

食品中硬脂酸的测定

吴云辉¹, 李云露^{2,3}, 徐敦明^{2,3*}

(1. 厦门海洋职业技术学院, 厦门 361100; 2. 厦门出入境检验检疫局, 厦门 361026;
3. 集美大学, 厦门 361021)

摘要: **目的** 建立两种食品中硬脂酸含量测定的方法, 以了解食品中硬脂酸的含量, 并对两种测定方法进行比较。**方法** 样品经提取脂肪后进行甲酯化衍生, 采用气相色谱法(GC)和气相色谱串联质谱法(GC-MS)进行定量分析。**结果** GC法和GC-MS法分别在5~500 mg/L和0.05~1 mg/mL范围内线性良好, 相关系数 R^2 大于0.99。GC法通过扣除本底值的方法, 在1.0、1.2和1.5 mg/kg三个添加浓度上回收率范围为77.6%~93.8%, 相对标准偏差小于12%, 方法检出限和定量限分别为3.3 mg/kg和10.0 mg/kg。GC-MS法在0.2、0.25和0.3 mg/kg三个添加浓度上回收率范围为83.8%~102.9%, 相对标准偏差小于10%, 方法检出限和定量限分别为0.06 mg/kg和0.2 mg/kg。两方法测定的结果经计算线性回归, 相关系数为0.9949, 两结果不存在显著差异。**结论** 两种方法重复性好, 灵敏度满足国内外对食品中硬脂酸的检测要求, 可用于大量样品的定量分析。

关键词: 食品; 气相色谱法; 气相色谱串联质谱法; 硬脂酸

Determination of stearic acid in foodstuffs

WU Yun-Hui¹, LI Yun-Lu^{2,3}, XU Dun-Ming^{2,3*}

(1. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China; 2. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China; 3. Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: Objective Two methods for the determination of stearic acid were developed in order to realize the content of stearic acid in foodstuffs. **Methods** Samples were determined by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry after extracting the fat and methyl esterifying. **Results** The method of GC showed the recoveries of stearic acid were between 77.6% and 93.8% with the relative standard deviations (RSDs) less than 12% at three spiked levels of 1.0, 1.2 and 1.5 mg/kg. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 3.3 mg/kg and 10.0 mg/kg respectively. The method of GC-MS showed the recoveries of stearic acid were between 83.8% and 102.9% with RSDs less than 10% at three spiked levels of 0.2, 0.25 and 0.3 mg/kg. The LOD and the LOQ were 0.06 mg/kg and 0.2 mg/kg. The correlation coefficient was 0.9949 through regression test to the results of the two methods. Therefore, there was no significant difference between the two results. **Conclusion** The repeatability and sensitivity satisfies the requirement of stearic acid in food detection and can be used in a large number of samples for quantitative analysis.

KEY WORDS: food; gas chromatography; gas chromatography-mass spectrometry; stearic acid

基金项目: 国家质检总局科技项目(2012IK154)、厦门市科技计划项目(3502Z20125029)

Fund: Supported by the State Quality Inspection Administration of Science and Technology Project (2012IK154) and the Xiamen City Science and Technology Project (3502Z20125029)

*通讯作者: 徐敦明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全研究与检测。E-mail: Xudm@xmciq.gov.cn

*Corresponding author: XU Dun-Ming, Researcher, Technical Center of Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No. 2165, Jiangang Road, Haicang District, Xiamen 361026, China. E-mail: Xudm@xmciq.gov.cn

