

检测分析

微生物油脂中花生四烯酸的气相色谱定量检测

董宏祯¹, 汤培平¹, 许建中², 许晨²

(1. 厦门大学 化学化工学院 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局 第三海洋研究所 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了快速、灵敏测定微生物油脂中花生四烯酸(AA)含量的气相色谱法(GC)。采用HP-INNOWAX毛细管柱,氦火焰离子化检测器(FID),优化了分析花生四烯酸酯化产物的色谱条件。结果表明:花生四烯酸甲酯(AA-ME)在0~1.00 mg/mL范围内具有较好线性,相关系数为0.999 6,检测限为0.000 5 mg/mL,相对标准偏差(RSD)为1.49%,回收率在95.86%~105.32%;花生四烯酸乙酯(AA-EE)在0~1.23 mg/mL范围内线性良好,相关系数为0.999 9,检测限为0.003 0 mg/mL, RSD为0.60%,回收率在97.79%~103.61%。

关键词: 气相色谱法; 微生物油脂; 花生四烯酸; 定量检测

中图分类号: TS225.6; TQ646 文献标志码: A 文章编号: 1003-7969(2011)09-0078-04

Quantitative determination of arachidonic acid from microbial oil by gas chromatography

DONG Hongzhen¹, TANG Peiping¹, XU Jianzhong², XU Chen²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China;

2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: A gas chromatography (GC) method for the determination of arachidonic acid (AA) in microbial oil was developed. Capillary column HP-INNOWAX with FID was used for detection. The parameters for analyzing esterified AA were optimized and the method established was proved to be accurate and precise. The linearity range for methyl arachidonate was 0-1.00 mg/mL and the linear correlation coefficient was 0.999 6, the detection limit was 0.000 5 mg/mL, the relative standard deviation (RSD) was 1.49% and the recovery rate was 95.86%-105.32%. The linearity range for ethyl arachidonate was 0-1.23 mg/mL and the linear correlation coefficient was 0.999 9, the detection limit was 0.003 0 mg/mL, the RSD was 0.60% and the recovery rate was 97.79%-103.61%.

Key words: gas chromatography; microbial oil; arachidonic acid; quantitative determination

花生四烯酸(Arachidonic acid,简称AA)是一种人体必需的多不饱和脂肪酸,是人体合成前列腺素的重要前体物质^[1]。AA在陆地动物油脂中普遍存在,但含量不高,主要存在于深海鱼油中,微生物发酵及藻类培养生产是新兴的两种AA生产方式^[2-4]。AA具有十分重要的生理活性功能,如降血脂、预防心血管疾病、促进脑组织发育、改善视网膜

功能、抗炎和抗癌等^[5-7],在营养、保健、药物合成领域应用广泛。

目前,AA分析检测技术主要有气相色谱法(GC)^[8]、高效液相色谱法^[9]、薄层色谱法及柱层析法等^[1],不同的检测方法样品的前处理条件不同,检测精度和灵敏度不同,适用范围也各异。薄层色谱法和柱层析法因分离效率不高,一般只作为半定量分析方法;高效液相色谱法检测脂肪酸类化合物一般采用正相色谱,需要耗费大量溶剂,检测灵敏度不高。GC检测脂肪酸类化合物,具有高灵敏度、高选择性、高效能、速度快及耗费试剂少等优点,是脂肪酸类化合物定量分析的首选方法。但AA是长碳

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 厦门海洋研究开发院共建项目

作者简介: 董宏祯(1988),男,硕士研究生,主要从事天然产物化学方面的研究工作(E-mail) jimmy_1988@126.com。

通信作者: 汤培平,教授(E-mail) pp_tang@xmu.edu.cn。

链脂肪酸,沸点高,高温下不稳定,易裂解,在微生物油脂中以不同结合形式存在,分析前需要将其转化为花生四烯酸甲酯(AA-ME)或乙酯(AA-EE)进行检测。本文在现有方法^[10-11]基础上对AA分析的GC方法进行改进,建立快速测定微生物油脂中AA的检测方法,并进行方法学的考察。

1 材料与与方法

1.1 试剂、原料

甲醇、无水乙醇、浓硫酸、无水乙醚等均为分析纯;正己烷为色谱纯。

微生物油脂(AA纯度大于38%),湖北福星生物科技有限公司;AA-EE对照品(纯度99.5%)、AA-ME对照品(纯度99.5%),美国NU-CHEK公司。

1.2 仪器、设备

QP-2010型GC-MS(配备有FID检测器),日本Shimadzu公司;Al-104/01电子天平;回流装置及实验室其他常用仪器。

1.3 实验方法

1.3.1 微生物油脂酯化^[12]

