

油脂资源

微孔草籽油脂肪酸的 HPLC - MS分析

曹 越^{1,2,3}, 赵先恩⁴, 索有瑞¹

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049;
3. 青海大学 医学院药理学系, 西宁 810001; 4. 山东省分析测试中心, 济南 250014)

摘要:采用柱前衍生 - 高效液相色谱荧光检测法 (HPLC - FLD) 分析了超临界 CO₂ 萃取得到的微孔草籽油的脂肪酸成分。用荧光衍生试剂 1 - [2 - (对甲苯磺酸酯) 乙基] - 2 - 苯基咪唑 [4, 5 - f] 9, 10 - 菲 (TSPP) 作为柱前衍生试剂, 对 39 种饱和与不饱和脂肪酸标准品进行衍生, 经梯度洗脱实现了 39 种脂肪酸衍生物完全分离, 使用外标法定量, 建立了同时测定 17 种脂肪酸绝对含量的方法。结果表明, 微孔草籽油中油酸、亚油酸、亚麻酸相对含量分别是 29.09%、23.85%、20.25%; 不饱和脂肪酸占总脂肪酸的相对含量为 73.19%。

关键词:微孔草籽油; 超临界 CO₂ 萃取; 脂肪酸; 高效液相色谱 - 荧光检测; 质谱

中图分类号: TQ642 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003 - 7969 (2010) 04 - 0072 - 05

HPLC - MS analysis of fatty acids in *Microula sikkimensis* Hemsl seed oil

CAO Yue^{1,2,3}, ZHAO Xian'en⁴, SUO Yourui¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, China Academy of Sciences, Xining 810008, China;
2. Graduate University of China Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Department of Pharmacy, Medicine College of Qinghai University, Xining 810001, China; 4. Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China)

Abstract: Fatty acids in *Microula sikkimensis* Hemsl seed oil extracted by supercritical CO₂ extraction were analyzed by HPLC fluorescence detection (HPLC - FLD) with pre - column derivatization. After derivatizing 39 kinds of saturated and unsaturated fatty acids with the pre - column derivatization reagent of 1 - [2 - (p - toluenesulfonate) ethyl] - 2 - phenylimidazole [4, 5 - f] 9, 10 - phenanthrene (TSPP), all the fatty acid derivatives were separated with a good baseline resolution in conjunction with a gradient elution. The external standard method for the simultaneous quantitative determination of 17 fatty acids was developed and applied for the determination of the fatty acid contents in *Microula sikkimensis* Hemsl seed oil samples. The results indicated that the relative content of oleic acid, linoleic acid and linolenic acid in *Microula sikkimensis* Hemsl seed oil was up to 29.09%, 23.85% and 20.25%, respectively, and the unsaturated fatty acids of the total fatty acids was 73.19%.

Key words: *Microula sikkimensis* Hemsl seed oil; supercritical CO₂ extraction; fatty acids; HPLC - fluorescence detection; MS

微孔草 (*Microula sikkimensis* Hemsl) 在传统藏药中早有应用, 全草可用于眼疾、疱疹等外用疮病的治

疗。微孔草籽中含有大量油脂, 本实验室已优化得出微孔草籽油超临界 CO₂ 萃取最佳提取工艺, 为工业生产奠定了基础。微孔草籽油中油酸、亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸含量较高, 具有多种生理功能^[1,2]和开发利用前景^[3]。

脂肪酸分析方法已有大量报道, 最常见的是 GC - MS 法。脂肪酸在紫外可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定, 已报道的微孔草籽油脂肪酸的

