

液相色谱/质谱大气压化学电离源鉴定深海鱼油中 长链不饱和脂肪酸

丁养军¹ 赵先恩² 朱芳¹ 索有瑞² 李玉林² 陈桂琛² 尤进茂^{*1,2}

¹(曲阜师范大学化学科学学院, 曲阜 273165) ²(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要 以 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基苯磺酸酯为衍生化试剂,在充氮的气氛下对鱼油进行皂化处理,所得皂化产物经正己烷萃取处理后进行柱前衍生化,再以 HPLC/MS 分离和鉴定。通过对长链脂肪酸分子的标记处理,其衍生物分子在质谱分析中呈现出双键位置的规范信息。通过建立模型计算式,借助不饱和脂肪酸的分子离子峰和特征碎片离子峰的质量数,计算不饱和的碳碳双键位置。共鉴定出 23 种脂肪酸。结果表明:深海鱼油主要由 C₁₂-C₂₂ 的脂肪酸组成,多不饱和脂肪酸含量占 67.08% (峰面积百分比,下同),其中 C_{16:1}-9-十六碳烯酸 (11.7%); C_{16:4,7,10,13}-十六碳四烯酸 (2.91%); C_{18:1}-12-十八碳烯酸 (11.1%); C_{18:4,6,9,12,15}-十八碳四烯酸 (3.62%); C_{20:1}-13-二十碳烯酸 (1.21%); C_{20:5}-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸 (16.71%); C_{22:6}-2,5,8,11,14,17-二十二碳六烯酸 (10.53%)。所建立的方法为不饱和脂肪酸碳链中双键位置的确定提供了新的技术手段。

关键词 高效液相色谱/质谱,柱前衍生,鱼油,脂肪酸,双键位置

1 引言

脂肪酸广泛分布于自然界中,是生物体内重要的营养和代谢产物,对调节生物体内各项生理和生物功能起着重要作用。尤其多不饱和脂肪酸的结构特征与生理功能的关系倍受关注。油脂中脂肪酸的 GC/EMS 分析常采用甲酯或三甲基硅烷化,但该方法不能确定多不饱和脂肪酸中碳碳双键的位置,因为在电子轰击下,双键沿脂肪酸链明显迁移^[1-3]。本实验通过柱前衍生以液相色谱/质谱 (LC/MS/APCI) 研究皂化后的深海鱼油中脂肪酸的组成,用 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基苯磺酸酯 (BDEBS) 作脂肪酸的柱前衍生试剂^[4,5],采用软离子化检测技术 (大气压化学电离源, APCI) 解析了脂肪酸衍生物的相关质谱信息,确定了深海鱼油中多不饱和脂肪酸的碳碳双键的位置。所建立的方法可望在医药、食品、生命科学等领域获得广泛应用。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱/质谱联用仪 (Agilent 公司), 配备四元梯度泵、100 位自动进样器、荧光检测器和在线真空脱气机; Agilent 1100 Series LC/MSD Trap, 配备大气压化学电离源 (APCI)。1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基苯磺酸酯 (自制, 见文献 [4, 5]); 长链饱和及不饱和脂肪酸标准样品 (Sigma 公司); 无水乙腈 (禹城化学试剂厂) 用 P₂O₅ 干燥后蒸馏处理, 用于制备缓冲溶液的甲酸、氨水等均为分析纯。纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

2.2 标准溶液的配制

准确称取定量脂肪酸标品, 用光谱纯乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液 (长链脂肪酸需加入少量 DMF 作为助溶剂)。称取 0.0404 g 的 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基苯磺酸酯用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 5.0×10^{-2} mol/L。相应低浓度的衍生试剂 (5.0×10^{-3} mol/L) 及低浓度脂肪酸 (1.0×10^{-4} mol/L) 的标准溶液分别用 DMF 和光谱纯乙腈稀释而成。

2006-05-03 收稿; 2006-09-16 接受

本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 20075016)

* E-mail: jnyou6304@163.com

2.3 深海鱼油的皂化和衍生

鱼油皂化参考文献 [6]。取 100 mg 深海鱼油于具塞试管中,加入 1.0 mL 2 mol/L KOH 的乙醇溶液,充氮密封后,在 100 °C 水浴反应 0.5 h,取出冷却至室温。滴加 2.0 mol/L HCl 至 pH 2.0,加入 500 μ L 正己烷超声处理 2 min,静止分层,用注射器吸掉水层后,用去离子水洗至 pH 7.0。氮气吹干,残余物重新溶解在 500 μ L 的乙腈中。向盛有 10 mg 无水 K_2CO_3 催化剂的 2 mL 安培瓶中依次加入 180 μ L DMF, 50 μ L 混合脂肪酸的提取样, 120 μ L 衍生试剂溶液 (5.0×10^{-3} mol/L), 封口后于 85 °C 恒温水浴下振荡反应 45 min,取出放冷后,加入 1000 μ L 乙腈水溶液 ($CH_3CN/H_2O, 1:1, V/V$) 稀释后进样 10 μ L 分析。衍生反应概况如图 1 所示。

