

定量核磁共振碳谱同时测定食用油中甘油三酯的 *sn*-1,3 和 *sn*-2 脂肪酸含量

肖坤 龚灿 郭强胜 许旭*

(上海应用技术大学 化学与环境工程学院, 上海 201418)

摘要 建立了定量核磁共振碳谱(¹³C-qNMR)技术测定食用油中特定位置不饱和脂肪酸含量的方法。使用反转门控去耦技术对食用油中的脂肪酸进行位置特异性分析,针对未完全分离的谱峰,比较了直接普通积分、使用不同的洛伦兹/高斯函数比值去卷积积分等数据处理方式对核磁共振碳谱定量结果的影响,选择以洛伦兹-高斯(3:2)的比例,对谱图进行去卷积拟合,提取 *sn*-1,3 和 *sn*-2 位亚油酸和油酸两种不饱和脂肪酸的定量峰,测定 3 种食用油中甘油三酯的饱和脂肪酸、*sn*-1,3 位亚油酸、*sn*-2 位亚油酸、*sn*-1,3 位油酸、*sn*-2 位油酸含量分别为:大豆油(16.2%、27.8%、24.0%、15.5%、7.9% (w/w,下同));玉米油(15.3%、30.7%、20.5%、20.1%、13.3%);花生油(18.3%、18.7%、12.5%、24.9%、25.5%)。大豆油中 *sn*-1,3 位亚麻酸、*sn*-2 位亚麻酸分别为 4.5% 和 4.0%,玉米油和花生油中未检出亚麻酸。上述结果与¹H-qNMR测定的各脂肪酸总量一致。¹³C-qNMR可对食用油中脂肪酸进行位置特异性分析,无需复杂的样品前处理过程,可区分不饱和脂肪酸的不同位置分布,为在缺乏甘油三酯标样的情况下测量食用油中特定甘油三酯位置异构体成分含量提供了新方法。

关键词 定量核磁共振波谱法;核磁共振碳谱;食用油;脂肪酸;位置异构体

1 引言

食用油是人体所需脂肪和能量的重要来源^[1],也是体内必需脂肪酸的主要来源。目前,市场上常见的食用油多为植物油,如大豆油、玉米油、花生油和橄榄油等。甘油三酯(TAGs)是食用油的主要成分,因其甘油骨架上结合的脂肪酸不同而种类繁多^[2],其中的亚麻酸、油酸、亚油酸以及棕榈酸等饱和脂肪酸的摄入量与多种慢性疾病有关^[3~6]。食用油中脂肪酸的主要分析方法有气相色谱法(GC)^[7~11]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[12~14]等。这些方法需要复杂的样品前处理过程,即将甘油三酯转酯化为沸点较低的脂肪酸甲酯再分析^[15]。Barison 等^[16]提出了一种简便的核磁共振氢谱(¹H-NMR)方法,测定食用油中脂肪酸的相对含量,快速简便,且无需复杂的样品前处理过程,测定的脂肪酸结果与 AOAC 的气相色谱法一致。

脂肪酸在甘油骨架中还存在位置特异性,可根据 *sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 (*sn*: stereospecific numbering) 编号区别各脂肪酸在甘油骨架的位置^[7],其结构如图 1 所示。脂肪酸的位置对油脂的物理性质、生物化学性质和营养价值都有重要影响^[17]。位于 *sn*-2 位的脂肪酸通过肠壁以甘油单酯的形式被吸收^[18],可能对动脉粥样硬化、血脂和脂蛋白原形成不同的急性或慢性作用,并增加患心血管疾病的风险^[19~21];而位于 *sn*-1,3 位的脂肪酸则作为游离的脂肪酸被人体吸收。研究表明^[22,23],棕榈酸在甘油骨架的 *sn*-2 位具有促进婴幼儿对矿物质吸收的作用;而 *sn*-1,3 位的棕榈酸则很容易被肠道内脂肪酶水解成游离棕榈酸,与钙、镁等矿物质发生皂化反应,降低人体对脂肪的吸收利用效率。因此,对甘油三酯中的脂肪酸进行区域特异性分析非常重要。

脂肪酸在甘油骨架上的位置分析通常通过酶水解、格氏化学降解和色谱分析的组合确定^[26]。常规的酶和化学方法存在长链多不饱和脂肪酸对某些脂肪酶催化分析的抗性^[27]、通过格式化学降解可能引起的酰基迁移^[28]、样品制备期间的损失或污染等缺点^[29]。脂肪酸的核磁共振分析通常使用

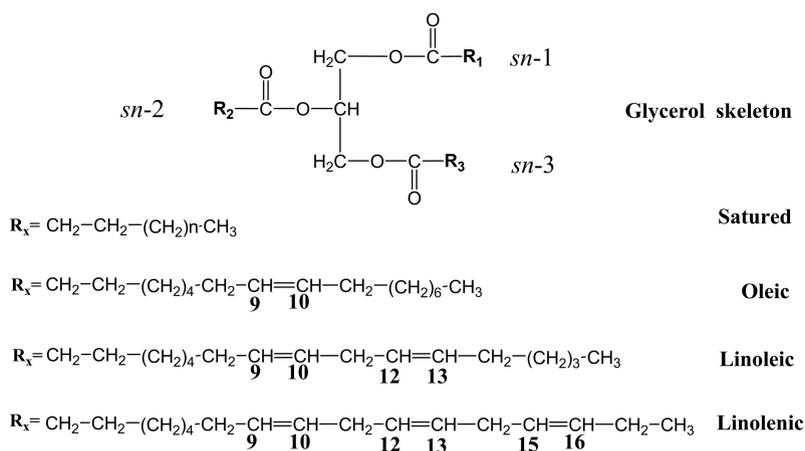


图1 甘油骨架及脂肪酸的基本结构

Fig. 1 Basic structure of glycerol backbone and fatty acids

$^1\text{H-NMR}$, 但 $^1\text{H-NMR}$ 不能对脂肪酸进行位置特异性分析。 $^{13}\text{C-NMR}$ 的化学位移范围 (约 200 ppm) 较大, 可以识别几乎所有饱和和不饱和脂肪酸, 而且可以通过特征化学位移区分不饱和脂肪酸的位置特异性, 还可以避免甘油三酯的酶促和格氏水解中无法完全消除酰基迁移所引起的样品损失或污染等问题。因此, 定量核磁共振碳谱 ($^{13}\text{C-qNMR}$) 在分析食用油中不同位置脂肪酸时具有明显优势。

