

牛奶脂肪酸检测方法的研究进展

陈美庆^{1,2,3}, 张养东^{1,2,3}, 王峰恩^{1,2,3}, 郑楠^{1,2,3}, 王加启^{1,2,3*}

- (1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶及奶制品质量安全控制重点实验室, 北京 100193;
2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室, 北京 100193;
3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心, 北京 100193)

摘 要: 牛奶脂肪酸组成不仅与其理化性质和营养品质密切相关, 还是评价奶牛健康状况的重要指标。建立准确的定性定量方法, 能够全面地了解牛奶脂肪酸组成, 有利于奶牛场对奶牛进行饲养管理和乳品加工厂对乳制品进行质量控制。本文针对牛奶脂肪酸分析中的样品前处理技术和仪器检测技术进行了综述, 对比了不同检测方法的优缺点, 为建立牛奶脂肪酸高通量、高灵敏度的分析方法提供参考。

关键词: 牛奶; 脂肪酸; 前处理; 仪器检测

Research progress of milk fatty acid detection methods

CHEN Mei-Qing^{1,2,3}, ZHANG Yang-Dong^{1,2,3}, WANG Feng-En^{1,2,3}, ZHENG Nan^{1,2,3}, WANG Jia-Qi^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Quality & Safety Control for Milk and Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Milk and Milk Products Inspection Center of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: The composition of milk fatty acids is not only closely related to the physical and chemical properties and nutritional quality of milk, but also an important indicator for evaluating the health status of dairy cows. An accurate qualitative and quantitative analysis of milk fatty acids and a comprehensive understanding of the composition of milk fatty acids are of vital importance to the dairy farm's feeding management of dairy cows and the quality control of dairy products by dairy processing plants. This article reviewed the sample preparation technology and instrument detection analysis in the analysis of milk fatty acids and compared the advantages and disadvantages of different technical methods, in order to provide a reference for establishing a high-throughput and high-sensitivity analysis method for milk fatty acids.

KEY WORDS: milk; fatty acid; sample preparation; instrument detection

基金项目: 中国农业科学院农业科技创新工程重大产出科研选题项目(CAAS-ZDXT2019004)、中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS12)、现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-36)

Fund: Supported by the Scientific Research Project for Major Achievements of Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ZDXT2019004), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP-IAS12), and Modern Agro-Industry Technology Research System of the PR China (CARS-36)

***通讯作者:** 王加启, 博士, 研究员, 主要研究方向为奶牛营养与牛奶质量安全。E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

***Corresponding author:** WANG Jia-Qi, Ph.D, Professor, Animal Science Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.2, Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, China. E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

1 引言

脂肪酸对人类健康至关重要。研究表明, 饱和脂肪酸与心血管疾病等慢性疾病的发生有关, 而共轭亚油酸、 ω -3 多不饱和脂肪酸与心血管疾病和癌症等疾病的预防有关, 中短链脂肪酸对肠道健康有益, 支链脂肪酸具有抗炎作用^[1-3]。牛奶含有 3%~5% 的脂质, 包括甘油酯、类脂和游离脂肪酸, 其中约 98% 以上的脂肪酸以结合态甘油酯或类脂的形式存在, 少部分以游离脂肪酸存在, 牛奶脂质被乳脂球膜包被, 以乳脂球的形式存在^[4,5]。因此, 脂肪酸检测前, 需要对牛奶样品进行水解、脂质提取、皂化、脂肪酸甲酯

化等前处理步骤。研究表明, 牛奶脂肪酸种类多达 400 种, 但含量超过 1% 的脂肪酸仅 15 种左右^[4-6]。

为了进一步探索牛奶潜在的脂肪酸与人类健康之间的关系, 亟待建立一种高通量的检测方法定性定量分析牛奶脂肪酸。目前, 牛奶脂肪酸的检测技术主要有气相色谱法(gas chromatography, GC)、近红外光谱法(near infrared reflectance spectroscopy, NIRS)等^[7-10]。大部分文献报道的牛奶脂肪酸分析思路如图 1。本文对牛奶脂肪酸分析中的样品前处理技术和仪器检测进行综述, 旨在对比不同检测方法的优缺点, 为建立牛奶脂肪酸高通量、高灵敏度的分析方法提供参考。