2.4 色谱与质谱条件

Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 200 mm, 5 μ m, 大连依利特公司)。流动相 A: 50% 乙腈水溶液内含 30 mmol/L 的甲酸-氨水缓冲液 (pH 3.5); B: 100% 的乙腈。梯度条件: 40 min 由 A 到 B (B 保持 10 min), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ L, 柱温 30 °C。荧光激发和发射波长分别为 333 和 390 nm。大气压化学电离源 (APCI): 正离子检测模式, 喷雾压力 60 p. s. i (1 p. s. i = 6894.76 Pa), 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350 °C, 气化温度 450 °C, 毛细管电压 3500 V, 电晕电流 4000 nA (Pos) [5, 6]。

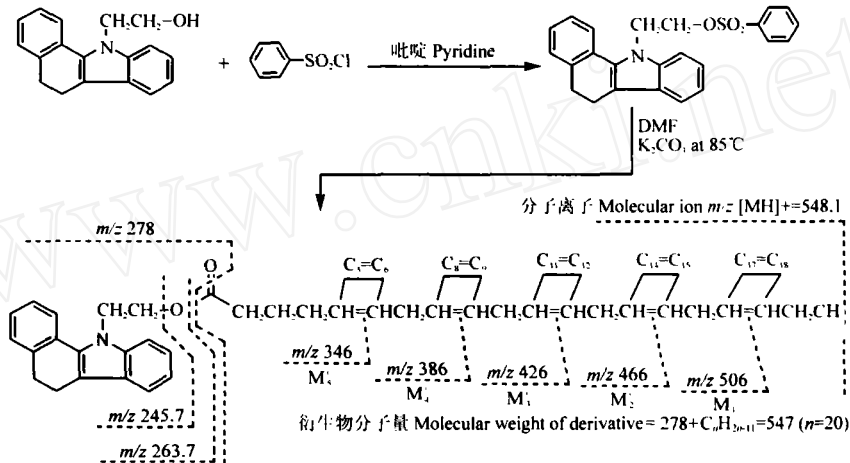


图 1 1,2-苯并-3,4-二氢咔唑-9-乙基苯磺酸酯与 5,8,11,14,17-二十碳五烯酸的衍生概况及质谱断裂模式

Fig 1 Scheme of derivatization procedure using 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethylbenzenesulfonate (BDEBS) as labeling reagent; and the profile of collision-induced dissociation of representative derivative of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid ($C_{20:5}$)

2.5 理论部分 (双键位置判定)

借助质谱分析中所获得的衍生物分子所对应的分子离子峰的质量数 $[MH]^+$ (图 1 所示), 可推出公式 (1) ~ (7), 并由此确定长链饱和及不饱和脂肪酸的碳原子数目 n 。

饱和脂肪酸:

$$C_n \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-1}; \quad n = (MH^+ - 278) / 14 \quad (1)$$

不饱和脂肪酸:

$$C_{n-1} \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-3}; \quad n = (MH^+ - 276) / 14 \quad (2)$$

$$C_{n-2} \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-5}; \quad n = (MH^+ - 274) / 14 \quad (3)$$

$$C_{n-3} \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-7}; \quad n = (MH^+ - 272) / 14 \quad (4)$$

$$C_{n-4} \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-9}; \quad n = (MH^+ - 270) / 14 \quad (5)$$

$$C_{n-5} \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-11}; \quad n = (MH^+ - 268) / 14 \quad (6)$$

$$C_{n-6} \quad MH^+ - 1 = 278 + C_n H_{2n-13}; \quad n = (MH^+ - 266) / 14 \quad (7)$$

公式中 n 为饱和及不饱和脂肪酸的碳原子数目；278 为试剂分子母核结构部分的分子量； MH^+ 为质谱确定的饱和及不饱和脂肪酸的分子离子峰的质量数。依据分子中双键的断裂模式见图 2。有质谱分

