编委论坛(155 ~ 159)

大果白刺游离脂肪酸的柱前衍生高效液相色谱 - 荧光检测法分析

胡　娜[1,2,3],索有瑞[1,2]

(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. 中国科学院大学,北京　100049)

摘要: 采用 2 - (11H - 苯 [a] 咔唑)乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)为柱前荧光衍生试剂,通过梯度洗脱使得 18 种脂肪酸在 BDS - C8 柱上得到良好的分离. 方法应用于大果白刺不同部位中游离脂肪酸的分析,结果表明大果白刺的果皮果肉和叶子中均含有大量的不饱和脂肪酸,其总不饱和脂肪酸含量分别为 70.74% 和 73.47%. 大果白刺种子中不饱和脂肪酸的含量相对较少,仅占总脂肪酸含量的 57.21%,其不饱和脂肪酸组成主要是 C18: 1(油酸)和 C18: 2(亚油酸). 其中,大果白刺的果皮果肉中,不饱和脂肪酸主要是 C18: 1、C18: 2 和 C18: 3(亚麻酸). 其叶子中的不饱和脂肪酸主要是 C18: 3,所占总脂肪酸比例为 48.34%. 首次对大果白刺中的脂肪酸进行了分析,可以为大果白刺在食品、药品中的进一步开发应用和质量控制提供一定的数据支持.

关键字: 大果白刺;脂肪酸;柱前衍生;高效液相色谱 - 荧光检测法

中图分类号: O657.32　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1006-3757(2014)03-0155-05

白刺属(*Nitraria L.*)植物属于蒺藜科(Zygophyllaceae)的落叶灌木. 目前白刺属植物分布于亚洲、欧洲、非洲和澳洲,在我国主要分布于西北、华北和沿海地区. 青海省有 3 种,分别为小果白刺(*Nitraria sibirica* Pall)、大果白刺(*Nitraria roborowskii* Kom)和唐古特白刺(*Nitraria tangutorum* Bobr),多分布于柴达木盆地的香日德、小柴旦、乌兰、德令哈等地区的沙漠绿洲边缘,东部黄土丘陵的干旱荒坡和沟岔内亦有分布[1]. 白刺果实是药食两用植物,其用药历史悠久,具有降血脂、抗氧化、降血糖、调节免疫和抗疲劳等作用[2-3]. 白刺果实中含有较丰富的脂肪酸、蛋白质、氨基酸、糖、维生素 C、有机酸等多种营养成分,还具有对人体有益的矿物质及微量元素[3-4]. 白刺属植物枝、叶营养价值高,羊、骆驼喜采食,是发展畜牧业的优良饲料[3]. 目前,国内对白刺属营养成分的研究主要集中在小果白刺与唐古特白刺,对大果白刺的研究较少,尤其是脂肪酸组成方面未见文献报道.

脂肪酸的分析多数采用气相色谱法和气相色谱 - 质谱联用方法[5-6]. 但是气相色谱法分析前需要对脂肪酸进行甲酯化,衍生反应繁琐耗时,酸性催化剂(如三氟化硼)可导致共轭脂肪酸异构化,且其危险性和毒性也较大. 近年来高效液相色谱法因其检测条件温和、重复性好、准确度高等优点逐渐应用于脂肪酸的检测,但由于脂肪酸缺乏共轭结构而紫外吸收很弱,不适合用紫外检测器进行定量分析. 柱前荧光标记法可以解决这个问题,且具有灵敏度高、选择性好、重复性和精密度高的优点[7-8].

本文以 2 - (11H - 苯 [a] 咔唑)乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)为柱前荧光衍生试剂,采用高效液相色谱 - 荧光检测法(HPLC - FLD)对大果白刺不同部位中的游离脂肪酸组成进行了研究,为进一步开发利用大果白刺资源提供理论基础.

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪,配备自动进样器,四元泵,柱温箱.

收稿日期: 2014 - 09 - 10;　**修订日期:** 2014 - 09 - 17.

基金项目: 科技部星火计划之青海生态经济林浆果资源利用技术集成及产业化(No 2011GA870007).

