

以甲基酯化法與10% DEGS 充填之 層析管快速鑑別脂肪酸

林錦英 李蕙芳

摘 要

由1 N氫氧化鈉·甲醇溶液直接作用於植物油之脂肪酸甲基酯化法較A.O.A.C公定法所載三氟化硼法，操作簡易，節省時間且經濟，並具相等之實驗效果。又比較數種層析管充填劑中，以10% DEGS 附著於80/100 mesh Chromosorb W 之分離效果最好。

鍵語：甲基酯化，游離脂肪酸，DEGS 層析管充填劑。

前 言

植物油已成為現代人不可缺少的必需食品。市售食用植物油種類很多，品質各異，各種油脂品質鑑定之方法，極待加強研究，以期能抑止摻雜、假冒之情形。因此，本文據文獻A.O.A.C所載三氟化硼法¹及油脂類期刊(LIPIDS)所述之簡易甲基酯化法²，實驗、比較。並討論G.C層析管，不同之充填劑，其對組成各異之脂肪酸之分離效果。以期尋找出較簡單、迅速、精確之檢驗方法。

材料與方法

一、材料：

(一)標準品：

1. Methyl Myristate (C_{14:0})
2. Methyl Palmitate (C_{16:0})
3. Methyl Stearate (C_{18:0})
4. Methyl Oleate (C_{18:1})
5. Methyl Linoleate (C_{18:2})
6. Methyl Linolenate (C_{18:3})
7. Methyl Arachidate (C_{20:0})
8. Methyl Eruate (C_{22:1})
9. Methyl Behenate (C_{22:0})
10. Methyl Lignocerate (C_{24:0})

(二)試藥：

氯化鈉、甲醇、氫氧化鈉、無水硫酸鈉、三氟化硼·甲醇溶液均採用試藥特級。正己烷採用氣相層析級。

(三)試液之調製：

1. 1 N氫氧化鈉·甲醇溶液：取4 g 氫氧化鈉加甲醇使成100 ml。

2. 0.5 N氫氧化鈉·甲醇溶液：取2 g 氫氧化鈉同1.法操作。

(四)裝置與器具：

1. 裝置：

(1) 氣相層析儀：Varian 3700。

A. 檢出器：FID。

B. 層析管：玻璃製。長度：4' × 4'' × 2 mm。

C. 層析管充填劑共四種，分別試驗。

充填劑a：EGSS-X15%附著於100/120 mesh Chromosorb P上。

充填劑b：DEGS 10%附著於80/100 mesh Chromosorb W上。

充填劑c：DEGS 15%附著於80/100 mesh Chromosorb W上。

充填劑d：GP10% SP-216-PS 附著於100/120 mesh Supelceport上。

(2)迴流冷却裝置。

(3)離心機：轉速可達 3500 rpm 者。

(4)水浴。

2. 器具：

(1)共栓試管：20 ml，10 ml。

(2)濾紙：定量用。

(3)吸管。

二、方法：

(一)三氟化硼法 (Boron Trifluoride Method; 以下簡稱A法)：

精確稱取檢體約 300 mg 於 20 ml 共栓試管中，加 5 ml 0.5 N 氫氧化鈉·甲醇溶液，並加沸石一粒，於迴流冷却裝置上加熱 5 ~ 10 分鐘，次加入三氟化硼·甲醇溶液 5 ml，繼續迴流 2 分鐘後，以吸管正確加入 5 ml 正己烷，再加熱 1 分鐘。迅速於冷水冷却後取出，吸取適量上層液至共栓試管中，加入適量之無水硫酸鈉後過濾，取濾液以 G.C 檢定。

(二)簡易甲基酯化法 (Methyl esterification Method; 以下簡稱B法)：

精確稱取檢體 30 ~ 50 mg 於 10 ml 共栓試管中，加入 1 ml 1 N 氫氧化鈉·甲醇溶液，振搖，於室溫下靜置 1 小時後，加 2 ml 正己烷激烈振搖，再加 4 ml 蒸餾水振搖後、離心，吸取適量上層液至另一共栓試管中，加入適量無水硫酸鈉振搖後過濾，取濾液以 G.C 檢定。