称取一定量的微生物油脂,加入5~10倍量的甲醇,以浓硫酸作催化剂,在70℃水浴充氮加热回流2h进行酯化反应。反应结束后,回收部分甲醇,加入乙醚振摇后分掉水层。醚层用蒸馏水反复洗涤至中性。旋蒸除去甲醇、乙醚和水,即得AA-ME供试样品。将上述方法中的甲醇改为无水乙醇进行乙酯化反应,即得AA-EE供试样品。

1.3.2 样品溶液的配制

1.3.2.1 标准溶液的配制

准确称取AA-ME标准品0.0500g,用正己烷定容至50.0mL,即得1.00mg/mL的AA-ME正己烷标准溶液,作为储备液。分别精密移取AA-ME标准储备液1.0、2.0、3.0、4.0mL置于4支5.0mL容量瓶中,用正己烷定容至刻度,即得0.20、0.40、0.60、0.80mg/mL的AA-ME标准工作溶液。

类似上述方法,配制得到6.16mg/mL的AA-EE标准溶液作为储备液,以及质量浓度梯度为0.077、0.15、0.31、0.62、1.23mg/mL的AA-EE标准工作溶液。

1.3.2.2 供试样品溶液的配制

分别精密称取AA-ME、AA-EE供试样品50.1、51.2mg,用正己烷定容至25.0mL,即得2.00mg/mL的AA-ME和2.05mg/mL的AA-EE供试样品溶液。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:HP-INNOWAX弹性石英毛细管柱(30m×0.25mm×0.25μm);载气:99.999%的高纯氮,流速为30cm/s;氢气流速:50mL/min;空气流速:400mL/min;进样口温度:250℃;检测器温度:250℃;升温程序:240℃保持30min;进样方式:分流进样,分流比为10:1;检测器:FID;进样量:1μL。

2 结果与讨论

2.1 定性分析

通过考察GC柱温、升温速度、载气流速和分流比等对分离效果、保留时间的影响,确定选择恒定柱温240℃、载气流速30cm/s、氢气流速50mL/min、空气流速400mL/min、进样口温度250℃、检测器温度250℃、分流比10:1为GC条件,该条件下目标峰与其他组分峰达到完全分离,且保留时间适中,能满足分析检测要求,AA-ME色谱图如图1所示。

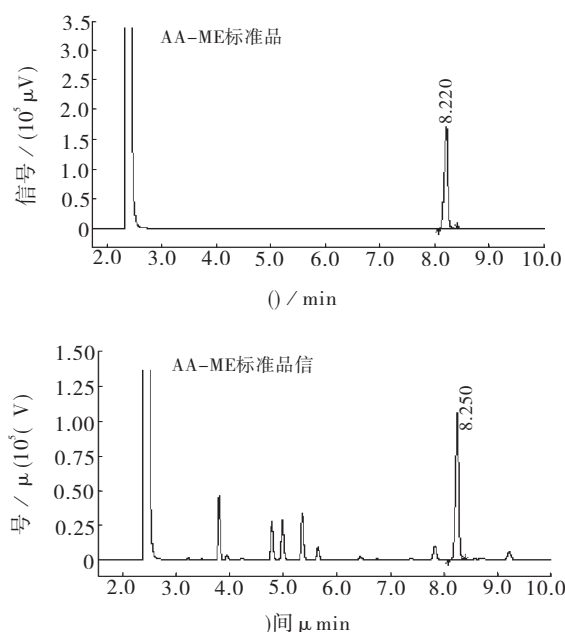


图1 AA-ME色谱图

分别吸取1μL的AA-ME、AA-EE供试样品,利用GC检测分析,同样条件下分别吸取1μL AA-ME、AA-EE标准样品进样作对照,确定供试样品中目标物质的保留时间。在本研究所采用的GC条件下,AA-ME供试样品的保留时间为8.250min(见图1),AA-EE供试样品的保留时间为8.610min。

