

畜禽产品中游离脂肪酸的快速检测方法

冯潇慧¹, 孟庆石¹, 杨悠悠¹, 刘娜¹, 饶正华^{1,*}

(1. 农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 作为影响畜产品品质的重要因素, 脂肪酸尤其是游离脂肪酸与畜产品营养价值密切相关。常见的脂肪酸检测方法包含气相色谱法和气相-质谱分析方法, 该方法适用于检测总脂肪酸(游离和结合脂肪酸), 且前处理方法复杂。为克服上述方法的缺陷, 将化学衍生法与超高效液相色谱-串联三重四级杆结合开发畜禽产品中的游离脂肪酸的检测方法, 采用柱温箱为 45 °C; 流动相 A 和 B 分别为水和乙腈, 流动相中均含千分之一甲酸; 检测流速为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。采用该方法检测脂肪酸在 1-500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的范围内具有良好的线性范围, 相关系数大于 0.99, 方法检出限为 0.2-2.3 ng/L , 定量限为 1.0-5.3 ng/L , 精密度在 1.07-3.53% 范围内, 满足畜禽产品中游离脂肪酸的检测需求。

关键词: 游离脂肪酸, 畜禽产品, 超高效液相色谱-串联质谱, 化学衍生法

中图分类号: S-3

文献标识码: B

Analysis of free fatty acid with high sensitivity and specificity in livestock product

Feng Xiaohui¹, Meng Qingshi, Yang Youyou¹, Liu Na¹, Rao Zhenghua^{1*}

(1. Institute of Animal Sciences of CAAS, 100193, Beijing, China)

Abstract: As one of major factors influencing the quality of livestock products, fatty acids, especially free fatty acids, are closely related to the nutrition of livestock products. In this paper, free fatty acid was analyzed based on chemical derivatization method using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrum. The derivatized analysts were separated using an Agilent Eclipse Plus C8 RRHD 1.8 μm (2.1 \times 100 mm, pore size 95 \AA) with a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. The column temperature was set at 45 °C. The mobile phase A was water while the mobile phase B was acetonitrile. Both mobile phase A and B contain 0.1% formic acid. The limit of detection was 0.2-2.3 ng/L while the limit of quantitation was 1.0-5.3 ng/L with RSD lower than 5% which satisfied the requirement of quantifying free fatty acid in livestock products.

Keywords: free fatty acids, livestock product, high performance liquid chromatography coupled

with mass spectrum, chemical derivatization.

随着对健康和美好生活的追求提升,人们对畜产品品质提出更高要求。农村农业部《“十四五”全国农产品质量安全提升规划》指出,加强品质研究,推动品种培优、品质提升,品牌打造和标准化生产,提高农业质量效益和竞争力。而畜禽产品中的游离脂肪酸正与营养价值密切相关。

脂肪酸是含有羧酸官能团的长链烃类化合物,按照碳链的长度分为短链脂肪酸(C4-C6),中链脂肪酸(C6-C12)和长链脂肪酸(碳数大于12)。按照双键数量可以划分为饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸(含有一个碳碳双键)和多不饱和脂肪(含有两个或多个碳碳双键)。脂肪酸具有提供能量,维持肠道完整性,调节肠道微生物、脂质代谢和免疫功能的作用^[1-4]。在畜禽肉中,脂肪酸以结合和游离两种形式存在,结合型脂肪酸存在于中性酯、磷脂和糖脂等各种脂质成分中;游离脂肪酸在机体中通过脂肪酶水解脂质获得,其中不饱和脂肪酸在食品风味的形成过程中起到的不同作用^[5]。目前,常见的脂肪酸的检测方法包含气相色谱分析-火焰离子化检测器(GC-FID)和气质分析方法(GC-MS)^[6],其中GC-FID在顺、反式不饱和双键的位置异构体的检测中有部分重叠且洗脱时间较长的缺陷^[7];而气质检测方法将质谱仪作为检测器,可对气相色谱柱上重叠组分进行质谱定量,在一定程度上弥补GC-FID方法的不足,但上述两个方法的前处理方法均是甲酯化的方法^[8,9],适用于检测总脂肪酸(游离型和结合型)。