目前, $^{13}\text{C-qNMR}$ 已被用于天然产物^[30] 和代谢物^[31] 的定量分析、材料科学^[32] 和脂质分析^[33] 等领域。甘油三酯骨架上的羰基碳是 $^{13}\text{C-qNMR}$ 的主要研究对象。然而, 羰基碳自旋-晶格弛豫时间 (T_1) 比其它类型的碳更长, 而且脉冲角度、脉冲序列以及温度等实验参数对区域特异性分析影响较大, 导致每次 NMR 实验时间较长^[34]。这对于在较短的实验时间内实现最佳信噪比 (S/N), 进而进行准确的区域特异性分析提出了挑战。为缩短实验时间, Vlahov 等^[35] 假设所有羰基碳受质子去耦的影响相同, 在完全核 Overhauser 增强 (NOE) 下可获得信噪比较高的谱图。Suárez 等^[36] 将宽带去耦脉冲序列应用于 qNMR 碳谱分析。然而, Gouk 等^[34] 的研究表明, 在 *sn*-1,3 和 *sn*-2 处的羰基碳的 NOE 可能不同, 因此, 宽带去耦脉冲序列并不能用于 qNMR 碳谱分析中。除了羰基碳, 甘油三酯的 *sn*-1,3 和 *sn*-2 位的其它碳原子也具有不同的化学位移, 如乙烯基碳。Meusel 等^[37] 将 GC、MALDI-TOF-MS 和 DEPT-45 结合, 通过分析乙烯基碳确定食用油中甘油三酯的含量。Merchak 等^[38] 使用 $^{13}\text{C-INEPT}$ 序列 (极化转移技术) 和气相色谱 (GC) 分析橄榄油样品中脂肪酸和角鲨烯, 同时用 $^{13}\text{C-INEPT}$ 光谱的去卷积峰面积作为预测因子构建多变量预测模型。相对复杂的 HSQC-TOCSY NMR 谱也已被用于分析甘油三酯混合物中棕榈酸和油酸的位置特异性分布^[39]。通常, $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中的峰强度与碳核的数目不成正比, 原因是每个碳原子的自旋-晶格弛豫时间不同, 以及核的 Overhauser 增强 (NOE) 效应不同。然而, 采用加顺磁弛豫试剂和加大脉冲间隔, 特别是可以采用反转门控去耦消除 NOE 效应, 同时消除全部质子的耦合, 可以达到 ^{13}C 核定量分析的目的^[40]。脉冲傅里叶变换 NMR 的门控去耦 (Gated decoupling) 取 ^{13}C 的脉冲时间间隔 $t_R > 5T_1$ (T_1 为该化合物各碳原子中的最长纵向弛豫时间), 这样可使磁化矢量恢复到平衡值, 全去耦的碳谱 NOE 影响很小, 谱线高度正比于碳原子数目, 可用于定量分析。

本研究根据文献^[16] 的方法, 以苯甲酸为内标, 用 $^1\text{H-qNMR}$ 同时测定了大豆油中亚麻酸、亚油酸、油酸和饱和脂肪酸的绝对含量, 进行了方法学验证。在此基础上, 采用 $^{13}\text{C-NMR}$ 反转门控去耦技术对食用油中的脂肪酸进行位置特异性分析, 应用去卷积法提取 *sn*-1,3 和 *sn*-2 位上油酸和亚油酸的峰面积, 选择苯甲酸作为内标计算各位置不同脂肪酸的含量。本方法简便且无需复杂的样品前处理过程, 可在没有甘油三酯标准样品的情况下, 对食用油中甘油三酯的位置特异性脂肪酸进行绝对含量的分析测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Bruker AVANCE III 500MHz 核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司); VGT-2120QT 超声波清洗机 (广东

固特超声实业有限公司); DC-12 氮吹仪(上海安谱科学仪器有限公司)。

苯甲酸(基准物质,99.95%~100.05%,国药集团化学试剂有限公司);氘代氯仿(99.8% D + 0.03% TMS, Cambridge Isotope Lab 公司);油酸(Oleic Acid, >99.0%)和亚油酸(Linoleic acid, >99.0%,日本 Tokyo Chemical Industry 公司);亚麻酸(Linolenic Acid, >99.0%,美国 Acros Organics 公司);三油酸甘油酯(OOO)、三亚油酸甘油酯(LLI)(上海阿拉丁试剂有限公司);1,2-二油酸-3-亚麻酸甘油三酯(OOLn)、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(OPO)(瑞典 Larodan 精细化学品有限公司)。所有甘油三酯均冷冻保存。

大豆油(Soybean oil)、玉米油(Corn oil)和花生油(Peanut oil)购于本地超市。

2.2 样品的制备

称取约 200 mg 样品,溶于 0.5 mL CDCl_3 ,氮气吹扫 2 min 后,加入准确称取的苯甲酸内标,并超声 2 min,去除样品中顺磁性溶解氧对实验的影响,然后转移至 5 mm 的核磁管中待用。所有油样均用 60°C 水浴加热 10 min,确保其均匀性。

2.3 定量核磁共振碳谱

^{13}C -qNMR 采集条件:反转门控去耦脉冲序列 zgig30,其脉冲时序图和相循环如图 2 所示。扫描次数 NS=256,空扫次数 DS=4,延迟时间 $D1=35\text{ s}$,谱宽 SW=285 ppm, $O1P=110\text{ ppm}$, $O2P=4.5\text{ ppm}$, SI=256 K,测定 NMR 图谱。积分前先调平 NMR 基线,选择对应的峰的积分区间,每个峰积分 3~5 次,相对标准偏差(RSD)<1%时取平均值。在对谱图进行处理之前,先进行相位校正和基线调平。最后,根据中国药典的绝对定量公式计算待测组分的含量(W_s)^[41]:

$$W_s = W_r \times (A_s/A_r) \times (E_s/E_r)$$

其中 W_r 为称取得苯甲酸(内标)的质量, A_s 和 A_r 分别为供试品和苯甲酸内标峰($\delta\ 129.43\text{ ppm}$)的峰面积, E_s 和 E_r 分别为供试品和苯甲酸内标的当量重量(分子量/该共振峰处的碳核数目)。

2.4 ^1H -qNMR 谱中脂肪酸的分析

^1H -qNMR 采集条件:脉冲序列 zg30。选择脉冲宽度 $P1=14.10\ \mu\text{s}$,延迟时间 $D1=6\text{ s}$,扫描次数 NS=32,测定 NMR 图谱。参考文献[16]中脂肪酸的计算方法,并加入内标苯甲酸,对大豆油中脂肪酸的含量进行测定。