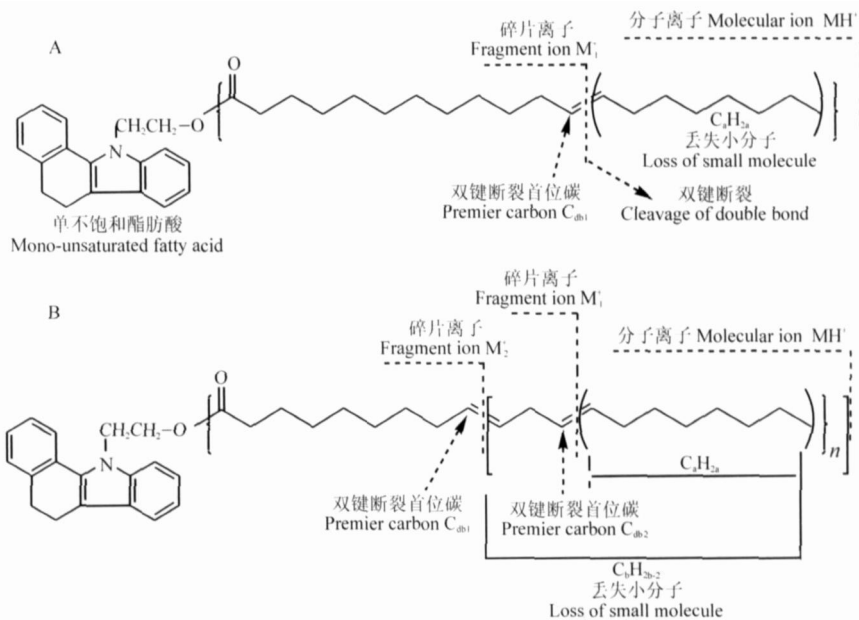


图 2 脂肪酸衍生物中的碳碳双键的质谱裂解示意图 (db: 双键; C_aH_{2a} : 末端双键断裂所丢失的小分子; C_bH_{2b-2} : 末端第二个双键断裂后丢失的小分子)

Fig 2 MS cleavage profile of collision-induced dissociation of fatty acid derivative (db: double bond; C_aH_{2a} : losing of small molecule with the cleavage of double bond at the end of molecular carbon chain)

析中所获得的不饱和脂肪酸衍生物的特征碎片离子的质量数 (双键断裂后产生的特征碎片离子), 含 1~6 个碳碳双键的脂肪酸链中。的双键位置可由下列公式 (8)~(13) 计算获得:

$$C_{n-1} \quad C_{db} = (M_1^+ - 276) / 14 \tag{8}$$

$$C_{n-2} \quad C_{db1} = (M_2^+ - 276) / 14; \quad C_{db2} = (M_1^+ - 274) / 14 \tag{9}$$

$$C_{n-3} \quad C_{db1} = (M_3^+ - 276) / 14; \quad C_{db2} = (M_2^+ - 274) / 14; \quad C_{db3} = (M_1^+ - 272) / 14 \tag{10}$$

$$C_{n-4} \quad C_{db1} = (M_4^+ - 276) / 14; \quad C_{db2} = (M_3^+ - 274) / 14; \quad C_{db3} = (M_2^+ - 272) / 14; \\ C_{db4} = (M_1^+ - 270) / 14 \tag{11}$$

$$C_{n-5} \quad C_{db1} = (M_5^+ - 276) / 14; \quad C_{db2} = (M_4^+ - 274) / 14; \\ C_{db3} = (M_3^+ - 272) / 14; \quad C_{db4} = (M_2^+ - 270) / 14; \quad C_{db5} = (M_1^+ - 268) / 14 \tag{12}$$

$$C_{n-6} \quad C_{db1} = (M_6^+ - 276) / 14; \quad C_{db2} = (M_5^+ - 274) / 14; \quad C_{db3} = (M_4^+ - 272) / 14; \\ C_{db4} = (M_3^+ - 270) / 14; \quad C_{db5} = (M_2^+ - 268) / 14; \quad C_{db6} = (M_1^+ - 266) / 14 \tag{13}$$

公式中的“dbx”; $x = 1, 2, \dots, 6$ 代表双键在脂肪酸碳链中的位置, M_1^+ 到 M_6^+ 是双键断裂后产生的特征碎片离子峰的质量数, 实验中涉及的长链脂肪酸的双键最大数目为 6, 即 $x \leq 6$; 且有: $M_1^+ > M_2^+ > M_3^+ > M_4^+ > M_5^+ > M_6^+$; 对同时含有多个双键脂肪酸的衍生物, 质谱上所获得的特征碎片离子应具有 $M_1^+ - M_2^+ = M_2^+ - M_3^+ = M_3^+ - M_4^+ = M_4^+ - M_5^+ = M_5^+ - M_6^+ = 40$ 个质量单位, 参见图 1 和图 2。

