

柱前衍生高效液相色谱-荧光检测/质谱联用测定 沙棘种子中游离脂肪酸

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

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

摘要:建立了一种利用 2-(11-H-苯- α -咔唑)乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)作为柱前荧光标记试剂的高灵敏度和高选择性的脂肪酸定量分析方法,并考察了该方法的分析性能。结果表明,方法表现出了较好的重现性和加标回收率,检测限在 0.42~1.82 ng/mL 之间。该方法已被成功的用于青藏高原沙棘种子中脂肪酸含量的分析,结果表明沙棘种子中富含脂肪酸,以不饱和脂肪酸为主,约占总脂肪酸的 85.01%。不饱和脂肪酸中,以油酸、亚油酸和亚麻酸为主,分别占总脂肪酸的 26.01%、30.86%和 14.07%。
关键词:沙棘;脂肪酸;柱前衍生;HPLC-FLD-APCI/MS

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1006-6144(2015)01-043-04

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae* L.)植物(Sea-buckthorn),又叫醋柳、酸刺、黑刺,为灌木或小乔木^[1]。沙棘的天然分布很广,在欧亚大陆温带地区均有分布。我国沙棘属植物资源丰富,而青海沙棘资源约占全国总沙棘总量的 10%。沙棘除作为生态保护的先锋物种^[2],还具有祛痰、利肺、开胃、补脾、活血、祛瘀、消炎、止痛、促进组织再生等药理功能^[3],其维生素 C 含量之高是其他浆果和水果无法相比的^[4]。在工业应用上,沙棘籽油、黄酮、花青素和维生素 E 等都是护肤美容活性成分^[5]。其中,沙棘籽油是多种脂溶性维生素和皮脂活性物质的复合体,具有滋养皮肤,促进新陈代谢,抗过敏,杀菌消炎,促进上皮组织再生的功能作用^[6]。

研究发现,脂肪酸尤其是不饱和脂肪酸具有重要的生理功能,对中枢神经系统和视网膜的生长和发育、心血管系统具有重要的作用,可以预防动脉粥样硬化、心脏病、抑郁症和癌症等疾病^[7]。沙棘种子中脂肪酸成分的测定目前已有许多报道,但方法多数是采用气相色谱或者气相色谱-质谱联用技术。本研究以新型荧光衍生试剂 2-(11-H-苯- α -咔唑)乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)为柱前荧光衍生试剂(结构见图 1),利用高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)并与质谱(MS)联用对沙棘种子中的游离脂肪酸组成进行了研究,为进一步开发利用沙棘果实提供理论基础。

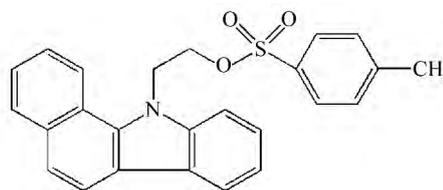


图 1 BCETS 的结构式
Fig. 1 The structure of BCETS

1 实验部分

1.1 仪器与条件

Agilent 1100 液相色谱-离子阱质谱联用仪(美国,Agilent 公司),配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器和自动进样器,大气压化学电离源(APCI)。高效液相色谱系统软件:HP Chemstation soft-

收稿日期:2013-12-18 修回日期:2014-02-17

基金项目:科技部星火计划(No. 2011GA870007)

* 通讯作者:索有瑞,男,博士,研究员,主要从事青藏高原生物资源持续利用与天然产物化学研究。

ware; 质谱系统: Esquire-LC NT software; Hypersil BDS C8 柱(200×4.6 mm, 5 μm, Agilent Co.); 流动相 A: 100% 乙腈, 流动相 B: 5% 乙腈; 洗脱梯度如下: 0 min 为 65% A, 35 min 为 83% A, 50 min 为 88% A, 55 min 为 100% A, 60 min 为 100% A; 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 35 °C。荧光激发和发射波长分别为 279 nm 和 380 nm。色谱峰按标准对照品保留时间定性, 并通过在线质谱鉴定, 质谱条件: 大气压化学电离源(APCI), 正离子模式, 喷雾压力 60 psi, 干燥气流量为 5 L/min, 干燥气温度 350 °C, Vap 温度 450 °C, 毛细管电压 3 500 V, 电晕电流 4 000 μA(Pos)。

1.2 试剂与材料

脂肪酸标准品均购自 Sigma 公司; 2-(11-H 苯- α -唑) 乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)由尤进茂教授课题组实验室合成; 光谱纯乙腈购于 Merck 公司; N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)(济宁化学试剂公司)经减压蒸馏后使用; 色谱纯乙腈(禹王试剂公司); 其他试剂均为分析纯。纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

