$ 440 和 297(C17:0),  $m/z$ 454 和 311(C18:0),  $m/z$ 425 和 281(C16:1),  $m/z$ 453 和 309(C18:1), 和  $m/z$ 451 和 307(C18:2)。这表明确实形成了相应长链脂肪酸的酯衍生物。

C12:0, C14:0, C16:1, C18:2, C16:0,

C18:1, C18:0和 C17:0的合成衍生物相对应峰的保留时间分别显示在图 2A 中。这些合成衍生物的保留时间可用于确定来自牛奶样品中长链游离脂肪酸衍生物的谱峰(图 2B)。

该研究中长链脂肪酸衍生的基本方法与血浆中脂肪酸的衍生相类似。然而,该法中长链游离脂肪酸的提取简化为用甲苯作为溶剂,同时也作为反应溶剂。相比于用正庚烷作为提取溶剂,用甲苯作为反应溶剂,本方法节省了蒸发溶剂所用的时间。此外,

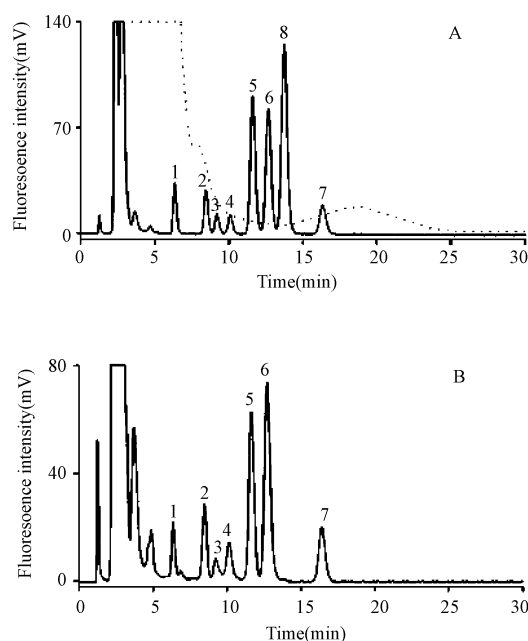


图2 (A)长链脂肪酸参照物(C16:1,C18:2 2.5  $\mu\text{M}$ ; C12:0,C14:0和 C18:0 5.0  $\mu\text{M}$ ; C16:0和 C18:1 7.5  $\mu\text{M}$ ,IS 10.0  $\mu\text{M}$ )混合样品的LC色谱图。实线所示为各种脂肪酸经NOEPES衍生,酸处理后的色谱峰,1 = C12:0;2 = C14:0;3 = C16:1;4 = C18:2;5 = C16:0;6 = C18:1;7 = C18:0和8 = C17:0(IS)。虚线表示为未经酸处理的空白试剂谱图,与长链脂肪酸的谱峰相重叠。

(B)纯奶中长链游离脂肪酸的LC分析色谱图(表1A中的样品3)。峰的编号与A相同。此牛奶样品中未加IS,表明没有其它峰与IS干扰(C17:0)。

该分析方法对长链脂肪酸的检出限(信噪比=3)可达8nM。可见这是一种简单,灵敏,快速的脂肪酸痕量分析方法。

长链脂肪酸衍生物(酯)的稳定性研究是使用1-[4-(2-苯基乙基)苄基]萘(非酯)作为第二个内标,以评估其与长链脂肪酸衍生物的峰面积比。结果发现,超过24小时未见峰面积比明显变化,表明长链脂肪酸衍生物在液相分析所需的时间内足够稳定。

#### 4 牛奶中长链游离脂肪酸的分析

在牛奶中长链游离脂肪酸的分析中,无脂肪酸的牛奶不可用作基质,因此使用一种标准加入方法进行测定。该分析方法向牛奶中添加或者不添加长链脂肪酸,其中每一种脂肪酸按四种不同浓度被添加进牛奶中,其浓度范围应与样品中脂肪酸含量尽量相符:C16:1与C18:2在1~25 $\mu\text{M}$ ;C12:0、C14

:0与C18:0在2~50 $\mu\text{M}$ ;C16:0和C18:1在8~200 $\mu\text{M}$ 。峰面积与长链游离脂肪酸的浓度进行了线性考察。结果表明,每一种脂肪酸的相关系数均高于0.999。内生性长链脂肪酸的存在使得基于已知浓度脂肪酸的精确度无法进行评估。因此,我们对纯奶和低脂奶基于线性回归方程斜率和截距的日内( $n=5$ )与日间( $n=5$ )精密性(相对标准偏差,RSDs)进行了研究。结果表明,斜率与截距的相对标准偏差都分别低于6.0%和6.4%。

该方法被用于乳制品、低脂牛奶和纯牛奶中长链脂肪酸的分析。图2B所示为纯牛奶中长链脂肪酸分析的典型色谱图(未加内标),可见牛奶中组分的谱峰不会与内标相干扰。空白试剂分析还表明内标不会干扰长链脂肪酸衍生物的分析。表1A,B所示为

表 1 液态奶中长链脂肪酸的分析

(A) 原奶							
奶样 <sup>a</sup>	长链游离脂肪酸( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>						
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2
1	92.5	105.8	280.8	150.5	27.1	461.7	75.8
2	25.3	51.3	150.2	100.5	16.6	280.3	62.4
3	63.5	115.5	236.0	148.6	30.1	380.4	84.6
4	28.3	54.2	189.6	158.5	10.6	194.6	43.1
5	51.6	103.0	215.5	124.8	37.2	360.7	73.2
6	37.8	93.0	228.5	107.0	32.1	336.1	68.7
7	40.5	69.0	245.0	119.9	31.3	256.3	67.7
mean	48.5	84.5	220.8	130.0	26.4	324.3	67.9
SD	23.4	26.1	41.8	22.8	9.4	88.4	13.0
(B) 低脂奶							
奶样 <sup>a</sup>	长链游离脂肪酸( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>						
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2
1	15.9	54.4	122.1	64.5	15.4	195.5	42.3
2	11.8	37.7	102.2	67.8	11.3	149.6	37.0
3	31.9	74.2	161.3	84.6	24.2	255.2	58.0
4	14.7	32.3	116.8	84.8	5.1	96.6	31.5
5	20.2	63.2	138.6	79.4	18.9	206.2	45.5
6	22.8	67.1	159.8	88.3	21.9	290.3	61.6
7	18.5	45.3	117.2	78.1	13.8	159.6	41.6
mean	19.4	53.5	131.1	78.2	15.8	193.3	45.4
SD	6.6	15.7	22.8	9.0	6.5	65.6	10.9

<sup>a</sup> 七种不同的液态牛奶样品均来自台湾当地食品公司; <sup>b</sup> 脂肪酸浓度( $\mu\text{M}$ )取三次平行实验的平均值。

牛奶中长链脂肪酸的分析结果。由表可见,与纯奶相比,低脂奶中游离脂肪酸的含量相对较低。表 1A 和 B 中牛奶样品 1~7 各游离脂肪酸含量的相对标准偏差均低于 6.5%。

总之,该研究通过荧光衍生与液相色谱相结合,建立了一种高灵敏的牛奶中长链游

离脂肪酸痕量分析方法。长链游离脂肪酸使用反向色谱柱等进行分离。分析过程仅需很少量(10 $\mu\text{L}$ )牛奶样品。这一方法在动物组织样品游离脂肪酸含量以及兽医学脂肪酸相关疾病研究中,尤其是样品量非常有限的情况下,如来自小动物,将非常有用。

参考文献(略)