



薄层色谱法测定油脂中甘油三酯含量

鲍方宇¹, 张 敏^{1,2,*}

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.北京工商大学食品学院, 北京 100037)

摘 要: 采用薄层色谱-可见分光光度法以内标法定量测定油脂中甘油三酯的含量。应用硅胶柱层析将混合甘油酯中的甘油三酯分离出来, 得到甘油三酯的高纯品, 作为甘油三酯测定的标准品。混合甘油酯经薄层色谱分离、洗脱及显色, 然后经分光光度法在700nm测定其吸光度, 测定甘油三酯的含量。本方法的平均回收率为99.8%, 有良好的准确度, 精密度略低; 获得的甘油三酯标准品, 在10~100μg/mL范围内线性关系良好; 保证薄层板在5min固定时间显色, 洗脱液在1.5h内检测, 其稳定性良好; 样品的检测限为0.55μg/mL。本方法为混合脂肪酸组成的甘油三酯含量测定提供简单快捷的方法。

关键词: 薄层色谱-可见分光光度法; 混合甘油酯; 甘油三酯标准品

Determination of Triglyceride Content in Oils and Fats by Thin Layer Chromatography

BAO Fang-yu¹, ZHANG Min^{1,2,*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China)

Abstract: A method for the determination of triglyceride content in oils and fats was established using thin layer chromatography (TLC) -visible spectrophotometry and internal standard quantification. High-purity triglyceride was separated by silica gel column chromatography from mixed glycerides for use as a reference substance. For the spectrophotometric determination of triglyceride content at 700 nm, triglyceride was separated by TLC before color development. The average recovery rate of the developed method was 99.8%, with high accuracy but slightly lower precision. An excellent linear relationship was observed for the calibration curve established using the prepared triglyceride standard over the concentration range of 10 to 100 μg/mL. Good stability was achieved by color development for 5 min and detection of the eluates within 1.5 h. The limit of detection for triglyceride was 0.55 μg/mL. This method can provide a simple and quick method for the determination of triglyceride content.

Key words: TLC-spectrophotometry; mixed glycerides; triglyceride standard

中图分类号: TS227

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)04-0125-04

甘油酯的定量分析方法主要为外标法, 应用标准品绘制标准曲线从而确定其含量^[1-5]。此方法对于单一脂肪酸组成的甘油酯的分析十分准确, 但对于混合脂肪酸组成的甘油酯的含量测定存在一定的误差。以大豆油为例, 大豆油中的甘油酯为混合物, 若使用单一脂肪酸组成的甘油酯标准品进行定量, 会使甘油酯的含量偏低。由于各种植物油甘油三酯的种类和比例有自身的特点, 最好的甘油三酯标准品应是从原料本身制备出来的。这种制备的标准品和样品中的甘油三酯的种类是一致的, 能够很好的反应样品中的甘油三酯组成。它远比一两个商业化的甘油三酯标准品标样更具有代表性, 且测定更加准确^[6]。

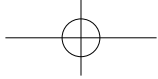
收稿日期: 2012-07-06

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2009BADB9B08); 国家“863”计划项目(2010AA101503)

作者简介: 鲍方宇(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: fangyu8023@126.com

*通信作者: 张敏(1972—), 女, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: xzm7777@sina.com

薄层色谱法是一种微量分离方法^[7], 是分离中性脂类(包括甘油三酯、二酯、单酯、游离脂肪酸、甾醇及酯)最简单而且常用的方法^[8]。薄层色谱法原理是动相溶剂带动混合物组分流经静相的过程, 使被分离组分在动相与静相间进行分配, 是利用物质的极性进行吸附解吸最终分离物质的方法, 将混合甘油酯分离成不同的区域, 每个区域为同一类物质^[9]。薄层色谱洗脱法联合紫外-可见分光光度法在一些中药成分及苏丹红的检测中已有应用, 检测方法成本低、操作简单、分离效率高、易于普及^[10-12]。薄层色谱可用于“可疑”样本和很容易损坏高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)系统的样本分析, 这一优点尤为重要^[13]。



