

柱前衍生 HPLC-MS 法测定黑果枸杞果实中脂肪酸

胡娜^{1,2,4}, 索有瑞^{*1,2}, 韩丽娟^{1,4}, 索有芳³, 尤进茂¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 青海大学农林科学院, 西宁 810016;
3. 青海省环境监测中心站, 西宁 810007; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用柱前衍生荧光检测高效液相色谱-大气压化学电离源/质谱联用技术对黑果枸杞果实中的脂肪酸成分进行分析。经 2-(11-H-苯-a-吡唑)乙基对甲苯磺酸酯荧光衍生试剂对脂肪酸进行柱前衍生, 梯度洗脱分离, 荧光检测, 外标法定量和在线质谱鉴定, 建立了同时测定 20 种脂肪酸含量的方法, 并运用此方法对黑果枸杞果实中的脂肪酸进行了分析。结果表明, 检测限可以达到 0.42 ~ 1.84 ng/mL。黑果枸杞果实中主要含有不饱和脂肪酸, 其含量约占整个脂肪酸总量的 64%, 其中不饱和脂肪酸种类主要是 C18:1(油酸), C18:2(亚油酸)和少量的 C18:3(亚麻酸); 饱和脂肪酸主要是以 C16(棕榈酸), C18(硬脂酸), C20(花生酸)和 C22(山嵛酸)为主, 另外还含有少量的 C12(月桂酸), C14(肉豆蔻酸), C17(珠光脂酸), C23(二十三酸)和 C24(木蜡酸)。本研究可以为黑果枸杞在食品、医药和保健方面的进一步开发应用提供可靠的科学依据。
关键词: 黑果枸杞; 脂肪酸; 柱前衍生; 高效液相色谱-大气压化学电离源/质谱联用技术

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2014)06-0698-04

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium* L.) 的多年生落叶灌木, 是我国西北荒漠地区一种特有的野生植物资源, 通常分布在干旱、盐碱和荒漠与半荒漠地区。目前对黑果枸杞的研究主要集中在多糖、色素、甜菜碱和黄酮等方面, 黑果枸杞果实中的脂肪酸研究很少^[1-4]。

对于脂肪酸的研究, 目前主要使用的方法是气相色谱法 (GC)、气相色谱质谱联用法 (GC-MS) 和高效液相色谱 (HPLC) 衍生紫外检测法^[5-9]。柱前荧光衍生 HPLC 技术是近几年来被广泛应用于脂肪酸测定的一种新方法, 该方法具有灵敏度和选择性高, 耗时短, 且重复性和精密度高的优点^[10-12]。本研究以 2-(11-H-苯-a-吡唑)乙基对甲苯磺酸酯 (BCETS) 为柱前荧光衍生试剂, 利用荧光检测和液相色谱-质谱联用等方法对黑果枸杞果实中的脂肪酸组成进行研究。应用此方法对黑果枸杞果实中的脂肪酸进行分析, 可以为进一步

开发利用黑果枸杞果实提供理论基础。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

于 2012 年 9 月在青海省柴达木盆地诺木洪农场采集已经完全成熟的黑果枸杞果实, 经中国科学院西北高原生物研究所索有瑞研究员工鉴定为黑果枸杞的果实。将黑果枸杞果实置于 60 °C 烘箱中烘至恒重, 取 30 g 干燥好的黑果枸杞果实, 用高速万能粉碎机粉碎, 过 0.5 mm 筛, 备用。

乙腈 (色谱纯, Merck 公司); N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 经减压蒸馏后使用; 乙腈 (色谱纯, 禹王试剂公司); 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备; 脂肪酸标准对照品均购自美国 Sigma 公司; BCETS 由尤进茂教授课题组合成; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与条件

Agilent 1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 公司), 配备四元梯度泵 (G1311A), DAD 检测器 (G1315B), 恒温调节器 (G1311A), 在线真

收稿日期: 2014-01-25

基金项目: 科技部星火计划项目 (2011GA870007) 资助

E-mail: huna880125@163.com

空脱气机(G1322A),100位自动进样器,电喷雾电离源(ESI Source)。KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器公司)。BF2000型氮气吹干仪(北京八方公司)。

HPLC分析条件:色谱柱为Hypersil BDS C₈柱(4.6 mm×200 mm,5 μm,Agilent公司);流动相为A:5%乙腈,B:100%乙腈。流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL,柱温35℃。荧光激发和发射波长分别为:λ_{ex}=279 nm和λ_{em}=380 nm。洗脱梯度如下:0~35 min,65%~83% B;35~50 min,83%~88% B;50~55 min,88%~100% B;55~60 min,100% B。

