

大豆种子脂肪酸含量的快速测定

张颖君¹, 高慧敏², 蒋春志¹, 胡梦芸¹, 刘兵强¹, 李 辉¹

(¹河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北省作物遗传育种种实验室, 国家大豆改良中心石家庄分中心, 河北 石家庄; ²河北省农林科学院经济作物研究所, 河北 石家庄 050031)

摘 要:脂肪酸的含量是油料作物品质的重要指标, 以往的脂肪酸测定方法需要样品量大、工序繁琐、耗时长, 不适合育种工作者前期对材料的筛选。用 0.040 g 大豆种子 (约占种子的 1/4) 对脂肪酸的提取和甲酯化过程进行了条件优化, 采用提取液 (苯: 石油醚 = 1:1) 提取 5 min, 0.5 mol · L⁻¹ 甲醇钠酯化 7 min 后即可进行气相色谱分析, 使通常需要用近 10 h 的工作在 12 min 内完成, 大大缩短了检测时间。通过与传统的索氏提取 (GB/T 5009.6-2003)、甲酯化方法 (GB/T 17376-1998) 比较, 改进的方法结果准确可靠。

关键词:大豆; 脂肪酸; 气相色谱

中图分类号: Q547

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841 (2008) 05-0859-04

Fast Analysis on Fatty Acids of Soybean Seed by Gas Chromatography

ZHANG Ying-jun¹, GAO Hui-min², JIANG Chun-zhi¹, HU Meng-yun¹, LIU Bing-qiang, LI Hui¹

(¹ Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hebei Province, National Soybean Improvement Center Shijiazhuang Sub-center, Shijiazhuang 050031; ² Cash and Crops Institute of Agriculture, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, Hebei, China)

Abstract: The content of fatty acids is an important index for oil crops. The traditional methods of detecting fatty acids need more samples and more time, which unsuitable to select hundreds of seeds for breeders. In this experiment, 0.040 g soybean seed (about quarter of the soybean seed) was used to optimize the method of oil extraction and methyl esterification, and extracted oil from the soybean powder using the mixture (benzene: petroleum ether = 1:1) for 5 minutes, methyl esterified using sodium hydroxide-methanol solution ($c = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 7 minutes, then the supernatant fluid was injected into the gas chromatography system. Using this method, the work which usually need almost ten hours, now can be completed in 12 minutes, thus lots of time can be saved. By comparing with traditional method (GB/T 5009.6-2003, GB/T 17376-1998) for detecting fatty acid compositions, it was confirmed that the results got from this method was exact and credible.

Key words: Soybean; Fatty acids; Gas chromatography

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是重要的油料作物。大豆油脂中的不饱和脂肪酸为人体健康所必需, 不同的脂肪酸具有不同的营养价值, 如亚油酸在人体内对于合成磷脂和前列腺素, 防止血清中胆固醇的增加和沉积、软化血管、防止高血压和心血管疾病均有重要作用^[1]。对于亚麻酸的含量存在不同的观点, 有人认为亚麻酸可以预防血栓的形成, 适宜的亚油酸与亚麻酸比率对于健康平衡与预防心血管疾病尤为关键, 并提出‘健康油’的概念, 即亚油酸: 亚麻酸 = 4:1, 亚油酸含量为 48%, 亚麻酸含量为 12%。但也有人^[2]认为由于亚麻酸含有 3 个不饱和

键, 易于引起大豆油的氧化变质, 为提高大豆油的品质应该降低亚麻酸的含量。

由此可见, 不论从健康角度还是从提高大豆油品质的角度, 对大豆品种进行脂肪酸组成及含量的分析都是非常必要的。但是, 对于脂肪酸的分析人们还是延续多年以来的传统方法^[3-8], 传统的分析方法包括多个步骤: 首先用索氏提取器从样品中提取粗脂肪, 提取出的粗脂肪还要经过多个步骤的甲酯化处理, 抽提分层后才能进行 GC 分析^[9-15], 整个过程需要进行近 10 h。传统方法工序繁琐、用时长, 并且需用样品用量大, 只适于样品量较大的高世代

收稿日期: 2008-04-15

作者简介: 张颖君 (1977-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事作物品质育种与生物技术研究。E-mail: zhang-yingjun@sohu.com。

