

HPLC-APCI-MS 法分析测定白刺籽油中游离脂肪酸

王洪伦¹, 刘永军¹, 赵先恩^{1,2}, 丁晨旭^{1,2}, 李玉林^{1,2}, 尤进茂¹, 索有瑞^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用荧光衍生试剂 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯 (BDETS) 作为脂肪酸柱前衍生化试剂, 采用梯度洗脱在 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱上对游离脂肪酸 (FFA) (油酸、亚油酸、软脂酸和硬脂酸) 衍生物进行分离。利用柱后在线的串联质谱以大气压化学电离源 (APCI) 正离子模式实现了各组分的质谱定性。荧光检测的激发和发射波长分别为 $\lambda_{ex} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 390 \text{ nm}$ 。脂肪酸的线性回归系数大于 0.9990, 检出限为 3.38 ~ 6.59 nmol/L。建立的方法具有良好的重现性。利用此方法对超临界 CO₂ 提取的唐古特白刺籽油中几种游离脂肪酸进行了分析。结果表明白刺籽油中含有大量的游离不饱和脂肪酸。

关键词: 白刺籽油; 液相色谱-质谱联用; 荧光检测; 衍生试剂; 游离脂肪酸

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2007)11-025-04

白刺 (*Nitraria*) 是蒺藜科 (Zygophyllaceae) 旱生或超旱生典型荒漠植物, 是防风固沙的优良灌木^[1]。白刺果实研究发现具有较高的经济和药用价值, 并已得到了开发应用^[2-4]。在利用白刺果实时, 产出大量白刺种籽, 种籽含油率达 11% ~ 13%, 以超临界 CO₂ 萃取的白刺籽油中含有丰富的保健活性成分, 利用 GC-MS 对白刺籽油的分析研究表明其含有大量的脂肪酸, 特别是不饱和脂肪酸的含量高达 90%^[5]。

脂肪酸在紫外-可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定^[6]。高效液相色谱荧光检测法具有较高的灵敏度, 主要荧光衍生试剂有溴代香豆素类化合物^[7-10] 和重氮甲烷类^[11-13], 然而该两类试剂不稳定。虽然可以采用 2-(2-萘氧基)乙基-2-(哌啶子基)乙基磺酸酯 (NOEPES) 对脂肪酸类化合物进行测定^[14], 但衍生过程需在 KOH、冠醚及相转移催化剂的存在下于苯或甲苯溶剂中完成, 分离前需进行烦琐的预处理。本文采用合成的 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯 (BDETS) 作为柱前衍生化试剂, 以 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 作

溶剂, 在 90 °C 下以 K₂CO₃ 作催化剂可获得稳定的荧光产物。试剂稳定、衍生产率高、条件温和、操作简便, 衍生溶液不必预处理可直接进样分析。采用梯度洗脱实现了各种脂肪酸衍生物的同时分离。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HA221-50-06 循环式超临界 CO₂ 萃取装置, 带有 1L 与 5L 两萃取釜 (江苏南通华安超临界萃取有限公司); CO₂ (纯度为 99.99%)。

Agilent1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 公司) 配备四元梯度泵, 在线真空脱气机, 荧光检测器, 100 位自动进样器, 大气压化学电离源 (APCI), Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm i. d. × 150 mm, 5 μm, Agilent 公司)。

1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯 (BDETS) (由本实验室合成); 各种脂肪酸 (软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸) 标准样品 (Sigma 公司); 乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 所用试剂皆为分析纯, 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

* 收稿日期: 2006-09-22; 修订日期: 2006-12-20

基金项目: 中国科学院“百人计划”资助项目和中国科学院“西部之光”人才培养计划项目资助

作者简介: 王洪伦 (1979-), 男, 助理研究员

N,N-二甲基甲酰胺(DMF)经减压蒸馏后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取相应质量的各种脂肪酸标准品,用色谱纯乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液。称取 208.5 mg BDETS 用乙腈定容至 10 mL,相应浓度为 5.0×10^{-2} mol/L。相应低浓度的衍生试剂 (5.0×10^{-4} mol/L) 及低浓度脂肪酸 (1.0×10^{-5} mol/L) 的标准溶液分别用光谱纯乙腈