1 引言

被膜剂是一种重要的食品添加剂, 它指的是涂抹在食品表面, 上光、保质、保鲜、防止水分蒸发等作用的物质, 它可以分为水溶性和水不溶性两种^[1]。列入 GB2760-2011 中的被膜剂都经过了安全性评价, 按照规定使用不会造成伤害, 它们主要用于水果、蔬菜、软糖、鸡蛋等食品的保鲜^[2]。硬脂酸是食品被膜剂中的一种, 同时也是一种饱和脂肪酸, 别名十八烷酸, 是白色至微黄色、稍有光泽的结晶性硬质固体, 它不溶于水, 可以溶于乙醇、氯仿、乙醚、石油醚等有机溶剂^[3]。硬脂酸可以添加在可可制品、巧克力和巧克力制品以及糖果中, 最大使用量为 1.2 g/kg^[4]。目前, 硬脂酸的测定方法主要有气相色谱法(gas chromatograph, GC)^[5], 吸附分离法^[6], 热压片法^[7], 高效液相色谱串联质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometer, HPLC-MS)^[8], 薄层扫描法^[9]。有关食品中硬脂酸的测定方法研究报道很少, 刘飞报道了气相色谱法同时测定食品中 34 种脂肪酸^[10], 本文采用气相色谱和气相色谱质谱联用技术, 以建立一种食品中的硬脂酸的测定方法。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Agilent 7890 气相色谱仪(美国 Agilent 公司), 配氢火焰离子化检测器(FID); Agilent 7890A/7000A 气相色谱-三重四级杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司); 分析天平(0.1 mg, 德国赛多利斯公司); 高速离心机(Anke 上海安亭科学仪器厂); Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司); 旋转蒸发器(EYELA SB-1000); 恒温水浴槽(Julabo TW 20, 厦门德维科技有限公司); 涡旋振荡器(IKA MS1, 德国), 氮气浓缩仪(Turbo Vap LV, 美国 Caliper Life Sciences 公司); GM200 刀式混合碾磨仪(德国 Retsh 公司)。

石油醚(C_nH_{2n+2})(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 正己烷(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司)。

1 mol/L 氢氧化钾甲醇溶液: 称取 5.6 g 氢氧化钾, 用甲醇溶解, 并稀释定容至 100 mL, 混匀待用。

饱和 NaCl 溶液: 称取 36.5 g 的 NaCl 固体, 加 100 mL 超纯水。

硬脂酸标准品(纯度 $\geq 98.5\%$, Dr.Ehrenstorfer, 德国)。

硬脂酸甲酯标准品(纯度 $\geq 98.5\%$, Dr.Ehrenstorfer, 德国)。

硬脂酸甲酯标准溶液: 准确称取一定量硬脂酸甲酯标准品, 用正己烷定容至 50 mL, 放入贮样瓶中, 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 前处理方法

2.2.1 可可制品、巧克力和巧克力制品前处理方法

脂肪的提取: 准确称取 0.30 g(精确到 0.1 mg)样品, 置于 250 mL 抽脂瓶中, 加入 50 mL 石油醚, 搅拌均匀, 放置过夜。取上清液至 250 mL 圆底烧瓶中。再将 30 mL 石油醚加入抽脂瓶中, 进行二次提取, 搅拌均匀, 放置 1 h, 转移上清液至圆底烧瓶。30 mL 石油醚加入抽脂瓶中, 重复二次提取过程, 进行三次提取。50 °C 旋转蒸发三次提取液, 至干。量取 5 mL 正己烷至圆底烧瓶, 待固体完全溶解, 转移至 20 mL 刻度试管中。

甲酯化: 加入 1 mol/L 的氢氧化钾甲醇溶液 2 mL, 至装有脂肪的试管中, 涡旋振荡混匀。40 °C 水浴衍生 30 min, 冷却至室温, 加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液, 涡旋混合 1 min, 静置。转移溶液至 50 mL 的离心管中, 4000 r/min 离心 10 min, 离心后取上层液至 20 mL 的刻度试管, 放入氮气浓缩仪中吹干。正己烷复溶析出物, 定容至 10 mL。取 1 mL 过 0.2 μ m 尼龙滤膜至 4 mL 离心管, 稀释 10 倍, 取 1 mL 至样品瓶, 待上机。

2.2.2 糖果样品的前处理方法

称取已粉碎糖果样品 0.30 g(精确到 0.1 mg), 置于 250 mL 的抽脂瓶中, 加入 65 °C 左右的水 10 mL, 振摇, 使样品完全分散^[11]。其余提取及甲酯化步骤同 2.2.1。但不同于甲酯化的过程: 稀释倍数 10 倍后, 再稀释 20 倍, 取 1 mL, 待上机。