收稿日期: 2009 - 08 - 04

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目

作者简介: 曹 越 (1974), 男, 副教授, 研究生, 主要从事生物资源方面的研究工作 (E-mail) qhcaoy@126.com。

通讯作者: 索有瑞 (Tel) 0971 - 6143857 (E-mail) yrsuo@mwjph.ac.cn

分析方法都是采用 GC 或 GC-MS 法^[4]。但该法的缺点是灵敏度欠佳,稳定性差,衍生重现性不够理想等。高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FLD)分析脂肪酸国外报道较多,它具有较高的灵敏度,已报道的荧光衍生试剂主要有溴代香豆素类^[5]和重氮甲烷类^[6],然而这两类试剂不稳定。本文采用自制的 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲(TSPP)作为柱前荧光衍生试剂^[7],试剂稳定、条件温和、操作简便,建立了 39 种脂肪酸衍生物的同时分析测定方法,并应用到微孔草籽油的脂肪酸分析,结果满意。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS),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(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)。1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲,自制;30 种饱和脂肪酸标准样品(上海试剂厂),9 种不饱和脂肪酸标准品(Sigma 公司);光谱纯乙腈(ACN,德国 Merck 公司),其他试剂皆为分析纯;蒸馏水采用 Milli-Q 型超纯水系统制备;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)经干燥减压蒸馏后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确取定量脂肪酸标准品,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 N,N-二甲基甲酰胺作为助溶剂)。称取 0.246 0 g 1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲,用 N,N-二甲基甲酰胺定容至 10 mL,浓度为 5.0×10^{-2} mol/L。相应低浓度的衍生试剂及低浓度脂肪酸标准液分别用 N,N-二甲基甲酰胺和光谱纯乙腈稀释而成。

1.2.2 色谱与质谱条件 色谱柱: Eclipse XDB-C8 色谱柱。流动相 A: 50% 乙腈水溶液;流动相 B: 50% 乙腈水溶液(含 20 mmol/L HCOONH₄);流动相 C: 乙腈 / N,N-二甲基甲酰胺 (V(ACN) : V(DMF) = 100 : 2);流动相 D: 乙腈 / N,N-二甲基甲酰胺 (V(ACN) : V(DMF) = 100 : 30)。流速为 1.0 mL/min,进样量为 10 μL,柱温 30。荧光激发和发射波长分别为: $\lambda_{ex} = 260$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm。

大气压化学电离源,正离子模式,喷雾压力 413.68 kPa,干燥气流量为 5 L/min,干燥气温度 350,汽化温度 450,毛细管电压 3 500 V,电晕电流

4 000 nA (Pos)。

1.2.3 微孔草籽脂肪酸的提取 准确称取青海产锡金微孔草籽超临界 CO₂ 萃取油 0.111 6 g,置于 3 mL 安瓿瓶中,加入 1.0 mL 2 mol/L KOH 的乙醇溶液,充氮气密封后,在 100 水浴中反应 0.5 h,取出冷却至室温。滴加 2.0 mol/L 的盐酸至 pH 3.0,加入 500 μL 正己烷振荡提取 2 min,静置分层,用注射器吸去水相后,用去离子水洗至 pH 7.0,氮气吹干,残余物溶解在 500 μL N,N-二甲基甲酰胺中待测。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酸衍生条件的优化^[7]

1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲与脂肪酸的衍生化,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、四氢呋喃(THF)、二甲亚砜(DMSO)作为溶剂体系,对衍生化产率进行了测定。结果表明,二甲亚砜具有和 N,N-二甲基甲酰胺相当的衍生效果,但以二甲亚砜为溶剂时所获得的衍生物在色谱分离时出现几个较大的干扰峰,给色谱分析带来困难。因此,实验中选取 N,N-二甲基甲酰胺作为衍生化溶剂。1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲与脂肪酸的衍生化随碱性催化剂的不同,衍生化产率不同。实验中选取 K₂CO₃、K₂C₂O₄、Na₂CO₃、KAc 和柠檬酸钾等碱性催化剂,对衍生化产率进行了测定。结果表明, K₂CO₃ 和 Na₂CO₃ 具有最高的衍生化产率,由于 K₂CO₃ 在 N,N-二甲基甲酰胺中具有较大的溶解度,因此实验中选取 K₂CO₃ 为碱性催化剂。对 K₂CO₃ 用量的实验表明,用量为 10 mg 时具有最大衍生化产率,而过高的用量会导致试剂分解。对衍生化温度进行了考察,结果表明,衍生化产率随温度升高而增高,温度超过 90 后衍生化产率随之降低,因此实验中选择衍生化温度为 90,衍生化时间为 30 min。对衍生试剂用量进行了考察,结果表明,衍生试剂为脂肪酸摩尔总数的 5 倍以上衍生化产率恒定,所以实验选取衍生试剂为脂肪酸总量的 5 倍。1-[2-(对甲苯磺酸酯)乙基]-2-苯基咪唑[4,5-f]9,10-菲与脂肪酸的衍生反应见图 1。

2.2 标准脂肪酸衍生后 HPLC 色谱分离及质谱鉴定(39 种脂肪酸)

为了全面了解微孔草籽油的脂肪酸组成,首先建立 39 种脂肪酸的分析方法。按前述优化条件,对 39 种标准脂肪酸衍生后的色谱分离见图 2。由图 2 可看出,所有衍生物均可获得较好的基线分离。图