稀释而成。DMF 经减压蒸馏后备用。

1.2.2 脂肪酸标准品的衍生过程 向盛有 10 mg 无水 K_2CO_3 的 2 mL 安培瓶中依次加入 100 μ L DMF, 50 μ L 混合脂肪酸标准溶液 (1.0×10^{-3} mol/L), 100 μ L 衍生试剂溶液 (5.0×10^{-3} mol/L), 封口后于 90 $^{\circ}C$ 恒温水浴中振荡反应 30 min, 取出放冷后,加入 400 μ L $V(ACN) : V(H_2O) = 1 : 1$ 溶液后直接进样 10 μ L 分析^[15]。衍生反应概况如图 1。

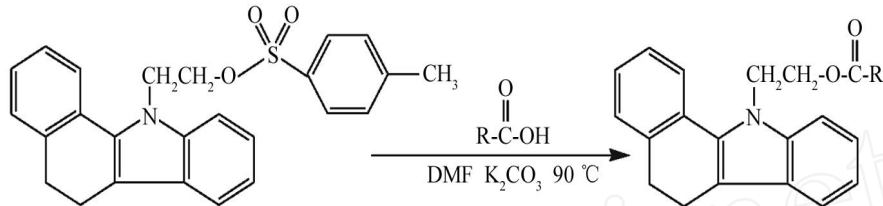


图 1 BDETS 与脂肪酸衍生反应概况

Fig. 1 Derivatization of free fatty acid with BDETS

1.2.3 色谱与质谱条件 色谱柱: Eclipse XDB-C₈ 色谱柱(4.6 mm i. d. \times 150 mm, 5 μ m)。流动相 A: 体积分数 50 %乙腈水溶液, B: 100 %乙腈, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ L, 柱温 30 $^{\circ}C$ 。荧光激发和发射波长分别为: $\lambda_{ex} = 333$ nm, $\lambda_{em} = 390$ nm。梯度洗脱程序如表 1。

大气压化学电离源(APCI), 正离子模式, 喷雾压力 414 kPa, 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}C$, 气化温度 450 $^{\circ}C$, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA (Pbs)^[16]。

将种子晾干、粉碎。每次将 380.0 g 粉碎的白刺种子样品装入 1 L 萃取釜中进行超临界 CO_2 流体萃取, 萃取釜压力为 25 MPa, 温度 45 $^{\circ}C$; 一级解析压力 11.0 MPa, 解析温度 58 $^{\circ}C$; 二级解析压力 7.0 MPa, 解析温度 38 $^{\circ}C$, CO_2 流量为 45 L/h, 萃取 2 h 得白刺籽油样品。

2 结果与讨论

2.1 标准品的色谱分离及质谱鉴定

通过前期的 GC-MS 分析研究发现白刺籽油中的主要脂肪酸为软脂酸、硬脂酸、油酸和亚油酸, 因此通过脂肪酸衍生的方法对白刺籽油中的此几种游离脂肪酸进行测定。BDETS 对 4 种游离脂肪酸的衍生条件主要参考尤进茂教授实验室对游离脂肪酸的衍生条件进行衍生。通过改变各种洗脱条件对 4 种标准脂肪酸的衍生物进行分离, 最终以表 1 所列的程序为梯度洗脱程序。4 种标准脂肪酸衍生后的色谱分离见图 2, 所有衍生物可获得分离。图中的主要杂质组分 A 是试剂在 K_2CO_3 作用下分解出的 BDET, 组分 C 为试剂峰。B 可能是试剂对 DMF 分解后的产物同时衍生的结果, 不影响分离。组分定性采用在线的柱后质谱鉴定, 4 种标准脂肪酸衍生物的质谱裂解数据见表 2。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间/min	A/ %	B/ %
0	100	0
12	60	40
15	20	80
25	0	100
30	0	100

1.3 白刺籽油的制备

采集的唐古特白刺果实, 榨汁分离出种子,

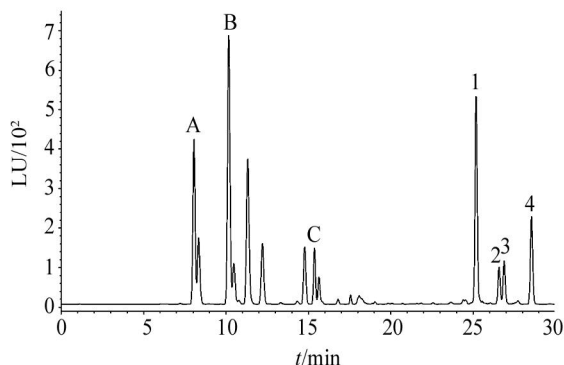


图 2 标准脂肪酸衍生物的色谱分离图

Fig. 2 Chromatogram of standard free fatty acid derivatives (100 pmol)