3 结果与讨论

3.1 质谱解析

质谱数据表明, 所有脂肪酸衍生物表现出强烈的分子离子峰, 其质量数为 $m/z [MH]^+$; 分子离子碰撞裂解后产生的 m/z 263.7 和 245.7 碎片峰为衍生试剂分子的母核结构的特征峰 (见图 1)。饱和脂肪酸衍生物, 以 C_{14} 为例 (见图 3): 分子离子峰为 474.1, 母核结构的特征碎片离子为 m/z 263.7 和 245.7,

质谱图中显示的碎片峰相对简单。

含一个碳碳双键的不饱和脂肪酸衍生物,以 C_{18} 为例 (见图 4): 分子离子峰为 m/z 528.1; 失水离子峰 m/z $[MH]^+ - H_2O$ (m/z 510.0), 表现出的特征碎片离子峰 M_1^+ , m/z 值在 444.1, 以及与之相邻并相差 12 个质量单位的特征峰 m/z 456.1。与 m/z 444.1 相差 1~2 两个质量单位的碎片峰 m/z 442.6 应归属于 m/z 444.1 的峰。依据等式 (8), 计算出被裂解双键的首碳位置为 12 ($C_{db} = 12$)。由于其高质量端与之相邻的峰为 m/z 456.1, 恰好相差 12 质量单位, 它应归属于 $C_{12} = C_{13}$ 的裂解。

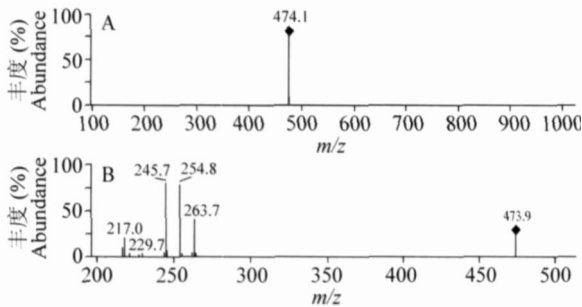


图 3 代表性的饱和十四酸 (C_{14}) 的质谱概况图 (A: MS 分析; B: MS/MS 分析)

Fig 3 Profile of ion current chromatogram and scanning of the isolated representative derivative of saturated tetradecanoic acid (C_{14} , fatty acid) derivatized with BDEBS as labeling agent

含多个碳碳双键的不饱和脂肪酸衍生物,以 C_{20} 为例 (见图 5): 分子离子峰为 MH^+ , m/z 548.1; 失水离子峰 $MH^+ - H_2O$ (m/z 529.9), 表现出的特征碎片离子峰 M_1^+ , m/z 506.1; M_2^+ , m/z 466; M_3^+ , m/z 425.7 (426); M_4^+ , m/z 385.8 (386); M_5^+ , m/z 346。这些特征碎片离子在其相邻的高质量端都有一个与之相邻的并相差 12 个质量单位的特征碎片峰,它们的质量数分别为 m/z 517.9 (518); m/z 478; m/z 438; m/z 398.8 (400) 和 m/z 358。依据等式 (6) 和 (12), 计算出被裂解双键的首碳位置分别为 17 ($C_{db1} = 17$)、14 ($C_{db2} = 14$), 11 ($C_{db3} = 11$)、8 ($C_{db4} = 8$) 和 5 ($C_{db5} = 5$), 所对应的被裂解的双键位置分别为 $C_{17} = C_{18}$ 、 $C_{14} = C_{15}$ 、 $C_{11} = C_{12}$ 、 $C_8 = C_9$ 和 $C_5 = C_6$ (断裂模式见图 1)。分析数据显示,饱和脂肪酸衍生物的质谱相对简单,不饱和脂肪酸随双键数目的增加,质谱裂解碎片逐渐复杂,本实验条件下,饱和脂肪酸衍生物大都没有丢失水分子峰,仅表现出 $[MH]^+$ 和衍生试剂母核分子的特征峰 m/z 263.7 和 245.7; 而不饱和脂肪酸衍生物显示出特有的失水碎片峰 $[MH]^+ - H_2O$ 和特征碎片离子峰 M_1^+ , M_2^+ ... M_n^+ (其特征峰的个数主要有双键的数目决定)。此外,对多不饱和脂肪酸而言,另一个显著性的特征是所有特征碎片离子峰 M_1^+ , M_2^+ ... M_n^+ , 它们相互之间有 40 个质量单位的差异,即相邻的两个双键之间相差一个 $-CH=CH-CH_2-$ 的结构单元 (见图 2)。这对于判断多不饱和脂肪酸双键位置时,寻找质谱图所示的特征碎片离子峰 M_1^+ , M_2^+ ... M_n^+ 起着至关重要的作用。它将指导对特征碎片离子峰的正确判断 (有时这些特征碎片离子峰的峰度相对较低,或者与其它碎片峰相邻,正确判断存在一定难度)。对一个完全未知的组分而言,首先由质谱确定相应分子离子峰的质量数,进而由母核结构的特征碎片离子峰推断该组分是含羧酸的衍生物 (其它组分在该条件下不发生衍生化,芳香酸衍生化产率很低,该条件下仅为直链脂肪酸的 10% 左右)。将分子离子的质量数 m/z $[MH]^+$ 代入公式 (1) 或公式 (2) ~ (7) 进行检验,所获得的碳原子数 n 必需满足整数。在此基础上寻找质谱图上显示的分子离子峰经裂解后产生的失水碎片峰 $[MH]^+ - H_2O$, 并由此推断是否为饱和或者不饱和脂肪酸。断定为不饱和脂肪酸后,根据计算所获得的不饱和脂肪酸的双键数目后,在质谱图上寻找相应数目的特征碎片离子