結果與討論

一、結果：

(一)檢驗方法之比較：

1. 脂肪酸含量百分組成：

表一 檢體中五種脂肪酸之百分組成比較

Sample	Method	Fatty Acid				
		Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
O ₁	A	10.2	3.7	22.2	55.4	8.2
	B	10.2	4.0	22.5	55.7	8.1
O ₂	A	10.1	3.7	22.5	55.1	8.1
	B	10.3	3.8	22.5	55.3	8.0
O ₃	A	10.4	3.7	22.0	55.0	8.5
	B	10.6	3.7	21.7	55.1	8.5

取市售沙拉油檢體 O₁、O₂ 及 O₃ 分別以二組依前述 A、B 兩種方法操作。取含量較多之五種脂肪酸百分組成做比較，發現二種檢驗方法之結果差異極小，如表一。

2. 圖譜：

以檢體 O₃ 經 A、B 二種檢驗方法處理後，持相同之 G.C 條件，所得之圖譜如圖一、二。以 A 法處理注射濃度 30 mg/ml，注射量 1.5 μ l 之圖譜如圖一。以 B 法處理注射濃度 18 mg/ml，注射量 1.5 μ l 之圖譜如圖二。經比較結果，並無任何特異不同之處。

故由以上之比較結果：B 法較理想。

(二)層析管填充劑對脂肪酸之分離效果

取由 C₁₄ 至 C₂₀ 之 10 種經酯化之脂肪酸標準品 (見材料中標準品項) 混合液為試驗對象進行氣相層析，分別使用四種不同之層析管填充劑 a、填充劑 b、填充劑 c 與填充劑 d，並調整層析之溫度及流速、加以試驗，發現其中前三種填充劑之分離效果較好。而再各對其層析管之溫度及流速詳加檢討如下：

1. 使用填充劑 a

G.C 條件：

層析管溫度：170 °C 或 180 °C。

檢出器及注射口溫度：240 °C。

放大器 (Attenuation)：5 × 10⁻¹¹。

紀錄表速度：0.25 cm/min。

載行氣體 (N₂) 流速：35 或 40 ml/min。

結果：9 種脂肪酸之層析結果 C₁₄ 至 C₂₀ 之順序依次排列。

①層析管溫度 170 °C，流速為 40 ml/min 時，分離效果良好。惟分離至 Behenic acid (

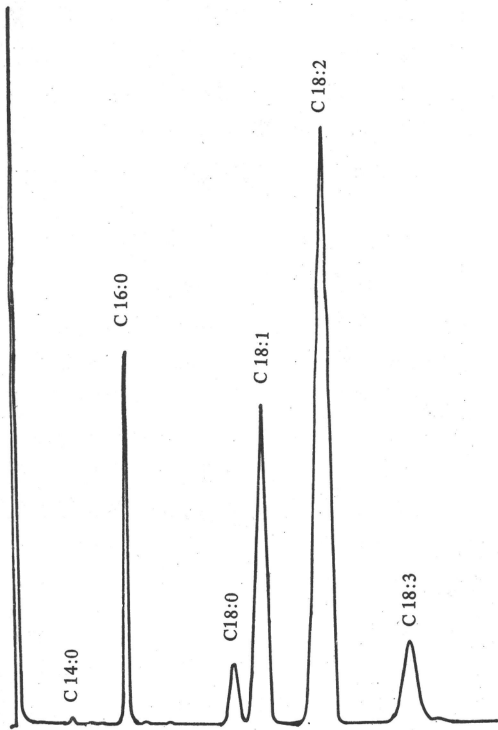
C_{22:0})，第 9 支波峰時]，已需時 87 分鐘。(如圖三)

