

蕨类植物中脂肪酸(C₁~C₁₀)的毛细管电泳分离分析

白新伟^{*1}, 陈定梅¹, 高永平², 田玲¹, 王丽华¹

(1. 六盘水师范学院化学与化学工程系, 贵州六盘水 553004;

2. 信阳师范学院华锐学院理工系, 河南信阳 464000)

摘要:建立了一种用于测定蕨类植物中(C₁~C₁₀)脂肪酸成分的毛细管电泳检测方法。用含有β-CD的硼砂缓冲溶液为背景电解质,10种脂肪酸在17min内可实现快速、高效的基线分离。各脂肪酸成分在0.07~5.0μmol/L浓度范围内呈良好的线性关系,相关系数 r^2 为0.9983~0.9998,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为0.34%~0.52%和1.36%~1.94%,检测限(3倍信噪比)为0.027~0.042μmol/L。该方法准确可靠,在最优化条件下对卷柏实际样品进行的定性定量检测实验,结果较好。

关键词:脂肪酸;柱前衍生;卷柏

中图分类号:O657.8

文献标志码:A

文章编号:1006-6144(2014)03-441-04

蕨是一类名贵的天然野生植物,《本草纲目》中所记载的蕨类植物就有十几种。到目前为止,作药用的蕨类^[1],至少有一百多种。例如用卷柏外敷,治刀伤出血;用江南卷柏治湿热黄疸、水肿、吐血等症。除药用外,蕨菜被当今国内外营养学家誉为“森林蔬菜”,其味道鲜美,质地脆嫩,营养丰富^[2]。经检测蕨类植物富含蛋白质、钙、铁等矿物质及多种脂肪酸。脂肪酸是生物体内重要的营养代谢物质,其含量测定对进一步深入研究病理学和生理学以及临床诊断具有重要的意义^[3]。蕨类植物体内富含多种脂肪酸,特别是C₁~C₁₀脂肪酸,因此对其定性定量分析,在饮食营养和保健品、药物开发方面都具有重要的指导意义。目前对脂肪酸分离分析最常用的方法是高效液相色谱法^[4-5],但存在溶剂消耗量大,分析时间长,色谱柱价格昂贵等缺点。

毛细管电泳分析法对酸类物质分离分析首先是90年代提出的^[6],近几年有了较大发展^[7-8]。但脂肪酸在200nm以上大多无紫外吸收或紫外吸收较弱,所以一般采用毛细管电泳-间接紫外检测方法^[9],但存在灵敏度低和线性范围窄,及背景吸收不稳定或基线漂移严重,难以保证峰形对称等诸多缺点。本实验采用7-氨基-1,3-萘二磺酸(ANDSA)作为柱前衍生试剂^[10],经过衍生条件的优化获得了稳定的脂肪酸衍生物,大大提高了检测灵敏度,改善了分离度。该法用于实际样品卷柏的测定,获得满意结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-3D毛细管电泳仪(美国,Agilent公司),熔融毛细管总长58.5cm×50μm i. d.,有效柱长为50cm。

脂肪酸标准品(北京百灵威有限公司),7-氨基-1,3-萘二磺酸(ANDSA,天津博迪化工有限公司)。配制脂肪酸标准品浓度为 5.0×10^{-4} mol/L,7-氨基-1,3-萘二磺酸衍生试剂溶液浓度为 5.0×10^{-4} mol/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚钠盐酸盐(EDC,美国Sigma公司)为 1.0×10^{-3} mol/L,色谱纯乙腈(禹王试剂公司),N,N-二甲基甲酰胺(DMF,上海试剂厂)。水为Milli-Q超纯水。

1.2 标准品的衍生化

依次向安培瓶中加入25μL混合标准液,75μL 7-氨基-1,3-萘二磺酸衍生试剂和150μL EDC,密封

收稿日期:2013-06-14

修回日期:2013-07-15

* 通讯作者:白新伟,男,讲师,主要从事毛细管电泳研究。

后于 60 °C 水浴中反应 15 min。取出冷却后,用乙腈稀释至 2.5 mL 备用。

1.3 实际样品预处理

将新鲜卷柏(蕨类)植物水洗干燥,经粉碎后,称取 0.1022 g 于具塞锥形瓶中,移取 10 mL 氯仿浸泡,超声振荡 30 min,放置过夜后过滤。残余物再加入 2 mL 氯仿洗涤,合并氯仿层,加入 1.5 mL 氨水超声振荡 20 s,用 N₂ 吹干后,用 1 mL DMF 溶解,4 °C 下保存备用。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的优化

