

简 报

用紫外可见分光光度法测定共轭亚油酸的含量^{*}

张亚刚^{1, 2} 樊 莉^{1, 2} 马 莉² 文 彬² 吾满江·艾力²

(1 中国科学院研究生院, 北京 100039; 2 中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011)

(2002 年 1 月 13 日收稿; 2002 年 4 月 24 日收修改稿)

摘 要 采用 UV-9100 型紫外可见分光光度计, 测定了共轭亚油酸、共轭亚油酸甲酯、共轭亚油酸三甘酯在不同浓度时在 200 ~ 300 nm 的吸光度, 绘制出样品在不同浓度时的吸光度曲线, 找出适宜的浓度范围; 用 Microcal Software Origin Version 4.0 做回归分析, 由线性回归给出样品浓度和吸光度的线性关系; 利用 PE Autosystem XL-TurboMass 测得样品中共轭亚油酸乙酯的准确浓度, 结合回归系数给出了测定样品中共轭亚油酸含量的经验公式。
关键词 紫外可见分光光度法, 共轭亚油酸, 十八碳二烯酸
中图分类号 TQ645.6

1 引言

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是含有共轭双键的一系列十八碳二烯酸(octadecadienoic acid)的混合物. 由于位置异构和几何异构的差异, 起先发现的这些十八碳二烯酸存在如下构型和构象各异的异构体: 9-c, 11-c; 10-c, 12-c; 9-t, 11-t; 10-t, 12-t; 9-t, 11-c; 9-c, 11-t; 10-c, 12-t; 10-t, 12-c; 后来 Lavillonniere 又报道了在法国奶酪中发现了 8, 10 和 11, 13 的异构体。
随后的研究中发现了 CLA 具有一系列令人兴奋的作用, 如: 抗癌; 抗动脉粥样硬化, 调控代谢, 增加肌肉, 减少脂肪; 增强机体免疫力, 减缓免疫系统副反应, 调节血糖, 抗糖尿病; 促进动物生长发育等. 目前, CLA 已引起了越来越多的关注。
紫外光谱测量灵敏度和准确度较高, 应用范围广, 且价格便宜, 操作简便快速. 本文的目的在于利用紫外可见分光光度计, 给出廉价、快速测量共轭亚油酸含量的方法和切实可行的经验公式。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-9100 型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); 气相色谱-质谱连用仪(美国 PE Autosystem XL-TurboMass); Mettler AE 160 型万分位电子天平(瑞典 Mettler 公司)。
试样 1: CLA(自制, 根据气相色谱积分面积计算的相对含量为 46.27%);
试样 2: CLA 甲酯(自制, 根据气相色谱积分面积计算的相对含量为 50.89%);
试样 3: 混合脂肪酸三甘酯(自制, 根据气相色谱积分面积计算的 CLA 相对含量为 30.76%); 正己烷(上海精化科技研究所), 氢氧化钠(北京化学试剂厂), 甲醇(沈阳化学试剂厂), 浓硫酸(西安化学试剂

^{*} 中国科学院“西部之光”资助项目: 共轭亚油酸系列产品的研究与开发(2002~2004 年)
张亚刚, 男, 1977 年 6 月生, 硕士生

厂),以上试剂均为分析纯.

2.2 主要仪器参数与实验条件

UV-9100 型紫外可见分光光度计主要参数:光栅分光;光谱带宽 2 nm;波长范围 200 ~ 800 nm;波长准确度 ± 2 nm;波长重复性 1 nm;透射比准确度 $\pm 0.5\%$ T;透射比重现性 0.3% T;仪器稳定性 光电流 0.5%T/3 min,暗电流 0.3%T/3 min.

气相色谱部分:PE Autosystem XL;质谱部分:TurboMass;谱库:Nist 98 Mass SPECTRAL LIBRARY, Wiley Registry 7th Edition;色谱柱:Supleco wax-10, 60 m $\times$ Φ 2.5 mm,固定相膜厚 0.25 μ ;载气:氦气(99.9995%), 16PSI;进样量:0.2 μ L;进样温度:230 $^{\circ}$ C;柱温:由 100 $^{\circ}$ C,以 2.6 $^{\circ}$ C/min 升温至 210 $^{\circ}$ C.