②層析管溫度為 180 °C，流速為 35 ml/min，分離情形不良，第 6 支波峰與第 7 支波峰有重疊現

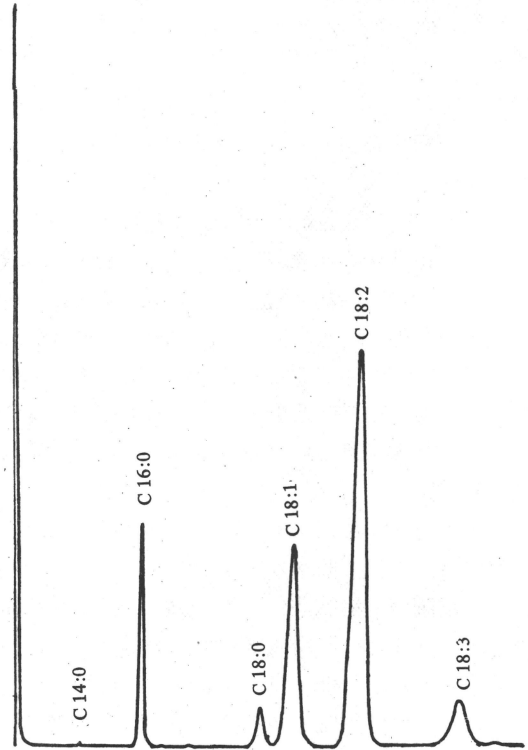
象，分離至第 9 支波峰時，需 57 分鐘。(如圖四)

2.使用充填劑 b：

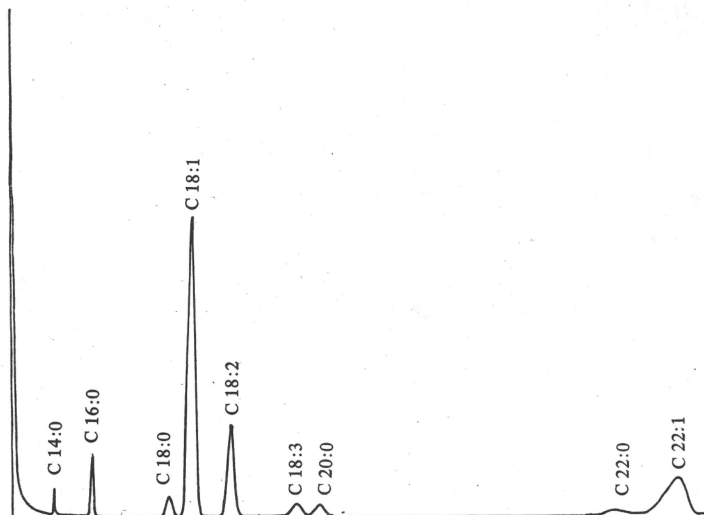
GC條件：



圖一 檢體 O₃ 經 A 法 (三氟化硼法) 處理之脂肪酸 G.C 圖譜。



圖二 檢體 O₃ 經 B 法 (簡易甲基酯化法) 處理之脂肪酸 G.C 圖譜。



圖三 脂肪酸標準品使用充填劑 a (Column Temp.: 170 °C, Flow Rate: 40 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。

層析管溫度：160 °C 或 170 °C 或 180 °C。

檢出器與注射口溫度：240 °C。

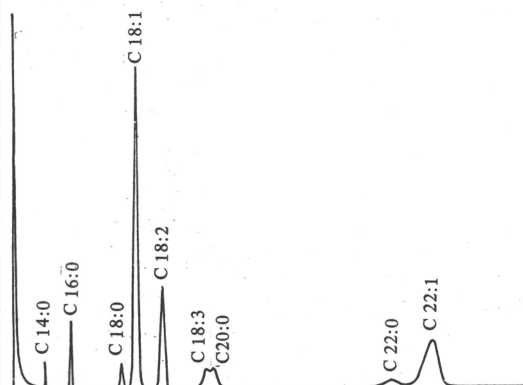
放大器： 10×10^{-11} 。

紀錄表速度：0.25 cm/min。

載行氣體 (N₂) 流速：30 ml/min。

結果：10 種脂肪酸之層析順序依次排列，惟 Linolenic acid (C_{18:3}) 與 Arachidic acid (C_{20:0}) 的位置對調。即第 6 支波峰為 C_{20:0}，第 7 支波峰為 C_{18:3}。