3 结果与讨论

3.1 脂肪酸的 ^1H -NMR 分析

3.1.1 实验参数的影响 分别考察了不同延迟时间 D1 和扫描次数 NS 对 ^1H -NMR 谱积分面积的影响。当 $D1 \geq 5\text{ s}$, $NS \geq 16$ 时,信噪比(S/N)可以达到 150 以上,且 A_r 与 A_s 趋于稳定。故选择参数 $P1=14.10\ \mu\text{s}$, $D1=6\text{ s}$, $NS=32$ 。

3.1.2 方法学考察结果 亚麻酸、亚油酸、油酸 3 种脂肪酸线性相关系数(R)为 0.9990~0.9997,日内精密性(RSD)为 0.2%~0.7%,日间精密性(RSD)为 0.8%~2.0%。根据中国药典的标准曲线剩余标准偏差和英国药典对 qNMR 要求($S/N \geq 150:1$),估计 3 种脂肪酸的检出限在 1.4~5.5 g/L 之间,定量限为 4.8~17.2 g/L。在测定后的样品中加入 3 种脂肪酸(加标量均约为样品中含量的两倍),测得加样回收率为 96.8%~102.9%。

3.1.3 样品中主要脂肪酸的测定 分别平行称取 200 mg 左右大豆油样品,用 2.4 节的方法的测定其中主要不饱和脂肪酸的含量($n=3$)为:亚麻酸 $9.1\% \pm 0.6\%$ 、亚油酸 $51.5\% \pm 1.7\%$ 、油酸 $23.2\% \pm 1.5\%$ 、饱和脂肪酸 $16.2\% \pm 1.2\%$ (w/w)。

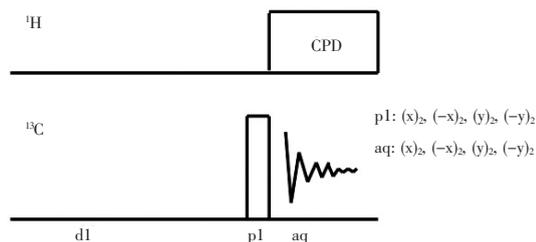


图 2 反转门控去耦脉冲时序图和相循环

Fig. 2 Pulse sequence and phase cycling of inverse gated decoupling

3.2 脂肪酸的¹³C-qNMR分析

3.2.1 食用油中位置脂肪酸的¹³C-NMR峰归属 采用2.3节的方法,测定几种甘油三酯试剂纯品的¹³C-NMR谱图,具体归属见图3。

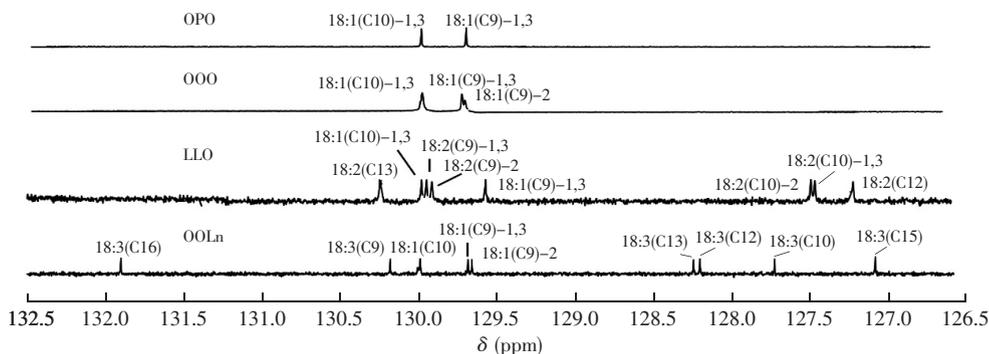


图3 甘油三酯纯品乙烯基的¹³C-NMR谱图

Fig. 3 ¹³C-Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of vinyl in triglyceride sample

OOO: Glycerol trioleate; OPO: Glycerol 1,3-dioleate-2-palmitate; LLO: Glycerol 1,2-dilinoate-3-oleate; OOLn: Glycerol 1,2-dioleate-3-linolenate.

对比图1中的甘油骨架和脂肪酸的基本结构,对比甘油三酯纯品的¹³C-NMR谱图,并参考文献[38],确定食用油中不同位置脂肪酸的¹³C-NMR化学位移如图4和图5所示。具体归属结果见表1。

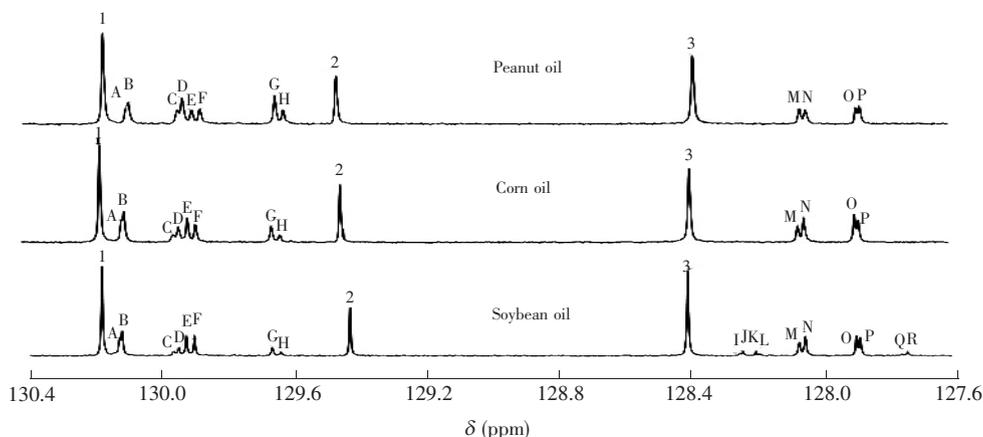


图4 食用油样品中脂肪酸链乙烯基的¹³C-NMR谱. 峰A-R的归属见表1

Fig. 4 ¹³C-NMR spectra of fatty acid chain vinyl in edible oil sample. Assignments of peak A to R are in Table 1

3.2.2 ¹³C核弛豫时间(T_1)的测定 通过反转恢复脉冲序列测量了用于获得定量¹³C-NMR谱图的弛豫时间。选择脉冲序列: t1irpg, T1 delay 设置为: 0.05、0.5、1、3、6、10、16、24 和 50 s。测得 *sn*-1,3 位亚油酸(L)的 T_1 最大值为 6.75 s。考虑脉冲延迟时间 D_1 、弛豫时间 T_1 与磁化矢量恢复关系。当 D_1 为 5 倍 T_1 时,磁化矢量恢复率大于 99.9%。最终选择 D_1 为 35 s。