2中的主要杂质组分 A 和 B 是衍生试剂在 K_2CO_3 作用下分解出的 1 - (2 - 羟乙基) - 2 - 苯基咪唑 [4,5 - f]9,10 - 菲和 2 - 苯基咪唑 [4,5 - f]9,10 - 菲,组分 C 为衍生试剂峰,D 是杂质峰,可能是衍生

试剂对 N,N - 二甲基甲酰胺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,二十碳脂肪酸衍生物的代表质谱图及其裂解模式见图 3。

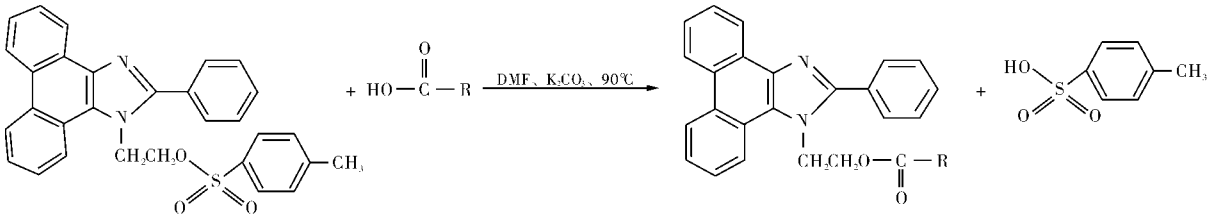
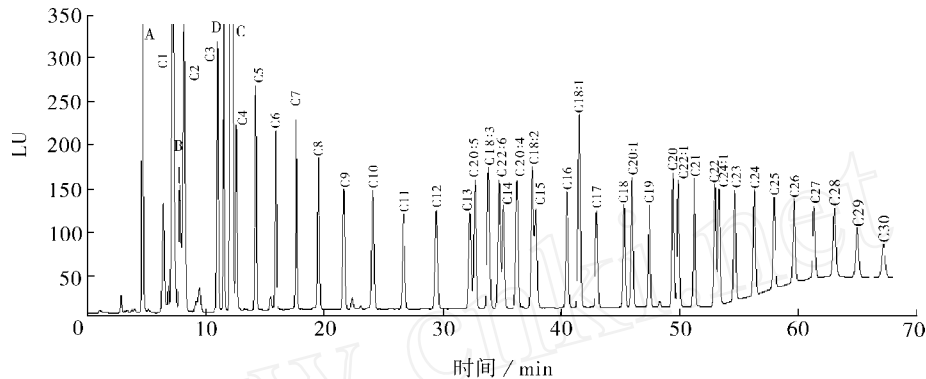


图 1 1 - [2 - (对甲苯磺酸酯)乙基] - 2 - 苯基咪唑 [4,5 - f]9,10 - 菲与脂肪酸的衍生反应



C1. 甲酸; C2. 乙酸; C3. 丙酸; C4. 正丁酸; C5. 戊酸; C6. 己酸; C7. 庚酸; C8. 辛酸; C9. 壬酸; C10. 癸酸; C11. 十一酸; C12. 十二酸; C13. 十三酸; C20.5. 5,8,11,14,17 - 二十碳五烯酸; C18.3. 8,11,14 - 十八碳三烯酸; C22.6. 2,5,8,11,14,17 - 二十碳六烯酸; C14. 十四酸; C20.4. 6,9,12,15 - 二十碳四烯酸; C18.2. 9,12 - 十八碳二烯酸; C15. 十五酸; C16. 十六酸; C18.1. 12 - 十八碳烯酸; C17. 十七酸; C18. 十八酸; C20.1. 11 - 二十碳烯酸; C19. 十九酸; C20. 二十酸; C22.1. 12 - 二十二碳烯酸; C21. 二十一酸; C22. 二十二酸; C24.1. 20 - 二十四碳烯酸; C23. 二十三酸; C24. 二十四酸; C25. 二十五酸; C26. 二十六酸; C27. 二十七酸; C28. 二十八酸; C29. 二十九酸; C30. 三十酸;
A. 1 - (2 - 羟乙基) - 2 - 苯基咪唑 [4,5 - f]9,10 - 菲; B. 2 - 苯基咪唑 [4,5 - f]9,10 - 菲; C. 试剂峰 (TSP); D. 杂质峰 (impurity)。

