

利用ACQUITY™ QDa™ II质谱检测器方法开发推进牛奶和婴儿配方奶粉中游离脂肪酸的分析

Dhwani Sardana, Jonathan Pugh, Cristian Cojocariu

Waters Corporation

摘要

牛奶和婴儿配方奶粉样品中的游离脂肪酸(FFA)分析可用于质量控制、产品开发和合规性分析。在食品行业中，缺少简单明了的FFA分析方法。本研究将深入介绍使用LC-MS分析FFA的方法开发过程。我们研究了一系列LC色谱柱、流动相、LC梯度和流速，然后使用选定的市售样品来分析最终方法的灵敏度、重复性并进行了初步验证。所开发的方法不仅为牛奶和婴儿配方奶粉样品提供了可靠的FFA筛查解决方案，还为进一步优化后对各种样品类型进行常规FFA定量分析开辟了道路。

优势

- 实时、定性和定量LC-MS方法开发
- 可在不到6 min内快速实现19种FFA (C8:0~C24:0)的色谱分离
- 利用质量数信息区分保留时间相似但质量数不同的化学组分
- 高灵敏度和高重复性的方法
- 从真实样品中轻松快速地提取FFA

简介

脂肪酸(FFA)在塑造乳制品独特的感官和视觉特征方面发挥着关键作用。然而，由于高浓度FFA会产生不良风味，进而导致酸败，因此需要谨慎管理脂肪酸对风味的显著影响¹。此外，这些脂肪酸的氧化又带来了另一项挑战，表现为乳制品的适口性下降和品质变差。由于脂质分解为醛、酮和醇，这种降解过程会产生一种令人不悦的“酸败”风味²。特别是在婴儿配方奶粉配方中，保持理想风味变得至关重要，因为这些配方是婴儿膳食摄入的基本组成部分。

对婴儿配方奶粉和牛奶中的FFA进行系统性筛查至关重要，涵盖了质量控制(QC)、产品改进、认证和法规合规性等多种关键功能。这类FFA是婴儿配方奶粉和牛奶中营养和风味成分不可或缺的一部分。除了作为能量来源，FFA还充当脂溶性维生素（如A、D、E和K）的重要载体。此外，FFA还通过建立保护性脂肪层为婴儿提供物理保护，同时促进视觉和神经系统的发育。因此，全球都强制要求对婴儿配方奶粉进行严格审查，监管审查也十分严格。此外，奇数链饱和脂肪酸（尤其是C15:0和C17:0）的鉴定和定量分析对于作为2型糖尿病、中风和特定原因死亡率等的生物标志物，具有深远的意义。因此，FFA分析的关联性和影响不仅限于在婴儿配方奶粉和牛奶的评估范围^{3,4}。

脂肪酸具有非极性特点，因此需要极性相对较低的色谱柱才能实现高效的色谱分离。此外，洗脱过程需要使用陡峭的有机相梯度，以确保理想的分离效果。目前，游离脂肪酸的评估主要采用气相色谱(GC)，该方法通常与火焰离子检测器(FID)或高分辨率质谱仪(HRMS)结合使用。但是，GC分析需要将脂肪酸转化为脂肪酸甲酯(FAMES)，这一步骤常常带来挑战，例如增加MS噪音水平、影响响应灵敏度、产生干扰、成本增加和分析复杂性增加等。

相比之下，使用液相色谱-质谱联用(LC-MS)作为替代方案，具有许多显著的优势。与GC不同，LC-MS不仅操作更简便，还无需对脂肪酸进行衍生化出力，因此消除了分析人员出错等相关复杂问题，同时保持样品的完整性。

前述的主流FFA分析技术通常具有操作复杂、成本高昂且依赖与复杂质谱方法设置的特点。相比之下，本研究中介紹的是一种精简常规的FFA分析方法，该方法在配备ACQUITY QDa II质谱检测器的LC上使用标准化的FFA混合物进行分析，每个样品在六分钟内即可获得结果。

实验

LC系统	ACQUITY I-Class UPLC系统
LC色谱柱	ACQUITY UPLC BEH™ 苯基柱 1.7 μm, 2.1 × 50 mm (P/N: 186002884)
柱温	60 °C
进样体积	10 μL
流速	0.4 mL/min
流动相A	1 mM甲酸铵(NH ₄ HCO ₄)水溶液
流动相B	乙腈
样品稀释剂	流动相A和B(1:1)