作者简介: 胡娜(1988 -),女,在读博士,主要从事天然药物化学研究工作. E - mail: huna880125@163.com

通信作者: 索有瑞(1960 -),男,博士,研究员,《分析测试技术与仪器》副主编,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. Tel: 0971 - 6143857. E - mail: yrsuo@nwipb.cas.cn

脂肪酸标准品 C10(葵酸)、C11(十一烷酸)、C12(十二烷酸)、C13(十三烷酸)、C18: 3(亚麻酸)、C14(十四烷酸)、C16: 1(棕榈油酸)、C18: 2(亚油酸)、C15(十五烷酸)、C16(十六烷酸)、C18: 1(十八烯酸)、C17(十七烷酸)、C18(十八烷酸)、C20:1(二十碳一烯酸)、C19(十九烷酸)、C20(二十烷酸)、C21(二十一烷酸)、C22(二十二烷酸)购自美国 sigma 公司;色谱纯的乙腈购自天津科密欧集团;分析纯的二甲基甲酰胺(DMF)、碳酸钾和石油醚购自上海化学试剂有限公司;水为娃哈哈纯净水,其它试剂均为分析纯.

1.2 色谱条件

Hypersil BDS C8 column (5 μm, 200×4.6 mm, 大连依利特公司). 流动相:5% 乙腈水溶液(A) - 乙腈(B). 梯度洗脱程序:0~35 min,65% B - 83% B;35~50 min,83% B - 88% B,50~55 min,88% B - 100% B,55~60 min,100% B,每次进样前用初始梯度平衡 5 min. 柱温:30 ℃. 流速:1.0 mL/min. 荧光激发和发射波长分别为 279 nm 和 380 nm. 进样量:10 μL.

1.3 样品制备

完全成熟的大果白刺果实和叶子于 2013 年 9 月份在青海省海西州大格勒乡采集,经中国科学院西北高原生物研究所周昌范高级工程师鉴定为大果白刺 *Nitraria roborowskii* Kom 的果实和叶子. 果实榨汁后将果皮果肉与籽分离,将果皮果肉、种子与叶子置于 60 ℃烘箱中烘干,用高速万能粉碎机粉碎,备用.

标准品溶液的制备:脂肪酸的标准品溶液(单标 1.0×10^{-4} mol/L)由母液(1×10^{-2} mol/L)用乙腈稀释得到,保存于 4 ℃冰箱中.

衍生试剂溶液的制备:称取 20.75 mg BCETS,置于 10 mL 的容量瓶中,加乙腈溶解并定容,得到衍生试剂溶液,保存于 4 ℃冰箱中.

供试品溶液的制备: 称取 50 mg 白刺样品,置于 10 mL 离心管中,加入 3 mL 石油醚,超声提取 30 min,提取液于 4 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移到另一 5 mL 离心管中,残渣再加入 2 mL 石油醚,重复提取 1 次,合并提取液. 提取液于氮气下吹干,乙腈复溶备用.

衍生步骤: 向含有 100 μL 样品溶液或 30 μL 标准品溶液的 2 mL 安瓿瓶中依次加入 100 μL 衍生试剂溶液,10 mg K_2CO_3 和 100 μL DMF,封口后于 90 ℃反应 30 min. 衍生后冷却至室温,然后加入适量乙腈定容至 0.6 mL,过有机滤膜后取 10 μL 进样分析. 衍生反应概况如图 1 所示.

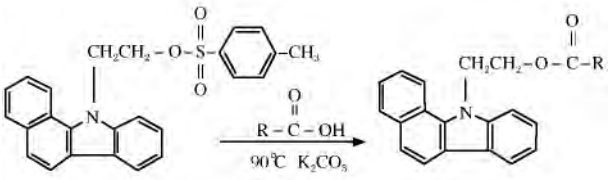

图 1 脂肪酸与 BCETS 的衍生反应

Fig. 1 Derivatization scheme of BCETS with fatty acids

脂肪酸的含量确定方法: 采用峰面积归一化方法(以峰值面积的百分比表示),计算各组分的质量百分比.