通讯作者: 李辉, 研究员。E-mail: zwslhui@163.com。

材料的检测,而对于大豆育种工作者前期对基础材料的筛选很不适合。Kowalski^[16]研究还认为,甲酯化过程中的长时间高温对脂肪酸成分是不利的,可能导致检测结果不准确。研究对大豆脂肪酸分析的前处理过程进行了条件优化,以期对育种工作者进行材料筛选提供简便、准确的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

所用大豆品种为冀豆 7 号、冀豆 12、冀豆 13、冀豆 15、冀 n58、五星一号。

1.2 试剂

苯、石油醚(30~60℃)、无水乙醚等为国产分析纯试剂,三氟化硼甲醇为 Riedel-deHaen 产品,脂肪酸甲酯标准品购自 Sigma。

1.3 仪器与分析条件

Agilent 6890N 型气相色谱仪, FID 检测器, FFAP 弹性石英毛细管柱(50 m×0.2 mm×0.33 μm),恒压模式,载气:高纯 N₂,流速 1 mL·min⁻¹; H₂流速:35 mL·min⁻¹,空气流速:350 mL·min⁻¹。进样量:2 μL,分流比:10:1,进样口温度:250℃,检测器温度:250℃,程序升温:180℃,3 min;9℃·min⁻¹升至 225℃,保持 25 min。

1.4 样品前处理

用尖嘴钳夹住大豆种子,用干净刀片沿平行种脐方向,切下子叶的一部分(如图 1),切下部分用尖嘴钳夹碎,放入 1.5 mL 离心管中,用玻璃研磨棒研成粉末供分析之用,其余部分视分析结果决定是否育苗,侧切后的种粒成苗率可达 90% 以上。以冀 n58 为材料,从单粒种子上切下 0.040 g,进行条件优化实验。

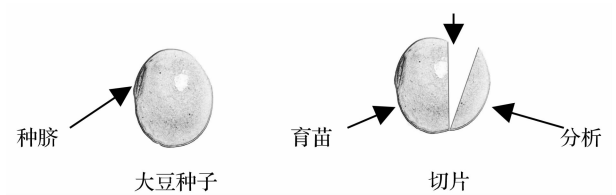


图 1 大豆种子切片示意图

Fig. 1 Sketch map of cutting soybean

1.5 脂肪提取及甲酯化

向 0.040 g 研磨好的豆粉中加入脂肪提取液(苯:石油醚=1:1)1 mL,振荡,离心取上清,加入 0.5 mol·L⁻¹甲醇钠 1.5 mL 进行甲酯化,加入饱和 NaCl 溶液 2 mL,静置分层,吸取 2 μL 上清液进行

GC 分析。

2 结果与分析

2.1 提取时间

传统的索氏提取法耗时较长,一般要 6~12 h,有人也提出不用索氏提取器,直接用乙醚等有机溶剂浸泡^[17],但要求浸提的时间依然要几个小时或过夜,此方法虽然省去了购置索氏提取器,但要求浸提的时间依然比较长,不能起到快速检测的目的。

提取时间设 2、5、10、15、20、30 min 6 个处理,甲酯化时间均为 30 min,每个处理 3 个重复。GC 分析结果见表 1。

表 1 不同提取时间对脂肪酸含量测定的影响

Table 1 The effect of different extract time on detecting fatty acids

时间 Time/min	软脂酸 C _{16:0} Palmitic acid	硬脂酸 C _{18:0} Stearic acid	油酸 C _{18:1} Oleic acid	亚油酸 C _{18:2} Linoleic acid	亚麻酸 C _{18:3} Linolenic acid
2	9.13861	3.69671	17.20310	46.24699	7.12128
5	10.55187	4.93741	20.63457	54.88916	8.52699
10	10.54616	4.98905	20.11153	54.80006	8.53786
15	10.60090	4.99210	19.93358	54.85555	8.63113
20	10.56984	5.03557	20.29544	54.52463	8.53297
30	10.54732	5.05669	20.27798	54.75534	8.55789

提取时间为 2 min 时,结果与其它处理存在较大差别。经方差分析检测,提取时间为 5~30 min 时,结果无显著差异,所以用苯:石油醚=1:1 提取液提取 5 min 即可满足 GC 检测要求。