对于反转门控去偶技术,为了使去偶照射建立起来的 NOE 效应不影响下一次测定,必须增加两次 NMR 信号采样之间的延迟时间,但增加延迟时间会延长分析时间。通常在实验测定核弛豫时间(T_1)的基础上,选择 5 倍 T_1 或稍长的时间作为延迟时间。

3.2.3 ¹³C-NMR谱定量峰的选择 根据图4中乙烯基碳的归属,在实际油样中选择 $\delta = 129.683$ ppm (即图4中的G)和 $\delta = 129.657$ ppm (即图4中的H)分别作为 *sn*-1,3位油酸和 *sn*-2位油酸的定量峰; $\delta = 130.145$ ppm (即图4中的A)和 $\delta = 130.139$ ppm (即图4中的B)分别作为 *sn*-2位亚油酸和 *sn*-1,3位亚油酸的定量峰;除了大豆油中可以观察到亚麻酸 *sn*-1,3和 *sn*-2的位置特征峰,在其它3种食用油几乎观察不到亚麻酸的特征峰,因此,只对大豆油油中亚麻酸进行定量分析, $\delta = 127.775$ ppm (即图4中的Q)

和 $\delta=127.758$ ppm(即图 4 中的 R)分别作为 *sn*-2 位亚麻酸和*sn*-1,3位亚麻酸的定量峰。

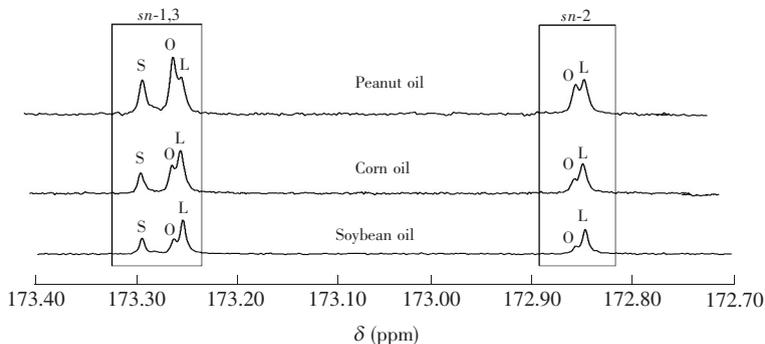


图 5 食用油样品中脂肪酸链羰基的¹³C-NMR谱

Fig. 5 ¹³C-NMR spectra of fatty acid chain carbonyls in edible oil sample

S: saturated fatty acid; O: Oleic oil; L: Linoleic oil

表 1 食用油 NMR 碳谱中峰的归属

Table 1 Assignment of peak in edible oil ¹³C-NMR spectrum

编号 No.	碳位置 Position of carbon	化学位移 Chemical shift (δ)	编号 No.	碳位置 Position of carbon	化学位移 Chemical shift (δ)
A	18:2(C13)-2	130.145	J	18:3(C13)-1,3	128.257
B	18:2(C13)-1,3	130.139	K	18:3(C12)-1,3	128.218
C	18:1(C10)-2	129.981	L	18:3(C12)-2	128.206
D	18:1(C10)-1,3	129.967	M	18:2(C10)-2	128.086
E	18:2(C9)-1,3	129.944	N	18:2(C10)-1,3	128.067
F	18:2(C9)-2	129.918	O	18:2(C12)-1,3	127.913
G	18:1(C9)-1,3	129.683	P	18:2(C12)-2	127.901
H	18:1(C9)-2	129.657	Q	18:3(C10)-2	127.775
I	18:3(C13)-2	128.266	R	18:3(C10)-1,3	127.758

根据图 5 中对羰基碳的归属,选择实际油样中 $\delta=173.262$ ppm(图 5 *sn*-1,3 的 O)和 $\delta=172.887$ ppm(即图 5 中 *sn*-2 的 O)分别作为*sn*-1,3位油酸和 *sn*-2 位油酸的定量峰; $\delta=173.253$ ppm(即图 5 中 *sn*-1,3 的 L)和 $\delta=172.947$ ppm(即图 5 中 *sn*-2 的 L)分别作为 *sn*-1,3 位亚油酸和 *sn*-2 位亚油酸的定量峰;对于饱和脂肪酸,选择 $\delta=173.298$ ppm(即图 5 中 *sn*-1,3 的 P)作为其定量峰,在 *sn*-2 位置几乎检测不到饱和脂肪酸,因此,只对*sn*-1,3位的饱和脂肪酸进行定量分析。

3.2.4 ¹³C-NMR谱的数据处理方式 当谱图中有峰重叠或受噪声影响过大时,可以使用去卷积方法算出各峰的峰面积。NMR 峰的理论形状是由洛伦兹(Lorenz, L)方程给出的^[42]。然而,由于场的不均匀性和加权函数可以产生部分高斯(Gauss, G)线形状。洛伦兹线性适用于底部较宽,顶部较尖的峰形,而高斯线性适用于底部较窄、顶部较缓的峰形。从图 6 可见,6B 和 6C 是两个互补的形状,在某种程度上,大多数对称的峰可用洛伦兹和高斯线性以适当的比例近似代替。

本研究选择直接普通积分和去卷积积分两种积分方式对得到的碳谱谱图进行对比考察分析,其中,去卷积积分选择纯高斯、纯洛伦兹以及洛伦兹和高斯线性不同比例(1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 3:1)进行拟合。其中“普通积分”为选择两个波谷之间的部分进行直接中切法(Midcut method)积分处理。

由图 6A(图 3 中的 A 和 B 两峰)可见,使用直接普通积分时,两个相邻峰的谱图重叠以及基线都会对峰面积造成影响,无法准确获取该化学位移处峰的面积信息,引起最终的结果的偏差。

去卷积积分,对需要去卷积的部分进行去卷积拟合,将得到的谱图用 Bruker Topspin 软件,Analysis 菜单里的 Line Ship Fitting→Lorenz/Gauss Deconvolution[dcon]功能处理,得到相应的峰面积。本研究选用 7 种去卷积拟合方式进行处理:纯洛伦兹(b)、纯高斯(c)、洛伦兹:高斯=1:4(d)、2:3(e)、1:1(f)、3:2(g)、3:1(h),分析比较了去卷积结果,详见电子版文后支持信息表 S1(乙烯基区域)和表 S2