2 结果与讨论

2.1 色谱分离

为充分研究大果白刺中可能存在的脂肪酸,本研究选择了 18 种脂肪酸作为标准品,包括 5 种不饱和脂肪酸和 13 种饱和脂肪酸. 由于饱和脂肪酸经常与碳原子数目少 1 或 2 个的不饱和脂肪酸共流出,导致在普通的反相色谱柱上分离 18 种脂肪酸标准品具有很大难度. 测试不同色谱柱包括 Hypersil C18(200 mm×4.6 mm, 5 μm), Hypersil BDS C8(200 mm×4.6 mm, 5 μm), Hypersil BDS C18 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), Spherisorb C18 (200 mm×4.6 mm, 5 μm)对 18 种脂肪酸的分离度,虽然 C18 色谱柱的分离效果要优于 C8 柱,但其分离时间过长,需 120 min 以上,最终选择 Hypersil BDS C8 柱效果最佳. 选择合适的洗脱剂,优化梯度洗脱,最终实现了 18 种脂肪酸衍生物较好的分离. 图 2(a)为标准品色谱,可见峰型尖锐无拖尾,分离度高,分离时间短.

2.2 样品分析

采用建立的方法对大果白刺不同部位中的游离脂肪酸进行分析,采用峰面积归一化,计算各组分的质量百分比. 图 2(b)、(c)和(d)分别是大果白刺果皮与果肉、种子和叶子的色谱图,表 1 为大果白刺不同部位的脂肪酸组成分析. 实验结果表明大果白刺的果皮果肉以及叶子中富含不饱和脂肪酸,主要是 C18: 1(油酸)、C18: 2(亚油酸)和 C18: 3(亚麻酸),其不饱和脂肪酸含量分别是总脂肪酸含量的 70.74% 和 73.47%. 果皮果肉中不饱和脂肪酸以 C18: 1(油酸)为最高,C18: 2(亚油酸)次之,

