

大豆脂肪酸组分的快速气相色谱分析

苗兴芬^{1,2}, 朱命喜¹, 徐文平², 申宏波², 杜升伟¹, 裴宇峰³, 陈庆山¹, 胡国华^{1,3}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江农业职业技术学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 黑龙江农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:探讨了大豆脂肪酸快速气相色谱分析方法, 不需从原料中提取脂质, 直接将磨碎原料中的脂质皂化、甲酯化后, 利用色谱柱 HP519091J-413, 进行气相色谱分析。结果表明: 软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸的出峰时间依次为 6.57、7.83、8.73、8.86、9.06 min。这种方法的优点是快速、操作方便、节省药品; 即使在较低的杂交世代样品很少, 用普通法不易提取脂质时, 此法也能顺利地完成分析工作。

关键词:大豆; 脂肪酸; 气相色谱分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0358-03

Rapid Determination on Fatty Acids Content by Gas Chromatography in Soybean

MIAO Xing-fen^{1,2}, ZHU Ming-xi¹, XU Wen-ping², SHEN Hong-bo², DU Sheng-wei¹, PEI Yu-feng³, CHEN Qing-shan¹, HU Guo-hua^{1,3}

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Heilongjiang Agriculture College of Vocational Technology, Jimusi 154007; 3. Land Reclamation Research & Breeding Centre of Heilongjiang, Harbin 150090, Heilongjiang, China)

Abstract: This paper discussed the rapid determination on fatty acids content by gas chromatography in soybean, which just saponificate and Methyl esterificate the lipids from grinding soybean seeds directly without having to extract lipids from soybean, then get the gas chromatography determination by chromatography column HP519091J-413. The time of peak value of palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid was 6.57, 7.83, 8.73, 8.86, 9.06 min, respectively. The method proved to be time and material saving, and easy to operate. The method also helpful for soybean acids determination in early generation for it only needs few samples.

Key words: Soybean; Fatty acids; Gas chromatography

大豆油脂是由脂肪酸和甘油组成, 其中脂肪酸占油脂总量的 90% 以上, 是油脂的主要成分。大豆油脂的特性与其所含饱和脂肪酸的组成与配比有关。大豆油脂饱和脂肪酸中所含的亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)是哺乳动物自身不能合成的, 该重要营养物质必须从植物油脂中获得^[1]。大豆是亚油酸含量较高的油用作物, 可防止血清中胆固醇的增加和沉积, 软化血管, 对防治高血压和心血管疾病均有重要作用。亚麻酸对维持细胞膜的稳定性和调节细胞膜适应性具有极其重要的生物学意义。大豆脂肪酸均采用色谱分析法测定, 但不同研究者所采用的进样样品前处理方法和酯化试剂不同。前人分析大豆脂肪酸组分, 通常采用索氏抽提法或二氧化碳临界萃取法先提取脂肪^[2-8], 提取脂肪要浪费大量的时间, 提取脂肪后再使用有机溶剂溶解脂肪。现对 Susana 等^[9]方法进行了改进, 将磨碎原料中的脂质不进行提取直接用正己烷溶

解浸提, 取上清甲酯化, 采用醇钾作为甲酯化试剂, 酯化反应速度快并酯化完全, 甲酯化后离心取上清用 HP5 色谱柱进行 GC 分析, 获得了一种快速检测大豆脂肪酸组分的气相色谱分析法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Agilent6890 气相色谱仪, 购于安捷伦公司。

标准品: 软脂酸(>99%)、硬脂酸(>99%)、亚油酸、油酸、亚麻酸(>99.3%, 购于美国 Sigma 公司)。

试剂: 正己烷(>97%, AR) 甲醇(>99.7%, GR) 购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 甲酯化试剂制备

取分析纯氢氧化钾 2.244 g 放入带磨口的棕色试剂瓶中, 取 100 mL 甲醇沿玻璃棒注入试剂瓶中,

收稿日期: 2009-08-09

基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目(115350033)。

作者简介: 苗兴芬(1975-), 女, 副教授, 在职博士, 研究方向大豆育种与生物技术。E-mail: hnzymxf@126.com。

通讯作者: 陈庆山, 教授。E-mail: qshchen@sohu.com; 胡国华, 研究员。E-mail: hugh757@vip.163.com。

用玻璃棒搅拌 3 min,在室温下反应 2 h 后,待用,如不用立即放于 4℃ 冰箱中保存,可使用 3 d。

1.3 样品处理

称取 0.33 g 已粉碎的大豆样品于 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL 正己烷,充分振摇 0.5 min,室温放置 5 h,然后将上清液移入另一只 1.5 mL 离心管中,在上清离心管加入已配好的 0.5 mL 甲酯化试剂进行甲酯化反应,振荡 2 min,在室温下反应 1 h。移上清,在 6 000 r · min⁻¹ 离心机离心 5 min,然后上清进样 GC 分析。