表1.液相色谱参数。

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	45	55	6
0.2	0.4	45	55	6
4.0	0.4	20	80	6
4.5	0.4	20	80	6
4.6	0.4	45	55	6
6.0	0.4	45	55	6

表2.液相色谱梯度。

MS系统	ACQUITY QDa II检测器
毛细管电压	0.8 kV (最大)
采样锥孔	20 V
脱溶剂气温度	600 °C
电离模式	负离子电喷雾(ES-)
质量范围	m/z 50~1500
采集速率	5 Hz
采集模式	选择离子监测(SIR)

表3.MS参数。

数据管理

使用MassLynx™ v4.2采集数据完成，使用TargetLynx™处理数据。

样品

用于分析的GLC参比标准品426（包含20种游离脂肪酸，范围从C6:0到C24:0）购自Nu-Chek Prep（美国明尼苏达州） <<http://www.nu-chekprep.com/home.htm>>。标准品中各组分的重量百分比范围为2%~16%（表3）。混标中各FFA组分的浓度与真实样品中的浓度相近。

名称	重量百分比	分子式	分子量(Da)	m/z [M-H] ⁻	保留时间 (min)
己酸 *	2	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.2	n.d.	n.d.
辛酸	4	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.2	143.1	0.43
癸酸	8	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	171.1	0.57
月桂酸	8	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.3	199.1	0.77
肉豆蔻酸	12	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.4	227.1	1.09
肉豆蔻油酸	2	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226.4	225.1	0.89
十五烷酸	2	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.4	241.1	1.36
棕榈酸	16	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.4	255.2	1.60
棕榈油酸	2	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254.4	253.2	1.29
十七烷酸	2	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.5	269.2	1.86
十七烯酸	2	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268.4	267.2	1.54
硬脂酸	12	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.5	283.2	2.1
油酸	8	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.5	281.2	1.79
亚油酸	6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.5	279.2	1.49
亚麻酸	2	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.4	277.2	1.23
十九烷酸	2	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298.5	297.3	2.41
花生酸	2	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.5	311.3	2.69
11-二十碳烯酸	4	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310.5	309.3	2.3
二十二烷酸	2	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340.6	339.3	3.24
二十四烷酸	2	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.6	367.3	3.75

*n.d.- 未检出

表4. 混标中的游离脂肪酸。

将市售牛奶和婴儿配方奶粉样品用甲醇(MeOH) (1:5)稀释，然后在10,000 g下离心5 min。得到的上清液用去离子水(1:5)进一步稀释。然后用流动相A和B (1:1)稀释溶液，并转移到LC样品瓶中进行LC-MS分析。

结果与讨论

色谱分离

LC-MS方法开发的第一步是筛选合适的LC色谱柱和流动相。由于烃链的长度和羧酸等官能团的存在，FFA的极性可能有所不同。碳原子数较少的短链FFA的极性通常较低，而碳原子数较多的长链FFA由于羧酸基团的存在，极性往往更高。

本应用中测试了三种ACQUITY UPLC色谱柱，分别为AX BEH C₁₈、CSH C₁₈和BEH苯基柱。AX和CSH色谱柱在目标FFA的峰分离上表现不足，并且需要较高的有机相梯度(> 80%)，这会降低峰响应，因

为MS离子源需要水来实现理想的电离效率。使用苯基柱时，在6 min的梯度内，20种混合物组分（范围从C8:0到C24:0）中有19种组分实现了理想的峰分离。

无论流动相B的组成如何，均可得出结论：流动相A中的1 mM甲酸铵水溶液(NH_4HCO_4)对于电离样品中的FFA至关重要。浓度高于1 mM的 NH_4HCO_4 会显著降低信号强度（图1）。