磷钼酸是一种非特异性的物质,可以检测油脂中所有分离组分,分离物质的区域和背景板比较具有较高的对比度,并可长时间保持其强度,欧洲药典应用其作为油脂定性检测的试剂^[14]。本研究采用磷钼酸作为显色剂,硅胶柱层析方法分离混合甘油酯得到甘油三酯的高纯品作为标准品,薄层色谱洗脱与可见分光光度相结合,采用内标法定量测定油脂中甘油三酯含量,以期探索这种方法的可行性,为今后油脂中甘油三酯含量的检测提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

单槽层析缸(200mm×200mm) 天津思利达科技有限公司;层析板(200mm×200mm);层析柱(Φ2.5cm×75cm、Φ1.2cm×100cm);铺板器;旋转蒸发器;SC-3614低速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;KQ-300E超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司;XK96-A混匀器 姜堰市新康医疗器械有限公司;722S分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司。

硅胶G 青岛海洋化工厂;一级大豆油(市售);自制不同含量甘油三酯样品;其他所用试剂均为分析纯。

1.2 检测程序

薄层色谱板的制备,使用硅胶27g加5%羧甲基纤维素钠81g研磨均匀铺板,样品用氯仿-甲醇(2:1, V/V)溶液溶解,展开剂为正己烷-乙醚-冰乙酸(45:25:1, V/V)^[15]。样品上行展开,自然晾干后,置碘蒸汽中显色至斑点完全显现,用10%磷钼酸乙醇溶液将显色的点完全覆盖,置105℃烘箱中至斑点变为深蓝色为止,用浓氨水熏以去除背景影响。

将薄层上洗脱的斑点取下,加3mL蒸馏水溶解,4500r/min离心10min取上清液,定容至5mL,在(700±1)nm波长处测定其吸光度^[16]。

另本实验数据置信区间不小于95%,平行测定数据误差范围为±0.05,每块薄层板分析6个样品,每块薄层板均进行空白对照。

1.3 标准品的制备

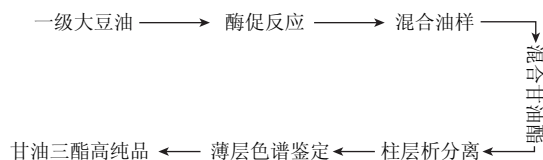


图1 标准品制备流程图

Fig.1 Flow chart of standard sample preparation

标准品制备的流程如图1所示。以一级大豆油为原料,在无溶剂体系采用脂肪酶催化甘油解反应制备混合甘

油酯。反应条件为甘油/油物质的量比为2:1(mol/mol),甘油与硅胶质量比为1:1,甘油含水量为1%,加酶量为(以反应油脂质量为标准)10%,在45℃条件下反应12h^[17]。应用碳酸钠溶液脱除其中的游离脂肪酸,分子筛脱水^[18]。

混合甘油酯采用柱层析法进行分离,得到混合脂肪酸的甘油三酯。取15g样品于100mL烧杯中,加入15mL氯仿溶解,溶液上硅胶柱(Φ2.5cm×75cm),以200mL苯为洗脱剂进行初步分离,旋转蒸发脱溶得到甘油三酯的粗品^[19]。取1g甘油三酯粗品溶解在20mL的正己烷中,然后溶液上硅胶柱(Φ1.2cm×100cm),用250mL正己烷进行梯度洗脱^[6],经旋转蒸发脱溶,吹氮去除溶剂残留,经0.45μm滤膜去除不溶性杂质,得甘油三酯高纯品。