2.2 标准曲线

准确吸取不同质量浓度的AA-ME、AA-EE标准工作溶液1μL,分别进行GC检测分析,记录各质量浓度对应的峰面积,与质量浓度进行线性拟合,实验结果如图2所示。

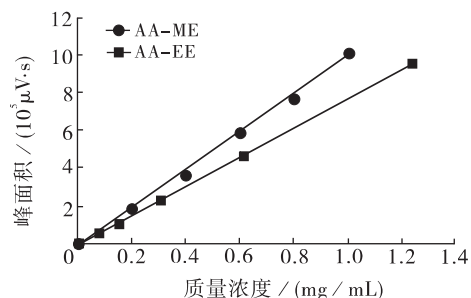


图2 AA-ME与AA-EE标准曲线

图2表明,AA-ME在0~1.00 mg/mL范围内质量浓度与峰面积有较好的线性关系,线性方程为

表1 AA-ME与AA-EE精密度实验

样品	不同测定次数的峰面积/($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)						平均峰面积 /($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	标准偏差 /($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6			
AA-ME	150 808	152 786	151 113	152 351	156 218	155 652	153 155	2 284	1.49
AA-EE	109 590	111 025	110 426	109 486	108 997	110 134	109 943	731	0.66

如表1所示,以AA-ME、AA-EE标准工作溶液连续重复进样6次,所测定的AA-ME峰面积的RSD为1.49%,AA-EE峰面积的RSD为0.66%,说明本方法精密度良好。

2.4 加标回收率测定

加标回收率的测定,是对所建立样品分析方法适用性和方法系统误差的检验,也是分析质量控制的一种重要手段。常采用下列公式计算:

加标回收率 = (加标样品测定值 - 样品测定值) / 加标量 $\times 100\%$ (1)

根据公式(1),以样品质量浓度表示的加标回收率公式为:

$$P = (\rho_2 \times V_2 - \rho_1 \times V_1) / (\rho_0 \times V_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中: P 为加标回收率; ρ_0 为加标用标准溶液质量浓度; ρ_1 为供试样品质量浓度; ρ_2 为加标后试样质量浓度; V_0 为加标体积; V_1 为试样体积; V_2 为加标后试样体积。

本实验取等体积的供试样品溶液和标准工作溶液进行加标检测,忽略溶液混合前后体积的变化量,则公式(2)可简化为

$$P = (2\rho_2 - \rho_1) / \rho_0 \times 100\% \quad (3)$$

配制3个不同质量浓度的AA-ME供试样品溶液以及浓度约为样品浓度80%、100%和120%的对应标准品溶液(实际质量浓度均由GC分析测定,如表2中 ρ_0 、 ρ_1 所示),分别准确吸取1.00 mL供试样品溶液与标准品溶液置于试管中,混合均匀,得到9个不同质量浓度的AA-ME加标试样溶液。按同样方法配制得9个不同质量浓度的AA-EE加标试样溶液。进行GC检测分析,计算

$Y = 1.06558 \times 10^6 x - 48610.3$,线性相关系数为0.9996;AA-EE在0~1.23 mg/mL范围内线性关系良好,线性方程为 $Y = 7.751374 \times 10^5 x - 7941.79$,线性相关系数为0.9999。

2.3 精密度实验

准确吸取0.20 mg/mL的AA-ME标准工作溶液和0.15 mg/mL的AA-EE标准工作溶液1 μL ,分别连续重复进样6次,记录每次的峰面积,计算峰面积的相对标准偏差(RSD)结果见表1。

加标回收率(P)、平均加标回收率(P')及RSD,如表2、表3所示。

表2 AA-ME加标回收率实验结果

ρ_0 /(mg/mL)	ρ_1 /(mg/mL)	ρ_2 /(mg/mL)	$P/\%$	P' /%	RSD /%
0.152 0	0.165 5	0.155 6	95.86		
0.180 3	0.165 5	0.172 2	99.22		
0.206 4	0.165 5	0.186 9	100.92		
0.287 0	0.349 9	0.318 1	99.76		
0.366 2	0.349 9	0.367 8	105.32	100.61	3.17
0.428 9	0.349 9	0.384 0	97.48		
0.943 4	1.125 2	1.046 4	102.57		
1.152 6	1.125 2	1.167 4	104.95		
1.390 4	1.125 2	1.254 0	99.45		

表3 AA-EE加标回收率实验结果

ρ_0 /(mg/mL)	ρ_1 /(mg/mL)	ρ_2 /(mg/mL)	$P/\%$	P' /%	RSD /%
0.071 4	0.084 0	0.077 6	99.69		
0.088 7	0.084 0	0.085 8	98.73		
0.106 0	0.084 0	0.095 3	100.57		
0.239 8	0.293 5	0.264 0	97.79		
0.296 8	0.293 5	0.300 5	103.61	99.66	1.79
0.354 1	0.293 5	0.325 2	100.79		
0.420 0	0.535 6	0.474 7	98.53		
0.521 8	0.535 6	0.524 8	98.51		
0.626 2	0.535 6	0.577 0	98.75		