色谱峰: 1- 亚油酸; 2- 软脂酸; 3- 油酸; 4- 硬脂酸;

A- BDET 峰; B- 未知峰; C- 试剂峰

色谱条件: 柱温 30 , 激发波长 333 nm, 吸收波长 390 nm, Eclipse XDB-C₈ (4.6 ×150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流速 1.0 mL/min

2.2 线性回归方程及检出限

不同浓度的脂肪酸标准品溶液分别进样 10 μL, 标品进样量在 385.0 pmol ~ 75.20 fmol 范围内, 依据峰面积和实际进样量进行线性回归, 得各脂肪酸衍生物的线性回归方程、相关系数和检出限 (见表 3)。各游离脂肪酸衍生物的线性相关系数在 0.9990 ~ 0.9995 之间, 检出限为 3.38 ~ 6.59 nmol/L (按 S/N = 3 1 计算)。

2.3 重现性实验

在相同洗脱条件下, 对 50 pmol 脂肪酸衍生物平行六次进样分析, 亚油酸、软脂酸、油酸和硬脂酸的保留时间相对标准偏差 RSD (%) 分别为: 0.024 %、0.034 %、0.074 % 和 0.045 %; 峰面积相对标准偏差 RSD (%) 分别为 1.5 %、2.0 %、1.9 % 和 1.5 %。以上结果表明该方法重现性良好。

表 2 脂肪酸 BDETS 衍生物的质谱数据

Tab. 2 MS data of BDETS fatty acid derivatives

游离脂肪酸	分子离子峰 [MH] ⁺	碎片离子峰 m/z	特征离子峰
亚油酸 C _{18:2}	526.4	508.3 ([MH] ⁺ - H ₂ O); 307.2	264.1, 246
软脂酸 C _{16:0}	502.4	283.2	264.1, 246
油酸 C _{18:1}	528.4	510.1 ([MH] ⁺ - H ₂ O); 309.2	264.1, 246
硬脂酸 C _{18:0}	530.5	311.3	264.1, 246

表 3 游离脂肪酸衍生物的线性回归方程、相关系数、检测限、一级质谱

Tab. 3 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits, mass spectral data of free fatty acid derivatives

游离脂肪酸	回归方程 c: 浓度 Y: 峰面积	线性相关系数 (r)	检出限/(nmol/L)	一级质谱 [M+1] ⁺
亚油酸 C _{18:2}	Y = 35.71c - 12.07	0.9994	3.38	526.4
软脂酸 C _{16:0}	Y = 18.22c - 41.25	0.9991	4.73	520.4
油酸 C _{18:1}	Y = 18.23c - 56.71	0.9995	5.65	528.4
硬脂酸 C _{18:0}	Y = 23.63c - 13.64	0.9990	6.59	530.5

2.4 样品测定

2.4.1 回收率 在白刺籽油样品中加入 10 μL 浓度为 1.0 ×10⁻⁴ mol/L 各种脂肪酸标准品后, 按照上述方法进行衍生, 重复 3 次所得各脂肪酸的回收率在 91.34 % ~ 106.07 % 之间。

2.4.2 白刺籽油实际样品测定 按照实验确定的色谱分离方法对几次相同条件下超临界 CO₂ 提取的白刺籽油分析测定, 利用图谱中各个峰的保留时间和质谱数据与标准图谱相比较从而确定各种脂肪酸衍生物峰的位置。图 3 为白刺籽油样品的色谱分离图。各种游离脂肪酸的测定结果如表 4 所示。