2.3 测定条件

2.3.1 气相色谱检测法(GC)

色谱柱: Agilent HP-5(30 m \times 0.53 mm \times 0.25 μ m); 升温程序见表 1; 载气: 高纯氮气; 进样口温度: 280 °C; 检测器温度: 250 °C; 进样量: 1 μ L; 分流比: 不分流。

2.3.2 气相色谱-质谱联用法(GC-MS)

色谱柱: Agilent HP-5MS(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m); 升温程序见表 2; 进样口温度: 280 °C。

表1 升温梯度表
Table 1 Temperature gradient

速率(°C/min)	数值(°C)	保持时间(min)	运行时间(min)
初始值	120	3	3
阶升1	15	200	0.5
阶升2	5	280	10

表2 升温梯度
Table 2 Temperature gradient

速率(°C/min)	数值(°C)	保持时间(min)	运行时间(min)
初始值	120	3	3
阶升1	15	200	0.5
阶升2	5	280	5

质谱条件: 电离方式为电子轰击离子源模式(EI); 电子能量: 70 eV; 离子源温度为 230 °C; MS 传输线温度为 300 °C; 扫描范围(m/z): 50~320; 扫描方式: 选择性离子扫描(SIM), 特征离子有 298, 255, 143, 74, 其中 m/z 74 作为定量离子。

3 结果与讨论

3.1 提取方法的选择

从现有食品中脂肪酸检测标准和文献可知^[12], 脂肪酸的提取方法主要有酸水解-石油醚-乙醚提取法、碱水解-石油醚-乙醚提取法和直接提取法。前两种的前处理过程都很繁琐, 而采用石油醚浸泡过夜直接提取, 饱和脂肪酸的提取效率与酸提取法相当。由于本实验只有一种饱和脂肪酸, 故采用石油醚直接提取, 这样既省去了提取时由于步骤繁琐造成的回收率不理想, 也有效地避免了提取液中副产物的生成。

3.2 测定条件的优化

3.2.1 色谱柱的选择

一般来说脂肪酸的测定会选择脂肪酸专用柱, 如婴幼儿乳品和食品的脂肪酸专用测定柱 100%二氟丙基聚硅氧烷色谱柱 PC-2560 柱, 采用三氟化硼对油脂中脂肪酸进行甲酯化时会选择 CP-Sil88 或 DB-Wax 两种色谱柱^[13-15], 除此以外 HP-5 或 DB-5((5%-苯基)-甲基聚硅氧烷)色谱柱也对多种脂肪酸达到很好的分离效果。本实验中由于只涉及一种脂肪酸, 所以

并没有选用脂肪酸专用柱, 而是选择使用普遍的 HP-5 系列的色谱柱, 在气相色谱法中选用 HP-5 色谱柱, 在气质联用法中选用 HP-5MS 色谱柱。

3.2.2 质谱扫描离子的选择

在硬脂酸标准品中所含的硬脂酸全扫谱图中均有 74、87、143、255、298 这几种特征离子, 下图是几种特征离子的断裂机理以及麦氏重排的化学结构式。由于 m/z 74 的碎片离子丰度最高, 选其作为定量离子, 选择剩下相对丰度较高的 m/z 143, 255, 298 三种离子作为定性离子。表 3 为硬脂酸甲酯碎片离子的产生机理, 图 1 为硬脂酸定量离子 74 麦氏重排的化学方程式, 图 2 为质谱全扫谱图。

3.3 方法的检出限和定量限

本试验采用外标法定量, 以目标物硬脂酸甲酯浓度为横坐标, 其对应峰面积为纵坐标建立标准曲线, 线性范围、回归方程及相关系数见表 4。按信噪比(S/N)为 3 计算出方法的检出限(LOD), 按信噪比(S/N)为 10 计算出方法的定量限(LOQ), 气相色谱法的 LOD 和 LOQ 分别为 3.3 mg/kg 和 10.0 mg/kg, 气相色谱质谱联用法的 LOD 和 LOQ 分别为 0.06 mg/kg 和 0.2 mg/kg。图 3 和图 4 分别是气相色谱法和气质联用法中硬脂酸甲酯标准品谱图。