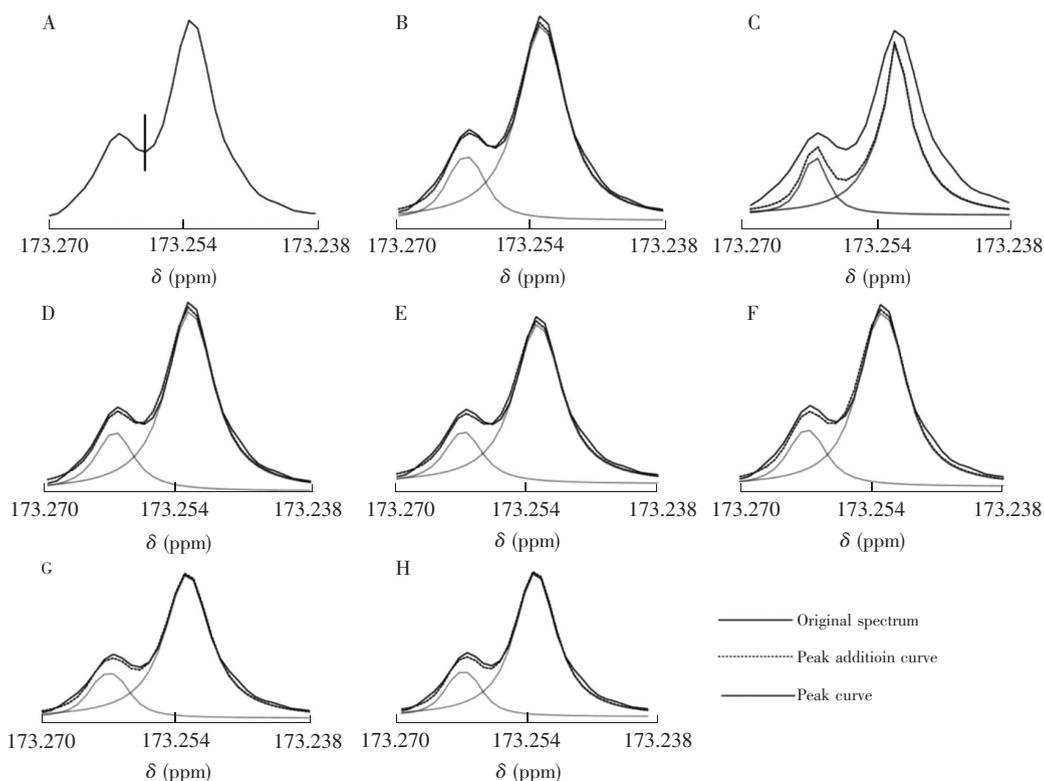


图6 数据处理方式的对比: (A) 普通积分; (B) 纯洛伦兹去卷积; (C) 纯高斯去卷积; (D) 洛伦兹:高斯=1:4; (E) 洛伦兹:高斯=2:3; (F) 洛伦兹:高斯=1:1; (G) 洛伦兹:高斯=3:2; (H) 洛伦兹:高斯=3:1

Fig. 6 Comparison of data processing methods: (A) ordinary integral; (B) deconvolution of pure Lorentz; (C) deconvolution of pure Gauss; (D) Lorentz : Gauss = 1:4; (E) Lorentz : Gauss = 2:3; (F) Lorentz : Gauss = 1:1; (G) Lorentz : Gauss = 3:2; (H) Lorentz : Gauss = 3:1

(羰基区域)。当对谱图直接进行积分(中切法)时,得到的结果偏差较大。用纯洛伦兹或纯高斯进行去卷积拟合时,计算出的结果区别较大,两种峰去卷积拟合残差较大,与氢谱测定的脂肪酸总量仍有较大的差别。采用洛伦兹和高斯以一定比例进行去卷积拟合时发现,当洛伦兹:高斯=3:2时,拟合程度与原来的峰形最相似,且与氢谱测定的脂肪酸总量结果接近。选择洛伦兹:高斯=3:2进行去卷积拟合提取。

对羰基区域的谱图进行同样处理,区域拟合的结果与氢谱计算得到的脂肪酸含量结果(饱和脂肪酸(16.2%±1.2%,亚油酸51.5%±1.7%,油酸23.2%±1.5%))接近。从表3可知,该区域拟合的结果同表2的结果接近。

表2 食用油中各位置脂肪酸的检出限

Table 2 Limit of detection (LOD) of fatty acids at various positions in edible oil

	<i>sn</i> -2 亚油酸 <i>sn</i> -2 Linoleic acid	<i>sn</i> -1,3亚油酸 <i>sn</i> -1,3 Linoleic acid	<i>sn</i> -1,3油酸 <i>sn</i> -1,3 Oleic acid	<i>sn</i> -2 油酸 <i>sn</i> -2 Oleic acid	<i>sn</i> -2 亚麻酸 <i>sn</i> -2 Linolenic acid	<i>sn</i> -1,3亚麻酸 <i>sn</i> -1,3 Linolenic acid	饱和脂肪酸 Saturated fatty acid
LOD (mg/g)	0.94	0.88	0.87	0.71	0.052	0.082	0.54

考察了在洛伦兹:高斯=60:40(40% L)附近其它的比例。对于乙烯基区域,当洛伦兹:高斯=62:38(38% L)时,碳谱结果与氢谱最接近,对于羰基区域,洛伦兹:高斯=58:42(42% L)时,碳谱结果与氢谱最接近,考虑到整个图谱的处理方法尽量一致,且在40% L附近不同比例的差异不大。选择以洛伦兹:高斯=60:40(40% L)的比例,同时用于去卷积计算乙烯基区域和羰基区域的峰面积。

大多数 NMR 峰可用洛伦兹和高斯以适当的比例近似。本研究选用洛伦兹:高斯=3:2进行去卷积拟合,对于不同的谱仪、仪器状态、样品,两者之间的比例可能也有差别,故在对谱图进行去卷积拟合

时,建议通过考察实验数据选择合适的比例。

3.2.5 检出限(LOD) 根据中国药典四部^[35]通则(2015版)规定,基于能显示基线噪声的分析方法,可以以信噪比为3或2时的相应浓度确定检出限(LOD)。本研究以普通光谱分析信噪比 $S/N > 3$ 确定检出限,选择本研究中采用的定量峰,根据其信噪比计算检出限,结果见表2。