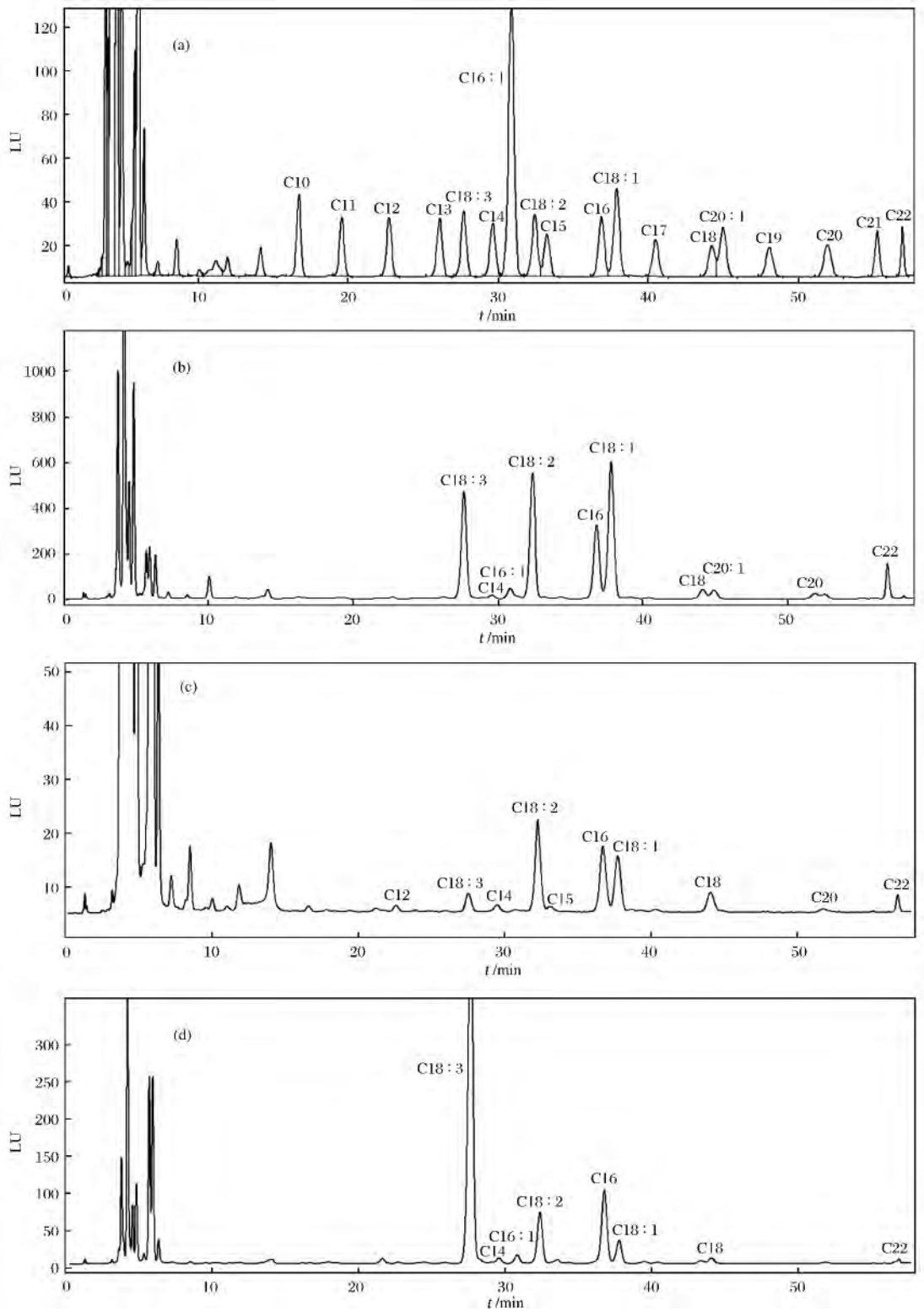

图 2　脂肪酸标准品衍生物(a)和大果白刺果皮果肉(b)、种子(c)以及叶子(d)中脂肪酸衍生物的色谱图

Fig. 2　Chromatograms of (a) fatty acid standards, (b) sarcocarps of *N. roborowskii* Kom., (c) seeds of *N. roborowskii* Kom., and (d) leaves of *N. roborowskii* Kom.

C10(葵酸)、C11(十一烷酸)、C12(十二烷酸)、C13(十三烷酸)、C18: 3(亚麻酸)、C14(十四烷酸)、C16: 1(棕榈酸)、C18: 2(亚油酸)、C15(十五烷酸)、C16(十六烷酸)、C18: 1(十八烯酸)、C17(十七烷酸)、C18(十八烷酸)、C20: 1(二十碳一烯酸)、C19(十九烷酸)、C20(二十烷酸)、C21(二十一烷酸)、C22(二十二烷酸)

C18: 3(亚麻酸)含量较前两者稍低,另外还含有少量的C16: 1(棕榈酸). 大果白刺叶中不饱和脂肪酸以C18: 3为最高,其所含比例占到了总脂肪酸的48.34%,C18: 2次之,C18: 1含量远低于亚麻酸含量,另外还含有少量的C16: 1. 大果白刺果皮果肉和叶子中,饱和脂肪酸主要以C16(棕榈酸)和C18(硬脂酸)为主,另外还含有少量的C14、C20和C22. 种子中的不饱和脂肪酸总量仅占脂肪酸总量的57.21%,其不饱和脂肪酸主要是C18: 2和C18: 3,另外还含有少量的C18: 1,饱和脂肪酸组成主要是C16和C18,也有少量的C12、C14、C15、C20和C22.

表1 大果白刺不同部位的脂肪酸组成分析

Table 1 Comparative analysis of fatty acids in different parts of *Nitraria roborowskii* Kom.

(%)

脂肪酸衍生物	脂肪酸含量		
	果皮果肉	种子	叶子
C12	ND	1.76	ND
C14	0.45	2.45	2.33
C15	ND	1.23	ND
C16	12.52	21.84	17.39
C18	3.86	8.56	4.22
C20	3.97	1.52	1.26
C22	8.46	5.43	2.43
总饱和脂肪酸	29.26	42.79	28.53
C16:1	1.35	ND	3.45
C18: 1	29.32	21.32	8.43
C18: 2	24.15	31.28	13.25
C18: 3	13.57	4.61	48.34
C20:1	2.35	ND	ND
总不饱和脂肪酸	70.74	57.21	73.47

ND:未检出(not detected).