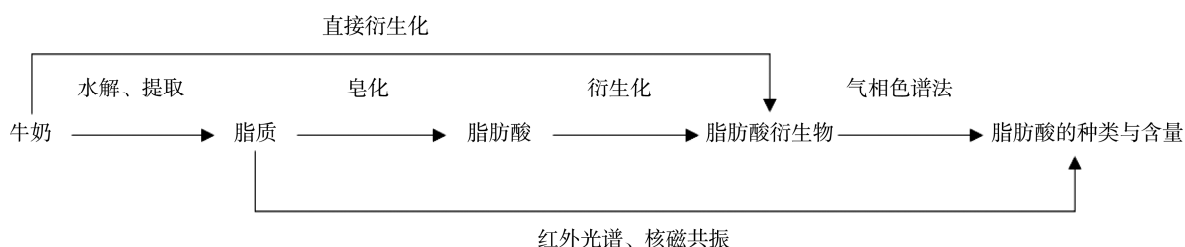


图 1 牛奶脂肪酸检测流程

Fig.1 Procedures for the analysis of milk fatty acids

2 牛奶样品前处理

牛奶是一种复杂的基质, 在测定脂肪酸前通常需要对其进行前处理, 包括水解、脂质提取、皂化、脂肪酸衍生化等, 以实现对样品脂质的充分提取、减少基质干扰。近年来, 有研究提出直接对牛奶脂肪酸进行衍生化的前处理方法^[11-13]。前处理效果将直接影响后续检测结果的准确性、灵敏性和可靠性, 因此选择适当的前处理方法至关重要。

2.1 常规前处理方法

2.1.1 水解

牛奶中脂质被乳脂球膜包裹形成乳脂球, 从而保持牛奶的乳化稳定性^[14]。未经均质化处理的牛奶样品, 通常需要先水解破坏乳脂球膜使脂质游离出来, 而后使用有机溶剂提取游离态脂质。美国分析化学协会发布的 AOAC 996.06^[15]和我国的 GB 5009.168-2016《食品安全国家标准食品中脂肪酸的测定》^[16]在关于食品中脂肪酸测定的标准中均提出对于乳粉及液态乳等需在氨水的碱性条件下水解, 对于乳酪需分别在氨水的碱性条件和盐酸的酸性条件下水解; 国际标准化组织和国际乳业联合会联合发布的 ISO 14156/IDF 172^[17]的标准中提出用氨水-乙醇在碱性条件下水解乳脂球膜, 而后提取牛奶及奶制品中的脂质。

2.1.2 脂质提取

牛奶中存在的蛋白质等成分会影响脂肪酸检测的精

确度与准确性, 如不提前去除, 可能会缩短气相色谱等仪器的使用寿命^[18]。因此通常情况下, 在脂质提取的过程中, 可以同时进行蛋白沉淀, 以简化前处理步骤、减少样本损失。氯仿能提取极性和非极性脂质, 甲醇能沉淀蛋白杂质, 氯仿-甲醇的混合溶剂能同时提取脂质和去除蛋白杂质, 因而广泛应用于牛奶等食品的脂质提取^[19-22]。由于氯仿的毒性较大, 学者们不断尝试其他毒性较小或无毒的有机溶剂以替代氯仿进行脂质提取。AOAC 996.06^[15]、ISO 14156^[17]、GB 5009.168-2016^[16]等标准中均提出使用乙醚与石油醚或正戊烷的混合溶液提取乳粉和液态乳等乳制品中的脂质。

以氯仿-甲醇为溶剂的液液萃取法(liquid liquid extraction, LLE)是目前最常用的提取牛奶脂质的方法, 但提取过程耗时较长且消耗有机溶剂较多。基于此, 学者们提出了一些改进方法, 如超声辅助萃取(ultrasonic assisted extraction, UAE)、微波辅助萃取(microwave assisted extraction, MAE)、加速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)、分散液液微萃取(dispersive liquid liquid microextraction, DLLME)等。基于超声波产生的机械能加速物质在两相间分配的特点, Firl 等^[23]使用 UAE 提取牛奶的脂质, 并通过气相色谱-氢火焰离子化检测器(gas chromatography-flame ionization detector, GC-FID)测定 C4:0 到 C23:0 的 50 多种牛奶脂肪酸; 基于微波产生的热量提高萃取体系温度的特点, Gonzalez-Arrojo 等^[24]使用微波取代传统的加热方法用于牛奶脂质提取、脂肪酸衍生化等

过程,结果表明,此方法对脂肪酸的稳定性无显著影响,且能缩短样品前处理时间^[25]; ASE 通过同时加压和升温能加速物质运动和提高体系温度, Murphy 等^[26]使用 ASE 优化 AOAC 996.06 标准中提出的脂质提取方法,缩短了脂质的提取时间; DLLME 通过增大溶剂分子间的接触面积,以实现待提取物在萃取剂中的快速富集,加快萃取速度, Quigley 等^[27]研究 LLE 和 DLLME 对牛奶脂肪酸测定结果的影响,发现使用 DLLME 能提高总脂肪酸的提取回收率,缩短样品前处理时间。