3.4 精密度和回收率

硬脂酸作为食品被膜剂可以用在两类食品中, 第一类是巧克力及巧克力制品、可可制品类; 第二种是糖果类。本实验对空白样品进行了三个水平的加标回收实验, 进行三次平行测定, 得到 GC 法和 GC-MS 法中空白样品的回收率和精密度(RSD)数据见表 5。图 5 和图 6 分别是 GC 法和 GC-MS 法中溶剂空白、样品及样品加标叠加谱图结果。

表3 硬脂酸甲酯碎片离子产生机理
Table 3 Formation mechanism of the fragment ions of methyl stearate

碎片离子(m/z)	产生机理	来源
255	C-C 键断裂失去羟基-C ₃ H ₇	M-43
199	C-C 键断裂失去羟基-C ₇ H ₁₅	M-99
143	C-C 键断裂失去羟基-C ₁₁ H ₂₃	M-155
87	C-C 键断裂失去羟基-C ₁₅ H ₃₁	M-211
74	麦氏重排(-CH ₂ OC(OH)=CH ₂)	m/z 74

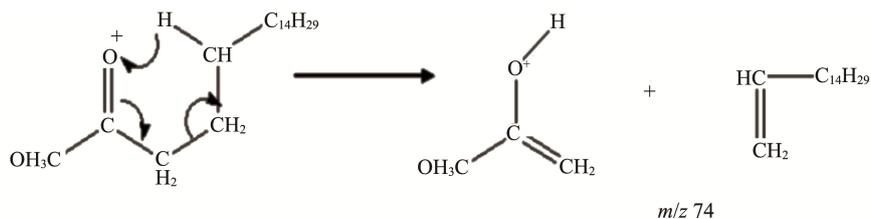


图 1 硬脂酸定量离子 74 麦氏重排的化学结构式

Fig. 1 The chemical formula of stearic acid quantitative ion 74 McLafferty rearrangement

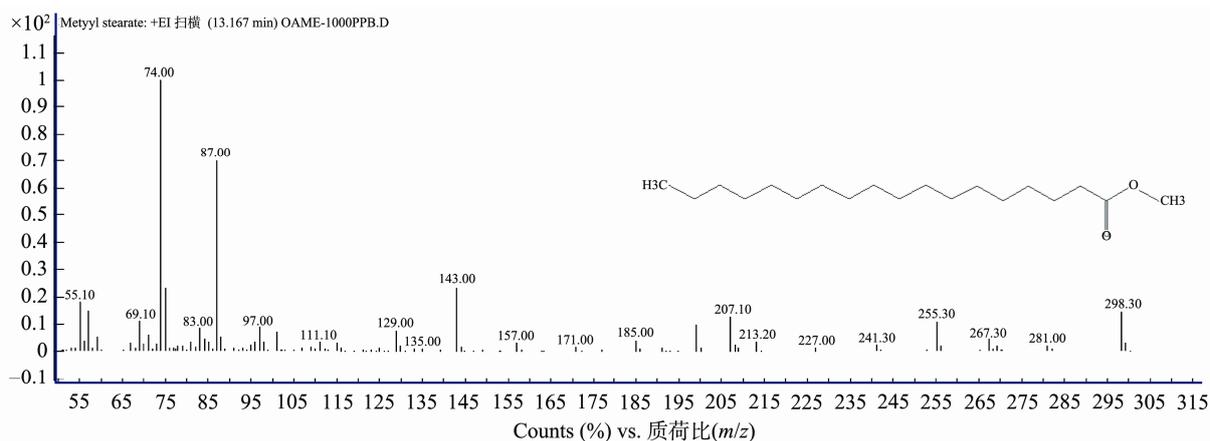


图 2 硬脂酸甲酯标准品全扫谱图

Fig. 2 Scan spectrum of methyl stearate standard

表 4 GC 法和 GC-MS 法中标准品的线性范围、线性方程、相关系数、LOD 和 LOQ

Table 4 Linear ranges, linear equations, coefficients(R), limits of detection (LODs)and limits of quatitation (LOQs)of methyl stearate in GC and GC-MS methods