2.3 实验方法

2.3.1 甲酯化

(1)游离脂肪酸样品的甲酯化

称取 18.5 g 无水甲醇于 500 mL 三口瓶中,称取 2.5 g 浓 H₂SO₄加入其中,并向其中加入 25 g CLA,装上搅拌和回流装置,升温至 66 $^{\circ}$ C,反应 6 h.反应结束后,冷却至室温,倒入分液漏斗中静置,分去下层,上层用热水洗 3 ~ 4 次,减压下旋转蒸发,蒸除残存的水和甲醇,得淡黄色清澈透明液体,将所得物减压蒸馏得混合脂肪酸甲酯,馏分范围 186 ~ 188 $^{\circ}$ C.

(2)混合脂肪酸三甘酯的甲酯化

称取 13.2 g 无水甲醇于 250 mL 三口瓶中,称取 0.2 g NaOH 加入其中,装上搅拌和回流装置,45 $^{\circ}$ C 下搅拌,待 NaOH 完全溶解后,向其中加入 60 g 混合脂肪酸三甘酯,升温至 66 $^{\circ}$ C,反应 2 h.反应结束后,冷却至室温,倒入分液漏斗中静置,分去下层,上层用热水洗 3 ~ 4 次,减压下旋转蒸发,蒸除残存的水和甲醇,得淡黄色清澈透明液体.将所得物减压蒸馏得混合脂肪酸甲酯,馏分范围 190 ~ 204 $^{\circ}$ C.

2.3.2 气相色谱-质谱连用分析

试样 1 和试样 3 甲酯化后,与试样 2 一起进行 GC-Mass 分析.确定试样中各脂肪酸的含量.

2.3.3 紫外光谱分析

(1)准确称取 0.0446 g 的试样 1 于 25 mL 容量瓶中,用正己烷定容.分别从中移取 2 mL、1.5 mL、1 mL、0.5 mL、0.4 mL、0.3 mL、0.2 mL、0.1 mL 于另一 25 mL 容量瓶中定容,测定试样 1 在 198 ~ 310 nm 处 9 个不同浓度下的吸光度.

(2)准确称取 0.0522 g 试样 2 于 25 mL 容量瓶中,用正己烷定容.分别从中移取 2 mL、1.5 mL、1 mL、0.5 mL、0.4 mL、0.3 mL、0.2 mL、0.1 mL 于另一 25 mL 容量瓶中定容,测定试样 2 在 198 ~ 310 nm 处 9 个不同浓度下的吸光度.

(3)准确称取 0.0437 g 的试样 3 于 25 mL 容量瓶中,用正己烷定容.分别从中移取 2 mL、1.5 mL、1 mL、0.5 mL、0.4 mL、0.3 mL、0.2 mL、0.1 mL 于另一 25 mL 容量瓶中定容,测定试样 3 在 198 ~ 310 nm 处 9 个不同浓度下的吸光度.

3 结果与讨论

由于技术上的原因,目前所得产品中的 CLA 是其各种异构体的混合物.早期曾有人用紫外光谱进行样品中共轭亚油酸的定性分析^[1],共轭亚油酸在 232 ~ 234 nm 有最大吸收,由于紫外光谱不能分别给出 CLA 的各种异构体的含量,且有研究者认为产物中其他脂肪酸成分会对 CLA 的紫外吸收产生干扰^[2].过多的看到其不足的一面,而未给予足够的重视,也没有给出切实可用的经验公式.国内有研究者^[3]给出过用 UV 测定共轭二烯含量的公式,按其所述操作,实际中应用较为困难.由于共轭亚油酸沸点较高,且高温下易氧化变性,因此分析中常将其做进一步的衍生,最常用的方法是将其甲酯化,再用气相色谱进行定量分析.这方面的研究工作报道的较多^[4 ~ 12].尽管 GC 的分析结果准确度高,但必须做衍生

而手续繁杂,且要保证甲酯化前后各脂肪酸成分不发生变化,对仪器和操作的要求比较高,成本昂贵,不适用于工业化生产中大批量样品的抽样分析.为此本文利用紫外可见分光光度计,给出廉价、快速测量共轭亚油酸含量的方法和切实可行的经验公式.