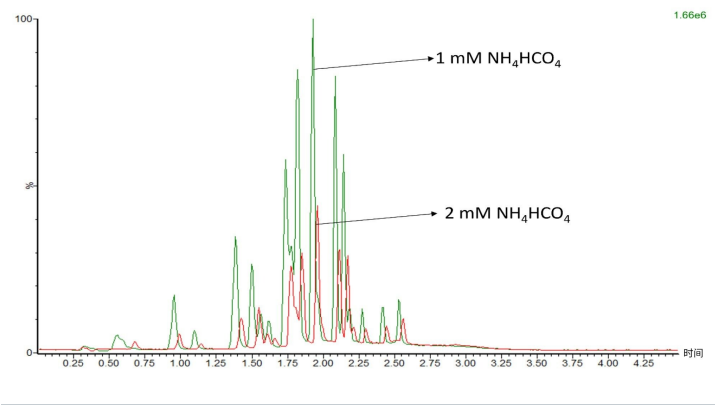


图1. 当在流动相A中使用2 mM NH_4HCO_4 （红色）代替1 mM NH_4HCO_4 （绿色）作为添加剂时，信号强度减少了五倍。每次测试的柱上混标上样量为10 ng。

流动相	梯度	流速 (mL/min)	样品稀释剂
流动相A: 1 mM NH_4HCO_4 流动相B: IPA: ACN(1:1)	B%: 50% (0~0.2 min) → 85% (4 min) → 50% (4.10 min) → 50% (5 min)	0.6	IPA: ACN (3:7)
流动相A: 1 mM NH_4HCO_4 流动相B: MeOH	B%: 70% (0~0.2 min) → 90% (4~4.5 min) → 70% (4.60 min) → 70% (6 min)	0.4	MeOH: H ₂ O (1:1)
*流动相A: 1 mM NH_4HCO_4 流动相B: ACN	B%: 55% (0~0.2 min) → 80% (4~4.5 min) → 55% (4.6 min) → 55% (6 min)	0.4	MeOH: H ₂ O (1:1) *ACN: H ₂ O (1:1)

表5.LC-MS FFA分析方法开发的测试方法。*最终结果方法条件在方法开发步骤中确定。

在确定上述最终方法之前，测试了三种方法（表5）。所有方法均使用相同的流动相A。流动相B影响峰分离和MS响应。使用异丙醇(IPA)和乙腈(ACN) (1:1)作为流动相B改善峰形和响应；但是，始终观察到高背景噪音（图2）。

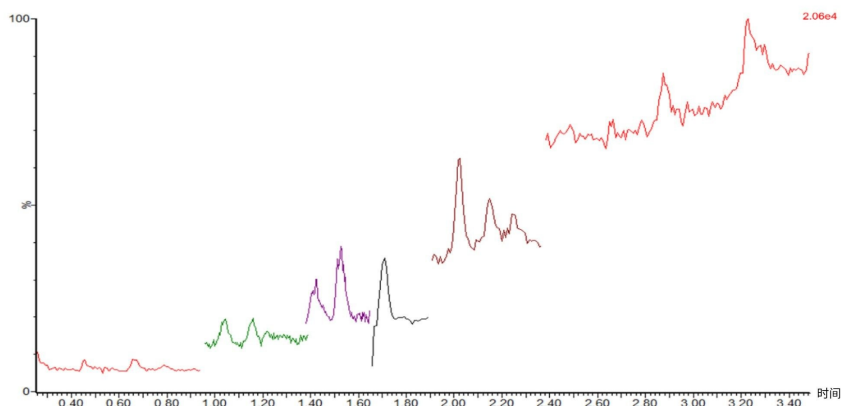


图2.当在柱上分析500 pg/μL FFA混标时，使用IPA:ACN(1:1)作为流动相B，背景噪音高。

使用甲醇作为流动相B提供了与ACN相似的响应和灵敏度，但需要非常高的有机相梯度(70%~90%)，这会导致电离效果较差并出现展宽的拖尾峰。

最终的方法条件是以ACN作为流动相B，因为这样对于混标中的大多数FFA而言，该方法的峰分离效果良好、灵敏度较高，且所有组分的重复性RSD均低于8%（表6）。灵敏度定义为定量下限(LLOQ) < 10 pg/ μL (ppb)，对应于婴儿配方奶粉或牛奶样品中的0.01 mg/L（表7）。