	GC	GC-MS
线性范围($\mu\text{g/mL}$)	5~500	0.1~1
线性方程	$Y=16.928X+1.1192$	$Y=44.061X-3133.6$
R^2	1	0.9959
LOD(mg/kg)	3.3	0.06
LOQ(mg/kg)	10.0	0.2

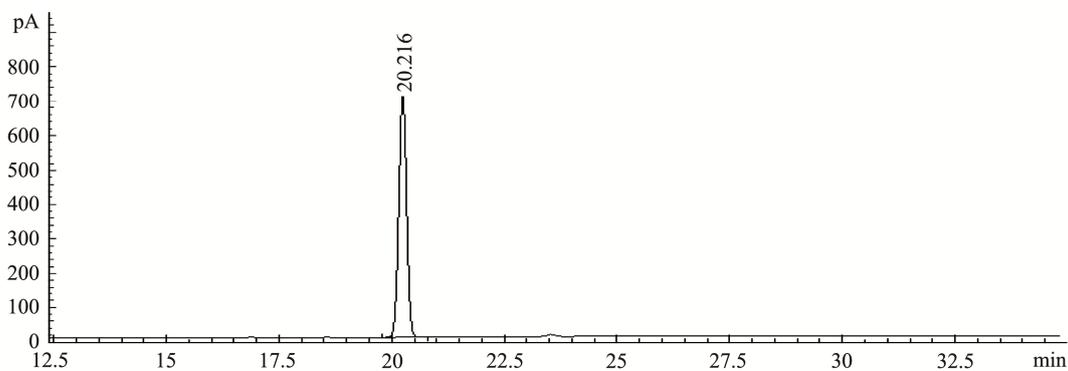


图 3 气相色谱法中硬脂酸甲酯标准色谱图

Fig. 3 Standard gas chromatogram of methyl Stearate in by GC-FID

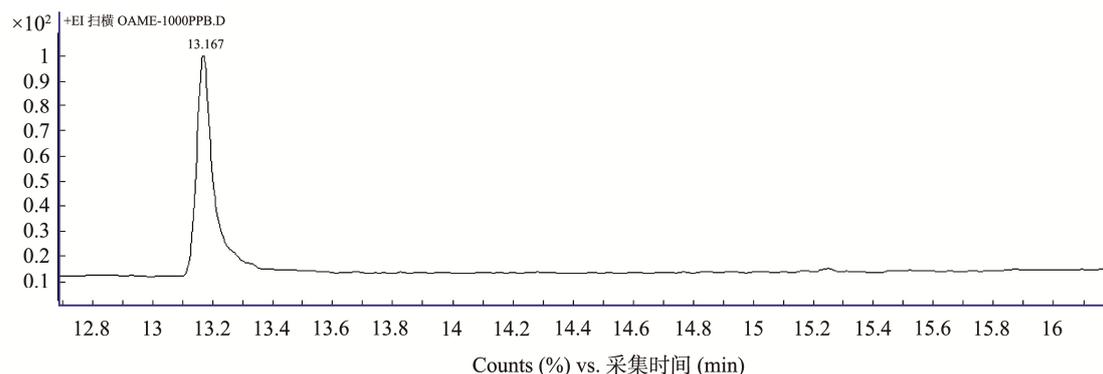


图 4 气质联用法中硬脂酸甲酯标准色谱图

Fig. 4 Standard gas chromatogram of methyl Stearate in by GC-MS

表 5 空白样品中硬脂酸甲酯的平均回收率和精密度

Table 5 Average spiked recoveries and relative standard deviations of methyl stearate in blank samples