MS条件:质谱配备大气压化学电离源(APCI),其条件为:喷雾压力:413 kPa;干燥气温

度:350℃;干燥气流量:5 L/min;气化温度:450℃;电晕电流:4 μA(Pos);毛细管电压:3.5 kV。选用正离子模式。

1.3 HPLC标准液制备

准确称取定量脂肪酸标品,用乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L的溶液。低浓度的脂肪酸标准溶液 1.0×10^{-4} mol/L用乙腈稀释而成。称取8.32 mg BCETS用DMF定容至10 mL。向已经盛有15 mg K₂CO₃的安培瓶中依次加入30 μL脂肪酸标准溶液,100 μL DMF和200 μL BCETS,封口后于90℃恒温水浴下震荡反应30 min。取出冷却至室温后,过0.22 μm滤膜后进样分析。脂肪酸与衍生试剂BCETS的衍生过程如图1所示。

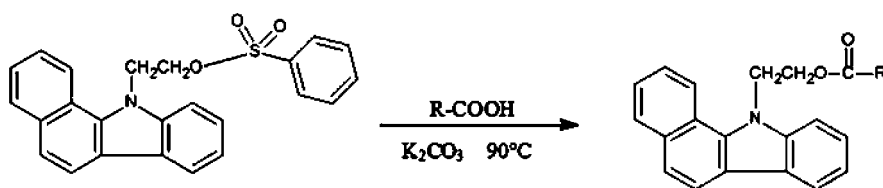


图1 脂肪酸与BCETS的衍生过程

Fig. 1 Derivatization scheme of BCETS with fatty acids

1.4 样品溶液制备

称取约100.0 mg已粉碎好的黑果枸杞果粉于10 mL玻璃离心管中,加入5 mL石油醚,超声提取1 h后,将上清液移出。再加入2 mL石油醚到玻璃离心管中进行充分的提取,超声提取1 h后,将两次上清液合并。取出100 μL合并液到2 mL安培瓶中,用N₂吹干。然后加入15 mg K₂CO₃,100 μL DMF和200 μL BCETS,封口后于90℃恒温水浴下震荡反应30 min。取出冷却至室温后,加入200 μL乙腈稀释并过0.22 μm滤膜后进样分析。

2 结果与讨论

2.1 HPLC色谱分离与质谱鉴定

按照前述实验条件,20种标准脂肪酸衍生物获得完全分离,图谱如图2所示。各组分经液相色谱分离荧光检测后,直接进入柱后串联质谱进行定性鉴定,各组分质谱数据图见表1,裂解模式见图3。

2.2 线性、检测限及定量限、精密度与准确度

在相同的实验条件下,平行进样3次建立标准曲线,进样浓度为1.25~40 μmol/L,各衍生物均表现出良好的线性,相关系数均大于等于0.9995。检出限(LODs)被定义为峰高约在基线噪音高的3倍时被测物质的质量浓度,本实验中LODs在

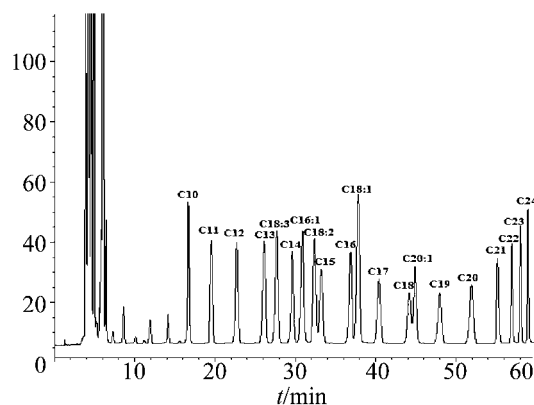


图2 标准脂肪酸衍生物的色谱分离图

Fig. 2 Chromatograms of fatty acid derivatives from fatty acid standards

0.42~1.82 ng/mL之间。定量限(LOQs)被定义为峰高约在基线噪音高的10倍时被测物质的质量浓度,本实验中LOQs在1.34~6.64 ng/mL之间。平行进样3次标准品衍生物考察方法的精密度,其相对标准偏差小于5.0%。为考察方法的准确度,进行了加样回收率实验,标准品浓度分别为1.25,5,20 μmol/L,其回收率在92.6%~101.9%范围内。见表1。