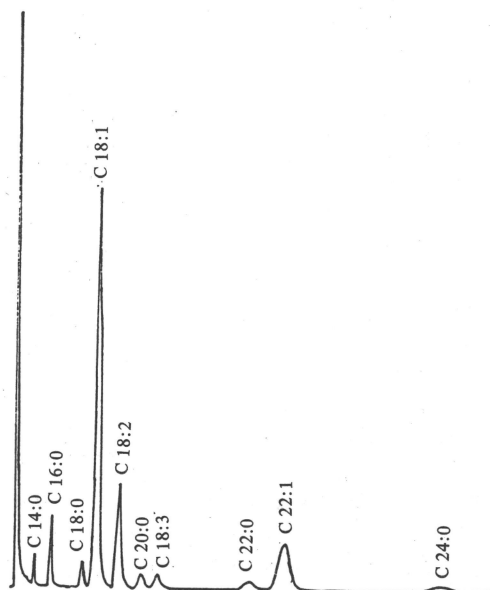
①層析管溫度為 160 °C，流速 30 ml/min，分離效果良好，分離至第 9 支波峰時，需時 57 分鐘。(如圖五)



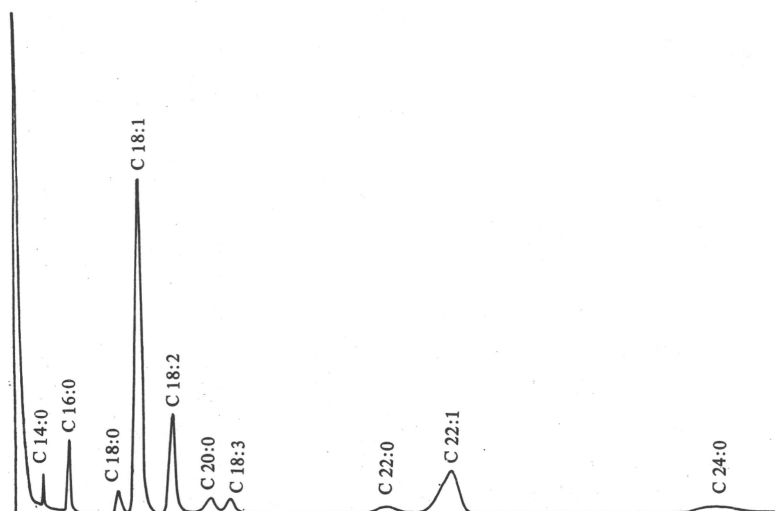
圖四 脂肪酸標準品使用充填劑 a (Column Temp.: 180 °C, Flow Rate: 35 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。

②層析管溫度為 170 °C，流速 30 ml/min，分離效果極好，分離至第 9 支波峰時需時 32 分鐘。(如圖六)

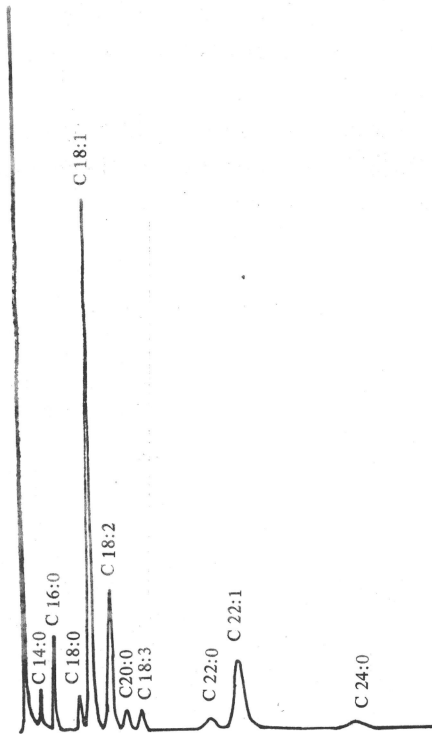
③層析管溫度為 180 °C，流速 30 ml/min，分離效果雖好，但稍為擁擠，分離至第 9 支時，需時 20 分鐘。(如圖七)