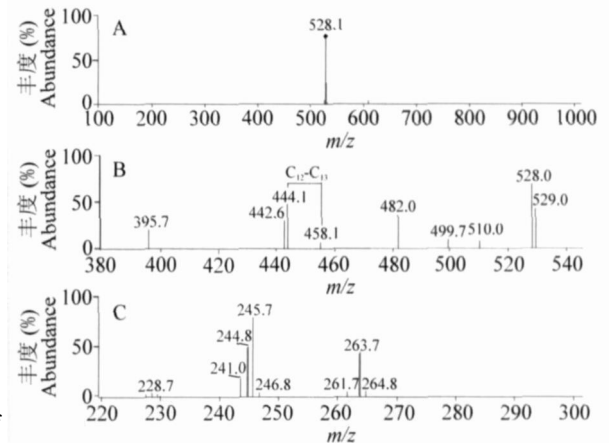


图 4 以 12-十八碳稀酸为代表的单不饱和脂肪酸衍生物的质谱裂解示意图 (A: MS; B 和 C 为 MS/MS)

Fig 4 Profile of ion current chromatogram and scanning of the isolated representative derivative of monounsaturated 12-octadecenoic acid (C_{18} , fatty acid) derivatized with BDETS as labeling reagent

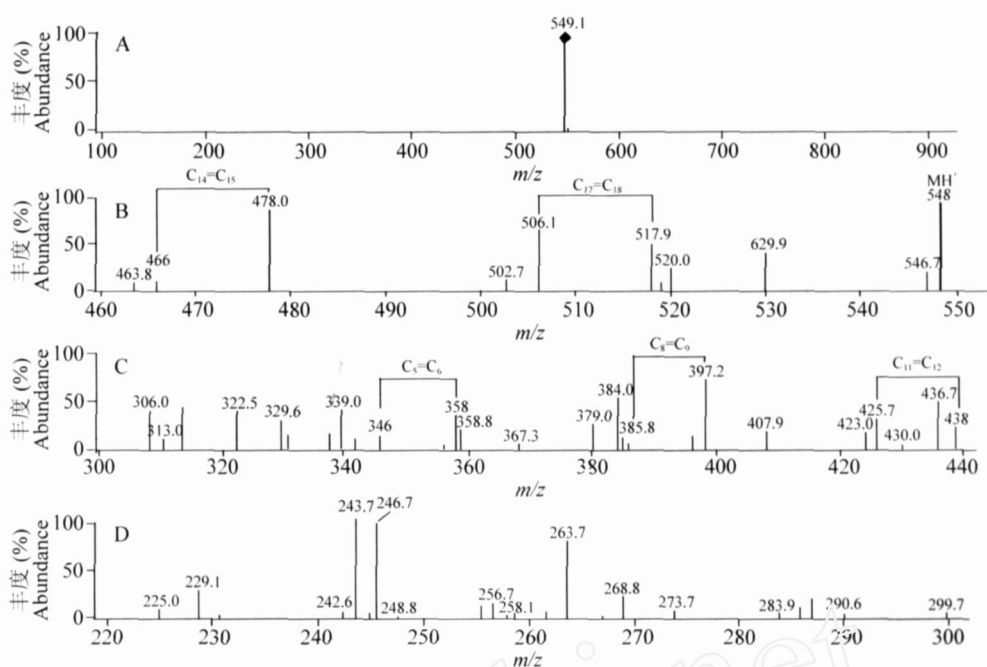


图 5 以 5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸为代表的饱和脂肪酸衍生物的质谱裂解示意图