方法	脂肪酸	添加量(mg/kg)	空白样品			
			回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	
GC 法	脂肪酸	1.0	80.6			
		水平 1	1.0	77.6	84.0	11
		1.0	93.8			
		1.2	85.6			
		1.2	88.0	88.2	3	
	硬脂酸	1.2	91.0			
		1.5	83.0			
		水平 3	1.5	85.3	83.4	2
		1.5	82.0			
		0.2	99.3			
GC-MS 法	脂肪酸	水平 1	0.2	83.8	91.1	9
		0.2	90.2			
		0.25	92.3			
	硬脂酸	水平 2	0.25	85.6	88.6	4
		0.25	88.0			
		0.3	102.9			
		水平 3	0.3	96.4	97.3	5
	0.3	92.5				

3.5 不同样品中硬脂酸的含量测定

由于在巧克力及巧克力制品、可可制品中的脂肪酸含量相对较高,其中配料中所含有的乳粉中就由脂肪酸组成,而硬脂酸就是其中的一种,最终我们只能得到产品中总硬脂酸的含量,试验分别用气相色

谱法和气质联用法测定了巧克力及巧克力制品、可可制品中硬脂酸的含量,测定结果见表 6,最后,将两种仪器方法测得的数据进行对比,比照的结果见图 7,两方法测定的结果经回归,相关系数为 0.9949,两结果不存在显著差异。

4 结 论

本文采用气相色谱法和气质联用色谱法, 通过

硬脂酸提取和甲酯化等步骤, 建立了一种准确测定食品中硬脂酸含量的方法。气相色谱法的仪器检出限和定量限分别为 3.3 mg/kg 和 10.0 mg/kg, 回收率为

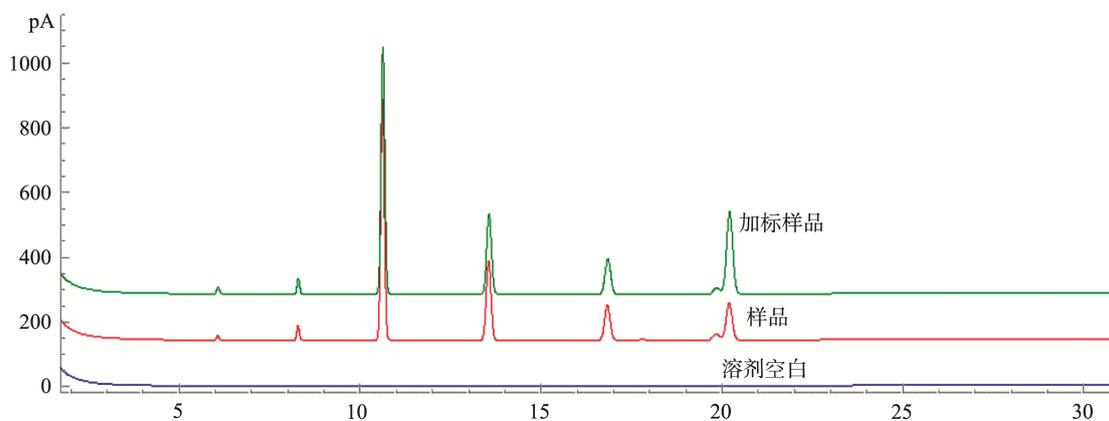


图 5 GC-FID 法中溶剂空白、样品及样品加标叠加谱图结果

Fig. 5 Overlay spectrum result of solvent blank, samples and spiked samples in GC-FID method