由于混标中FFA组分的种类繁多以及FFA的化学性质，必须在梯度开始时将样品稀释剂与FFA组分相匹配。观察到以ACN为流动相B时，使用流动相A:B (1:1)代替甲醇:水(1:1)作为样品稀释剂时，后洗脱组分的响应提高了10倍（图3）。

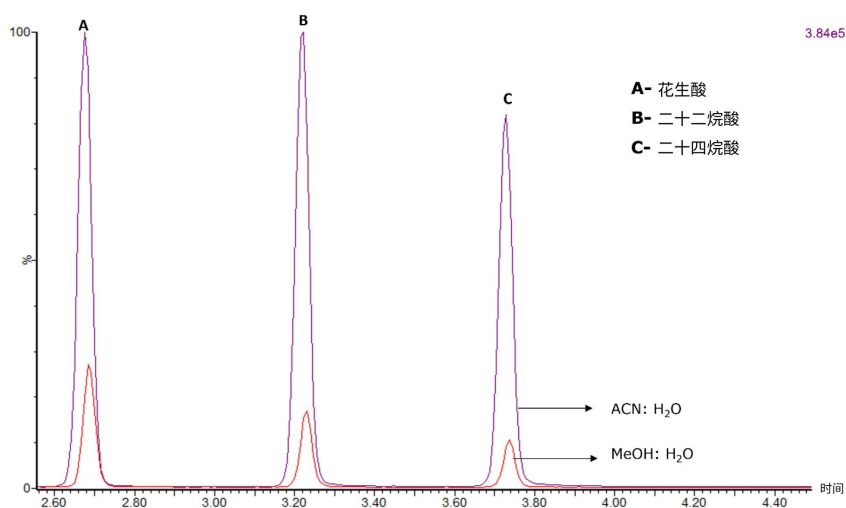


图3.稀释剂对FFA LC-MS分析的影响。每次进样的FFA标准品的柱上进样量为500 pg/μL。

本研究测试了一系列流速和流动相梯度，以在不降低峰响应的前提下提高峰分离度。对0.8~0.3 mL/min范围内的流速进行评估后，确定了0.4 mL/min是能够提供理想QDa II性能的速率（图4）。

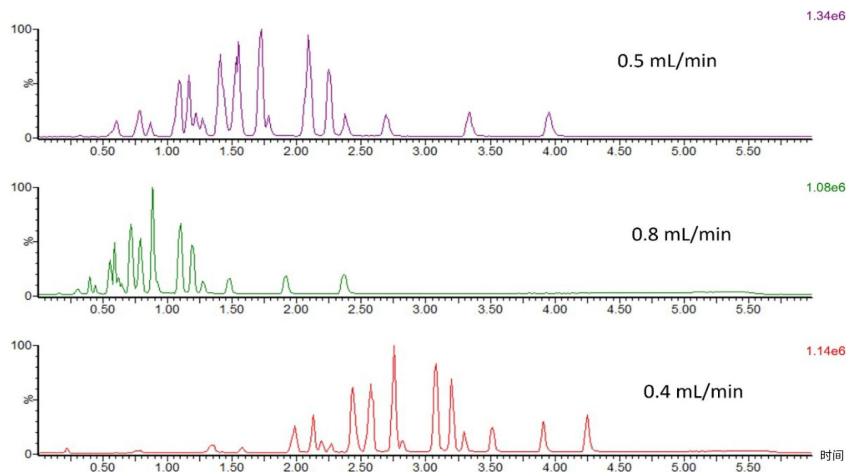


图4.色谱柱流速对FFA峰分离的影响。每次进样的FFA标准品的柱上进样量为10 ng。

为了从LC色谱柱上洗脱FFA，需要高有机相条件。因此，为了获得早洗脱组分（即C8:0至C12:0）的峰，研究中选择了高有机相起始条件（流动相B为55%）。

将流动相B%从55%提高至90%后，观察到所有化合物在不到1 min的时间内就从色谱柱中快速洗脱。相比之下，将梯度从55%逐渐过渡到80%则取得了良好的结果，峰分离良好（图5）。这种优化的峰分离有助于对混合物中的各FFA应用单离子扫描(SIR)采集模式。实施方法是将采集方法分为5个独立的SIR时间窗口，每个窗口涵盖3~5种不同的FFA组分。