1.4 GC 分析条件

色谱柱 HP519091J-413 (30m × 320μm × 0.25μm);进样量 1μL,分流进样方式,分流比 50:1;进样口温度:220℃;载气:Ne,45 mL · min⁻¹;氢气:40 mL · min⁻¹;空气 450mL · min⁻¹。程序升温:150℃ 下保持 1 min,然后以 20℃ · min⁻¹ 的速率升至 200℃,保持 3 min,再以 10℃ · min⁻¹ 的速率升至 250℃,保持 2 min。检测器:氢火焰离子检测器(FID),检测器温度恒温 275℃。

2 结果与分析

2.1 与传统方法比较

运用毛细管气相色谱进行分离,经甲酯化的脂肪酸成分,通过色谱数据工作站 6890,利用峰面积归一化法,测得各化学组分在脂肪酸中的百分含量。该方法快速、操作方便、节省药品;即使在较低的杂交世代样品很少,用普通法不易提取脂质时,此法也能顺利地地完成分析工作,与其它方法的区别见表 1。

表 1 快速分析方法与其他方法比较

Table 1 Comparison on rapid determination and other methods			
	快速分析方法 Rapid determination	索氏抽提法 Soxhlet extraction method	CO ₂ 超临界 萃取法 Supercritical CO ₂ extraction
样品量 Sample quantity	0.33 g 豆粉	0.1 g 油样, 至少 2 g 豆样	0.1 g 油样,至 少 2 g 豆样
前处理 Previous process	磨碎,正烷浸 提 5 h	磨碎,抽油 8 h,有机溶剂 溶解	磨碎,萃取油 8 h,有机溶剂 溶解
色谱柱 GC Columns	HP519091J-413 (30m × 320μm × 0.25μm)	FFAP 弹性石英毛细管柱	
GC 分析时间 GC time	10 min	15 ~ 35min	

2.2 主要脂肪酸测定结果

大豆籽粒中主要含有 5 种脂肪酸,按出峰顺序依次是软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸(图

1)。从大豆样品脂肪酸色谱图(图 2)中可以看到,整个色谱分析时间 10 min 就可以完成,软脂酸的出峰保留时间为 6.57min,硬脂酸为 7.83 min,油酸为 8.73 min,亚油酸为 8.86 min,亚麻酸为 9.06 min。出峰时间非常稳定,1 054 次分析中出峰时间结果一致,与王晓燕等^[7]相比出峰时间早了 10 min。

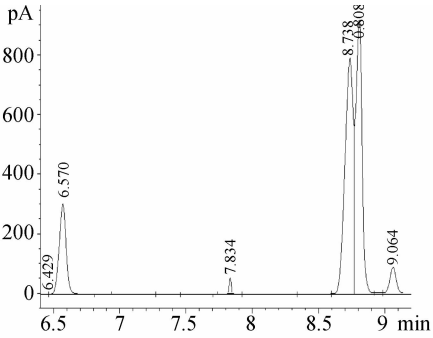


图 1 大豆脂肪酸标准品气相色谱图

Fig. 1 GC graph of standard sample fatty acids

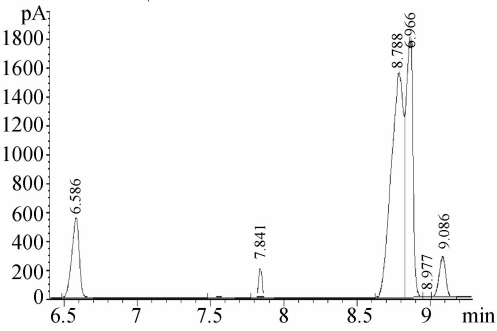


图 2 大豆脂肪酸样品气相色谱图

Fig. 2 GC graph of testing sample fatty acid from soybean

2.3 精密度分析

对同一样品进行了 5 次分析,变异系数很小(表 2),表明该方法精密度高,多次分析重现性好。

表 2 大豆同一样品 5 种脂肪酸含量测定结果

Table 2 Five fatty acids content of soybean				
序号 Serial number	软脂酸 Palmitic	硬脂酸 Stearic	油酸 Oleic	亚油酸 Linoleic
1	9.64	2.19	25.71	54.01
2	9.48	2.09	25.28	54.40
3	9.52	2.12	25.51	54.23
4	9.59	2.14	25.43	54.22
5	9.55	2.16	25.44	54.25
平均 Mean	9.56	2.14	25.47	54.22
标准差 MS	0.06	0.04	0.16	0.14
变异系数 CV/%	0.65	1.78	0.61	0.26