与 LLE 相比, ASE、MAE、UAE、DLLME 均能够缩短萃取时间、减少溶剂用量,但 ASE 设备的维护费用较高, MAE 可能会导致不饱和脂肪酸发生氧化,限制了其在脂肪酸分析中的应用。UAE、DLLME 不改变萃取体系温度,有利于萃取脂肪酸等热稳定性差的物质。因此, UAE、DLLME 可作为 LLE 的替代方法,应用于脂质提取。

2.1.3 脂质皂化和脂肪酸衍生化

GC 是检测脂肪酸最常用的方法,但由于脂肪酸的高极性和低挥发性,未经衍生化处理的脂肪酸难以使用 GC 进行分析。脂肪酸衍生化是增加脂肪酸的挥发性、提高检测灵敏度、改善色谱分辨率和减少长链脂肪酸色谱峰拖尾的常见步骤^[28]。甲酯化是目前最常用的脂肪酸衍生化方式,包括酸催化法、碱催化法等^[29]。

酸性条件下的甲醇溶液能使样品中存在的所有脂肪酸转化为相应的脂肪酸甲酯,包括结合态和游离态脂肪酸,但酸催化甲酯化过程耗时长,反应所需要高温条件会导致部分不饱和脂肪酸的异构化和挥发性短链脂肪酸的损失,且酸性条件无法将脂质提取物中的脂肪酸游离出来,因此在酸催化甲酯化之前需要碱性条件使脂质皂化^[7]。常用的酸性甲酯化试剂包括盐酸-甲醇、硫酸-甲醇和三氟化硼-甲醇等,需要 60~100 °C 的高温反应条件,反应时间长达 1~5 h^[19,30-32]。三氟化硼-甲醇是目前常用的酸性甲酯化试剂, AOAC 969.33^[32]与 GB 5009.168-2016^[16]中提出的脂肪酸甲酯化方法均采用三氟化硼-甲醇缩短酸性条件下脂肪酸的甲酯化时间。Anorve-Morga 等^[33]研究发现,三氟化硼-甲醇在 95 °C 下反应 10 min,中长链脂肪酸的回收率分别达到 67%和 85%, Yurchenko 等^[34]采用三氟化硼-甲醇在 80 °C 下反应 2 min 催化脂肪酸甲酯化反应,利用 GC-FID 分析牛初乳中脂肪酸,结果表明方法的定量限和检出限分别为 0.11~0.68 mg/L 和 0.37~2.27 mg/L。

碱性条件下,催化过程耗时短、不产生不饱和脂肪酸异构化,能同时进行脂质的皂化和脂肪酸的衍生化,但不能催化游离脂肪酸甲酯化^[35]。常用的碱催化甲酯化试剂包括氢氧化钾-甲醇、氢氧化钠-甲醇、甲酸钠-甲醇、三甲基氢氧化硫等,通常在室温下或加热到 50 °C,几分钟内可完成脂肪酸衍生化^[23,25]。ISO 15884/IDF 182 中提出使用氢氧化钾-甲醇或甲酸钠-甲醇对牛奶脂肪酸进行甲酯化^[25]。

酸性条件和碱性条件的催化均能将脂质提取物转化为脂肪酸甲酯,但各有利弊,因此需要根据待分析的脂肪酸目标选定合适的脂肪酸衍生化方法。

2.2 直接衍生化

传统的样本前处理方法需要水解、提取、皂化和衍生化等步骤,能够减少样本基质的干扰,有利于脂肪酸的准确分析。但存在以下缺点,一是步骤繁琐且耗时,二是易发生脂肪酸异构化而造成样品损失,三是试剂消耗大。因此学者们建立了一种直接在牛奶基质中对脂肪酸进行衍生化的前处理方法。相关研究对比了直接衍生法和传统前处理方法的处理效果。Liu 等^[13]研究离心和脂质提取对生乳脂肪酸测定结果的影响,发现经离心-干燥-甲酯化、离心-甲酯化、脂质提取-干燥-甲酯化的 3 种前处理方法所测得的各脂肪酸绝对含量无显著差异,离心-甲酯化前处理方法中脂肪酸的回收率达 96%~106%,重复性良好,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)<7%,经离心处理,生乳中 99%以上的脂质从样本基质中分离出来,形成上层脂肪层。与生乳相比,经过均质化处理的牛奶,离心不能形成牢固而明显的脂肪层,因此,离心替代脂质提取或许只适用于生乳样本的前处理。Liu 等^[11]研究发现,牛奶经脂质提取-干燥-甲酯化、干燥-甲酯化和直接甲酯化的前处理方法对测定脂肪酸的绝对含量无显著影响,因此直接甲酯化可作为简化的前处理方法用于测定牛奶脂肪酸。