选择SIR采集延长了每种组分的持续时间，从而改善了峰响应和分离，减少了信噪比(S/N)，从而提高了灵敏度和响应重现性，如图6所示。

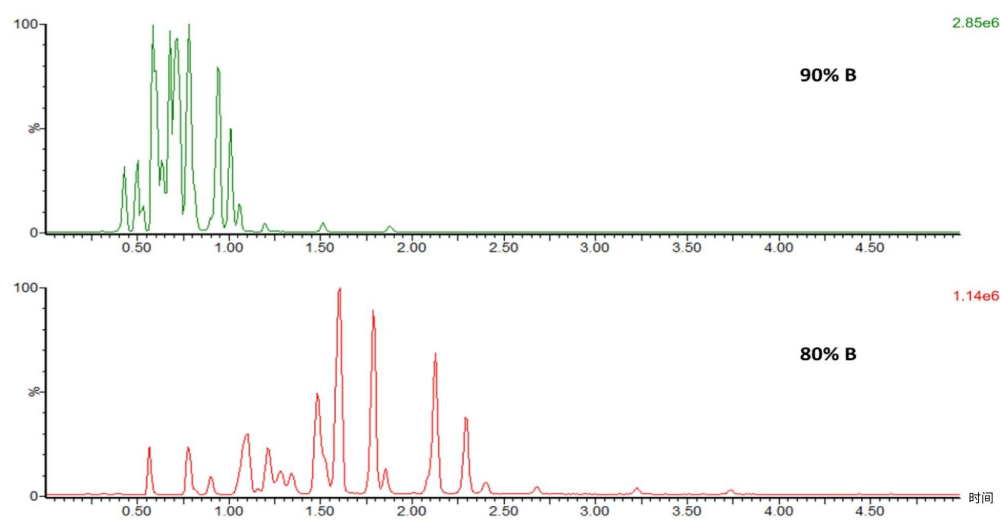


图5.FFA混标的峰分离需要使用有机相从高逐渐到低的梯度。FFA标准品的柱上进样量分别为最高10 ng和最低5 ng。

图6展示了为FFA分析选择的最终LC-MS方法获得的色谱图。在评估一系列方法开发因素后，确定以1 mM NH₄ HCO₄水溶液和ACN分别作为流动相A和B，并在BEH苯基柱上以B%从55%~80%为梯度（表1和表2）。