Fig 5 Profile of ion current chromatogram and scanning of the isolated representative derivative of 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid ($C_{20.5}$) with BDEBS as labeling reagent

A. MS; B, C, D: MS/MS

峰的质量数(对含单双键的脂肪酸,借助于 12 个单位质量差更为容易;对多不饱和的脂肪酸,借助 40 个质量差的结构单元尤为重要)。

3.2 衍生条件优化及鱼油样品分离

1,2-苯并-3,4-二氢吡嗪-9-乙基苯磺酸酯与脂肪酸的衍生化随溶剂不同衍生化产率有显著差异。实验中分别选取苯、甲苯、乙腈、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,干燥后减压蒸馏处理)、四氢呋喃、二甲亚砜(DMSO,干燥后减压蒸馏处理)作为溶剂体系,以 $C_{16.0}$ 、 $C_{17.0}$ 、 $C_{18.1}$ 、 $C_{22.0}$ 和 $C_{20.4}$ 长链饱和及不饱和脂肪酸为代表,考察了衍生化产率。尽管 DMSO 具有和 DMF 相当的衍生效果,然而以 DMSO 为溶剂时所获得的衍生物在色谱洗脱过程中导致较多的干扰峰(副反应产物多),实验中选取 DMF 作衍生化溶剂。磺酸酯与脂肪酸的衍生化随碱性催化剂的不同,反应产率不同,实验中选取 K_2CO_3 、 $K_2C_2O_4$ 、 Na_2CO_3 、KAc 和柠檬酸钾等几种碱性催化剂,对衍生化产率进行了考察,结果表明: K_2CO_3 和 Na_2CO_3 具有最高的衍生化产率。考虑到 K_2CO_3 在 DMF 中具有较大的溶解力,故实验选取 K_2CO_3 。尽管衍生化产率随 K_2CO_3 用量的增加而提高,但过高的用量会导致试剂的部分分解。实验中选取 K_2CO_3 的用量为 10 mg (用量约为衍生化试剂用量的 30~40 倍,按摩尔量计算)。对衍生化温度的考察表明:衍生化产率随温度升高而提高,超过 95 后,由于副反应的发生衍生化产率随之降低,实验中选择衍生温度为 85,衍生化时间 45 min。按前述衍生条件,经 LC 分离的色谱图见图 6。获得的 LC/MS/APCI 总离子流见图 7。质谱数据解析结果列于表 1。

由表 1 可见,深海鱼油主要由 C_{12} - C_{22} 的饱和及不饱和脂肪酸组成,分离后不饱和脂肪酸的含量占 67.08% (峰面积归一化以 15 到 45 min 内流出的各组分进行计算)。其中 $C_{16.1}$ 9-十六碳烯酸 (11.7%); $C_{16.4, 7, 10, 13}$ 十六碳四烯酸 (2.91%); $C_{18.1}$ 12-十八碳烯酸 (11.1%); $C_{18.4, 6, 9, 12, 15}$ 十八碳四烯酸 (3.62%); $C_{20.1}$ 13-二十碳烯酸 (1.21%); $C_{20.5}$ 5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸 (16.71%); $C_{22.6}$ 2, 5, 8, 11, 14, 17-二十二碳六烯酸 (10.53%) 等不饱和长链脂肪酸是鱼油的主要组分。

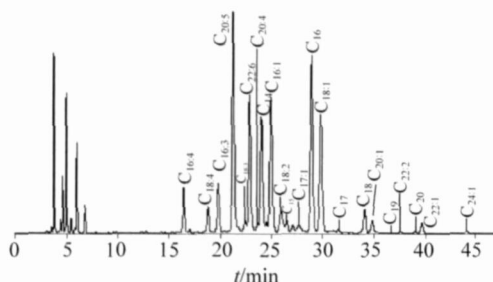


图 6 深海鱼油脂肪酸的色谱分离图 (峰标注见表 1)

Fig. 6 Chromatogram of long-chain fatty acid derivatives from deep-sea fish oil (peaks as in Table 1)

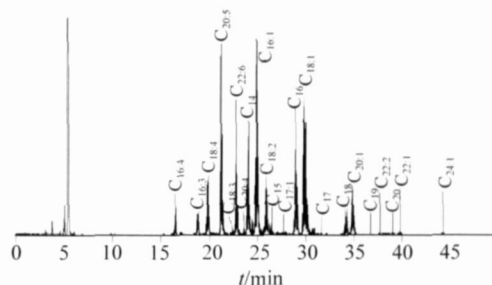
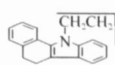
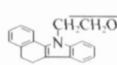