3 检测方法

3.1 气相色谱法

GC 主要基于待测组分沸点、极性及吸附性的差异进行分离,经过分离的组分流出色谱柱,通过 FID 实现待测物的定性定量分析。GC-FID 因其高分辨率、高灵敏度被广泛用于脂肪酸的测定,国内外发布的牛奶脂肪酸检测标准均采用 GC-FID^[16,36-39]。FID 主要依据标准品的保留时间对物质进行定性,局限于有标准品的物质,而质谱检测器(mass spectrometer detector, MSD)根据物质的特征离子对除标准品之外的物质进行鉴定。GC-MS 结合了 GC 的分离能力与 MSD 的鉴定能力,是 GC-FID 分析脂肪酸的一种强有力的替代方法,能够大大地提高检测的灵敏度和通量。

牛奶脂肪酸种类繁多、结构复杂、含量差异大的特点导致了牛奶脂肪酸检测灵敏度和通量较低,众多的单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的顺反异构体和位置异构体限制了牛奶脂肪酸检测^[40]。先前学者们通过使用银离子固相萃取法(Ag^+ -SPE)^[41]以及银离子薄层色谱法^[42]对脂肪酸甲酯进行预分离,而后进行色谱分离,解决部分十八碳不饱和脂肪酸甲酯色谱峰重叠的问题,但银离子固相萃取柱的成本较高、分析效率低等,限制了其在脂

肪酸分析上的应用。

近些年, 以聚乙二醇、氰丙基、离子液体为固定相的毛细管色谱柱广泛用于脂肪酸甲酯的分离^[43]。毛细管柱涂覆聚乙二醇或氰丙基等极性固定相是目前国内外标准中用于分离脂肪酸甲酯及其顺反异构体最常用的柱型^[16,36,38,39]。Quigley 等^[27]采用 AT-1000 毛细管色谱柱分离脂肪酸甲酯, 检出限达 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 方法灵敏度高; Firl 等^[23]利用 UAE 提取牛奶脂质, 使用 CP 7420 色谱柱, 通过 GC-FID 可以对牛奶中含量低至 0.01 mg/L 的 C4:0 到 C23:0 等 50 多种牛奶脂肪酸定量, 脂肪酸的平均回收率为 $108\% \pm 3.5\%$; Dreiuicker 等^[44]利用 ASE 200 仪器提取脂质、 Ag^+ -SPE 预分离脂肪酸甲酯, 使用 SP 2331 色谱柱, 通过 GC-MS 的选择离子模式测定了骆驼乳、驼鹿乳、奶牛乳、人乳等乳中 87 种脂肪酸, 包括 29 种饱和脂肪酸(包括 11 种支链脂肪酸和 11-环己基十一酸), 16 种顺式和 23 种反式单不饱和脂肪酸, 以及 19 种多不饱和脂肪酸; Teng 等^[45]使用 SP 2560 色谱柱, 利用 GC-MS-SIM 分析了骆驼乳、驼鹿乳、奶牛乳、人乳、羊奶等乳中 60 多种脂肪酸。离子液体色谱柱不仅适用于分离脂肪酸甲酯的顺反异构体和位置异构体, 还能在聚乙二醇或氰丙基色谱柱的基础上进一步分离脂肪酸甲酯^[46,47]。Delmont 等^[48]对比氰丙基硅氧烷色谱柱和 SLB-IL111 色谱柱对脂肪酸甲酯的分离效果发现, 200 m SLB-IL111 能在 80 min 内成功分离牛奶的大部分脂肪酸, 包括短链、长链多不饱和脂肪酸及其异构体。Gomez-Cortes 等^[49]研究发现, SLB-IL111 色谱柱能较好地分离牛奶奇数链和支链脂肪酸(C11:0、iso C13:0、anteiso C13:0、iso C15:0、anteiso C15:0、C15:0 和 iso C17:0)。Fuente 等^[50]建立了 GC-MS 快速准确定性和定量检测牛奶脂肪酸的方法, 采用氢氧化钾-甲醇对牛奶脂肪酸直接甲酯化得到对应的脂肪酸甲酯, 使用 Ag^+ -SPE 对不饱和脂肪酸及其顺反异构体进行预先分离后, 再采用 CP-Sil 88 色谱柱和 SLB-IL111 色谱柱分离脂肪酸甲酯。结果表明, SLB-IL111 色谱柱可以在 CP-Sil 88 色谱柱基础上对不饱和脂肪酸甲酯的顺反异构体和位置异构体进行进一步分离, 结合 2 种色谱柱能够良好分离约 100 种脂肪酸, 如分离 10:1/11:0、*cis*-10 12:1/13:0、*iso* 17:0/*trans* 9 16:1、*anteiso* 17:0/*cis*-9 16:1、*trans* 16 18:1/*cis*-14 18:1、*trans* 11 *cis*-15 18:2/*trans*-10 *cis*-15 18:2 和 *trans* 7 *cis*-9 18:2/*cis*-9 *trans*-11 18:2 等。全二维气相色谱应用 2 个不同极性固定相的色谱柱, 能够更大程度分离牛奶十八碳不饱和脂肪酸的顺反异构体和位置异构体^[43,51-53]。