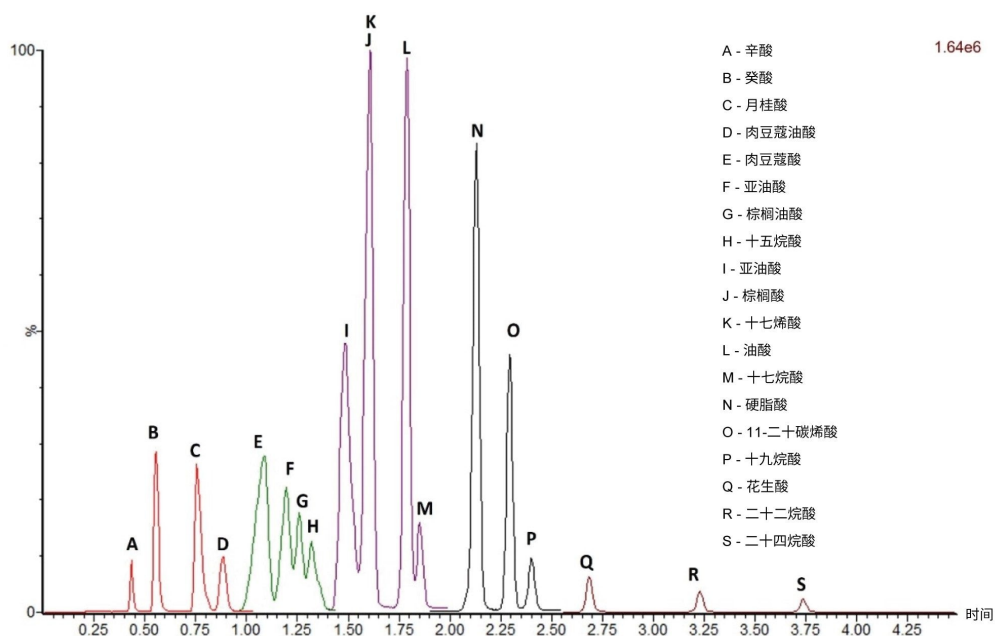


图6. 使用包含所有19种目标FFA的五个不同时间窗口进行的SIR采集。每个SIR窗口和FFA峰以不同颜色和字母突出显示。

灵敏度和重复性评估

此外，该方法对所有浓度低于10 pg/ μ L的FFA组分均表现出高灵敏度，并在高浓度和低浓度条件下均具有良好的重现性，所有组分的%RSD均在0.3%~8.2%之间。

化合物	pg/ μ L (ppb)	% RSD	pg/ μ L (ppb)	% RSD
辛酸	20	1.4	100	0.8
癸酸	40	0.9	200	0.7
月桂酸	40	1.1	200	1.1
肉豆蔻酸	60	0.9	300	1.1
肉豆蔻油酸	10	1.9	50	0.7
十五烷酸	10	2.4	50	1.2
棕榈酸	80	0.5	400	0.5
棕榈油酸	10	1.4	50	0.8
十七烷酸	10	1.6	50	0.8
十七烯酸	10	2.6	50	1.0
硬脂酸	60	0.5	300	0.4
油酸	40	0.6	200	0.7
亚油酸	30	0.5	150	0.3
亚麻酸	10	1.4	50	0.7
十九烷酸	10	0.6	50	0.8
花生酸	10	0.8	50	0.9
11-二十碳烯酸	20	1.0	100	0.8
二十二烷酸	10	0.5	50	2.0
*二十四烷酸	10	3.3	50	8.2

表6.混标中19种FFA组分的重复性数据。*ppb*浓度的差异反映了混标中的丰度相对百分比。*二十四烷酸的%*RSD*较高可以用临近运行结束时的化学噪音增加来解释。

定量下限(LLOQ)确定为20:1 S/N（通过均方根(RMS)计算），以及峰面积达到空白响应的五倍。

化合物	LLOQ (pg/μL)
辛酸	4
癸酸	2
月桂酸	2
肉豆蔻酸	3
肉豆蔻油酸	1
十五烷酸	2
棕榈酸	2
棕榈油酸	1
十七烷酸	2
十七烯酸	3
硬脂酸	2*
油酸	2
亚油酸	3
亚麻酸	0.5
十九烷酸	5
花生酸	10
11-二十碳烯酸	1
二十二烷酸	5
二十四烷酸	5

表7. 混合物中19种FFA组分的LLOQ。*在硬脂酸中观察到峰干扰

使用基质样品进行初步方法验证

为评估此方法的适用性，我们评估了选定的基质样品（图7）。牛奶和婴儿配方奶粉样品中的FFA采用简单的甲醇萃取法进行萃取，并在LC-MS分析前用流动相A和B进一步稀释(1:1)。尽管在牛奶和婴儿配方奶粉中，FFA在脂肪中所占的比例不到2%，但在分析样品中检出的FFA浓度与制造商和文献报道的水平一致^{5,6}。