图 2 39种标准脂肪酸的色谱分离图

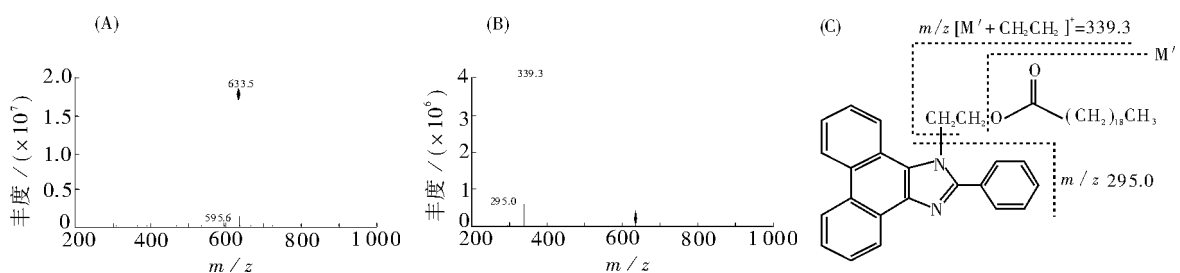


图 3 二十碳脂肪酸衍生物的一级 (A)与二级 (B)质谱图和质谱裂解模式 (C)

2.3 微孔草籽油脂脂肪酸的全面分析

应用该法对微孔草籽超临界萃取油进行全面分析,色谱分离图见图 4,结果发现脂肪酸组分主要是集中在 C14 ~ C24 之间的长链饱和与不饱和脂肪酸。

39种脂肪酸的同时分离分析方法虽然全面,但对微孔草籽超临界萃取油中主要含 C14 ~ C24 的饱和与不饱和脂肪酸而言,分析时间过长,不利于企业生产或检测标准的建立。

2.4 标准脂肪酸衍生后 HPLC 色谱分离及质谱鉴

定 (17种脂肪酸)

为了实现快速定量分析,重新配制 C14 ~ C24 的饱和与不饱和脂肪酸标准品,建立了快速测定长链饱和与不饱和脂肪酸的方法。标准品衍生方法:向盛有 10 mg 无水 K_2CO_3 的 2 mL 安瓿瓶中依次加入 200 μ L N,N - 二甲基甲酰胺,50 μ L 混合脂肪酸 (17种脂肪酸,每种浓度为 1.0×10^{-4} mol/L),45 μ L 衍生试剂溶液 (1.0×10^{-2} mol/L),封口后于 90 $^{\circ}$ C 恒温水浴下振荡反应 30 min,冷却后取 100 μ L 衍生液加入 400 μ L 乙腈/N,N - 二甲基甲酰胺溶液

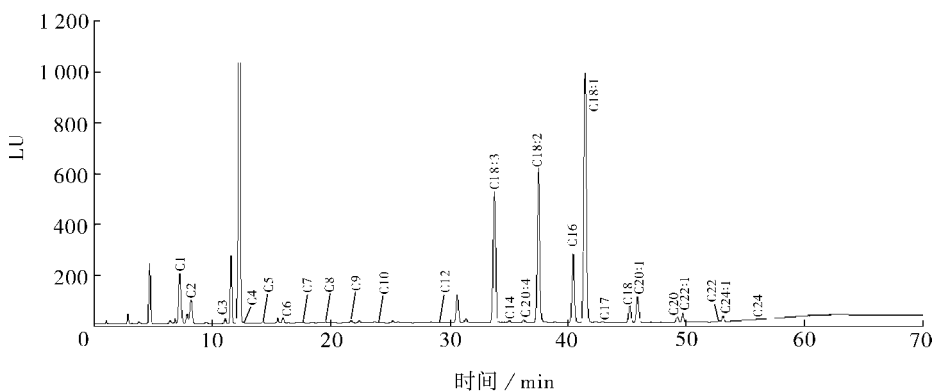


图4 微孔草籽超临界萃取油脂脂肪酸的全面分析色谱图

(V(ACN) V(DMF) = 1 1)稀释后直接进样 10 μ L (33.9 pmol)分析。其中不饱和脂肪酸 8种,饱和脂肪酸 9种,共 17种脂肪酸能够实现快速分离分析。通过调整梯度洗脱程序,在 35 min内实现 17种长链脂肪酸的快速定量分析,优化的梯度洗脱程序如表 1所示。17种标准品的色谱分离图见图 5。

表1 梯度洗脱程序

时间 /min	A /%	B /%	C /%	D /%
0	95	0	5	0
4	0	85	15	0
8	0	55	45	0
10	0	0	50	50
30	0	0	100	100
35	0	0	0	100