对于 $qNMR$,英国药典^[103]要求根据 $S/N \geq 150$ 确定定量限。对于碳谱,达到此信噪比的要求较难。中国药典四部^[35]通则(2015版)中“9101药品质量标准分析方法验证指导原则”以 $S/N = 10$ 时对应浓度为方法的定量限(LOQ)。上述研究结果可满足中国药典的信噪比要求。但较低的信噪比会使精密度差一些。需要进一步研究提高 ^{13}C - $qNMR$ 信噪比和精密度的方法。本研究暂未对定量限做明确评价。

3.3 实际样品分析

称适量大豆油、玉米油和花生油样品和内标苯甲酸,按2.2节的方法配制成待测样品,用2.3节的方法测定。分析结果见表3,与3.1.3节中大豆油中脂肪酸的测定结果基本一致,说明 NMR 碳谱以内标法测定不同位置脂肪酸的结果可靠。

大豆油中亚油酸含量最多,且 $sn-1,3$ 位亚油酸与 $sn-2$ 位的亚油酸含量都高,其次是油酸,而亚麻酸含量较少,且这几种脂肪酸多位于 $sn-1,3$ 位,饱和脂肪酸只在 $sn-1,3$ 位。玉米油中亚油酸含量较高,且 $sn-1,3$ 位较 $sn-2$ 位含量多,花生油中油酸最多。由食用油的 1H - $qNMR$ 分析结果可知,玉米油和花生油中含有的亚麻酸较少,在碳谱中难以观察到其特征峰,也难以测定其含量。而大豆油中的亚麻酸含量比较多,可采用 ^{13}C - $qNMR$ 测定其含量。同时,在这几种食用油中,不饱和脂肪酸在 $sn-1,3$ 位和 $sn-2$ 位都有分布,并且含量相差不大,而饱和脂肪酸则都位于 $sn-1,3$ 位,未检测到有 $sn-2$ 位的饱和脂肪酸。

表3 食用油中脂肪酸的含量

Table 3 Quantitative determination results of fatty acids in edible oil (% , w/w , $n=3$)

样品 Sample		大豆油 Soybean oil	玉米油 Corn oil	花生油 Peanut oil
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid	$sn-1,3$	16.2±1.5	15.3±1.4	18.3±1.5
	$sn-2$	-	-	-
总和 Total		16.2±1.5	15.3±1.4	18.3±1.5
亚油酸含量 Content of linoleic acid	$sn-1,3$	27.8±1.7	30.7±1.5	18.7±1.4
	$sn-2$	24.0±1.6	20.5±1.2	12.5±1.7
总和 Total		51.8±1.7	51.3±1.3	31.2±1.5
油酸含量 Content of oleic acid	$sn-1,3$	15.5±1.3	20.1±1.2	24.9±1.8
	$sn-2$	7.9±1.7	13.3±1.6	25.5±1.3
总和 Total		23.4±1.5	33.4±1.4	50.5±1.5
亚麻酸含量 Content of linolenic acid	$sn-1,3$	4.5±1.0	-	-
	$sn-2$	4.0±0.9	-	-
总和 Total		8.6±0.9	-	-

注:表中数值为平均值±SD; Note: The values in the table are mean ± standard deviation

致谢:感谢华东师范大学磁共振重点实验室余亦华的帮助。

References

- FANG Hong-Yun, HE Yu-Na, YU Dong-Mei, GUO Qi-Ya, WANG Xun, XU Xiao-Li, ZHAO Li-Yun. *Food and Nutrition in China*, **2017**, 23(2): 56-58
房红芸, 何宇纳, 于冬梅, 郭齐雅, 王寻, 许晓丽, 赵丽云. *中国食物与营养*, **2017**, 23(2): 56-58
- ZHANG Yao-Li, PEI Xing-Li, GONG Can, HAN Yu-Liang, NI Tian-Qiang, WANG Fan, WANG Sheng-Jun, LU Hai-Peng, XU Xu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(2): 183-190
张耀利, 裴兴丽, 龚灿, 韩玉良, 倪天强, 王帆, 王盛君, 卢海鹏, 许旭. *分析化学*, **2017**, 45(2): 183-190
- Helgadottir A, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Hjartarson E, Sigurdsson E, Magnusdottir A, Jonasdottir A, Kristjansson H, Sulem P, Oddsson A, Sveinbjornsson G, Steinthorsdottir V, Rafnar T, Masson G, Jonsdottir I, Olafsson I, Eyjolfsson G I, Sigurdardottir O, Daneshpour M S, Khalili D, Azizi F, Swinkels D W, Kiemeny L, Quyyumi A A, Levey A I, Patel R S, Hayek S S, Gudmundsdottir I J, Thorgerirsson G, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson D F, Holm H, Stefansson K. *Nat.*