3.2 波谱技术

牛奶脂肪酸在电磁波谱的 NIR 区域(780~2526 nm)具有吸收特性, 因此可以使用 NIRS 预测牛奶 FA 的组成, 用于脂肪酸含量的快速检测^[54,55]。Coppa 等^[56]通过 NIR(700~2500 nm)和 GC-FID 分析了 468 份牛奶样品的脂

肪酸组成, 并建立了牛奶脂肪酸含量的预测方程, 结果表明, NIRS 能预测牛奶总脂肪酸含量以及饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、反式及顺式 C18:1、共轭亚油酸的相对含量, 其外部验证决定系数(coefficient of determination in external validation, R_v^2) ≥ 0.88 , 剩余预测偏差(residual predictive deviation, RPD) ≥ 3.26 。近红外光谱法在脂肪酸检测上无需气相色谱法复杂的前处理过程, 但是建立准确的脂肪酸预测模型需要较大的样本数据, 对于牛奶较高浓度的脂肪酸, 有较好的预测效果, 对牛奶微量脂肪酸的含量预测的准确性不如气相色谱法。

NMR 氢谱(^1H NMR)能提供化合物中所有的氢原子信息, 已成功用于牛奶和乳制品中短链脂肪酸、总饱和脂肪酸、总不饱和脂肪酸、总单不饱和脂肪酸、亚油酸、共轭亚油酸、亚麻酸等脂肪酸的定量分析^[8,57,58]。Hu 等^[59]研究发现, 使用 NMR 对牛奶中单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的浓度预测结果与参考值无显著差异。

牛奶中脂肪酸常用检测分析方法, 包括前处理方法和仪器检测技术如表 1 所示。

4 结 论

本文详细介绍了牛奶脂肪酸检测的方法和流程。牛奶样本的前处理是实现脂肪酸准确定性定量分析的基础, 而仪器是定性定量分析脂肪酸的关键。GC 是目前脂肪酸分析中最常用的方法, 但是其前处理需要经过水解、脂质提取、脂肪酸衍生化等繁琐步骤。针对这一问题, 通过对牛奶样本直接衍生化并使用微波或超声辅助前处理的简化方法, 不仅能降低脂肪酸的损失, 还能提高前处理效率。针对使用 GC 对牛奶脂肪酸难以完全分离的问题, 提出使用全二维气相色谱(如 ^1D : CP Sil 88+ ^2D : SLB IL 111)能对十八碳不饱和脂肪酸的顺反异构体和位置异构体进行更大程度的分离。NIRS 和 NMR 等波谱技术无需衍生化步骤, 可用于牛奶脂肪酸的直接分析。NIRS 对脂肪酸结构不产生影响且能短时间内分析脂肪酸含量, 但建立预测牛奶脂肪酸含量的模型需要大量数据, 且牛奶低浓度的脂肪酸的定量分析准确性不高。NMR 虽能快速准确地测定牛奶脂肪酸含量, 但昂贵的仪器成本限制了其在脂肪酸检测上的实际应用。因此, GC 仍是未来几年定性定量分析牛奶脂肪酸的主要方法。

由于牛奶脂肪酸种类多、含量差异大, 现有的脂肪酸标准品种类有限, 目前的技术手段难以一次性分离、检测所有脂肪酸, 需要依据分析目标选择合适的样本前处理及仪器检测方法。未来的研究需建立快捷、可靠的样品前处理方法, 开发高通量、高灵敏的牛奶脂肪酸定性定量分析方法, 为研究奶牛脂肪酸代谢途径和揭示牛奶脂肪酸与人类健康之间的关系提供技术支撑。