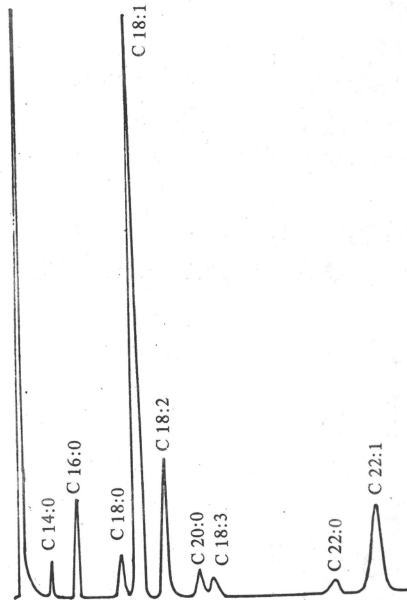
圖六 脂肪酸標準品使用充填劑 b (Column Temp.: 170 °C, Flow Rate: 30 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。



圖五 脂肪酸標準品使用充填劑 b (Column Temp.: 160 °C, Flow Rate: 30 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。



圖七 脂肪酸標準品使用充填劑 b (Column Temp. : 180 °C , Flow Rate : 30 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。



圖八 脂肪酸標準品使用充填劑 c (Column Temp. : 190 °C , Flow Rate : 15 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。

3. 使用充填劑 c :

G.C 條件 :

層析管溫度 : 190 °C 、 180 °C 、 170 °C 。

檢出器及注射口溫度 : 240 °C 。

放大器 (Attenuation) : 5×10^{-11} 。

紀錄表速度 : 0.25 cm/min 。

載行氣體 (N_2) 流速 : 15 ml/min 。

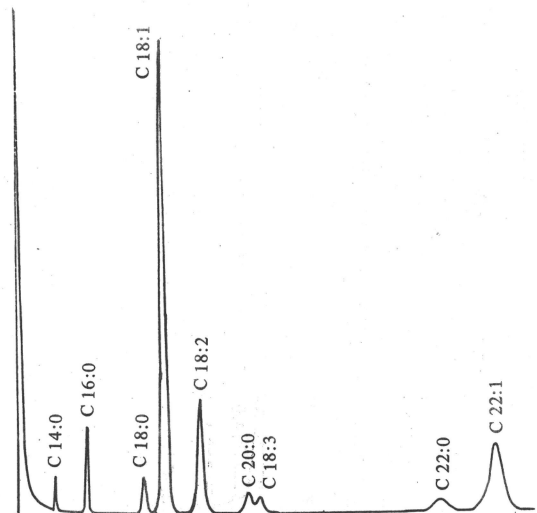
結果 : 9 種脂肪酸之層析結果如充填劑 b 。

① 層析管溫度 190 °C , 流速為 15 ml/min 時 , 分離效果良好 , 分離至第 9 支波峰時 , 需時 39 分鐘。 (如圖八)