获得的高纯品,经薄层板鉴定后,做为甘油三酯的标准品使用。

1.4 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值的计算

相对标准偏差RSD^[20]能够指示数据之间的离散程度,用以指示数据的精密度和准确度,计算公式如下:

$$RSD/\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

式中: S 为样本标准偏差, $\bar{x}$ 为样本平均值。

2 结果与分析

2.1 标准品的鉴定

将大豆油按1.3节标准品制备方法分离,得到甘油三酯的高纯品,作为甘油三酯标准品。获得的大豆甘油三酯高纯品经薄层色谱鉴定结果如图2所示。

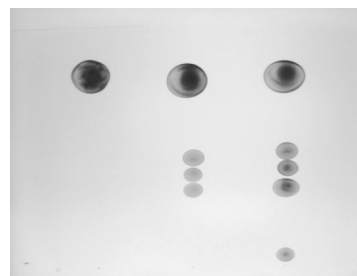


图2 薄层色谱鉴定图

Fig.2 TLC identification of triglyceride standard

图2中从左至右依次为甘油三酯高纯品、原料大豆油及混合甘油酯。薄层色谱图中各物质确定是根据其不同的Rf(迁移率)值确定的,甘油三酯、游离脂肪酸、1,3-甘油二酯、1,2-甘油二酯及单甘酯的极性是依次增大的,故其在薄层板上移动的距离依次减小,从而确定各物质的成分^[21]。大豆油中含有4种组分,从上至下依次为甘油三酯、游离脂肪酸、1,3-甘油二酯和1,2-甘油二酯,其中1,3-甘油二酯、1,2-甘油二酯含量较低;混合甘油酯中有5种

成分,从上至下依次为甘油三酯、游离脂肪酸、1,3-甘油二酯、1,2-甘油二酯及单甘酯。比较大豆油和混合甘油酯的图谱发现,经酶促反应后,混合甘油酯中甘油二酯的含量明显提高了,并且生成了单甘酯。

图中甘油三酯高纯品经薄层色谱鉴定为一点,由于其他甘油酯在薄层板上的检测限为0.5%^[13],说明甘油三酯已有较高的纯度,可以作为标准品。采用内标法定量,分离出混合脂肪酸的甘油三酯高纯品作为标样,避免了采用单一脂肪酸甘油三酯所造成的偏差。

2.2 甘油三酯线性范围确定

将制得的甘油三酯高纯品配制成不同质量浓度的一系列溶液,各取2 μ L点于同一薄层板上。按实验方法中的条件展开、显色、洗脱,测定吸光度。以溶液质量浓度为纵坐标,以吸光度为纵坐标,绘制甘油三酯与吸光度的关系曲线。结果可知,甘油三酯标准品含量在10~100 μ g/mL范围之间,甘油三酯标准品的质量浓度与吸光度之间呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.008X+0.0961$,复相关系数 $R^2=0.9973$ 。

2.3 稳定性实验

取样品点样,按色谱的检测程序进行展开、显色、洗脱后测定吸光度,分别在1、1.5、2、2.5、3h和48h进行检测,测量结果如表1所示。

表1 稳定性测量结果
Table 1 Stability of the developed method

测定时间/h	1	1.5	2	2.5	3	48
吸光度	0.852	0.855	0.836	0.823	0.800	0.050

从表1可以看出,洗脱后样品在1.5h之内吸光度稳定。随时间的推移吸光度逐渐降低,48h时测定的吸光度与空白样的吸光度接近,故应保证在1.5h内检测洗脱样品。本方法采用磷钼酸作为显示剂,其对甘油三酯有良好的特异性,且显色后产生的物质稳定,有利于操作人员的操作。

2.4 精密度实验

2.4.1 平行性实验

配制同一质量浓度的样品6份,在同一薄层板上以相同的条件展开、显色、洗脱后测定吸光度,得吸光度如表2所示。

表2 平行性测定结果(n=3)
Table 2 Results of parallel determinations (n=3)

编号	吸光度	平均值	偏差/%	RSD/%
1	0.334 $\pm$ 0.007	0.332 $\pm$ 0.0078	-1.4	2.55
2	0.322 $\pm$ 0.025		3.9	
3	0.341 $\pm$ 0.015		2.7	
4	0.335 $\pm$ 0.036		6.1	
5	0.332 $\pm$ 0.010		-2.2	
6	0.321 $\pm$ 0.056		7	