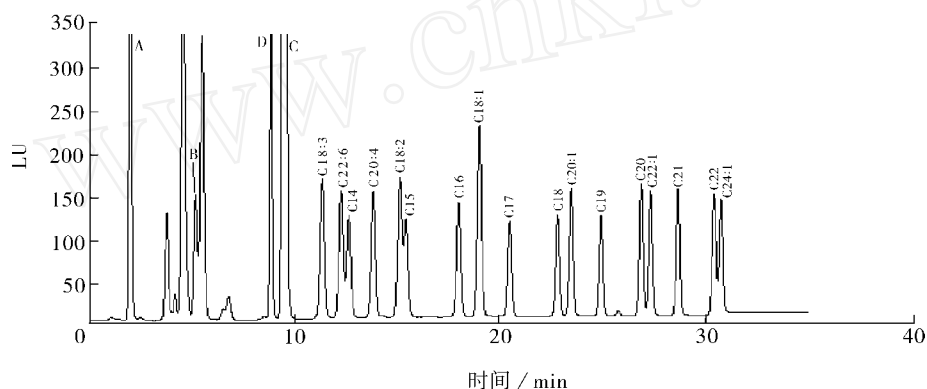


图5 17种长链脂肪酸的标准品色谱分离图

2.5 方法的稳定性与重现性

取新衍生的同一份标准品衍生液 (33.9 pmol),分别在室温放置 0、1、2、4、8、16、24、72 h时进行色谱分析,计算得各时间点下各脂肪酸衍生物峰面积对 0时的标准偏差值均小于 2.8%,表明衍生物对于常规色谱分析稳定性良好。

在相同洗脱条件下,对 33.9 pmol脂肪酸衍生物进行平行 6次分析,保留时间和峰面积重现性见表 2,保留时间相对标准偏差 RSD 小于 0.1036%,峰面积相对标准偏差 RSD 小于 1.246%。

2.6 线性回归方程及检出限

进样量在 69.75 ~ 200.00 fmol范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所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 2。各脂肪酸衍生物的线性相关系数在 0.9992 ~

0.9999之间,检出限在 14.32 ~ 26.82 fmol之间 (S/N = 3.1)。

2.7 微孔草籽超临界萃取油样品的脂肪酸分析

2.7.1 方法的回收率 在超临界萃取油样品中加入 10 μ L浓度为 1.0 $\times 10^{-4}$ mol/L脂肪酸标准品后,按照上述提取方法提取后进行衍生,重复 3次,所得各脂肪酸的回收率在 91.42% ~ 104.2%之间。

2.7.2 实际样品测定 实际样品的测定借助柱后质谱鉴定。微孔草籽超临界萃取油脂脂肪酸的色谱分离图见图 6。采用建立的外标法测出微孔草籽超临界萃取油脂脂肪酸的组成及含量见表 3。

3 结论

(1)采用自制的 1 - [2 - (对甲苯磺酸酯)乙基] - 2 - 苯基咪唑 [4,5 - f]9,10 - 菲作为柱前荧光衍生试剂,经优化的脂肪酸衍生条件的衍生处理

表 2 脂肪酸衍生物的回归方程、相关系数、检出限、保留时间和峰面积重现性

脂肪酸	标准曲线	线性相关系数	质谱 [M + H] ⁺	检出限 /fmol	保留时间	RSD /%	峰面积	RSD /%
C18 3	$Y = 64.21X + 13.37$	0.9997	599.2	16.82	0.05872	0.2469		
C22 6	$Y = 56.11X + 20.44$	0.9999	649.2	18.07	0.05786	0.2931		
C14 0	$Y = 47.61X + 16.48$	0.9999	549.4	26.31	0.04375	0.2523		
C20 4	$Y = 56.78X + 16.61$	0.9999	625.2	17.35	0.07345	0.3127		
C18 2	$Y = 65.41X + 12.76$	0.9998	601.2	16.49	0.03473	0.2238		
C15 0	$Y = 41.69X + 30.75$	0.9994	563.4	26.82	0.04331	0.1369		
C16 0	$Y = 52.07X + 11.55$	0.9999	577.4	21.71	0.03069	0.0954		
C18 1	$Y = 85.58X + 25.01$	0.9998	603.2	14.32	0.02885	0.1174		
C17 0	$Y = 42.61X + 3.47$	0.9999	591.4	25.08	0.02616	0.1746		
C18 0	$Y = 42.31X + 12.84$	0.9997	605.4	23.34	0.01949	0.1558		
C20 1	$Y = 52.32X + 20.59$	0.9998	631.2	16.37	0.02734	0.1654		
C19 0	$Y = 40.55X + 11.83$	0.9999	619.5	24.44	0.02018	0.1562		
C20 0	$Y = 51.23X + 16.39$	0.9999	633.5	22.17	0.04326	0.3643		
C22 1	$Y = 48.77X + 17.98$	0.9996	659.3	21.94	0.08367	0.5217		
C21 0	$Y = 49.36X + 15.25$	0.9992	647.6	23.44	0.07187	0.8788		
C22 0	$Y = 49.01X + 15.60$	0.9999	661.6	24.72	0.09515	1.246		
C24 1	$Y = 45.28X + 26.56$	0.9999	687.3	24.85	0.1036	1.137		