2.2 甲酯化时间

脂肪提取时间固定为 5 min,对甲酯化时间进行优化。甲酯化时间设 5、7、10、20、30 min 5 个处理,GC 分析结果见表 2。

表 2 不同甲酯化时间对脂肪酸含量测定的影响

Table 2 The effect of different methyl esterification time on detecting fatty acids

时间 Time/min	软脂酸 C _{16:0} Palmitic acid	硬脂酸 C _{18:0} Stearic acid	油酸 C _{18:1} Oleic acid	亚油酸 C _{18:2} Linoleic acid	亚麻酸 C _{18:3} Linolenic acid
5	9.53074	4.91707	19.41152	52.07259	7.99200
7	10.36240	5.03623	20.37744	54.90854	8.38661
10	10.43123	4.97398	20.33307	54.94724	8.43621
20	10.55120	5.14827	20.09906	54.75877	8.40889
30	10.62105	5.08145	20.10069	54.69923	8.43937

甲酯化时间为 5 min 时,甲酯化不完全,结果与其它处理存在较大差别。甲酯化时间为 7~30 min

时,结果无显著差异,所以用甲醇钠溶液对脂肪甲酯化 7 min,即可满足 GC 检测要求,并且不需要加热回流,简化了操作步骤。

2.3 改进的方法与传统方法对比

为了验证改进后方法的准确性,用 4 个大豆品种为材料与传统方法(简称索氏法)做了对比。传

统方法中脂肪提取参照 GB/T 5009. 6-2003 中的索氏提取法,甲酯化方法参照 GB/T 17376- 1998。结果见表 3。对结果进行 t 检验,经分析,各脂肪酸的 t 值均小于 3. 18($t_{0.05,4}=3.18$),由此说明改进后的方法与传统方法间无显著差异,改进的方法具有很好的准确度。

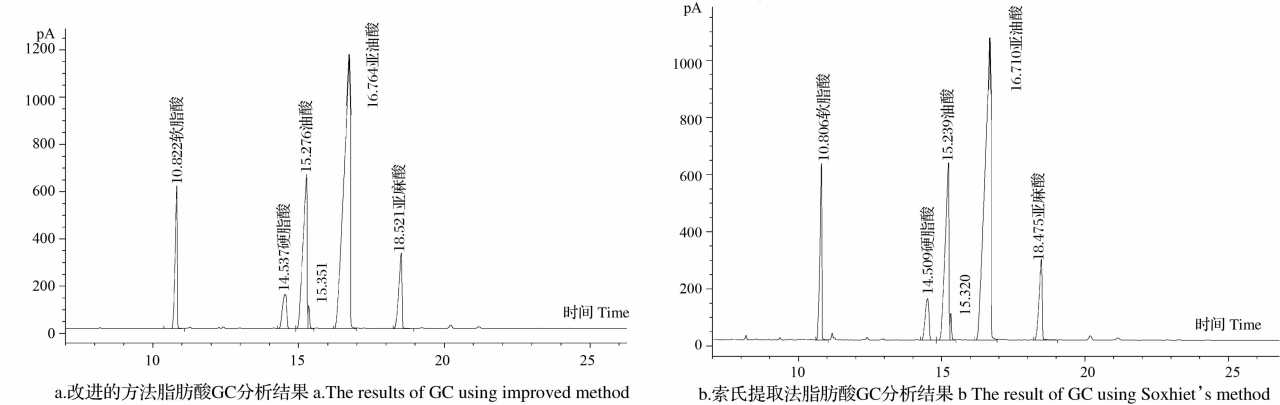


图 2 改进的方法与索氏提取方法 GC 结果(冀豆 13)
Fig. 2 The GC results of Jidou 13 using improved method and Soxhiet's method