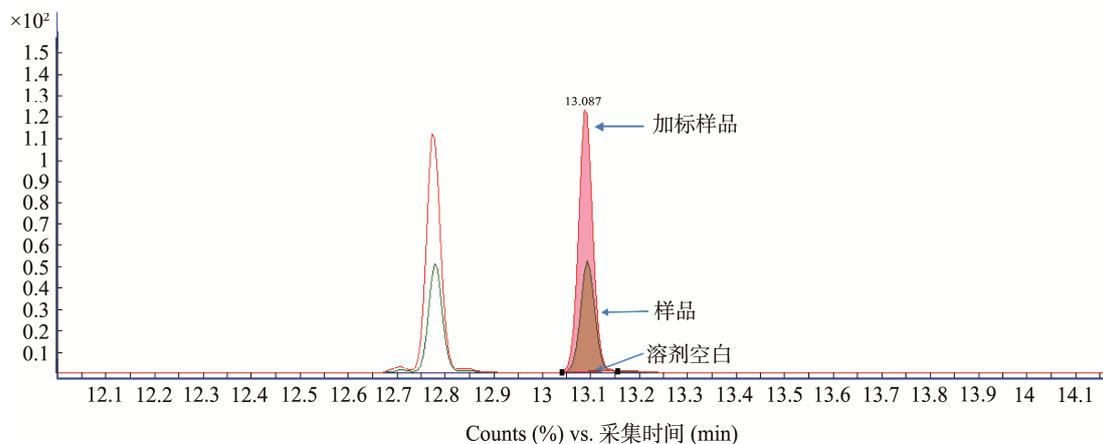
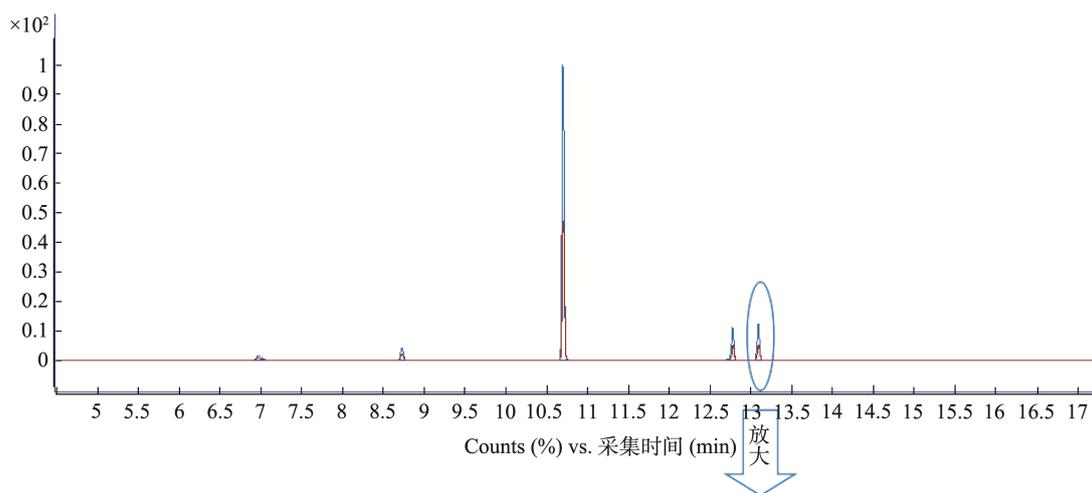


图 6 GC-MS 法中溶剂空白、样品及样品加标叠加谱图结果

Fig. 6 Overlay spectrum result of solvent blank, samples and spiked samples in GC-MS method

表6 巧克力及巧克力制品、可可制品用GC和GC-MS法测得的硬脂酸的含量

Table 6 Content of stearic acid in chocolate and chocolate products, cocoa products measured with GC and GC-MS methods

样品	GC 法	GC-MS 法
	硬脂酸含量(g/kg)	硬脂酸含量(g/kg)
巧克力品牌 1	26.89	24.91
巧克力品牌 2	27.13	25.3
巧克力品牌 3	27.62	25.4
巧克力品牌 4	60.77	58.22
威化巧克力	21.28	20.61
某品牌咖啡	1.58	1.07
某品牌威化饼	10.44	12.74
可可粉	/	0.17

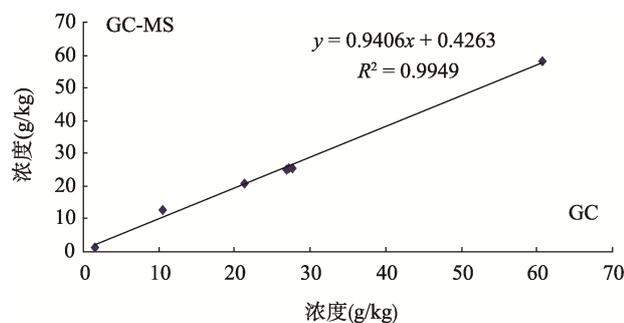


图7 GC和GC-MS法测定结果对比曲线

Fig. 7 Contrast curve of measurement results with GC and GC-MS methods

77.6%~93.8%, RSD 在 2%~11%之间, 仪器重现性良好, 灵敏度高。气质联用色谱法检测的方法检出限和定量限为 0.06 mg/kg 和 0.2 mg/kg, 回收率为 83.8%~102.9%, RSD 在 4%~9%之间, 可以实现低浓度检测。