注:数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。下同。

从表2可知,同浓度的6份样品所测得的吸光度的平均值为0.332,RSD值为2.55%。

2.4.2 方法重现性实验

将同一样品溶液,在同一薄层板上进行6次独立的测定,测定结果如表3所示。从表3可知,重现性测定结果的平均值为0.331,最大偏差为3%,RSD值为2.37%。

精密度主要反映分析方法存在的随机误差的大小,从平行性和重现性两个性质进行测量。其中平行性主要分析周围环境对实验方法引起的误差,重现性主要分析试验仪器体系所引起的误差。由精密度实验结果可知,RSD值在2.5%左右,属于低精密度的检测方法^[22],说明检测方法的精密度不高,但经多次实验降低随机误差后可提高其精密度。

表3 重现性测定结果
Table 3 Results of replicate determinations

编号	吸光度	平均值	偏差/%	RSD/%
1	0.334	0.331 $\pm$ 0.0078	3	2.37
2	0.322			
3	0.341			
4	0.335			
5	0.332			
6	0.321			

2.5 准确度实验

精密吸取甘油三酯标准品50mg,添加已知含量的混合油样50mg,混合后定容至1000mL,按样品测定方法进行测定,结果见表4。

表4 加样回收实验测定结果
Table 4 Spike recovery of the developed method

编号	添加量/ (μ g/mL)	原有量/ (μ g/mL)	测得量/ (μ g/mL)	回收量/ (μ g/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	50	29.49	78.99	49.5	99	99.8	1.61
2	50	29.49	80.48	50.99	101.9		
3	50	29.49	79.86	50.37	100.7		
4	50	29.49	79.38	49.89	99.8		
5	50	29.49	78.36	48.87	97.7		

准确度为检测方法存在系统误差和随机误差的综合指标,并决定分析结果的可靠性。从表4加样回收测定结果可见,平均回收率为99.8%,RSD值为1.61%。由准确度实验结果可知,本实验处理过程中样品的损失较少,准确度良好。

2.6 样品的测定

在无溶剂体系中,以固定化脂肪酶催化甘油解反应,甘油/油物质的量比为2:1,甘油含水量为1%,反应12h,分别在35、40、45 $^{\circ}$ C制备不同含量的甘油酯混合物。取50mg样品定容至1000mL进行测定,结果见表5。

由表5可知,精密度范围在2.55%~2.88%之间,可见本方法可以测定混合甘油酯中甘油三酯的含量。另外,



随着酶促反应温度的升高,样品中甘油三酯含量呈现递减的趋势,说明随温度的升高酶促甘油解产物中甘油三酯的转化率提高。

表5 样品测定结果($n=6$)Table 5 Results of determinations of triglyceride content in samples ($n=6$)

编号	反应温度/℃	甘油三酯含量/($\mu\text{g/mL}$)	RSD/%
1	35	36.24 ± 0.96	2.65
2	40	33.36 ± 0.96	2.88
3	45	29.49 ± 0.75	2.55

2.7 检测线的测定

将100 μL 磷酸乙醇溶液点在薄层板上,105℃条件下烘烤5min,用浓氨水熏去除背景影响,做20组平行,测得吸光度平均值为0.017,标准偏差为0.001468,得到本检测方法的检测限为0.55 $\mu\text{g/mL}$,定量检测下限为1.83 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.8 方法引起误差因素

本研究获得的检测方法可在常规条件下进行,分析过程中所使用的仪器均为常规仪器,操作简单方便,易于学习。引起本研究误差因素主要有以下3点:由于本研究定量级为微克,应注意操作的准确度,否则会使数据造成相当大的偏差;薄层板的均匀程度对实验影响较大,如薄层过薄会使样品点的面积增大,从而使实验结果偏大;显色时间应严格的控制在相同的时间,时间过短,反应不够完全,使测量值偏低;时间过长,会使显色剂过度反应,使测量结果偏高,最佳的显色反应时间应在5min左右。