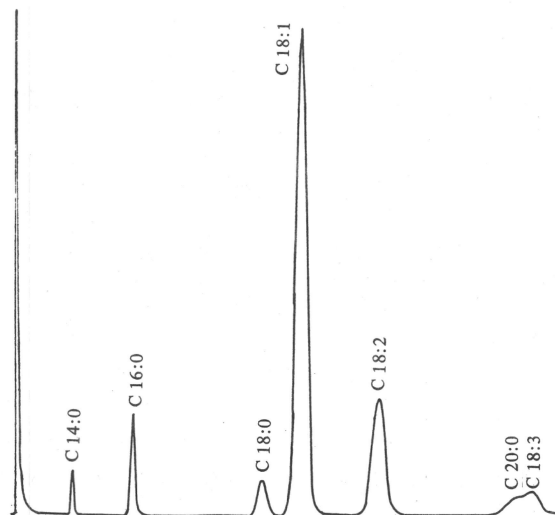
② 層析管溫度 180 °C , 流速 15 ml/min 時 , 第 6 及第 7 支波峰有重疊現象 , 需 65 分鐘。 (如圖九)

③ 層析管溫度降低至 170 °C , 流速 15 ml/min 時 , 分離情況不理想。 (見圖十)

由以上之比較結果 , 以 10 % DEGS 附着於 80/100 mesh chromosorb W 之充填劑 a , 在層析管溫度為 160 °C 或 170 °C 及流速 30 ml/min 之效果最理想。



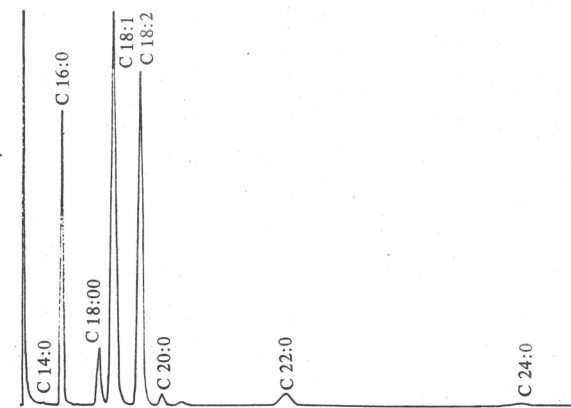
圖九 脂肪酸標準品使用充填劑 c (Column Temp. : 180 °C , Flow Rate : 15 ml/min) 之脂肪酸 G.C 圖譜。



圖十 脂肪酸標準品使用充填劑 c (Column Temp.: 170 °C , Flow Rate : 15 ml/min) 之脂肪酸 G. C 圖譜。

C_{14:0} , C_{16:0} , C_{16:1} , C_{17:0} , C_{18:0} , C_{18:1} , C_{18:2} , C_{18:3} , C_{20:0} , C_{20:1} , C_{20:2} , C_{22:0} , C_{24:0} , C_{22:1} 等 14 種為主 (而其中 C_{16:1} , C_{17:0} , C_{20:1} , C_{20:2} 因無標準品而未加檢討) 。故本文僅就此範圍探討層析充填之分離效果。

1. 使用充填劑 a : 層析管溫度為 170 °C , 流速為 40 ml/min 條件下, 雖有很好之分離效果, 但費時太長, [可由溫度程式 (Temperature program) 分析改善, 但並未列入本文探討] 。



圖十一 檢體花生油使用充填劑 b (Column Temp : 160 °C , Flow Rate : 30 ml/min) 之脂肪酸 G. C 圖譜。

二、討論：

(一) 方法上之比較：如表二

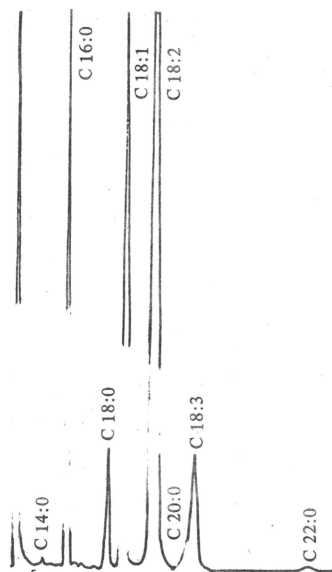
表二 A 法與 B 法之比較分析表

項 目	A 法	B 法
1. 迴流冷却裝置	必需	不需
2. 試藥及其用量	較多	較少
3. 費 用	較高	較低
4. 人工操作時間 (含準備工作)	較長	較短
5. 操作過程	繁雜	簡易
6. 正 己 烷	可能有蒸發現象	不可能有蒸發現象