参考文献

- [1] 沈心佩. 食品被膜剂及其应用[J]. 食品工业科技, 1983, 6: 003. Shen XP. Food coating agent and its application [J]. Sci Technol Food Ind, 1983, 6: 003.
- [2] 孙宝国. 躲不开的食品添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013. Sun BG. Unevadable food additives [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013.
- [3] 雷阳, 汪琳. 食品添加剂基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011. Lei Y, Wang L. The base of food additive [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011.
- [4] GB 2760-2011 食品添加剂使用标准[S]. GB 2760-2011 Standards for uses of food additives [S].
- [5] 邱颖姮. 硬脂酸中棕榈酸和硬脂酸的GC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(8): 599-600. Qiu YH. Determination of palmitic acid and stearic acid in stearic acid by GC [J]. Chin J Pharm, 2010, 41(8): 599-600.
- [6] 熊勋民, 李锋玉. 吸附分离法测定活性碳酸钙中硬脂酸含量[J]. 无机盐工业, 1996, (5): 39-41. Xiong XM, Li FY. Determination of stearic acid content in the active calcium carbonate adsorption separation method [J]. Inorg Salt Ind, 1996, (5): 39-41.
- [7] 孙秀霞, 徐宏德, 刘铭, 等. 热压片法定量分析丁基橡胶中硬脂酸含量[J]. 广东化工, 2012, 39(2): 250-251. Sun XX, Xu HD, Liu M, et al. Quantitative determination of stearic acid content in butyl rubber with hot press method [J]. Guangdong Chem, 2012, 39(2): 250-251.
- [8] 李伟, 李善茂. 化妆品中硬脂酸的HPLC-MS测定[J]. 广州化工, 2013, 40(22): 110-111. Li W, Li SM. Determination of stearic acid in cosmetic by HPLC-MS [J]. Guangzhou Chem Ind, 2013, 40(22): 110-111.
- [9] 张秀荣, 许英爱, 冯波, 等. 薄层扫描法测定痔克胶囊中硬脂酸的含量[J]. 第四军医大学吉林军医学院学报, 2005, 24(4): 194-196. Zhang XR, Xu YA, Feng B, et al. Determination of stearic acid in Zhike capsules by thin-layer scanning [J]. J Fourth Mil Med Univ Jilin Med College, 2005, 24(4): 194-196.
- [10] 刘飞. 气相色谱法同时测定食品中34种脂肪酸[J]. 福建分析测试, 2010, 19(3): 15-20. Liu F. Gas chromatographic method for the simultaneous determination of 34 kinds of fatty acids in food [J]. Fujian Anal Testing, 2010, 19(3): 15-20.
- [11] GB5413.27-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定[S]. GB5413.27-2010 The national food safety standards determination of fatty acids in foods for infants and young children [S].
- [12] ChristianBauer, GavinKing. Java persistence with hibernate [M]. New York: Manning Publications Co., 2007.
- [13] Alves SP, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, et al. Effect of a purification step and the type of internal standard used on fatty

acid determination of grass and maize silages [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(22): 10793–10797.

- [14] Kramer JKG, Blackader CB, Zhou J. Evaluation of two GC columns(60 m supelcowax 10 and 100 m cp sil88) for analysis of milk fat with emphasis on CLA, 18:2 and 18:3 isomers, and short-and long-chain FA [J]. Lipid, 2002, 37(8): 823–835.
- [15] Pernet F, Pelletier CJ, Milley J. Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves [J]. J Chromatogr A, 2006, 1137(2): 127–137.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



吴云辉, 硕士, 副教授, 主要研究方向为食品加工与检测。

E-mail: wyhxm61@163.com



徐敦明, 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: Xudum@xmcic.gov.cn