本文建立了化学衍生法结合液质联用的方法检测畜禽产品中的游离脂肪酸,通过优化色谱和质谱条件,分别用癸酸、十二烷酸、十四烷酸、十六烷酸、十八烷酸为饱和脂肪酸标准品代表,油酸为单不饱和脂肪酸标准品代表,亚油酸和亚麻酸为多不饱和脂肪的代表标准品,来验证方法的线性关系、检出限、定量限和精密度,该方法适用于畜禽产品中游离脂肪酸的检测,为畜产品品质研究提供理论支撑。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-三重四级杆(Agilent 1290-AB SCIEX 6500),组织研磨仪(净信研磨仪),离心机(Eppendorf, 5910R)。

超纯水(屈臣氏),乙腈(色谱纯),甲酸(色谱纯),癸酸、十二烷酸、十四烷酸、十六烷酸、十八烷酸、油酸、亚油酸和亚麻酸的标准品(安谱, 100 µg/mL),1-羟基-7-偶氮苯

并三氮唑,1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐, N,N-二甲基甲酰胺,肉样品 (购于市场), 衍生剂由本实验室自主合成^[10]。

1.2 仪器条件

1.2.1 液相色谱条件

色谱柱:安捷伦 C8 RRHD Eclipse Plus C8 (2.1x100 mm, 1.8 μ m),柱温: 40 $^{\circ}$ C,流速: 300 μ L/min; 以含有千分之一甲酸的纯水为流动相 A,以含有千分之一甲酸的乙腈为流动相 B,按照表 1 进行梯度洗脱。

表 1 流动相梯度

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	70	30
1.5	40	60
15.0	0	100
18.0	0	100
18.1	70	30
20.0	70	30

1.2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源正离子模式 (ESI⁺), 检测方式为动态多反应检测 (MRM)。参数设置, 电喷雾电压 5500 V, 离子源温度 500 $^{\circ}$ C,帘气为 30 psi, 去簇电压 80 eV; MRM 检测参数表如表 2

表 2 衍生后脂肪酸 MRM 表

化合物	母离子 m/z (Da)	子离子 m/z(Da)	碰撞能量 (V)
癸酸 (C10:0)	342.243	128.050	40
十一烷酸 (C11:0)	356.258	128.050	40
十二烷酸 (C12:0)	370.273	128.050	40
十三烷酸 (C13:0)	384.289	128.050	40
十四烷酸 (C14:0)	398.305	128.050	40
十六烷酸 (C16:0)	426.336	128.050	40
十八烷酸 (C18:0)	454.367	128.050	40

油酸 (C18:1)	452.352	128.050	40
亚油酸 (C18:2)	450.317	128.050	40
亚麻酸 (C18:3)	448.294	128.050	40

1.3 样品前处理

取 20 mg 肉样品放入离心管 (2.0 mL), 加入 1 mL 乙腈和 1 颗 5 mm 钢珠, 放入组织研磨仪在 4 °C, 60 Hz 匀浆 60 s。样品放在 4 °C、14000 rpm 离心 15 分钟取上清。

1.4 样品中脂肪酸衍生

取 50 μL 的上述提取液体放入 1.5 mL 离心管 (Eppendorf), 加入 50 μL 的衍生液 (含 20 mM 衍生剂, 750 mM 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和 15 mM 的 1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑)。在常温条件下孵育 30 分钟后, 再加入 10 μL 的千分之一甲酸孵育 30 分钟, 真空旋干, 加入 1 mL 乙腈溶液重转移至进样小瓶中待测

2 结果与讨论

2.1 衍生原理

衍生剂异噻啉-1-酰肼中胺根与脂肪酸的羧酸在 1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的催化作用下生成酰胺键, 反应原理如图 1 所示

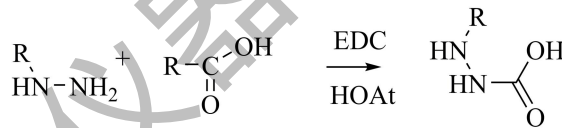


图 1 衍生剂的衍生原理

2.2 方法的标准曲线

线性范围的考察是通过 8 个校准点质量浓度 (分别为 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μg/L) 进行线性拟合, 并得到相关系数。脂肪酸在线性范围为 1-500 μg/L 时, 相关系数大于 0.9992, 结果如图 2 所示