3 讨论

建立了一种脂肪酸快速分析方法,该方法需要的样品量少,因此适合在较低的杂交世代分析脂肪

酸含量,实现特异脂肪酸含量的低世代选择,提高育种效率。采用醇钾作为甲酯化试剂,酯化反应快速且完全。但是甲酯化试剂需要现用现配,甲酯化试剂只能使用 3 d,超过 3 d 的试剂起不到酯化的效果,无法检出脂酸甲酯。结果发现,当甲酯化超过 20 h 时,样品的检出效果不好,得到的峰值偏低。因此,在做大量样品分析时,需要分批量做样品前处理,每次甲酯化 20 份左右材料为宜,以免甲酯化超过 20 h 导致检测结果不准确。

参考文献

- [1] 徐杰,胡国华,张大勇. 大豆籽粒发育过程中脂肪酸组分的累积动态[J]. 作物学报,2006,32(11):1759-1763. (Xu J, Hu G H, Zhang D Y. Dynamic accumulation of fatty acids in grain maturing process of soybean [J], Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(11):1759-1763.)
 - [2] 张学杰,程传格,李法曾. 蜀葵种油的脂肪酸组成分析[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(3): 58-59. (Zhang X J, Cheng C G, Lin F Z. Analysis of fatty acid constituents in seed oil of *Althaea rosea* [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2003, 12(3): 58-59.)
 - [3] 王宇惠. 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.)
 - [4] 于海芹,张天柱,魏春雁,等. 3 种碱蓬属植物种子含油量及其脂肪酸组成研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2077-2082. (Yu H Q, Zhang T Z, Wei C Y, et al. Fat contents and fatty acid composition in the seed of three species of *Suaeda* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(10):2077-2082.)
 - [5] 师治贤,刘梅,胡凤祖,等. 青藏茶子种子中的脂肪酸含量分析[J], 西北植物学报, 2004, 24(1): 149-151. (Shi Z X, Liu M, Hu F Z, et al. Analysis on fatty acids in seeds of *Ribes qingzang* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(1): 149-151.)
 - [6] 邢晓燕,回瑞华,侯冬岩. 几种稻米中脂肪酸的研究[J]. 鞍山师范学院学报, 2006(4):43-45; (Xing X Y, Hui R H, Hou D Y. Studies on fatty acid of several rice [J]. Journal of Anshan Normal University, 2006(4):43-45.)
 - [7] 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 Hebei Agricultural University, 2007, 30(2):15-18.)
 - [8] 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.)
 - [9] Susana Casa L, Beatriz O Liveira. Fatty acids analysis by gas chromatography[J]. Encyclopedia of Chromatography, 2007(2): 1-15.
 - [10] 张颖君,高慧敏,蒋春志,等. 大豆种子脂肪酸含量的快速测定[J]. 大豆科学, 2008, 27(5):859-862. (Zhang Y J, Gao H M, Jiang C Z, et al. Fast analysis on fatty acids of soybean seed by gas chromatograph [J]. Soybean Science, 2008, 27(5):859-862.)
-
- (上接第 357 页)
- [9] 孙酉石,王淑英,王玉芝,等. 回归旋转组合设计方法在玉米模式化栽培研究中的应用[J]. 吉林农业大学学报, 1989, 11(3):10-13. (Sun Y S, Wang S Y, Wang Y Z, et al. The utilization of regression rotation combination design method in modeled corn culture [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1989, 11(3):10-13.)
 - [10] 涂前程,罗英. 玉米闽单 88 高产制种综合农艺措施的数学模型[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(3):274-278. (Tu Q C, Lou Y. A mathematical model of composite agronomic measures for high-yielding seed production of corn Mindan 88 [J]. Journal of Fujian Agricultural University, 1999, 28(3):10-13.)
 - [11] 刘金印,张恒善,王大秋. 大豆种植密度和群体结构指标的研究[J]. 大豆科学, 1987, 6(1):1-10. (Liu J Y, Zhang H S, Wang D Q. Studies on soybean plant density and its index of population structure [J]. Soybean Science, 1987, 6(1):1-10.)
 - [12] 王继安,徐杰,宁海龙,等. 施用大、中、微量元素对大豆品质及其它性状的影响[J]. 大豆科学, 2003, 22(4): 273-277. (Wang X A, Xiu J, Ning H L, et al. Effects on soybean protein and oil content and other characteristics by application of major, middle and minor element in soil [J]. Soybean Science, 2003, 22(4):273-277.)
 - [13] 郭庆元,李志玉,涂学文. 大豆高产优质施肥研究与应用[J]. 中国农学通报, 2003, 19(3): 89-104. (Guo Q Y, Li Z Y, Tu X W. Studing and application of fertilization techniques for High-yield and good quality in Soybean [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2003, 19(3): 89-104.)