其次是, 由五種脂肪酸之總百分組成之結果顯示與張氏³之研究相若。且由二種方法所得的 G C 圖譜比較, 亦無差異。所以, B 方法實是一種非常理想、快速、簡易、簡便又經濟之檢驗植物油脂之方法。

(二) 層析管充填劑之比較

脂肪酸的種類很多, 就一般常用植物油, 包括花生油、芝麻油、黃豆油、葵花子油等, 其中以



圖十二 檢體 O₂ 使用填充劑 c (Column Temp. : 190 °C , Flow Rate : 15 ml/min) 之脂肪酸 G. C 圖譜。

而若將其溫度提昇到180℃時，雖可縮短時間，但Linolenic acid及Arachidic acid發生了重疊現象。

2. 使用充填劑b：層析管溫度為160℃，流速30 ml/min時，分離效果良好，時間亦較使用充填劑a為經濟。且提高層析管溫度時，亦無重疊之現象。顯示其對各脂肪酸有很好之分配率。以花生油檢體，經檢驗結果，非常理想。（如圖十一）

但層析管溫度達180℃時，稍嫌擁擠，脂肪酸亦可能造成重疊現象（如第2支波峰（ $C_{16:0}$ ）與第3支波峰（ $C_{18:0}$ ）中間尚有（ $C_{16:1}$ ）及（ $C_{17:0}$ ）。第7支波峰（ $C_{18:3}$ ）或（ $C_{20:0}$ ）與第8支波峰（ $C_{22:0}$ ）間有（ $C_{20:1}$ ），（ $C_{20:2}$ ）。因此，使用填充劑b時，層析管溫度在160℃或170℃，流速為30 ml/min時，條件最為良好。

3. 使用充填劑c：層析管溫度為190℃，流速為15 ml/min時，分離效果良好，惟以檢體 O_2 經氣相層析結果，（ $C_{20:0}$ ）與（ $C_{18:3}$ ）兩支波峰，分離不良，故亦不理想。（如圖十二）

4. 使用DEGS（充填劑b與c）及EGSS-X（充填劑a）兩種填充劑，另有一顯著不同之處，即二者對Linolenic acid（ $C_{18:3}$ ）及Arachidic acid（ $C_{20:0}$ ）之前後分離次序不同。使用

DEGS時，第6支波峰為 $C_{20:0}$ ，第7支波峰為 $C_{18:3}$ ，而使用EGSS-X時，正好相反。（見圖三、五）。故此二種層析管之填充劑亦可作為比對之用。

誌 謝

本研究承蒙食品工業研究所潘文智博士及邱秀英小姐提供寶貴資料，使本文得以順利完成，謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. Methods of A.O.A.C. 1980. Oils and Fats: Boron Trifluoride Method (14)-Official First Action. A.O.A.C.-IUPAC Method. 13th.
2. Pan, W. P. and E. G. Hammond. 1983. Methods: stereospecific analysis of triglycerides of *Glycine max.*, *Glycine soya*, *Avena sativa* and *Avena sterilis* strains. *Lipids*. 18, No. 12.
3. 張駟祥. 1975. 食用油脂化學. 食品工業研究所.
4. Litchfield, C. 1972. Analysis of triglycerides Academic Press. New York.

RAPID DETERMINATION OF FATTY ACIDS BY METHYLESTERIFICATION AND 10% DEGS COLUMN OF GAS CHROMATOGRAPHY

G-Y LEAN AND H-F LEE

ABSTRACT

Method of Determination of fatty acids of vegetable oil by Methylesterification with methanolic in NaOH solution was compared with borontrifluoride method described in A.O.A.C. The former is more simple, easy, time-saving and

less costed. Comparison was also made to several packing materials of Gas chromatography column. 10% DEGS on 80/100 mesh chromosorb w showed best efficiency for separation of fatty acids.