3.1 样品的紫外吸收分析

以波长为横坐标,吸光度为纵坐标,测定试样 1、试样 2、试样 3 不同质量浓度(g/L)的正己烷溶液的吸光度.紫外分析结果见图 1 至图 3,图例单位为样品质量浓度(g/L)

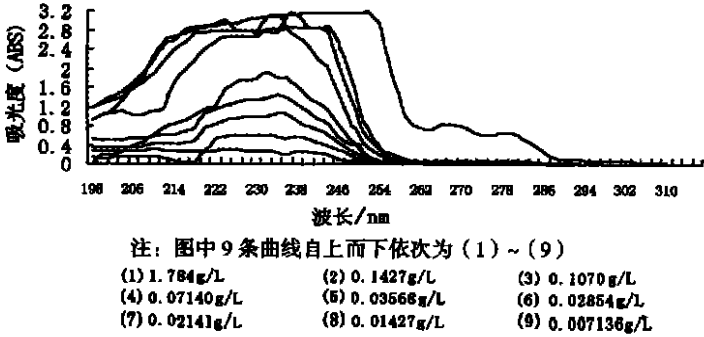


图 1 CLA 紫外光谱分析

Fig. 1 Ultraviolet spectrum of CLA

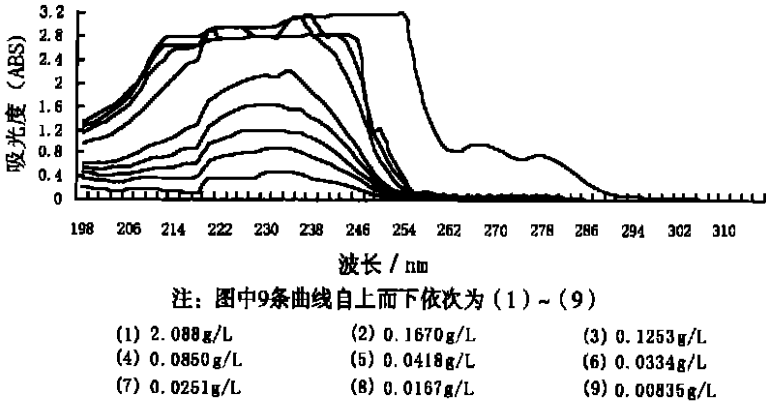


图 2 CLA 甲酯紫外光谱分析

Fig. 2 Ultraviolet spectrum of methyl ester of CLA

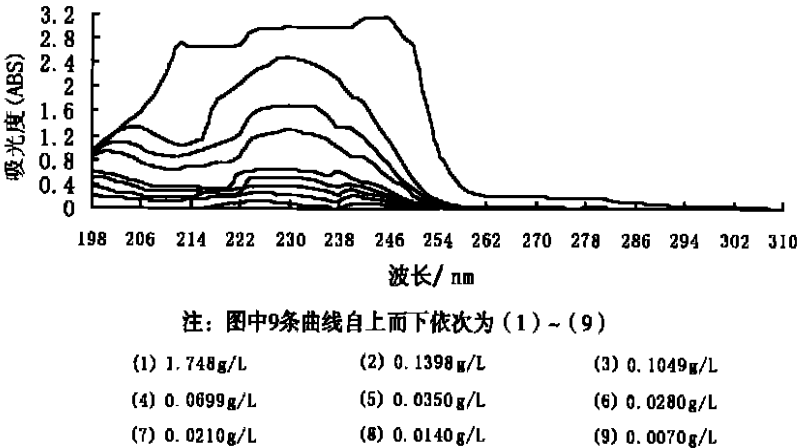


图 3 混合脂肪酸三甘酯紫外光谱分析

Fig. 3 Ultraviolet spectrum of mixed fatty acid triglyceride

3.2 谱峰的归属

为确定谱峰的归属,测定了亚油酸乙酯(自制,根据气相色谱积分面积计算的亚油酸乙酯的相对含量为 83.29%)、共轭亚油酸乙酯(自制,根据气相色谱积分面积计算的共轭亚油酸乙酯的相对含量为 78.70%)的紫外吸收谱图. 0.02232 g/L 亚油酸乙酯的正己烷溶液和 0.02299 g/L 共轭亚油酸乙酯的正己烷溶液 200~300 nm 的紫外吸收谱图见图 4.

从实验结果看,波长在 200~215 nm 的吸收可视为是油酸和亚油酸产生吸收的加合. 215~250 nm 的吸收可视为是共轭亚油酸的所有异构体产生吸收的加合.