- Genetics*, **2016**, 48(6): 634–639
- 4 Risérus U, Willett W C, Hu F B. *Prog. Lipid Res.*, **2009**, 48(1): 44–51
- 5 Houston D K, Ding J, Lee J S, Garcia M, Kanaya A M, Tylavsky F A, Newman A B, Visser N, Kritchevsky S B. *Nutrit. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2011**, 21(6): 430–437
- 6 LI Jing, WANG Yong, YANG Yao-Dong, LEI Xin-Tao, XIAO Yong. *Journal of Southern Agriculture*, **2016**, 47(12): 2124–2128
李静, 王永, 杨耀东, 雷新涛, 肖勇. 南方农业学报, **2016**, 47(12): 2124–2128
- 7 ZHU Tao-Hua, FAN Lu, QIAN Xiang-Ming, WANG Yan, JING Yin-Cheng. *China Oils And Fats*, **2011**, 36(5): 59–63
朱桃花, 范璐, 钱向明, 王艳, 井银成. 中国油脂, **2011**, 36(5): 59–63
- 8 LI Bin, QIU Li-Qun, SONG Shao-Fang, GAO Ai-Ying, ZHANG Hao. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, **2014**, 33(5): 528–532
李斌, 裘立群, 宋少芳, 高艾英, 张昊. 分析实验室, **2014**, 33(5): 528–532
- 9 FAN Sheng-Xu, Li Bin, SUN Jun-Ming, HAN Fen-Xia, YAN Shu-Rong, WANG Lan, WANG Lian-Zheng. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, **2015**, 37(4): 548–553
范胜栩, 李斌, 孙君明, 韩粉霞, 闫淑荣, 王岚, 王连铮. 中国油料作物学报, **2015**, 37(4): 548–553
- 10 FAN Jun-Ming, JIA Jun, CHEN Yan. *Hubei Agricultural Sciences*, **2017**, 56(4): 727–730
凡军民, 贾君, 陈燕. 湖北农业科学, **2017**, 56(4): 727–730
- 11 Haddad I, Mozzon M, Strabbioli R, Frega N G. *Dairy Sci. Technol.*, **2012**, 92(1): 37–56
- 12 LOU Ting-Ting, ZHAO Ting, WANG Wei, LIN An-Qing, ZHAO Jing-Yuan. *Food Research and Development*, **2014**, 35(21): 100–102
娄婷婷, 赵婷, 王伟, 林安清, 赵璟源. 食品研究与开发, **2014**, 35(21): 100–102
- 13 LI Sha, WANG Wei-Xiang. *Cereals & Oils*, **2015**, 28(9): 65–67
李莎, 王维香. 粮食与油脂, **2015**, 28(9): 65–67
- 14 LIAO Li-Ping, XIAO Ai-Ping, LENG Juan, YANG Xi-Ai, LIU Liang-Liang, MEI Shi-Yong. *China Oils and Fats*, **2017**, 42(4): 136–139
廖丽萍, 肖爱平, 冷鹃, 杨喜爱, 刘亮亮, 梅时勇. 中国油脂, **2017**, 42(4): 136–139
- 15 Delmonte P, Kia A R F, Hu Q, Rader J I. *J. AOAC Int.*, **2009**, 92(5): 1310–1326
- 16 Barison A, da Silva C W P, Campos F R, Simonelli F, Lenz C A, Ferreira A G. *Mag. Reson. Chem.*, **2010**, 48(8): 642–650
- 17 Fauconnot L, Hau J, Aeschlimann J M, Fay L B, Dionisi F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18(2): 218–224
- 18 Kayden H J, Senior J R, Mattson H F. *J. Clin. Invest.*, **1967**, 46(11): 1695–1703
- 19 Myher J J, Marai L, Kuksis A, Kritchevsky D. *Lipids*, **1977**, 12(10): 775–785
- 20 Manganaro F, Myher J J, Kuksis A, Kritchevsky D. *Lipids*, **1981**, 16(7): 508–517
- 21 Berry S E E. *Nutrit. Res. Rev.*, **2009**, 22(1): 3–17
- 22 BEI Pei, SUN Jian-Hua. *International Journal of Pediatrics*, **2014**, 41(1): 58–60
贝斐, 孙建华. 国际儿科学杂志, **2014**, 41(1): 58–60
- 23 SHANG Yun-Peng, SHENG Qing-Hai, WANG Zhen-Yu, ZHANG Zhi-Guo. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, **2010**, 25(10): 119–123
商允鹏, 生庆海, 王贞瑜, 张志国. 中国粮油学报, **2010**, 25(10): 119–123
- 24 Indelicato S, Bongiorno D, Pitonzo R, Stefano V D, Calabrese V, Indelicato S, Avellone G. *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1515: 1–16
- 25 Kim J, Jin G, Lee Y, Chun H S, Ahn S, Kim B H. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63(40): 8955–8965
- 26 Gouk S U, Cheng S F, Ong A S H, Chuah C H. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2012**, 114(5): 510–519
- 27 Bottino N R, Vandenburg G A, Reiser R. *Lipids*, **1967**, 2(6): 489–493
- 28 Becker C C, Rosenquist A, Holmer G. *Lipids*, **1993**, 28(2): 147–149
- 29 Igarashi T, Aursand M, Hirata Y, Gribbestad I S, Wada S, Nonaka M. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77(7): 737–748
- 30 Tenailleau E, Lancelin P, Robins R J, Akoka S. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(13): 3818–3825
- 31 Aursand M, Jorgensen L, Grasdalen H. *Comp. Biochem. Physiol.*, **1995**, 112B(2): 315–321

- 32 Holtman K M, Chang H M, Jameel H, Kadla J F. *J. Wood Chem. Technol.*, **2006**, 26(1): 21–34
- 33 Vlahov G, Giuliani A A, Re P D. *Anal. Methods*, **2010**, 2(7): 916–923
- 34 Gouk S W, Cheng S F, Malon M, Onga A S H, Chuah C H. *Anal. Methods*, **2013**, 5(8): 2064–2073
- 35 Vlahov G. *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36(5): 359–362
- 36 Suárez E R, Mugford P F, Rolle A J, Burton I W, Walter J A, Kralovec J A. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2010**, 87(12): 1425–1433
- 37 Meusel A, Popkova Y, Dannenberger D, Schiller J. *Food Anal. Methods*, **2017**, 10(7): 2497–2506
- 38 Merchak N, Silvestre V, Loquet D, Rizk T, Akoka S, Bejjani J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409(1): 307–315
- 39 Simova S, Ivanova G, Passov S L. *Chem. Phys. Lipids*, **2003**, 126(2): 167–176
- 40 YAN Bao-Zhen. *Graphical Nuclear Magnetic Resonance Technology and Examples*. Beijing: Science Press, **2010**: 240
严宝珍. 图解核磁共振技术与实例. 北京: 科学出版社, **2010**: 240
- 41 National Pharmacopoeia Committee. *The Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (Part IV, 2015 Ed), Beijing: China Medical Science Press, **2015**: 52–54, 376
国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (四部, 2015 年版). 北京: 中国医药科技出版社, **2015**: 52–54, 376
- 42 GAO Han-Bin, ZHANG Zhen-FANG. *Principles and Experimental Methods of Nuclear Magnetic Resonance*. Wuhan: Wuhan University Press, **2008**: 25
高汉宾, 张振芳. 核磁共振原理与实验方法. 武汉: 武汉大学出版社, **2008**: 25

Simultaneous Determination of Fatty Acids at *sn*-1,3 and *sn*-2 of Triglyceride in Edible Oils by Quantitative ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance

XIAO Kun, GONG Can, GUO Qiang-Sheng, XU Xu*

(School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract A ¹³C-quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) method was established for determination of content of fatty acid at different positions in edible oil. The positional specificity analysis of *sn*-1,3 and *sn*-2 in fatty acids in edible oil was performed using reverse-gated decoupling technique. The direct normal integral, deconvolution integral using different Lorentz-Gaussian ratios, and other data processing methods were compared for the analyzing ¹³C-qNMR unseparated peaks. Then the deconvolution integral with Lorentz-Gauss (3:2) was selected to extract the quantitative peak areas of two unsaturated fatty acids at *sn*-1,3 and *sn*-2, linoleic acid and oleic acid. The content of unsaturated fatty acids in different positions showed that the saturated fatty acids, *sn*-1 linoleic acid, *sn*-2 linoleic acid, *sn*-1,3 oleic acid, *sn*-2 oleic acid were as follows: soybean oil (16.2%, 27.8%, 24.0%, 15.5%, 7.9% (*w/w*, the same below)); corn oil (15.3%, 30.7%, 20.5%, 20.1%, 13.3%); peanut oil (18.3%, 18.7%, 12.5%, 24.9%, 25.5%). The *sn*-1,3 linolenic acid, *sn*-2 linolenic acid in soybean oil were 4.5% and 4.1%, respectively, but were undetectable in corn oil and peanut oil. The result was in accordance with content of total linoleic acid and total oleic acid detected by above ¹H-qNMR method. ¹³C-qNMR can be applied to distinguish the location and distribution of unsaturated fatty acids with easy sample preparation and flexible operation, providing a method for quantifying the specific triglyceride positional isomer component in edible oil without its standard sample.

Keywords Quantitative nuclear magnetic resonance; ¹³C-nuclear magnetic resonance; Edible oil; Fatty acid; Positional isomer

(Received 19 July 2019; accepted 6 March 2020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31671928) and the Natural Science Foundation of Shanghai, China (No. 15ZR1440800).

支持信息
Supporting Information

定量核磁共振碳谱同时测定食用油中甘油三酯的 *sn-1,3* 和 *sn-2* 脂肪酸含量

肖坤 龚灿 郭强胜 许旭*
上海应用技术大学 化学与环境工程学院, 上海 201418

**Simultaneous Determination of Fatty Acids at *sn-1,3* and *sn-2* of
Triglyceride in Edible Oils by Quantitative ¹³C-Nuclear Magnetic
Resonance**

XIAO Kun, GONG Can, GUO Qiang-Sheng, XU Xu*
School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418,
China

表 S1. 乙烯基区域不同去卷积拟合方式的结果 (% , w/w) 及误差对比

Table S1. Results (% , w/w) and error comparison of different deconvolution fitting methods

处理方式	亚麻酸含量		总和	亚油酸含量		总和	油酸含量		总和
	sn-1,3	sn-2		sn-1,3	sn-2		sn-1,3	sn-2	
氢谱结果对比	-	-	9.1±0.6	-	-	51.5±1.7	-	-	23.2±1.5
普通积分 (中切法)	3.9±1.5	3.9±1.3	7.9±1.5	25.9±1.5	22.5±1.7	48.4±1.7	15.3±1.5	7.3±1.6	22.3±1.5
纯洛伦兹 (100% L)	5.5±1.4	4.5±1.3	10.0±1.4	28.3±1.9	24.4±1.5	52.7±1.6	15.9±1.2	7.9±1.7	23.8±1.4
L/G=1:4(80%L)	4.2±1.2	4.0±1.1	8.3±1.0	26.3±2.2	23.1±1.8	49.4±1.9	15.1±1.4	8.1±1.9	23.1±1.6
L/G=2:3(60%L)	4.5±1.3	4.1±1.4	8.1±1.3	27.0±2.0	23.2±1.7	49.8±1.9	15.0±1.3	7.9±1.8	23.0±1.7
L/G=1:1(50%L)	4.5±1.4	4.0±1.1	8.0±1.3	27.1±1.9	23.8±1.5	50.4±1.8	15.0±1.2	7.9±1.9	23.0±1.7
L/G=3:2(40%L)	4.5±1.4	3.9±1.6	8.5±1.5	27.4±1.7	23.6±1.6	51.0±1.7	15.2±1.3	7.8±1.7	23.0±1.5
L/G=3:1(20%L)	4.4±1.2	4.0±1.6	8.4±1.5	27.4±1.8	23.2±1.7	50.5±1.8	15.0±1.3	7.8±1.8	22.2±1.6
纯高斯 (G, 0%L)	4.4±1.1	3.9±1.4	8.3±1.2	25.4±1.5	21.8±1.5	47.2±1.4	14.9±1.4	6.8±2.0	21.7±1.5

注: 图中数值为平均值 (n=3, % , w/w) ±SD; 乙烯基区域

Note: The values are mean (n=3, % , w/w) ± standard deviation in the table; Vinyl region

表 S2. 羰基区域不同去卷积拟合方式的结果 (% , w/w) 及误差对比

Table S2. Results (% , w/w) and error comparison of different deconvolution fitting methods

处理方式	饱和脂肪酸		总和	亚油酸含量		总和	油酸含量		总和
	sn-1,3	sn-2		sn-1,3	sn-2		sn-1,3	sn-2	
氢谱结果对比	-	-	16.2±1.2	-	-	51.5±1.7	-	-	23.2±1.5
普通积分(中切法)	14.9±1.2	-	14.9±1.2	26.2±1.4	21.5±1.7	47.7±1.6	12.5±1.7	7.3±1.5	19.7±1.6
纯洛伦兹 (100% L)	17.5±1.4	-	17.5±1.4	31.3±1.6	23.2±1.3	54.5±1.5	14.4±1.4	8.5±1.8	22.9±1.5
L/G=1:4(80%L)	16.6±1.2	-	16.6±1.2	30.4±1.9	22.0±1.8	52.5±1.9	13.5±1.8	8.1±1.3	21.7±1.6
L/G=2:3(60%L)	16.5±1.0	-	16.5±1.0	30.8±1.7	22.7±1.3	53.5±1.4	13.2±1.4	8.6±1.4	21.8±1.4
L/G=1:1(50%L)	16.1±1.6	-	16.1±1.6	29.8±1.4	21.3±1.7	51.2±1.6	13.4±1.7	9.3±1.3	22.7±1.5
L/G=3:2(40%L)	15.9±1.5	-	15.9±1.5	30.0±1.3	21.6±1.8	51.6±1.5	13.4±1.3	9.3±1.6	22.9±1.4
L/G=3:1(20%L)	16.5±1.3	-	16.5±1.3	29.4±1.7	22.7±1.7	52.0±1.7	13.0±1.8	8.7±1.4	22.8±1.6
纯高斯 (G, 0%L)	17.2±1.5	-	17.2±1.5	30.7±1.5	22.5±1.3	53.3±1.4	12.9±1.3	7.5±1.7	20.4±1.5

(图中数值为平均值±SD; 羰基区域)

(The values are mean ± standard deviation in the table; Carbonyl region)