注: Y. 峰面积; X. 进样量 (pmol)。

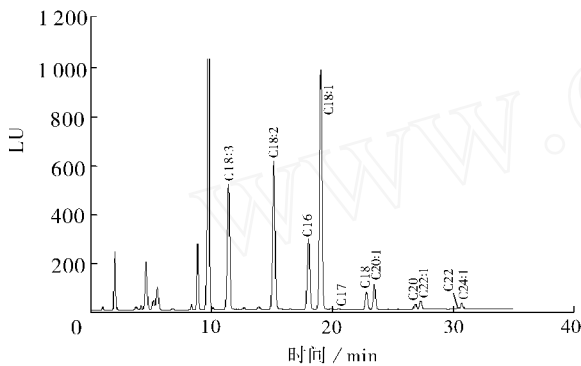


图 6 微孔草籽超临界萃取油脂脂肪酸的色谱图

表 3 微孔草籽超临界萃取油脂脂肪酸组成及含量 (n = 3)

脂肪酸	绝对含量 / (g/100 g)	相对含量 / %	脂肪酸	绝对含量 / (g/100 g)	相对含量 / %
C18 3	17.90	20.25	C18 0	3.45	3.90
C22 6	0	0	C20 1	4.33	4.89
C14 0	0.24	0.27	C19 0	0	0
C20 4	0.49	0.56	C20 0	0.79	0.89
C18 2	21.08	23.85	C22 1	1.65	1.87
C15 0	0	0	C21 0	0	0
C16 0	11.32	12.81	C22 0	0.13	0.15
C18 1	25.71	29.09	C24 1	1.12	1.26
C17 0	0.19	0.21			

39种标准脂肪酸衍生物均可获得较好的基线分离。根据微孔草籽油脂脂肪酸基本组成,建立了快速测定饱和与不饱和脂肪酸的方法,能够实现微孔草籽油脂脂肪酸的快速、全面的分离与测定。

(2)液相色谱-质谱联用法对实际样品色谱分离中组分峰的定性可通过标准品保留时间和柱后在

线质谱快速鉴定的双重定性,确保了组分确定的准确性。应用建立的外标法进行定量分析,通过线性回归方程计算,可得出微孔草籽油中各脂肪酸的绝对含量(每100g油中含的脂肪酸克数)及其相对含量(每种脂肪酸占脂肪酸总量的百分比)。

参考文献:

- [1] 陈志, 索有瑞, 杜继曾. 微孔草种籽油对小白鼠血脂水平的影响 [J]. 青海医药杂志, 1997, 27(4): 12 - 13.
- [2] 李茂言, 何利城, 吴志成, 等. 微孔草总油对大鼠实验性高脂血症的防治作用 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(2): 106 - 108.
- [3] 韩发, 程大志, 师生波, 等. 我国优质野生植物微孔草资源的研究与开发利用进展 [J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(5): 5 - 9.
- [4] 付华, 王故, 周志宇. 气质联用 (GC/MS) 研究天祝微孔草籽油中的脂肪酸 [J]. 草地学报, 1997(3): 205 - 208.
- [5] YOSHIDA T, UETAKE A, YAMAGUCHI H, et al. New preparation method for 9-anthryldiazomethane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives [J]. Anal Biochem, 1988, 173: 70 - 74.
- [6] LUCY, WUHL, CHENSW, et al. A fluorimetric liquid chromatography for highly sensitive analysis of very long chain fatty acids as naphthoxyethyl derivatives [J]. Chromatographia, 2000, 51: 315 - 321.
- [7] ZHAOXE, SUOYR, DNGCX, et al. Synthesis of 1-[2-(p-toluenesulfonate)ethyl]-2-phenylimidazole [4,5-f]9,10-phenanthrene and its application for analysis of long-chain fatty acids [J]. Chin J Chromatography, 2006, 24: 456 - 461.