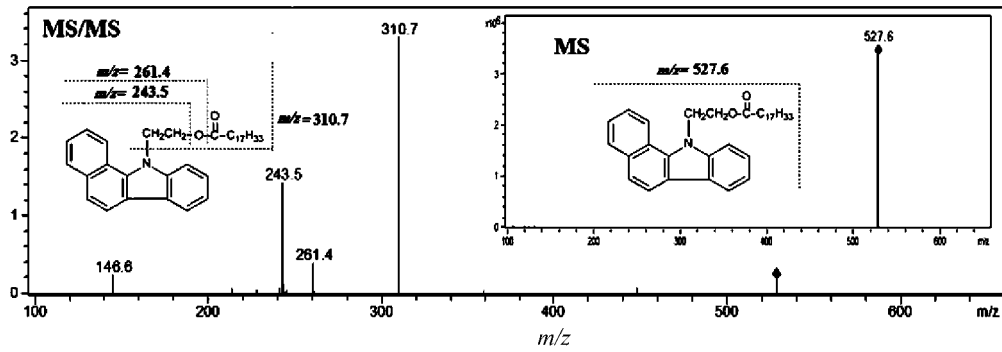


图 3 硬脂酸(C18)一级和二级质谱图及其质谱裂解模式

Fig. 3 MS and MS/MS spectra of representative octadecanoic acid (C18) derivative and the cleavage mode of protonated molecular ion

表 1 脂肪酸衍生物的质谱数据、相关系数、检测限、定量限、精密度、准确度与含量

Tab. 1 Molecular ions $[M + H]^+$, r , LODs, LOQs and recovery, precision of fatty acid derivatives

脂肪酸	m/z	相关系数 (r)	检出限 ρ_l (ng/mL)	定量限 ρ_l (ng/mL)	回收率/%	RSD/%	样品脂肪酸含量 w ($\mu\text{g/g}$)
C10	416.3	0.9999	0.53	1.61	98.6	2.5	nd
C11	430.1	0.9995	0.42	1.34	99.3	3.2	nd
C12	444.3	0.9999	0.61	1.89	95.5	1.9	1.64
C13	458.3	0.9996	0.59	1.67	101.9	3.1	nd
C18:3	521.9	0.9997	0.67	1.91	99.8	2.0	53.18
C14	472.3	0.9998	0.55	1.71	97.9	2.4	6.75
C16:1	497.8	0.9996	0.73	2.32	93.5	2.5	3.81
C18:2	523.9	0.9993	0.76	2.54	97.3	3.5	279.22
C15	486.3	0.9999	0.81	2.61	98.6	2.8	nd
C16	500.2	0.9995	0.87	2.73	96.5	3.4	80.45
C18:1	525.8	0.9994	0.92	2.98	99.7	4.2	135.15
C17	514.4	0.9995	0.88	2.82	92.6	4.3	7.57
C18	528.3	0.9997	0.99	3.21	94.8	3.8	77.9
C20:1	553.9	0.9997	1.12	3.54	99.3	3.9	nd
C19	542.4	0.9999	1.23	3.73	102.4	3.0	nd
C20	556.3	0.9998	1.41	4.15	94.2	3.4	42.47
C21	570.3	0.9997	1.51	4.74	93.5	4.2	nd
C22	584.1	0.9998	1.62	4.95	96.1	4.4	22.62
C23	598.4	0.9996	1.76	5.32	93.5	3.9	10.23
C24	612.3	0.9995	1.82	6.64	94.8	5.0	nd

nd: 未检出

2.3 黑果枸杞果实中游离脂肪酸的分析

按实验方法对黑果枸杞果实样品中的脂肪酸进行了分析,其色谱分离图如图 4 所示,脂肪酸含量组成见表 1。由图 4 可知,黑果枸杞果实中主要含有的饱和脂肪酸为 C16(棕榈酸),C18(硬脂酸),C20(花生酸)和 C22(山萘酸),另外还含有少量的 C12(月桂酸),C14(肉豆蔻酸),C17(珠光脂酸),C23(二十三酸)和 C24(木蜡酸);不饱和脂肪酸主要是 C18:1(油酸),C18:2(亚油酸)和 C18:3(亚麻酸),另外还含有