3 结论

本研究建立应用薄层色谱-可见分光光度法定量测定甘油三酯含量的方法。本方法的平均回收率为99.8%,有良好的准确度,精密度略低。研究获得了高纯度的甘油三酯标准品,在10~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好;在保证5min左右固定显色时间条件下,1.5h内检测结果的稳定性良好;样品的检测限为0.55 $\mu\text{g/mL}$,定量检测下限为1.83 $\mu\text{g/mL}$ 。检测时间大约为2h,最多可分析12个样品,其样品组分应不多于5种。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 刘涛,尹春华,谭天伟.高效液相色谱-蒸发光散射器测定脂肪酸和甘油酯的含量[J].中国油脂,2005,30(9):52-55.
- [3] 王丽丽,汪勇,胡长英,等.高温气相色谱分析甘油酯的研究[J].中国油脂,2011,36(7):75-80.
- [4] HOLCAPEK M, JANDERA P, ZDERAD ICKA 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.
- [5] COSSIGNAN I L, SIMONETTI M S, DAMIAN I P. Structural changes of triacylglycerol and diacylglycerol fractions during olive drupe ripening[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001, 212(4): 160-164.
- [6] 汪勇,宋珂珂,王丽丽,等.反相高效液相色谱法测定甘油二酯含量的研究[J].中国油脂,2010,25(3):119-124.
- [7] 章育中.薄层层析法和薄层扫描法[M].北京:中国医药科技出版社,1990.
- [8] HAMMOND E W. Chromatography for the analysis of lipids. Chapter3. Thin layer chromatography[M]. Boca Raton: CRC Press, 1993: 21-24.
- [9] 陶锐.薄层色谱及其在食品卫生分析上的应用[M].成都:四川人民出版社,1982.
- [10] 戴静,方娜娜.薄层层析-紫外分光光度法测定十全大补胶囊中芍药苷含量[J].天然产物研究与开发,2003,15(3):206-207.
- [11] 陈云侠,武希桃,王基光.薄层色谱-分光光度法测定疏肝健脾胶囊黄芪甲苷的含量[J].陕西中医学报,2006,29(5):60-61.
- [12] 庞艳玲.薄层色谱-紫外可见分光光度法在苏丹红检测中的应用[D].济南:山东师范大学,2006.
- [13] FUCHS B, SÜSS R, TEUBER K, et al. Lipid analysis by thin-layer chromatography: a review of the current state[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(19): 2754-2774.
- [14] ЧЕЧЕТА О В, САФОНОВА Е Ф, СЛИВКИН А И. Идентификация растительных масел и масляных экстрактов методом ТСХ[J]. Сорбционные и хроматографические процессы, 2008, 8(4): 646-653.
- [15] KAHVECI D, GUO Z, ÖZCELIK B, et al. Improving enzymatic production of diglycerides by engineering binary ionic liquid medium system[J]. New Biotechnology, 2009, 26(1/2): 37-43.
- [16] NT/T 1042.1—2007 蓖麻油甘油酯含量的测定薄层色谱法[S].
- [17] 王春茹,王琮,段作营,等.硅胶吸附甘油在无溶剂酶法甘油解合成甘油二酯中的作用研究[J].中国油脂,2006,31(5):55-58.
- [18] 杨琦.纯碱法精炼水冬瓜油的研究[J].中国油脂,1996,21(2):27-29.
- [19] 卢艳杰,龚院生,张连富.油脂检测技术[M].北京:化学工业出版社,2003:235-239.
- [20] 王钦德,杨坚.食品试验设计与统计分析基础[M].2版.北京:中国农业出版社,2009:1:33.
- [21] 陶锐.薄层色谱及其在食品卫生分析上的应用[M].成都:四川人民出版社,1982.
- [22] 李克安.分析化学教程[M].北京:北京大学出版社,2005.