表 1 牛奶脂肪酸检测方法
Table 1 Method for determination of milk fatty acids

样品	前处理			检测方法			分析结果		参考文献
	脂质提取	脂质皂化	脂肪酸衍生化	检测仪器	色谱柱	检测脂肪酸数量	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)	
生乳	LLE 氨水/乙醇/乙醚	氢氧化钠-甲醇 80 °C 反应 5~10 min	三氟化硼-甲醇 80 °C 反应 15 min	GC-FID/MS	SP-2560	60 种 FA	-	3.3~18	[45]
生乳	DLLME 氯仿/甲醇	-	三氟化硼-甲醇 90 °C 反应 30 min	GC-FID	AT-1000	5 种 FA	0.04	0.1	[27]
生乳	ASE 200	氢氧化钾-甲醇 80 °C 反应 5 min	三氟化硼-甲醇 80 °C 反应 5 min	GC-MS	SP-2331	87 种 FA	-	-	[44]
生乳	-	-	氢氧化钾-甲醇 50 °C 反应 20 min	GC-MS	RT-2560	8 种 FA	-	-	[60]
生乳	-	氢氧化钾-甲醇 50 °C 反应 20 min	氢氧化钾-甲醇 50 °C 反应 20 min	GC-MS	RT-2560	15 种 FA	-	-	[13]
生乳	-	-	乙酸甲酯-甲醇钠微波 700 W	GC-MS	CP-Sil11 88	15 种 FA	-	-	[24]
牛初乳	-	氢氧化钠-甲醇 80 °C 反应 7 min	三氟化硼-甲醇 80 °C 反应 2 min	GC-FID	DB-FFAP	10 种 FA	0.11~0.68	0.37~2.27	[34]
牛奶	LLE 氯仿/甲醇	-	三氟化硼-甲醇 95 °C 反应 10 min	GC-FID	DB WAX	15 种中链脂肪酸和长链脂肪酸	-	-	[33]
牛奶	UAE 氯仿/甲醇 40 Hz 超声 1 min	-	三甲基氢氧化硫	GC-FID	CP-7420	50 多种 FA	-	-	[23]
牛奶	-	-	硫酸-甲醇 60 °C 反应 2~5 h 或氢氧化钾-甲醇 50 °C 反应 30 min	GC-MS	RT-2560	15 种 FA	-	-	[11]