于 2012 年 9 月份在青海省循化县白庄镇苏乎沙村采集完全成熟的沙棘果实。分别选取附近 4 个不同的采样点进行采样, 经中国科学院西北高原生物研究所周昌范工程师鉴定为沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)的果实。将榨完果汁剩下的果渣进行清洗, 去除果皮, 保留种子, 并将洗净的沙棘种子于 60 °C 烘箱中烘至恒重。取 20 g 干燥好的沙棘种子, 用高速万能粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 备用。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制与衍生 稀释各标准品储备溶液(0.01 mol/L)得各低浓度标准品溶液。准确称取 22.15 mg BCETS, 用 DMF 定容至 10 mL。标准品溶液衍生: 向盛有 15 mg 无水 K₂CO₃ 的 2 mL 安培瓶中依次加入 30 μL 标准品混合溶液, 120 μL BCETS 溶液, 150 μL DMF, 封口后于 90 °C 恒温水浴下反应 30 min。反应完毕, 冷却, 过 0.22 μm 滤膜后, 待分析。

1.3.2 脂肪酸供试液的制备与衍生 精确称取约 100.0 mg 样品至 10 mL 具塞刻度试管中, 加入 5 mL 石油醚, 超声提取 1 h, 取 100 μL 用 N₂ 吹干后, 加入 100 μL 的 DMF 和 200 μL 的衍生试剂, 封口后于温度 90 °C 恒温水浴下衍生 30 min, 然后加入 250 μL 乙腈稀释, 过 0.22 μm 滤膜, 放入冰箱备用。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分离及 MS 鉴定

按上述实验条件, 20 种标准脂肪酸衍生物获得完全分离, 代表谱图见图 2。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, 20 种脂肪酸的衍生物一级质谱数据见表 1。代表性的 BCETS-C18:1 脂肪酸的 MS、MS/MS 和裂解模式分析见图 3。

2.2 方法学验证

优化条件下, 对标准系列溶液平行 6 次进样测定, 并建立标准曲线, 各衍生物均表现出良好的线性, 其相关系数(r) ≥ 0.9995 , 线性范围是 1.562~50 mmol/L。检测限(LOD)(S/N=3)在 0.42~1.82 ng/mL 之间, 定量限(LOQ)(S/N=10)在 1.34~6.64 ng/mL 之间, 证明该方法具有较高的灵敏度。将已知量的脂肪酸标准品加入样品, 加标样品用于整个实验过程, 包括提取、衍生和进样分析, 实验重复三次。依据公式计算回收率, 实验结果显示各脂肪酸的加标回收率在 92.6%~101.9% 范围内, 相对标准偏差(RSD)在 1.89%~4.91% 之间, 表明这种方法具有较好的准确度和精确度。实验结果列于表 1。

2.3 沙棘种子中游离脂肪酸分析

按上述实验条件, 对实际样品衍生后进行色谱分离及质谱鉴定, 色谱分离见图 4。由于所采四个样品中沙棘种子中脂肪酸含量相差不大, 故仅以 4 个采样点种子中脂肪酸含量的平均值进行说明。由图 4 可知,

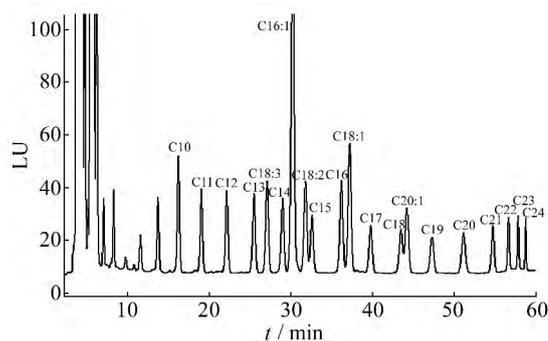


图 2 标准脂肪酸衍生物的色谱分离图

Fig. 2 Chromatogram of fatty acid derivatives from 20 fatty acid standards

Peak labels: C10(decoic acid); C11(undecanoic acid); C12(dodecanoic acid); C13(tridecanoic acid); C18:3(8, 11, 14-octadecatrienoic acid); C14(myristic acid); C16:1(palmitoleic acid); C18:2(9, 12-octadecadienoic acid); C15(pentadecanoic acid); C16(hexadecanoic acid); C18:1(12-octadecenoic acid); C17(heptadecanoic acid); C18(octadecanoic acid); C20:1(11-eicosenoic acid); C19(nonadecanoic acid); C20(arachidic acid); C21(heneicosanoic acid); C22(docosanoic acid); C23(tricosanoic acid); C24(tetracosanoic acid).