一般而言,共轭二烯在 232~234 nm 有最大吸收.在制取和存储共轭亚油酸的过程中,会发生共轭二烯结构的进一步氧化,部分氧化的过程也是共轭化的过程,会生成少量共轭化的三烯和次级氧化代谢产物以及极少量的共轭四烯^[13].次级氧化产物所产生的吸收峰在 268 nm 处,共轭三烯烃的主峰在靠近 267 nm 处,和起来会在 278 nm 处产生吸收,这一点在文献中已见报道^[14],从图 1 和图 2 中也可看出.由于共轭亚油酸有 16 种异构体(位置异构和几何异构),所以在谱图 215~250 nm 范围内各种异构体的吸收会连成一体.最大吸收峰有时会不在 232~234 nm,而是发生一定的偏移.

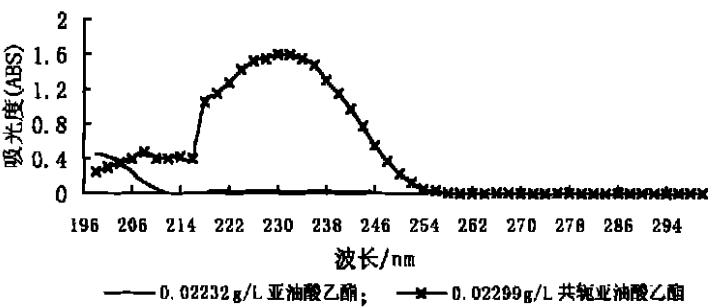


图 4 亚油酸乙酯和共轭亚油酸乙酯的紫外吸收谱图
Fig. 4 UV absorbance spectrogram of ethyl ester of linoleic acid and conjugated linoletic acid

3.3 标准曲线的绘制

根据朗伯-比耳定律,当吸光度与吸光物质的质量浓度成正比时,以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,得到的工作曲线应是一通过原点的直线.尽管本实验得出的工作曲线与原点稍有偏移,但在允许的误差范围内.采用 Microcal Origin Version 4.00 软件进行回归分析.从紫外光谱图中可以看出:质量浓度在 0.01~0.05 g/L 的范围是线性关系近似存在的范围,故取此质量浓度范围内的 5 个点进行线性回归,按照吸收最大且线性关系较好的原则选点.

表 1 CLA 回归分析数据表
Tab. 1 Data for regression analysis of CLA

质量浓度/(g/L)	0.007163	0.01427	0.02141	0.02854	0.03568	备注
吸光度(ABS)	0.307	0.626	1.011	1.359	1.817	取 232 nm 处 ABS

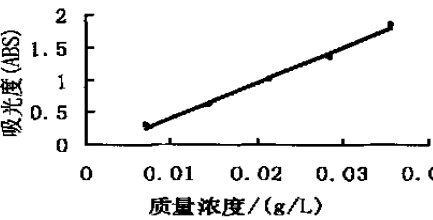


图 5 CLA 回归分析

Fig. 5 Regression analysis of CLA

采用 Microcal Origin Version 4.00 软件进行回归分析:
$$y_{scale}(Y) = A + B \cdot x_{scale}(X)$$

图 5 中以吸光度为纵坐标 $y_{scale}(Y)$, 质量浓度为横坐标 $x_{scale}(X)$, 进行回归分析的结果如下:

截距 $A = -0.10307$,
斜率 $B = 52.6359$.

表 2 CLA 甲酯回归分析数据表

Tab. 2 Data for regression analysis of methyl ester of CLA

质量浓度/(g/L)	0.00835	0.0167	0.0251	0.0334	0.0418	备注
吸光度(ABS)	0.389	0.785	1.191	1.578	1.981	取 228nm 处 ABS

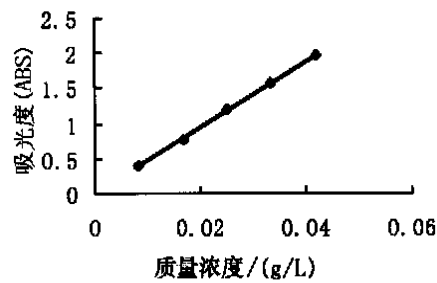


图 6 CLA 甲酯的回归分析

Fig.6 Regression analysis of methyl ester of CLA

表 3 混合脂肪酸三甘酯回归分析数据表

Tab. 3 Data for regression analysis of mixed fatty acid triglyceride

质量浓度/(g/L)	0.0070	0.0140	0.0210	0.0280	0.0350	备注
吸光度(ABS)	0.036	0.280	0.373	0.477	0.622	取 232nm 处 ABS