2.3 方法检出限和定量限

信噪比 (S/N) 接近 3 时的浓度确定为方法的检出限 (LOD), 使用信噪比 (S/N) 接近 10 时的浓度确定为方法的定量限 (LOQ)。方法的检出限在 0.2-2.3 ng/L, 定量限在 1.0-5.3 ng/L, 结果如表 3 所示。

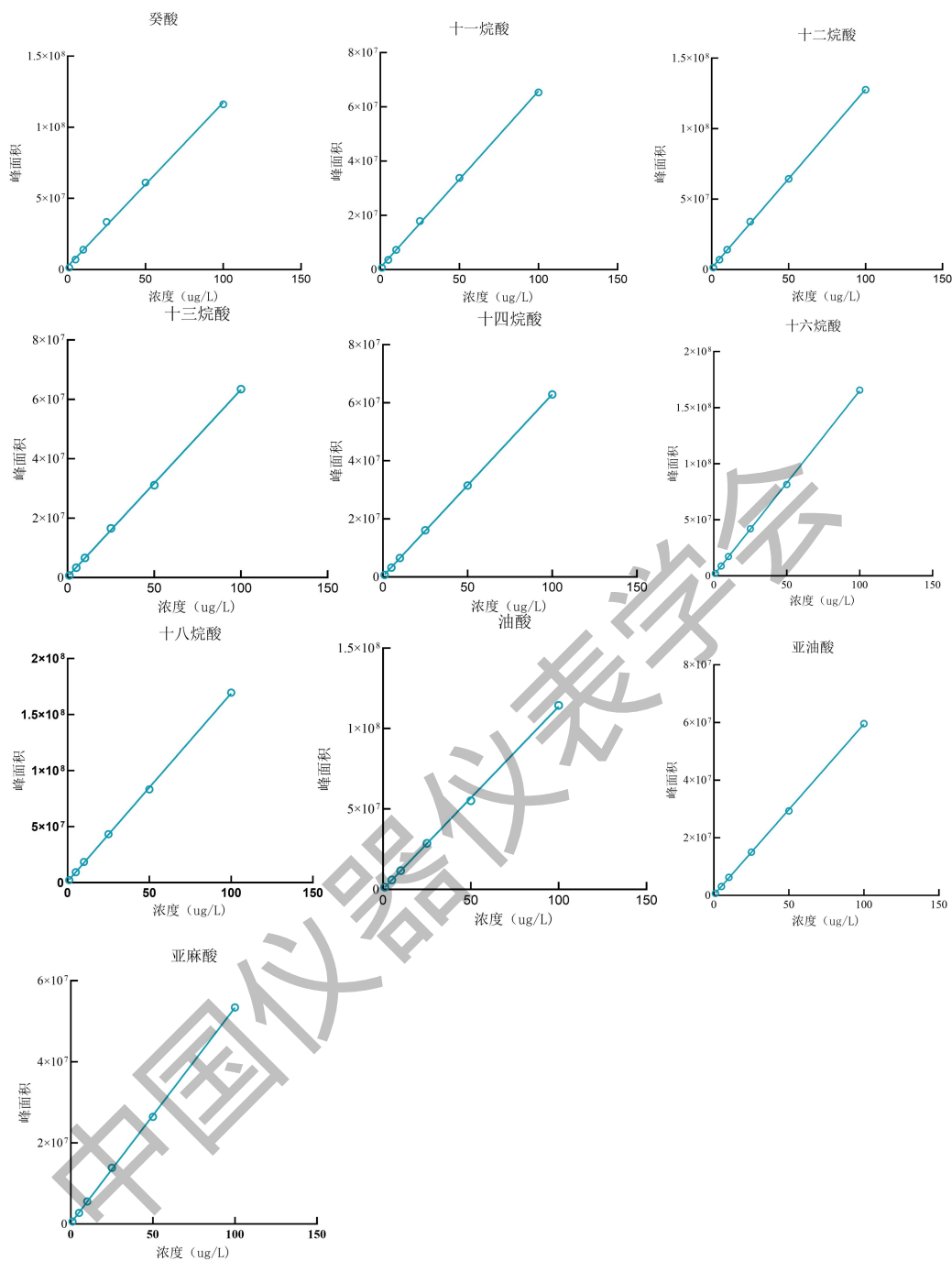


图 2 脂肪酸的线性拟合图

2.4 方法精密度

精密度分别考察三个肉样品经提取并衍生，每个样品平行三次重复后 RSD 小于 5%，结果如表 3 所示。

表 3 脂肪酸的线性关系、相关系数、线性范围、检出限、定量限和精密度

化合物	标准曲线	相关系数	线性范围	检出限	定量限 (ng/L)	精密度 (%)