表 1 脂肪酸衍生物的质谱数据、线性回归方程、相关系数、检出限、重现性与精确度

Fatty acid	MS	r	LOD(ng/mL)	LOQ(ng/mL)	Recovery(%)	RSD(%)
C10	416.3	0.9999	0.53	1.61	98.6	2.44
C11	430.1	0.9995	0.42	1.34	99.3	3.11
C12	444.3	0.9999	0.61	1.89	95.5	1.89
C13	458.3	0.9996	0.59	1.67	101.9	3.05
C18:3	521.9	0.9997	0.67	1.91	99.8	1.98
C14	472.3	0.9998	0.55	1.71	97.9	2.31
C16:1	497.8	0.9996	0.73	2.32	93.5	2.43
C18:2	523.9	0.9993	0.76	2.54	97.3	3.50
C15	486.3	0.9999	0.81	2.61	98.6	2.79
C16	500.2	0.9995	0.87	2.73	96.5	3.38
C18:1	525.8	0.9994	0.92	2.98	99.7	4.11
C17	514.4	0.9995	0.88	2.82	92.6	4.25
C18	528.3	0.9997	0.99	3.21	94.8	3.77
C20:1	553.9	0.9997	1.12	3.54	99.3	3.90
C19	542.4	0.9999	1.23	3.73	102.4	2.98
C20	556.3	0.9998	1.41	4.15	94.2	3.33
C21	570.3	0.9997	1.51	4.74	93.5	4.11
C22	584.1	0.9998	1.62	4.95	96.1	4.32
C23	598.4	0.9996	1.76	5.32	93.5	3.89
C24	612.3	0.9995	1.82	6.64	94.8	4.91

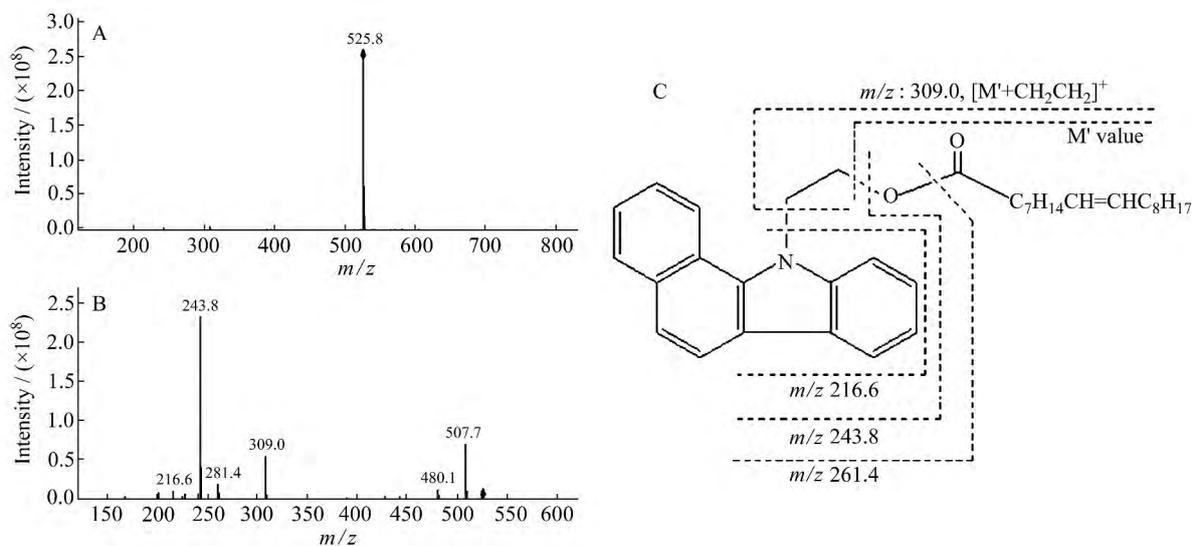


图 3 油酸(C18:1)质谱图及其质谱裂解模式

Fig. 3 MS and MS/MS spectrum of representative oleic acid (C18:1) derivative and the cleavage mode of protonated molecular ion

沙棘种子中主要含有的不饱和脂肪酸为亚油酸(C18:2), 亚麻酸(C18:1)和油酸(C18:3)。另外还含有少量的棕榈油酸(C16:1)。饱和脂肪酸主要以棕榈酸(C16)和硬脂酸(C18)为主, 含有少量的十三酸(C13)、肉豆蔻酸(C14)、花生酸(C20)、山嵛酸(C22)和木蜡酸(C24)。沙棘种子中所含脂肪酸含量分别为: C13(49.0 $\mu\text{g/g}$), C18:3(1060.5 $\mu\text{g/g}$), C14(26.6 $\mu\text{g/g}$), C16:1(1060.5 $\mu\text{g/g}$), C18:2(2325.3 $\mu\text{g/g}$), C16(528.6 $\mu\text{g/g}$), C18:1(1959.1 $\mu\text{g/g}$), C18(277.3 $\mu\text{g/g}$), C20(188.3 $\mu\text{g/g}$), C22(27.4 $\mu\text{g/g}$), C24(32.5 $\mu\text{g/g}$)。由上述数据可知, 总不饱和脂肪酸含量(6405.4 $\mu\text{g/g}$)远高于总饱和脂肪酸含量(1129.7 $\mu\text{g/g}$),