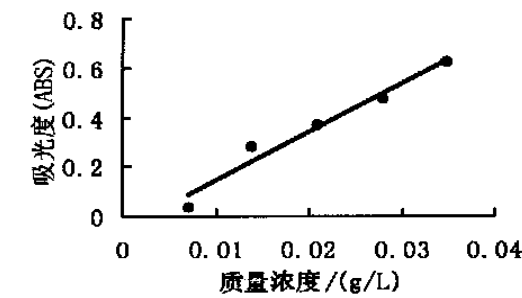


图 7 混合脂肪酸三甘酯回归分析

Fig.7 Regression analysis of mixed fatty acid triglyceride

采用 Microcal Origin Version 4.00 软件进行回归分析：

$$yscale(Y) = A + B \cdot xscale(X)$$

图 6 中以吸光度为纵坐标 $yscale(Y)$, 质量浓度为横坐标 $xscale(X)$, 进行回归分析的结果如下：

截距 $A = -0.00783$,

斜率 $B = 47.57213$.

采用 Microcal Origin Version 4.00 软件进行回归分析：

$$yscale(Y) = A + B \cdot xscale(X)$$

图 7 中以吸光度为纵坐标 $yscale(Y)$, 质量浓度为横坐标 $xscale(X)$, 进行回归分析的结果如下：

截距 $A = -0.0531$,

斜率 $B = 19.55714$.

3.4 经验公式的给出

基本原理是：在一定的浓度范围内，样品中共轭二烯的含量与吸光度成线性关系。由 GC-Mass 定出样品中共轭二烯的准确含量，结合回归系数，给出经验公式：

$$\frac{\text{含量}_1 \cdot \text{浓度}_1}{\text{吸光度}_1} = \frac{\text{含量} \cdot \text{浓度}}{\text{吸光度}},$$

式中含量₁由 GC-Mass 给出，浓度₁/吸光度₁是回归系数 B 的倒数，故得出经验公式为：

$$\text{含量} = \frac{\text{含量}_1}{B} \cdot \frac{\text{吸光度}}{\text{浓度}}。$$

试样 1~3 中各脂肪酸含量由 GC-Mass 给出(见表 4~表 6)。给出的 CLA 含量是各种异构体的总含量。

表 4 CLA 脂肪酸成分的 GC-Mass 分析

Tab. 4 GC-Mass analysis of CLA

成分	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	共轭亚油酸
含量/(%)	11.11	2.68	14.33	25.61	46.27

表 5 CLA 甲酯脂肪酸成分的 GC-Mass 分析
Tab. 5 GC-Mass analysis of methyl ester of CLA

成分	豆蔻酸	棕榈酸	9-十六碳烯酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	共轭亚油酸
含量/(%)	0. 78	19. 29	0. 53	2. 48	17. 72	8. 31	50. 89

表 6 混合脂肪酸三甘酯脂肪酸成分的 GC-Mass 分析
Tab. 6 GC-Mass analysis of mixed fatty acid triglyceride

成分	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	共轭亚油酸
含量/(%)	1. 86	1. 53	6. 17	59. 68	30. 76

由 GC-Mass 所得的 CLA 含量与回归系数 B 给出如下的经验公式. 式中 ABS 为待测样品采用 10 mm 石英比色皿所得的吸光度, C 为待测样品的正己烷溶液的质量浓度(g/L).

(1)对以游离脂肪酸形式存在的 CLA 样品, 样品适宜的质量浓度范围为 0.01 ~ 0.05 g/L, 以正己烷做参比.

$$\text{CLA 含量} = 0.008791 \times \frac{\text{ABS}}{C} \text{ (取 232 nm 处的 ABS)}.$$

(2)对以混合脂肪酸甲酯形式存在的样品, 样品适宜的质量浓度范围为 0.01 ~ 0.05 g/L, 以正己烷做参比.

$$\text{CLA 含量} = 0.01070 \times \frac{\text{ABS}}{C} \text{ (取 228 nm 处的 ABS)}.$$

(3)对以混合脂肪酸三甘酯形式存在的样品, 样品适宜的质量浓度范围为 0.02 ~ 0.05 g/L, 以正己烷做参比.

$$\text{CLA 含量} = 0.01573 \times \frac{\text{ABS}}{C} \text{ (取 232 nm 处的 ABS)}.$$