参考文献

- [1] Gómez-Cortés P, Juárez M, Fuente MA. Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision [J]. Trends Food Sci Technol, 2018, (81): 1–9.
- [2] Thorning TK, Raben A, Tholstrup T, *et al.* Milk and dairy products: Good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence [J]. Food Nutr Res, 2016, (60): 32527.
- [3] Haug A, Hostmark AT, Harstad OM. Bovine milk in human nutrition-A review [J]. Lipids Health Dis, 2007, (6): 25.
- [4] Jensen RG. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000 [J]. J Dairy Sci, 2002, 85(2): 295–350.
- [5] Mansson HL. Fatty acids in bovine milk fat [J]. Food Nutr Res, 2008, (52): 103402.
- [6] Schröder M, Vetter W. Detection of 430 fatty acid methyl esters from a transesterified butter sample [J]. J Am Oil Chem Soc, 2013, 90(6): 771–790.
- [7] Amores G, Virto M. Total and free fatty acids analysis in milk and dairy fat [J]. Separations, 2019, 6(1): 14.
- [8] Tao FF, Ngadi M. Applications of spectroscopic techniques for fat and fatty acids analysis of dairy foods [J]. Curr Opin Food Sci, 2017, (17): 100–112.
- [9] Eskildsen CE, Rasmussen MA, Engelsen SB, *et al.* Quantification of individual fatty acids in bovine milk by infrared spectroscopy and chemometrics: Understanding predictions of highly collinear reference variables [J]. J Dairy Sci, 2014, 97(12): 7940–7951.
- [10] Hanus O, Samkova E, Krizova L, *et al.* Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability-A review [J]. Molecules, 2018, 23(7): 1636.
- [11] Liu Z, Wang J, Li C, *et al.* Development of one-step sample preparation methods for fatty acid profiling of milk fat [J]. Food Chem, 2020, (315): 126281.
- [12] Piccioli A, Santos P, Da-Silva R, *et al.* Fatty acid determination in fermented milk samples employing direct esterification and gas chromatography [J]. J Brazil Chem Soc, 2019, 30(7): 1350–1351.
- [13] Liu ZQ, Moate P, Rochfort S. A simplified protocol for fatty acid profiling of milk fat without lipid extraction [J]. Int Dairy J, 2019, (90): 68–71.
- [14] 哈斯额尔敦, 白晨, 敖长金. 乳脂球膜结构、化学组成与潜在生物活性功能研究进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(3): 973–982.
- [15] Khas E, Bai C, Ao CJ. Research process of milk fat globule membrane structure, composition and its potential bioactivity functions [J]. Chin J Anim Nutr, 2020, 32(3): 973–982.
- [16] AOAC 996.06 Fat (total, saturated, and unsaturated) in foods-Hydrolytic extraction gas chromatographic method [S].
- [17] GB 5009.168-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定[S].
- [18] GB 5009.168-2016 National food safety standard-Determination of fatty acids in food [S].
- [19] ISO 14156: 2001/IDF 172: 2001 Milk and milk products-Extraction methods for lipids and liposoluble compounds [S].
- [20] Raterink RJ, Lindenburg PW, Vreeken RJ, *et al.* Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics [J]. Trend Anal Chem, 2014, (61): 157–167.
- [21] Liu XM, Zhang Y, Zhou Y, *et al.* Progress in pretreatment and analysis of fatty acids in foods: An update since 2012 [J]. Sep Purif Rev, 2019, (10): 1–20.
- [22] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues [J]. J Biol Chem, 1957, (226): 497–509.
- [23] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37(8): 911–917.
- [24] Timmen H, Dimick PS. Structure and synthesis of milk fat. X. Characterization of the major hydroxy compounds in milk lipids [J]. J Dairy Sci, 1972, 55(7): 919–925.
- [25] Firl N, Kienberger H, Rychlik M. Validation of the sensitive and accurate quantitation of the fatty acid distribution in bovine milk [J]. Int Dairy J, 2014, 35(2): 139–144.
- [26] Gonzalez-Arrojo A, Soldado A, Vicente F, *et al.* Microwave-assisted methodology feasibility for one-step extraction and transmethylation of fatty acids in milk for GC-mass spectrometry [J]. Food Anal Method, 2015, 8(9): 2250–2260.
- [27] ISO 15884: 2002/IDF 182: 2002 Milk fat -Preparation of fatty acid methyl esters [S].
- [28] Murphy B, Peterson J, Richter B, *et al.* Base hydrolysis and accelerated solvent extraction (ASE): Determination of total fat from dairy products [J]. Lc Gc North Am, 2011, 24(3): 31–31.
- [29] Quigley A, Connolly D, Cummins W. The application of dispersive liquid-liquid microextraction in the analyses of the fatty acid profile in bovine milk in response to changes in body condition score [J]. J Chromatogr B, 2018, (1073): 130–135.
- [30] Chiu HH, Kuo CH. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples [J]. J Food Drug Anal, 2020, 28(1): 60–73.
- [31] 宋诗瑶, 白玉, 刘虎威. 脂质组学分析中样品前处理技术的研究进展 [J]. 色谱, 2020, 38(1): 66–73.
- [32] Song SY, Bai Y, Liu HW. Advances in the development of the sample preparation techniques in lipidomics [J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(1): 66–73.
- [33] Cruz-Hernandez C, Goeuriot S, Gluffrida F, *et al.* Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2013, (1284): 174–179.
- [34] Ichihara K, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography [J]. J Lipid Res, 2010, 51(3): 635–640.
- [35] AOAC 969.33 Fatty acids in oils and fats-Preparation of methyl esters-Boron trifluoride method [S].
- [36] Anorve-Morga J, Castaneda-Ovando A, Cepeda-Saez A, *et al.* Microextraction method of medium and long chain fatty acids from milk [J]. Food Chem, 2015, (172): 456–461.
- [37] Yurchenko S, Sats A, Polkalainen V, *et al.* Method for determination of fatty acids in bovine colostrum using GC-FID [J]. Food Chem, 2016, (212): 117–122.
- [38] Mannion DT, Furey A, Kilcawley KN. Free fatty acids quantification in dairy products [J]. Int J Dairy Technol, 2016, 69(1): 1–12.
- [39] ISO 16958: 2015/IDF 231: 2015 Milk, milk products, infant formula and adult nutritional-Determination of fatty acids composition-Capillary gas chromatographic method [S].
- [40] GB 5009.257-2016 食品安全国家标准 食品中反式脂肪酸的测定[S].