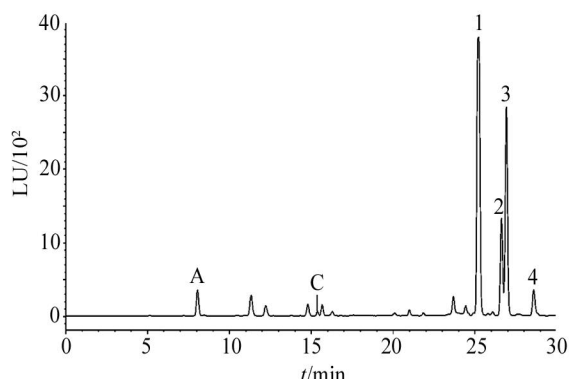


图 3 唐古特白刺籽油中游离脂肪酸的色谱分离图

Fig. 3 Chromatogram of FFA in extracted oil from *Nitraria tangutorum* seed

表 4 白刺籽油样品中游离脂肪酸测定结果

Tab. 4 Determination results of FFA in the samples

样品	/(mg/mL)			
	亚油酸	油酸	软脂酸	硬脂酸
1	17.02	6.05	2.18	0.87
2	18.18	6.33	2.30	0.78
3	16.81	6.15	1.98	0.73
4	19.19	6.31	2.90	0.86
平均值	17.80	6.21	2.09	0.81

参考文献

[1] 李必华. 山东林业科技, 1994, (3): 7

- [2] 索有瑞, 王洪伦, 汪汉卿. 天然产物研究与开发, 2004, 16(1): 54
- [3] 索有瑞, 汪汉卿. 食品科学, 2004, 25(7): 164
- [4] 李天才, 索有瑞. 青海科技, 2001, (5): 35
- [5] Suo You Rui, Gao Hang, Wang Hanqing. Natural Product R & D, 2004, 16(1): 16
- [6] Ingalls S T, Minkler P E, Hoppel C L. J Chromatogr, 1984, (299): 365
- [7] Crozier A, Zaerr J B, Morris R O. J Chromatogr, 1982, (247): 157
- [8] Murayama K, Kinoshita T. Anal Lett, 1982, 15: 123
- [9] Kelly R A, O Hara D S, Kelley V. J Chromatogr, 1987, (416): 247
- [10] Tsuchiya H, Hayashi T, Naruse H *et al.* J Chromatogr, 1982, (231): 247
- [11] Yamaguchi Y, Tomita T, Senda M *et al.* J Chromatogr, 1986, (357): 199
- [12] Nimura N, Kinoshita T, Yoshida T *et al.* Anal Chem, 1988, (60): 2067
- [13] Takadate A, Tahara T, Fujino H *et al.* Chem Pharm Bull, 1982, (30): 1363
- [14] Chi-yu Lu, Hsin-lung Wu, Sur-hwei Chen *et al.* Chromatographia, 2000, 51(5/6): 315
- [15] 石运伟, 明永飞, 赵先恩等. 曲阜师范大学学报, 2005, 31(1): 73
- [16] Friso S, Choi S W, Dolnikowski G G *et al.* Anal Chem, 2002, 74: 4526

Determination of free fatty acids in nitraria seed oil by HPLC-APCI-MS

WANG Hong-lun¹, LIU Yong-jun¹, ZHAO Xian-en^{1,2}, DING Chen-xu^{1,2}, LI Yu-lin^{1,2}, YOU Jin-mao¹ and SUO You-rui^{*1} (1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi, 2007, 26(11): 25 ~ 28

Abstract: Separation of free fatty acids (oleic acid, linoleic acid, hexadecanoic acid and octadecanoic acid) was accomplished with a pre-column derivatization method using 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-p-toluenesulfonate (BDETS) as labeling reagent followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. The target compounds were identified by mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI in positive ion detection mode). Separation of derivatized fatty acids have been optimized by a reversed-phase Eclipse XDB-C₈ column in conjunction with a water-acetonitrile gradient elution ($\lambda_{ex} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 390 \text{ nm}$). Excellent linear responses were observed with correlation coefficients > 0.9990 . Detection limits (at signal-to-noise of 3:1) are 3.38 ~ 6.59 nmol/L. And the free fatty acids in the *Nitraria tangutorum* seed oil obtained by supercritical carbon dioxide extraction were analysed, and the results showed that there are abundant unsaturated free fatty acids in *Nitraria* seed oil.

Key words: Nitraria seed oil; HPLC/MS; Fluorescence detection; Derivatization reagent; Free fatty acids