			($\mu\text{g/L}$)	(ng/L)		
癸酸 (C10:0)	$Y=1.1518e^6x+2.2029e^6$	0.9992	1-500	0.5	2.0	2.90
十一烷酸 (C11:0)	$Y=6.5086e^5x+7.2812e^5$	0.9968	1-500	1.5	5.0	2.39
十二烷酸 (C12:0)	$Y=1.2674e^6x+2.2684e^5$	0.9999	1-500	1.0	3.5	2.72
十三烷酸 (C13:0)	$Y=6.3033e^5x+1.85592e^5$	0.9999	1-500	1.6	5.3	1.80
十四烷酸 (C14:0)	$Y=6.2701e^5x+1.85592e^5$	0.9999	1-500	1.6	5.3	1.07
十六烷酸 (C16:0)	$Y=1.6455e^6x+5.2864e^5$	0.9999	1-500	0.9	3.1	2.75
十八烷酸 (C18:0)	$Y=1.6805e^6x+8.3147e^5$	0.9999	1-500	0.2	1.0	2.18
油酸 (C18:1)	$Y=1.1358e^6x+6.2365e^4$	0.9999	1-500	1.1	3.3	3.53
亚油酸 (C18:2)	$Y=5.9276e^5x+1.4621e^5$	0.9999	1-500	2.3	8.0	2.70
亚麻酸 (C18:3)	$Y=5.3161e^5x+1.8757e^5$	0.9999	1-500	0.5	2.0	1.39

3 结论

本文建立了一种使用高效液相色谱-质谱仪对不同畜禽肉中游离脂肪酸进行定性和定量的检测方法，本方法检测时间短，灵敏度高，可用于畜禽产品中游离脂肪酸的快速检测。

参考文献:

- [1]Yuan T., Wang L., Jin J., et al., Role Medium-Chain Fatty Acids in the Lipid Metabolism of Infants[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022. 9: 1-7.
- [2]Nonaka H., Ohue-Kitano R., Masujima Y., et al., Dietary Medium-Chain Triglyceride Decanoate Affects Glucose Homeostasis Through GPR84-Mediated GLP-1 Secretion in Mice [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022. 9.
- [3]Garidou L., Pomié C., Klopp P., et al., The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells

- Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease[J]. *Cell Metabolism*, 2015. 22(1): 100-112.
- [4]De Carvalho C.C.C.R. and Caramujo M.J., The Various Roles of Fatty Acids[J]. *Molecules*, 2018. 23(10): 2583.
- [5]Yu Y., Wang G., Yin X., et al., Effects of different cooking methods on free fatty acid profile, water-soluble compounds and flavor compounds in Chinese Piao chicken meat[J]. *Food Research International*, 2021. 149: 110696.
- [6]Sardenne F., Puccinelli E., Vagner M., et al., Post-mortem storage conditions and cooking methods affect long-chain omega-3 fatty acid content in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*)[J]. *Food Chemistry*, 2021. 359: 129828.
- [7]Xiang L., Zhu L., Huang Y., et al., Application of Derivatization in Fatty Acids and Fatty Acyls Detection: Mass Spectrometry-Based Targeted Lipidomics[J]. *Small Methods*, 2020. 4(8): 2000160.
- [8]Rydlewski A.A., Manin L.P., Pizzo J.S., et al., Lipid profile by direct infusion ESI-MS and fatty acid composition by GC-FID in human milk: Association with nutritional status of donors[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021. 100: 103797.
- [9]Badertscher R., Blaser C., and Noth P., Validated method for the determination of free volatile carboxylic acids in cheese and bacterial cultures by GC-FID after esterification in aqueous extract and headspace injection[J]. *Food Chemistry*, 2023. 398: 133932.
- [10]Feng X., Tang Z., Chen B., et al., A high-efficiency quantitation method for fatty aldehyde based on chemical isotope-tagged derivatisation[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022. 107: 104381.