由表2、表3可见,AA-ME及AA-EE的加标回收率分别在95.86%~105.32%、97.79%~103.61%之间,平均加标回收率分别为100.61%和99.66%,在允许范围90%~110%以内,RSD分别为3.17%和1.79%,表明该分析方法测定是

准确的。

2.5 检测限与定量限

以基线噪音的3倍峰高作为检测限($S/N \geq 3$),以基线噪音的10倍峰高作为定量限($S/N \geq 10$)。配制一系列低质量浓度的AA-ME、AA-EE标准样品溶液,进行GC检测分析,寻找满足条件的最低质量浓度,测得AA-ME与AA-EE的检测限分别为0.0005、0.0030 mg/mL,定量限分别为0.0050、0.0150 mg/mL。

3 结论

运用GC对微生物油脂中AA含量进行测定,确定最佳色谱条件为:HP-INNOWAX弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);FID检测器;高纯氮作载气,流速30 cm/s;氢气流速50 mL/min;空气流速400 mL/min;进样口温度250℃;检测器温度250℃;升温程序为240℃保持30 min;分流进样,分流比为10:1;进样量1 μL。该条件下AA-ME与AA-EE色谱峰均达到基线分离,峰形良好;检测限低,精密度好,灵敏度高;加标回收率分别在95.86%~105.32%和97.79%~103.61%之间。本研究为微生物油脂中AA含量的测定建立了一种快速可靠的分析方法。

参考文献:

- [1] 毕艳兰,郭诤,杨天奎.油脂化学[M].北京:化学工业出版社,2009.
[2] WARD O P, SINGH A. Omega-3/6 fatty acids: alternative

sources of production [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3627-3652.

- [3] ROBLES MEDINA A, MOLINA GRIMA E, GIMÉNEZ GIMÉNEZ A, et al. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids [J]. Biotechnology Advances, 1998, 16(3): 517-580.
[4] 王啸,邱树毅.微生物发酵生产花生四烯酸的研究进展[J].中国油脂,2004,29(9):37-40.
[5] 袁成凌,余增亮,汪志明,等.新型营养强化剂——花生四烯酸[J].中国食品添加剂,2001(4):27-30.
[6] 施东魁,胡春梅.花生四烯酸的主要作用及提取方法[J].中国中药杂志,2007,32(11):1009-1011.
[7] 袁成凌,姚建铭,余增亮.花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J].中国药物化学杂志,2000,10(1):75-78.
[8] 吕晴,余德顺,雷邦星.被孢霉菌丝体脂肪酸组成的气相色谱-质谱分析[J].分析测试学报,2003,22(2):22-24.
[9] 赵先恩,索有瑞,王凌云,等.深海鱼油中脂肪酸的柱前衍生-高效液相色谱串联质谱分析[J].食品科学,2007,28(8):358-362.
[10] GB/T 17377-2008 动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析[S].
[11] SN/T 1945-2007 食品中反式脂肪酸含量的测定方法 毛细管气相色谱法[S].
[12] 李京民,王静萍.植物油中脂肪酸的分离与鉴定方法[J].中国油脂,1994,19(2):32-37.

· 广告 ·

郑州欧润生物技术有限公司

郑州欧润生物技术有限公司专业致力于油脂工艺方面的研究与开发,在油脂的分提与脱蜡方面具有较深入的研究。我公司开发的油脂乳化剂可以应用于油脂的分提和脱蜡,具有结晶快、容易过滤和得率高等特点,同时提高低熔点油脂的抗冻性。

公司最新推出棉籽油分提技术,使分提后的棉籽油可以达到一级油的质量标准。公司研制的抗氧化护色剂,对油脂的颜色具有很好的保护作用,可以防止油脂的回色现象。公司经销进口TBHQ(camlin)抗氧化剂,具有用量少抗氧化效果好等特点。

我公司愿与客户合作技术开发,共同克服油脂工艺难点。

地址:郑州市经济技术开发区经北一路与第五大街交叉口工业园四楼 邮编:450008

电话:0371-55620562 传真:0371-55620562

联系人:孙东弦:13838268525 sundongxuan@163.com

徐辉:13403718321 xuhui119@tom.com