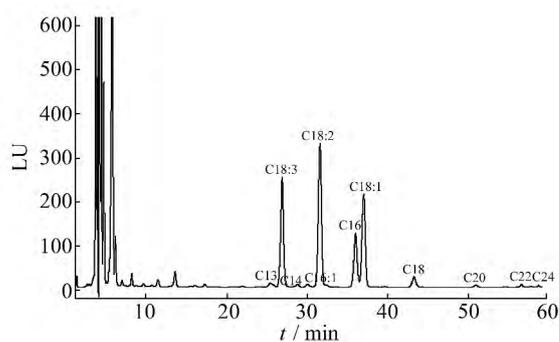


图 4 沙棘种子种脂肪酸衍生物的色谱分离图

Fig. 4 Chromatogram of fatty acid derivatives from seeds of *Hippophae rhamnoides* L.

且不饱和脂肪酸约占总脂肪酸的 85.01%。

3 结论

本文采用柱前衍生液相色谱-荧光检测/质谱联用的方法,对脂肪酸成分进行分析,并对所建立的方法进行了方法学验证。结果表明该方法简单、快速、检测灵敏度高、准确度和精确度高,可用于植物中脂肪酸的成分分析。该方法被成功的应用于沙棘种子中的脂肪酸成分分析,结果表明:沙棘种子中含有大量的不饱和脂肪酸,其比例可占总脂肪酸的 85.01%。不饱和脂肪酸中主要以亚油酸、油酸和亚麻酸为主,分别为总脂肪酸的 30.86%、26.01%和 14.07%。

参考文献:

- [1] LIU Zhen-shan(刘振山),SHI Wen-bin(史文彬). Bulletin of Biology(生物学通报)[J],1995,30(6):48.
- [2] LIU Zhen(刘震). Soil and Water Conservation and Ecological Construction in China[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社),2003.
- [3] ZHANG Feng-ping(张凤枰),ZHAO Yan(赵艳),LIU Yao-min(刘耀敏),SUO You-rui(索有瑞). Food Science(食品科学)[J],2010,31(02):179.
- [4] GU Qing-ping(顾清萍). The Global Seabuckthorn Research and Development(国际沙棘研究与开发)[J],2003,1(2):28.
- [5] LI Xiao-hua(李晓花),KONG Ling-xue(孔令学),LIU Hong-zhang(刘洪章). Journal of Jilin Agricultural University(吉林农业大学学报)[J],2007,29(2):162.
- [6] CHE Xi-ping(车锡平),GUO Feng(郭峰),GUAN Xiao-hong(关晓红),XI Zhong-xing(席仲兴). Sea-buckthorn(沙棘)[J],1999,12(4):34.
- [7] HUANG Feng-hong(黄凤洪),HUANG Qing-de(黄庆德),LIU Cang-sheng(刘昌盛). Food Science(食品科学)[J],2004,25(Z1):262.

Determination of Fatty Acids in *Hippophae rhamnoides* L. by Pre-Column Derivatization and HPLC-FLD-APCI/MS

HU Na^{1,2,4}, SUO You-rui^{*1,2}, HAN Li-juan^{1,4}, SUO You-fang³,
WANG Ning², 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)

Abstract: In the present study, a selective and sensitive method using 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl) ethyl 4-methylbenzenesulfonate(BCETS) as the labeling reagent based on pre-column derivatization for the qualitative and quantitative analysis of fatty acids(FAs) was developed and validated by linear range, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The proposed method exhibited excellent reproducibility and recovery. This method was successfully applied to the analysis of FAs in the seeds of *Hippophae rhamnoides* L. (SBT). The results showed that SBT seeds were rich in FAs, especially for unsaturated FAs (UFAs), the content of which contributed for 85.01% of the total FAs. As for unsaturated acids, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid shared the majority, their content were 26.01%, 30.86% and 14.07%, respectively. The analysis of FAs in SBT is important to the pharmacological research of SBT and is also imperative for the quality control.

Keywords: *Hippophae rhamnoides* L.; Fatty acids; Pre-column derivatization; HPLC-FLD-APCI/MS