表 3 改进的方法与索氏提取法脂肪酸测定结果比较

Table 3 Comparison of improved method with Soxhiet's method for detecting fatty acid compositions						
品种 Varieties	方法 Method	软脂酸 C _{16:0} Palmitic acid	硬脂酸 C _{18:0} Stearic acid	油酸 C _{18:1} Oleic acid	亚油酸 C _{18:2} Linoleic acid	亚麻酸 C _{18:3} Linolenic acid
冀豆 7 号 Jidou 7	本法 IM	11. 48413	3. 83515	22. 28565	53. 45008	7. 73339
	索氏 SM	11. 45733	3. 86777	22. 31960	53. 46864	7. 71219
冀豆 12 号 Jidou 12	本法 IM	11. 51055	4. 27209	20. 59751	53. 48682	8. 81407
	索氏 SM	11. 55192	4. 22202	20. 49874	53. 53107	8. 80855
冀豆 13 号 Jidou 13	本法 IM	9. 58620	4. 67636	20. 01891	56. 73497	7. 56893
	索氏 SM	9. 61242	4. 67375	20. 03689	56. 72304	7. 61376
五星一号 Wuxing 1	本法 IM	11. 77770	5. 64518	21. 42965	52. 92363	6. 88843
	索氏 SM	11. 79587	5. 62838	21. 43270	52. 94701	6. 90250
T 值 T - value		1. 006	0. 538	0. 366	1. 601	0. 565

IM; improved method; SM; Soxhiet's method.

2.4 精密度

用冀豆 15 平行 5 次做改进方法的精密度实验,各脂肪酸相对含量的最大变异系数符合国标要求,证明改进后的方法具有很高的精密度。

表 4 精密度结果

Table 4 The results of exactitude experiment					
序号 No.	软脂酸 C _{16:0} Palmitic acid	硬脂酸 C _{18:0} Stearic acid	油酸 C _{18:1} Oleic acid	亚油酸 C _{18:2} Linoleic acid	亚麻酸 C _{18:3} Linolenic acid
1	11. 60650	3. 64565	20. 72658	53. 79303	8. 80987
2	11. 60105	3. 61352	20. 70492	53. 78638	8. 81129
3	11. 61268	3. 65176	20. 70300	53. 76177	8. 84957
4	11. 61797	3. 62803	20. 74567	53. 79030	8. 85359
5	11. 60136	3. 63762	20. 68725	53. 75417	8. 83422

3 讨论

通过对脂肪酸的提取和甲酯化过程进行条件优化,大大简化了样品前处理过程,最终确定为:用 0. 040 g 大豆样品,脂肪提取液(苯:石油醚 = 1: 1) 1 mL 提取 5 min, 0. 5 mol · L⁻¹ 甲醇钠 1. 5 mL 常温下甲酯化 7 min, 加 2 mL 饱和 NaCl 静置分层,吸取上清液即可进行 GC 分析。

改进的方法与传统方法相比具有以下优点:1、改进的方法需要的样品量很少,可达到微量检测。传统方法需要的样品量一般为 0. 2 ~ 2. 0 g,需要用整粒或几粒的大豆种子,这就产生了留种与检测分析的矛盾,而改进的方法只需在种子上切下很小一

部分就可满足检测的需要,种子的剩余部分可照常育苗,这样就可以在材料较少的低世代进行检测分析。2、极大的缩短了处理时间。用传统方法需要近10 h的工作,而改进后的方法只需要12 min就可以完成,使繁琐的工作变得简单。3、改进的方法节约了大量的人力、物力。传统方法步骤多、耗时长,需要使用更多试剂,同时也需要更多的人员参与。改进的方法还减少了索氏提取器和加热回流设备的购置。鉴于脂肪酸分析的相似性,改进的方法有望在其它作物或材料上推广使用。