- GB 5009.257-2016 National food safety standard-Determination of trans fatty acids in foods [S].
- [38] ISO 23065: 2009/IDF 211: 2009 Milk fat from enriched dairy products-Determination of omega-3 and omega-6 fatty acid content by gas-liquid chromatography [S].
- [39] ISO 15885: 2002/IDF 184: 2002 Milk fat-Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography [S].
- [40] Yoshinaga K, Asanuma M, Mizobe H, *et al.* Characterization of *cis*- and *trans*-octadecenoic acid positional isomers in edible fat and oil using gas chromatography-flame ionisation detector equipped with highly polar ionic liquid capillary column [J]. *Food Chem*, 2014, (160): 39–45.
- [41] Kramer JKG, Hernandez M, Cruz-Hernandez C, *et al.* Combining results of two GC separations partly achieves determination of all *cis* and *trans* 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 except CLA isomers of milk fat as demonstrated using ag-ion SPE fractionation [J]. *Lipids*, 2008, 43(3): 259–273.
- [42] Kramer JKG, Blackadar CB, Zhou JQ. Evaluation of two GC columns (60-m Supelcowax 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA [J]. *Lipids*, 2002, 37(8): 823–835.
- [43] Nan H, Anderson JL. Ionic liquid stationary phases for multidimensional gas chromatography [J]. *Trends Anal Chem*, 2018, (105): 367–379.
- [44] Dreiucker J, Vetter W. Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction [J]. *Food Chem*, 2011, 126(2): 762–771.
- [45] Teng F, Wang P, Yang L, *et al.* Quantification of fatty acids in human, cow, buffalo, goat, yak, and camel milk using an improved one-step GC-FID method [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10(8): 2881–2891.
- [46] Poole CF, Lenca N. Gas chromatography on wall-coated open-tubular columns with ionic liquid stationary phases [J]. *J Chromatogr A*, 2014, (1357): 87–109.
- [47] Weztherly CA, Zhang Y, Smuts JP, *et al.* Analysis of long-chain unsaturated fatty acids by ionic liquid gas chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(6): 1422–1432.
- [48] Delmonte P, Fardin-Kia AR, Kramer JK, *et al.* Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat [J]. *J Chromatogr A*, 2012, (1233): 137–146.
- [49] Gomez-Cortes P, Rodriguez-Pino V, Juarez M, *et al.* Optimization of milk odd and branched-chain fatty acids analysis by gas chromatography using an extremely polar stationary phase [J]. *Food Chem*, 2017, (231): 11–18.
- [50] Fuente MA, Rodríguez-Pino V, Juárez M. Use of an extremely polar 100 m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles [J]. *Int Dairy J*, 2015, (47): 52–63.
- [51] Zeng AX, Chin ST, Marriott PJ. Integrated multidimensional and comprehensive 2D GC analysis of fatty acid methyl esters [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(5): 878–885.
- [52] Pellattiero E, Cecchinato A, Tagliapietra F, *et al.* The use of 2-dimensional gas chromatography to investigate the effect of rumen-protected conjugated linoleic acid, breed, and lactation stage on the fatty acid profile of sheep milk [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(4): 2088–2102.
- [53] Nolvachai Y, Kulsing C, Marlott PJ. Multidimensional gas chromatography in food analysis [J]. *Trend Anal Chem*, 2017, (96): 124–137.
- [54] Wang L, Sun DW, Pu H, *et al.* Quality analysis, classification, and authentication of liquid foods by near-infrared spectroscopy: A review of recent research developments [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2017, 57(7): 1524–1538.
- [55] Kalinin AV, Krashennnikov VN, Sviridov AP, *et al.* Near infrared spectrometry of clinically significant fatty acids using multicomponent regression [J]. *J Appl Spectrosc*, 2016, 83(5): 811–819.
- [56] Coppa M, Ferlay A, Leroux C, *et al.* Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy [J]. *Int Dairy J*, 2010, 20(3): 182–189.
- [57] Wiking L, Løkke MM, Kidmose U, *et al.* Comparison between novel and standard methods for analysis of free fatty acids in milk -Including relation to rancid flavour [J]. *Int Dairy J*, 2017, (75): 22–29.
- [58] Symeou S, Tsiafoulis CG, Gerothanassis IP, *et al.* Nuclear magnetic resonance screening of changes in fatty acid and cholesterol content of ovine milk induced by ensiled olive cake inclusion in Chios sheep diets [J]. *Small Ruminant Res*, 2019, (177): 111–116.
- [59] Hu FY, Furihata K, Kato Y, *et al.* Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11): 4307–4311.
- [60] Liu Z, Ezernieks V, Rochfort S, *et al.* Comparison of methylation methods for fatty acid analysis of milk fat [J]. *Food Chem*, 2018, (261): 210–215.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



陈美庆, 硕士研究生, 主要研究方向为奶牛营养与牛奶质量安全。
E-mail: MQCHEN1997@163.com



王加启, 博士, 研究员, 主要研究方向为奶牛营养与牛奶质量安全。
E-mail: jiqiwang@vip.163.com