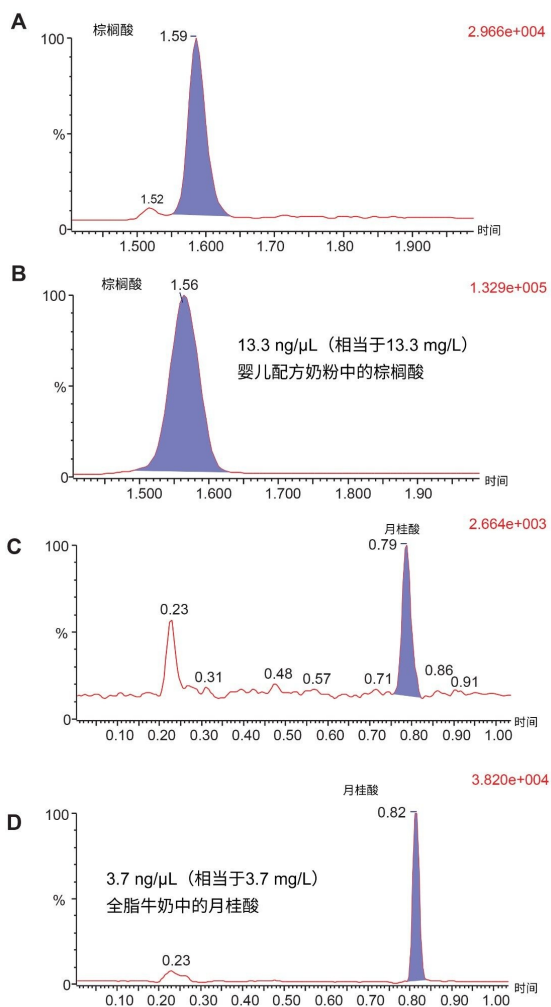


图7.方法性能在真实样品中的示例。A) 混标中1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的棕榈酸；B) 婴儿配方奶粉中13.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的棕榈酸；C) 混标中4 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 的月桂酸；D) 全脂牛奶中3.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的月桂酸。

该方法展示了在FFA快速、高样品通量分析（每天最多可分析240个样品）中的适用性，但尚未展示该方法用于定量分析研究的可靠线性关系（即 $R^2 \geq 0.99$ ）。

结论

综上，将ACQUITY I-Class UPLC与ACQUITY QDa II质谱检测器联用，并结合ACQUITY UPLC BEH苯基柱的创新分析方法，在游离脂肪酸分析方面展现出了明显优势。

该方法不仅可以确保在六分钟内快速准确地分离从C8:0到C24:0的各种FFA，还可以为实验室带来潜在的实质性益处，例如显著节省成本，同时大幅简化了复杂的操作步骤。

此外，该方法还可以节省大量时间（典型的GC-MS分析中，每个样品通常需要20分钟至1小时），帮助研究人员提高生产力和通量，从而提高实验室的运营效率。

总体而言，这种分析方法集速度、灵敏度和简便性于一身，有望在常规FFA分析中实现重大突破，彰显了其作为实验室执行此类分析的重要工具的价值。

参考资料

1. Significance of Lipolysis in the Manufacture and Storage of Dairy Products. IDF Bulletin No.144. Brussels, Belgium: *International Dairy Federation*. IDF (1987).
2. Clarke, H. J., McCarthy, W. P., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., and Kilcawley, K. N., Oxidative Quality of Dairy Powders: Influencing Factors and Analysis. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2021. 10, 2315. <https://doi.org/10.3390/foods10102315> <<https://doi.org/10.3390/foods10102315>> .
3. Imamura, F., Fretts, A., Marklund, M., Ardisson Korat, A. V., Yang, W. S., Lankinen, M., Qureshi, W., Helmer, C., Chen, T. A., Wong, K., Bassett, J. K., Murphy, R., Tintle, N., Yu, C. I., Brouwer, I. A., Chien, K. L., Frazier-Wood, A. C., Del Gobbo, L. C., Djoussé, L., Geleijnse, J. M., Fatty Acids and Outcomes Research Consortium (FORCE). Fatty Acid Biomarkers of Dairy Fat Consumption and Incidence of Type 2 Diabetes: A Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS medicine*, 15, e1002670. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002670> <<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002670>> .
4. de Oliveira Otto, M. C., Lemaitre, R. N., Song, X., King, I. B., Siscovick, D. S., Mozaffarian, D., 2018. Serial Measures of Circulating Biomarkers of Dairy Fat and Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults: the Cardiovascular Health Study. *The American journal of clinical nutrition*, 108, 476–484.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy117> <<https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy117>> .

5. Pilar Gómez-Cortés, Manuela Juárez, Miguel Angel de la Fuente, 2018. Milk Fatty Acids and Potential Health Benefits: An Updated Vision. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014> <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.014>> .

6. Kokotou, M. G., Mantzourani, C., & Kokotos, G., Development of a Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Method for the Determination of Free Fatty Acids in Milk. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020, 25, 1548. <https://doi.org/10.3390/molecules25071548> <

<https://doi.org/10.3390/molecules25071548>> .

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY QDa II质谱检测器 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/acquity-qda-ii-mass-detector.html>>

MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720008134ZH, 2024年1月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号