图 7 深海鱼油样品质谱离子流图 (峰标注见表 1)

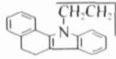
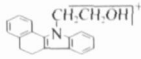
Fig. 7 MS ion chromatogram of the isolated fatty acid derivatives from deep-sea fish oil (peaks as in Table 1)

表 1 深海鱼油中脂肪酸衍生物的质谱解析数据

Table 1 MS analysis of the fatty acid derivatives from deep-sea fish oil sample

脂肪酸 Fatty acid	分子离子 Molecular ion MH ⁺	MH ⁺ - H ₂ O	双键裂解和特征 碎片离子质量数 Cleavage of double bond and specific fragment ion mass		
C ₁₄ 十四碳酸 Tetradecanoic acid	474	NO		245.79(L), 246.7(S)	263.7
C ₁₅ 十五碳酸 Pentadecanoic acid	488.0	NO		245.7(L), 246.6(S)	263.7
C ₁₆ 十六碳酸 Hexadecanoic acid	502.1	NO		243.8(S), 245.7(L)	263.7
C _{16:1} 9-十六碳烯酸 9-Hexadecenoic acid	500.0	482	402, C ₉ =C ₁₀	243.7(S), 245.7(L)	263.7
C _{16:3} 6,9,12-十六碳三烯酸 6,9,12-Hexadecatrienoic acid	496.0	478	440, C ₁₂ =C ₁₃ ; 440, C ₉ =C ₁₀ ; 360, C ₆ =C ₇	243.7(L), 246(S)	263.7
C _{16:4} 4,7,10,13-十六碳四烯酸 4,7,10,13-Hexadecatetraenoic acid	494.0	476	452, C ₁₃ =C ₁₄ ; 412, C ₁₀ =C ₁₁ ; 372, C ₇ =C ₈ ; 332, C ₄ =C ₅	243.7(L), 246(S)	263.7
C ₁₇ 十七碳酸 Heptadecanoic acid	516.1	NO		243.6(S), 245.6(L)	263.7
C _{17:1} 9-十七碳烯酸 9-Heptadecenoic acid	514.1	496.7	402, C ₉ =C ₁₀	244(L), 246(S)	263.7
C ₁₈ 十八碳酸 Octadecanoic acid	530.1	NO		244.7(S), 245.6(L)	263.7
C _{18:1} 12-十八碳烯酸 12-Octadecenoic acid	528.1	510	444, C ₁₂ =C ₁₃	244(S), 246(L)	263.7
C _{18:2} 9,12-十八碳二烯酸 9,12-Octadecadienoic acid	526.0	508	442, C ₁₂ =C ₁₃ ; 402, C ₉ =C ₁₀	244(L), 246(S)	263.7
C _{18:3} 8,11,14-十八碳三烯酸 8,11,14-Octadecatrienoic acid	524.0	506	468, C ₁₄ =C ₁₅ ; 428, C ₁₁ =C ₁₂ ; 388, C ₈ =C ₉	244(L), 246(S)	263.7
C _{18:4} 6,9,12,15-十八碳四烯酸 6,9,12,15-Octadecatetraenoic acid	522.0	504	480, C ₁₅ =C ₁₆ ; 440, C ₁₂ =C ₁₃ ; 400, C ₉ =C ₁₀ ; 360, C ₆ =C ₇	244(L), 246(S)	263.7
C ₁₉ 十九碳酸 Nonadecanoic acid	544.1	NO		245.7(L), 246.8(S)	263.7
C ₂₀ 二十碳酸 Eicosoic acid	558.2	NO		245.6(L), 246.9(S)	263.8
C _{20:1} 13-二十碳烯酸 13-Eicosenoic acid	556.2	536	458, C ₁₃ =C ₁₄	244(S), 246(L)	263.8
C _{20:5} 5,8,11,14,17-二十碳五烯酸 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	548.1	530	506, C ₁₇ =C ₁₈ ; 466, C ₁₄ =C ₁₅ ; 426, C ₁₁ =C ₁₂ ; 386, C ₈ =C ₉ ; 346, C ₅ =C ₆	244(L), 246	263.8
C _{20:4} 6,9,12,15-二十碳四烯酸 6,9,12,15-Arachidonic acid	550.0	532	480, C ₁₅ =C ₁₆ ; 440, C ₁₂ =C ₁₃ ; 400, C ₉ =C ₁₀ ; 360, C ₆ =C ₇	244(L), 246(S)	263.8
C ₂₂ 二十二碳酸 Docosanoic acid	586.1	NO		244(L), 246(S)	263.7
C _{22:1} 12-二十二碳烯酸 12-Docosenoic acid	584.0	566	444, C ₁₂ =C ₁₃	244(L), 246(S)	263.7