3 结论

本文采用峰面积归一法对大果白刺各个部位的脂肪酸种类及其所占比例进行了定性分析. 结果表明大果白刺的各个部位即果皮果肉、叶子与种子中不饱和脂肪酸占总脂肪酸的比例较高,其比例分别为70.74%、73.47%和57.21%. 但不同部位主要的不饱和脂肪酸种类存在差异. 其中,果皮果肉中不饱和脂肪酸以C18: 1含量最高,种子中不饱和脂肪酸C18: 2最高,而叶子中不饱和脂肪酸则主要以C18: 3为主,其所占总脂肪酸的比例达到了48.34%. 本研究是首次对大果白刺中的脂肪组成进行分析,其结果可以为大果白刺的进一步开发利用提供一定的数据依据与支持.

参考文献:

[1] 王镜泉. 白刺属植物的分类分布及其生物生态学特征的研究[J]. 干旱造林研究,1989,2:47-48.

[2] 索有瑞,王洪伦,汪汉卿. 柴达木盆地唐古特白刺果实降血脂和抗氧化作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(1):54-57.

[3] 索有瑞. 柴达木盆地白刺研究与开发[M]. 北京:科学出版社,2010:19-21.

[4] 高航,索有瑞. 柴达木盆地西伯利亚白刺和唐古特白刺的氨基酸含量与其营养评价[J]. 氨基酸和生物资源,2002,24(4):427.
[5] 詹汉英,刘瑞林,王德金,等. 微波 - 超声波协同一步提取衍生化 - 气相色谱 - 质谱联用快速分析中药材猫爪草中的脂肪酸[J]. 色谱,2013,31(3):240 - 248.
[6] 杨春英,刘学铭,陈智毅. 15 种食用植物油脂肪酸的气相色谱 - 质谱分析[J]. 食品科学,2013,34(6):211 - 214.
[7] 李国梁,史俊友,孙志伟,等. 超临界 CO_2 萃取柴达木枸杞籽油工艺与籽油成分研究[J]. 食品工业科技,2010,31(5):257 - 263.
[8] 张世娟. 羌活主要化学成分及其抗氧化活性研究[D]. 北京:中国科学院大学,2014.

Analysis of Fatty Acids in *Nitraria Roborowskii* Kom by Pre - Column Derivatization Coupled with High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

HU Na[1,2,3], SUO You - rui[1,2]

(1. *Northwest Institute of Plateau Biology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Xining* 810001, *China*;
2. *Academy of Agriculture and Forestry*, *Qinghai University*, *Xining* 810016, *China*;
3. *University of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: In this study, 18 kinds of fatty acids was separated on a C8 column by gradient elute using 2 - (11H - benzo [a] carbazol - 11 - yl) ethyl4 - methylbenzenesul - fonate (BCETS) as pre - column fluorescent derivatization reagent. The developed method was applied to analyze fatty acid composition in different fractions of *Nitraria roborowskii* Kom. The result showed that there existed abundant of unsaturated fatty acids in the parts of sarcocarps and leaves with percentages of 70.74% and 73.47%, respectively. The unsaturated fatty acids in seeds were relatively less than those in sarcocarps and leaves, which contributed only 57.21% to the total fatty acids. The composition of unsaturated fatty acids were mainly oleic and linoleic acids. The main unsaturated fatty acids in sarcocarps were oleic, linoleic and linolenic acids. The main unsaturated fatty acid in leaves was linolenic acid, and its percentage could reach 48.34% of the total fatty acids. To the best of our knowledge, this is the first time to study the fatty acid in *N. roborowskii* Kom, which can provide data support for its further development and application in food, medicine and quantity control.

Key words: *Nitraria roborowskii* Kom; fatty acid; pre - column derivatization; HPLC - FLD

Classifying number: O657.32