参考文献

- [1] 王晓燕,张彩英,贾晓艳. 河北省大豆品种脂肪酸组成与含量分析[J]. 河北农业大学学报,2007,30(2):15-18. (Wang X Y, Zhang C Y, Jia X Y. Analysis of fatty acids composition and content in soybean varieties in Hebei province[J]. Journal of Agricultural University of Hebei,2007,30(2):15-18.)
- [2] 赵迺新,李淑贞,陈霞,等. 黑龙江省大豆品种脂肪酸组成的研究[J]. 大豆科学,1988,7(4):327-332. (Zhao N X, Li S Z, Chen X, et al. Study on the component of fatty acid of soybean cultivars in Heilongjiang province[J]. Soybean Science,1988,7(4):327-332.)
- [3] 丁小丽,李雪娟. 党参蜂花粉脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 江西农业学报,2007,19(5):123-124. (Ding X L, Li X J. Analysis of fatty acids in codonopsis pilosula pollen by GC-MS[J]. Acta Agriculture Jiangxi,2007,19(5):123-124.)
- [4] 潘建国,郑尧隆,段怡,等. 山楂蜂花粉中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 中国野生植物资源,2004,23(5):45-47. (Pan J G, Zheng X L, Duan Y. Analysis of the fatty acids in hawthorn pollen by GC-MS[J]. Chinese Wild Plant Resources,2004,23(5):45-47.)
- [5] 崔昌浩,田晶,徐龙权. 气相色谱法在检测细胞脂肪酸及菌种鉴定中的应用[J]. 大连轻工业学院学报,2007,26(2):104-107. (Cui C H, Tian J, Xu L Q. Application of gas chromatography in identification of bacteria by analyzing fatty acid in cells[J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry,2007,26(2):104-107.)
- [6] 王宁惠. 油菜籽中脂肪酸含量的气相色谱分析[J]. 青海农林科技,2006,4:35-36. (Wang N H. Analysis on fatty acid content by gas chromatographic in rapeseeds[J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry,2006,4:35-36.)
- [7] 王秋红,陈亮,林营志,等. 福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究[J]. 中国农业科学,2007,40(8):1675-1687. (Wang Q H, Chen L, Lin Y Z, et al. Polymorphism of fatty acid of Ralstonia solanacearum in Fujian province[J]. Scientia Agricultura Sinica,2007,40(8):1675-1687.)
- [8] 姜贵全,牛佳牧,方桂珍. 吉林地区山葡萄籽中活性成分及脂肪酸组成的比较研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(23):6096-6097. (Jiang G Q, Niu J M, Fang G Z. Contrasting study on reactive component and fatty acid in wild crape seed grown in Jilin[J]. Journal of Anhui Agricultural Science,2006,34(23):6096-6097.)
- [9] Susana Casal, Beatriz Oliveira. Fatty acids analysis by gas chromatography[J]. Encyclopedia of Chromatography, 2007, 2:1-15.
- [10] Wang X, Yao J, Yu Z. GC-MS determination of fatty acids in arachidonic acid high-yield strain induced by low-energy ion implantation[J]. Chem. Pap,2005,59(4):240-243.
- [11] 邢晓燕,回瑞华,侯冬岩,等. 几种稻米中脂肪酸的研究[J]. 鞍山师范学院学报,2006,8(4):43-45. (Xing X Y, Hui R H, Hou D Y, et al. Studies on fatty acid of several rice[J]. Journal of Anshan Normal University,2006,8(4):43-45.)
- [12] 李红娟,牛立新,李章念,等. 不同栽培方式卷丹鳞茎挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(3):149-152. (Li H J, Niu L X, Li Z N, et al. GC-MS analysis of the composition of the volatile oil from the bulbs of L. lancifolium Thunb. with different cultivated modes[J]. Journal of Northwest Agriculture and Forest University (Nat. Sci. Ed),2007,35(3):149-152.)
- [13] 张国武,阙龙善,赖笋芽,等. 6个油茶优良无性系种子脂肪酸组分与含量分析[J]. 江西科学,2007,25(1):33-36. (Zhang G W, Que L S, Lai S Y. Fatty acid composition and contents in the seeds of six oil tea superior clones species[J]. Jiangxi Science,2007,25(1):33-36.)
- [14] 胡居吾,范青生,肖小年. 茵草灵芝孢子油与段木灵芝孢子油中脂肪酸组成的比较研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:606-608. (Hu J W, Fan Q S, Xiao X N. Comparison of fatty acid component in grass-cultivated ganoderma lucidum spores oil and tree-cultivated ganoderma lucidums spores oil[J]. Natural Production Research Development,2006,18:606-608.)
- [15] 宋文东,郭先霞,奚日立. 红树植物红海榄脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(5):447-449. (Song W D, Guo X X, Xi R L. GC-MS analysis of fatty acids in mangrove plant rhizophora stylosa[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany,2007,15(5):447-449.)
- [16] Kowalski R. GC analysis of changes in the fatty acid composition of sunflower and olive oils heated with quercetin caffeic acid, protocatechuic acid, and butylated hydroxyanisole[J]. Acta Chromatographica,2007,18:15-23.
- [17] 袁晓,袁蓁. 楮实子油的化学成分及含量分析[J]. 植物资源与环境学报,2005,14(1):54-55. (Yuan X, Yuan P. Analysis on chemical constituents and contents of oil from broussonetia papyrifera fruits[J]. Journal of Plant Resources and Environment,2005,14(1):54-55.)