续表 1 (continued Table 1)

脂肪酸 Fatty acid	分子离子 Molecular ion MH ⁺	MH ⁺ - H ₂ O	双键裂解和特征 碎片离子质量数 Cleavage of double bond and specific fragment ion mass		
C _{22:2} 13, 16-二十二碳二烯酸 13, 16-Docosadienoic acid	582.1	564	498, C ₁₆ =C ₁₇ ; 458, C ₁₃ =C ₁₄	244 (L), 264 (S)	263.7
C _{22:6} 2, 5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸 2, 5, 8, 11, 14, 17-Docosahexenoic acid	574.0	556	506, C ₁₇ =C ₁₈ ; 464, C ₁₄ =C ₁₅ ; 424, C ₁₁ =C ₁₂ ; 384, C ₈ =C ₉ ; 344, C ₅ =C ₆ ; 304, C ₂ =C ₃	244 (L), 246 (S)	263.7
C _{24:1} 20-二十四碳烯酸 20-Tetracosenoic acid	612.1	594	556, C ₂₀ =C ₂₁	246 (L), 246 (S)	263.8

References

- Mocloskey J A. *In Topic in Lipid Chemistry*. London: Logos Press, 1990: 369 ~ 370
- John W N, Bruce D H. *J. Chromatogr A*, 2001, 925: 223 ~ 240
- Björndz I *Anal. Chim. Acta*, 2002, 465: 1 ~ 37
- You J M, Shi Y W, Ming Y F, Yu Z Y, Yi Y J, Liu J Y. *Chromatographia*, 2004, 60: 527 ~ 535
- Shi Yunwei (石运伟), Wang Caiping (王彩萍), Xue Xia (薛霞), Deng Yingxia (邓英霞). *Analytical laboratory (分析实验室)*, 2005, 9: 6 ~ 10
- Zou Yaohong (邹耀洪). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2004, 32(1): 71 ~ 75

Identification of Long-chain Unsaturated Fatty Acids in Deep-sea Fish Oil by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Atmospheric Pressure Chemical Ionization

Ding Yang-Jun¹, Zhao Xian-En², Zhu Fang¹, Suo You-Ru², Li Yu-Lin², Chen Gui-Chen², You Jin-Mao^{1,2}

¹ (College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

² (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

Abstract A method for the identification of long-chain unsaturated fatty acids in deep-sea fish oil using 1, 2-benzo-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethyl-benzenesulfonate (BDEBS) as pre-column derivatization reagent by reversed-phase HPLC/MS has been developed. To avoid the migration of double bond in the fatty acid chain, fish oil samples were saponificated and derivatized under nitrogen circumstance. The derivatized solution was extracted with hexane and dried under a stream of nitrogen; the residue was re-dissolved with acetonitrile prior to LC analysis. MS analysis of the fatty acid derivatives exhibited regular information regarding the position of the double bond in the fatty acid chain. With molecular ion mass at m/z [MH]⁺ and specific fragment ions obtained with MS analysis, the position of the double bond in fatty acid chain was located (or calculated) by means of several established formulas. According to the analysis of HPLC/MS/APCI, 23 fatty acids were identified. The main fatty acids in deep-sea fish oil are C₁₄-C₂₂ and 67.08% (area percent) of them are polyunsaturated fatty acids. The main components of the unsaturated fatty acids are C_{16:1} 9-hexadecenoic acid, 11.7%; C_{16:4} 4, 7, 10, 13-hexadecatetraenoic acid, 2.91%; C_{18:1} 12-octadecenoic acid, 11.1%; C_{18:4} 6, 9, 12, 15-octadecatetraenoic acid, 3.62%; C_{20:1} 13-eicosenoic acid, 1.21%; C_{20:5} 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid, 16.71%; C_{22:6} 2, 5, 8, 11, 14, 17-docosahexenoic acid, 10.53%. The established method provides a new technical tool for the location of double bond positions in the polyunsaturated fatty acids.

Keywords High performance liquid chromatography/mass spectrometry, pre-column derivatization, fish oil, fatty acids, position of double bond

(Received 3 May 2006; accepted 16 September 2006)