4 结论

实验发现:正己烷是最佳溶剂, 以正己烷做溶剂, 吸光度与共轭亚油酸质量浓度成线性关系的样品质量浓度范围是 0.01 ~ 0.05 g/L. 样品质量浓度< 0.01 g/L 时, 准确度太低;样品质量浓度> 0.05 g/L 时, 线性关系丧失;样品中其他脂肪酸成分含量不同时, 最大吸收波长不同, 在 228 ~ 234 nm 之间, 但最大吸收波长处的吸光度与样品中共轭亚油酸的总浓度有准确的线性关系. 不同的样品形式:如共轭亚油酸、共轭亚油酸甲酯、共轭亚油酸三甘酯, 其样品浓度与吸光度之间的回归系数不同. 采用紫外可见分光光度计测量大批量样品中共轭亚油酸乙酯的含量是切实可行的.

参 考 文 献

[1] Iversen S A, Cawood M J, Madigan A M, et al. Identification of a diene conjugated component of human lipid as octadeca-9, 11-dienoic acid. *FEBS Lett.* 1984, 171(2) :320~324

[2] Situnayake R D, Crump B J, Zezulka A V, et al. Use second-derivative spectroscopy to quantify conjugated dienes. *Ann Clin Biochem.* 1990, 27 (3) :258~266

[3] 曹栋, 史苏佳, 方伟旋. 脱水蓖麻油的研究. *中国油脂*, 1999, 24(4) : 55~56

[4] Horning E C, Tumer D A, Goldwater W H, et al. Quantitative Analysis of Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography. *J Lipid Res.* 1964, 5 : 20~27

[5] Werner A S, Luedecke L O, Shultz T D. Detemination of conjugated linoleic acid in three cheddar-type cheeses :effects of cheese cultures, processing, and aging. *J Agric Food Chem.* 1992, 40:1817~1821

[6] Fulk W K, Shorb M S. Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *J Lipid Res.* 1970, 11 :276~277

[7] Dawidowicz E A, Thompson T E. Artifacts produced by boron trifluoride methanolysis of a synthetic lectin containing cyclopropane fatty acids(1-2-dihydrosterculoyl-3-snphosphatidyl choline) . *J Lipid Res.* 1971, 12 :636~637

[8] Luddy F E, Barfold R A, Riemerschneider R W. Direct conversion of lipid compotents to their fatty acid methyl esters. *J Am Oil Chem Soc.* 1960, 37 :447~451

[9] Kramer J K G, Fellner V, Dugan M E R, et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids.* 1997, 32 :1219~1228

[10] Lorette N B, Brown Jr J H. Use of acetone dimethyl acetal in preparation of methyl ester. *J Org Chem.* 1959, 24 :261~262

[11] Nalur Chandrasekaran Shantha, Eric Andrew Decker, Bernhard Hennig. Comparison of methylation methods for the quantitation of conjugated linoleic acid isomers. *J of AOAC Intemational.* 1993, 76 :644~649

[12] Masao Yamasaki, Koji Kishihara, Ikuro Ikeda, et al. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 1999, 76 :933~938

[13] 贝雷著. Y H Hui, 徐生庚, 裴爱泳, 倪培德等译. 油脂化学与工艺学(第 5 版第 2 卷). 北京 :中国轻工业出版社, 2001. 71

[14] Rossell J B, Allen J C, Hamilton R J. Rancidity in foods. London : Applied Science Publishers, 1987. 21~45

Quantitation of Conjugated Linoleic Acid by UV Spectrophotometry

ZHANG Ya-Gang^{1,2} FAN Li^{1,2} MA Li² WEN Bin² Wumanjiang °ELI²

(1 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039 ;

2 Xinjiang Institute of Physical and Chemical Technology , Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011)

Abstract Through absorbance measurement of conjugated linoleic acid, methyl ester of conjugated linoleic acid and conjugated linoleic acid triglycide from 210 ~ 300 nm by UV-9100 spectrophotometer, absorbancy curve of measured samples at different concentration is plotted. In the appropriate concentration range of samples, linear relationship of absorbancy and samples concentration is presented by linear regression with Microcal Software Origin Version 4.0 system. The accurate concentration of conjugated linoleic acid is obtained with PE Autosystem XL-T ruboMass. Combined with regression constant data , emprical formula for the quantitation of conjugated linoleic acid by UV spectrophotometer is given.

Key words ultraviolet-visible spectrophotometry, conjugated linoleic acid, octadecadienoic acid