少量的 C16:1(棕榈油酸)。黑果枸杞果实中所含的各种脂肪酸含量分别为: C12(1.64 $\mu\text{g/g}$), C18:3(53.18 $\mu\text{g/g}$), C14(6.75 $\mu\text{g/g}$), C16:1(3.81 $\mu\text{g/g}$), C18:2(279.22 $\mu\text{g/g}$), C16(80.45 $\mu\text{g/g}$), C17(7.57 $\mu\text{g/g}$), C18:1(135.15 $\mu\text{g/g}$), C18(77.90 $\mu\text{g/g}$), C20(42.47 $\mu\text{g/g}$), C22(22.62 $\mu\text{g/g}$), C23(10.23 $\mu\text{g/g}$)和 C24(15.56 $\mu\text{g/g}$)。饱和脂肪酸总量为 265.18 $\mu\text{g/g}$, 不饱和脂肪酸总量为 471.36 $\mu\text{g/g}$, 不饱和脂肪酸约占总脂肪酸的 64.0%。

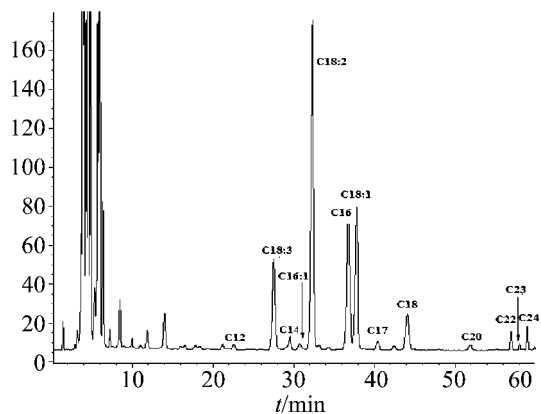


图4 黑果枸杞果实中游离脂肪酸衍生物的色谱分离图

Fig. 4 Chromatograms of fatty acid derivatives from *Lycium ruthenicum* Murr. fruit

参考文献

- [1] 矫晓丽,迟晓峰,董琦,等. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(3): 60
 [2] 索有瑞,鲁长征,李刚,等. 中国林业出版社,

2012: 23

- [3] 李进. 黑果枸杞色素研究. 上海: 华东师范大学, 2006: 11
 [4] 刘增根,陶燕铎,邵赟,等. 光谱实验室, 2012, 29(2): 694
 [5] 傅宇飞,张佩佩,潘再法,等. 分析试验室, 2013, 32(8): 103
 [6] 楼乔明,王玉明,徐杰,等. 分析试验室, 2011, 30(3): 18
 [7] 喻凤香,林亲录,黄中培,等. 食品研究与开发, 2013, 34(3): 72
 [8] 杨春英,刘学铭,陈智毅. 食品科学, 2013, 34(6): 211
 [9] 詹汉英,刘瑞林,王德金,等. 色谱, 2013, 31(3): 240
 [10] 席兴军,王 晓,郑媛媛,等. 分析试验室, 2013, 32(9): 27
 [11] 李国梁. 几种獐牙菜属植物主要化学成分的分离与分析. 北京: 中国科学院大学, 2012: 32
 [12] 强 伟,赵先恩,王洪伦,等. 中国粮油学报, 2012, 27(8): 65

Determination and analysis of fatty acids in *Lycium ruthenicum* Murr fruits by HPLC-MS with pre-column derivatization

HU Na^{1,2,4}, SUO You-rui^{1,2}, HAN Li-juan^{1,4}, SUO You-fang³ and YOU Jin-mao¹ (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Academy of Agriculture and Forestry, Qinghai University, Xining 810016; 3. Qinghai Environment Monitoring Center, Xining 810007; 4. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi 2014, 33(6): 698 ~ 701

Abstract: In the present study, fatty acids in fruits of *Lycium ruthenicum* Murr were analyzed by HPLC-FLD-APCI/MS with pre-column derivatization and fluorescence detection. A method for the determination of the absolute contents of 20 kinds of fatty acids by pre-column derivatization with 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl) ethyl 4-methylbenzenesulfonate (BCETS) as a derivatization reagent, gradient elution, fluorescence detection, external standard method and online MS identification was established. The method was successfully employed to analyze fatty acids in the fruits of *Lycium ruthenicum* Murr. The results show that the method has high sensitivity, selectivity, good reproducibility and applicability. The limits of detection were in the range of 0.42 - 1.84 ng/mL. The main fatty acids in the fruits of *Lycium ruthenicum* Murr are unsaturated fatty acids including C18:1, C18:2 and C18:3, the percentage of which could reach 64%. The primary saturated fatty acids are C16, C18, C20 and C22, and there are little amounts of C12, C14, C17, C23 and C24. This research can provide reliably scientific basis for its development and application in food, medicine and health products.

Keywords: *Lycium ruthenicum* Murr; Fatty acids; Pre-column derivatization; HPLC-FLD-APCI/MS