2.1.1 缓冲体系及 pH 硼酸盐缓冲液是毛细管电泳常用的缓冲液体系,而硼酸盐缓冲液 pH 影响电泳淌度。在硼酸盐的浓度为 10~40 mmol/L 对 10 种脂肪酸衍生物混合样进行分析。结果表明,当硼酸盐的浓度为 30 mmol/L 时,可检测到 10 种脂肪酸衍生物的信号峰,继续增加硼酸盐浓度,分离效果无明显改善而分离时间延长,所以确定硼酸盐浓度为 30 mmol/L。固定硼酸盐溶液为 30 mmol/L,调节其 pH 值为 9.1~9.7,分析混合标样。由图 1 可知,随着 pH 增加到,分析物之间分离度随之增加,但 pH 为 9.7 时分离效率呈下降趋势,且由于 OH⁻ 浓度的增大,导致离子强度高,基线漂移严重不利于分析测定。综合考虑,选择缓冲液 pH 为 9.5。

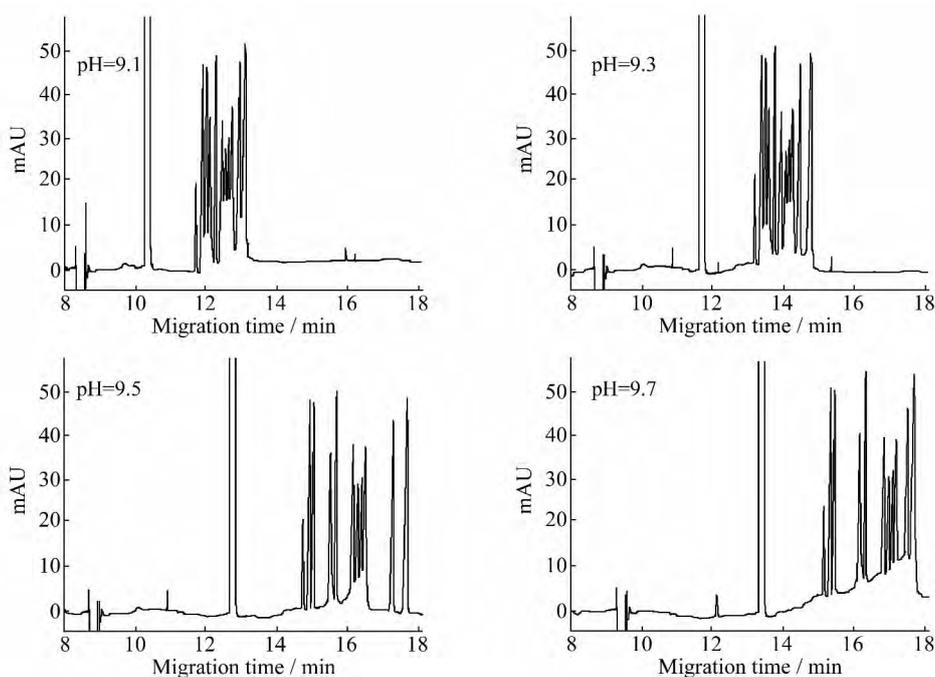


图 1 缓冲溶液 pH 值对 10 种脂肪酸标准品分离效果的影响
Fig. 1 Influence of borate buffer pH on separation of 10 standard fatty acids

2.1.2 有机添加剂的影响 β -CD 是一种理想的有机添加剂^[11-12],它有利于提高毛细管电泳的分离效果。在选定的硼砂溶液(30 mmol/L, pH=9.5)中,分别添加 10、15 mmol/L 的 β -CD,考察 β -CD 浓度对各组分分离度的影响。由图 2 可以看出: β -CD 浓度在 10~15 mmol/L 范围内 10 种脂肪酸衍生物之间的分离度随 β -CD 浓度增加而逐渐增加。当 β -CD 浓度高于 15 mmol/L 时,受 β -CD 溶解度影响,分离难度增加。综合考虑选择 β -CD 浓度为 15 mmol/L。

2.1.3 温度的影响 本实验考察了温度在 10~30 °C 范围变化对分离度的影响。结果表明此范围内温度变化对分离影响不明显,为防止温度过高产生较大的焦耳热,选择分离温度 20 °C。

最终确定最优分离条件为:含 15 mmol/L β -CD 的 30 mmol/L 硼酸盐缓冲溶液(pH 为 9.5)作为背景电解质,柱温 20 °C,分离电压 18 kV。

2.2 方法验证

配制一系列衍生的 10 种脂肪酸按优化条件分离分析,并进行线性回归,结果表明:在 0.07~5 μ mol/L

线性范围内,峰面积和每种分析物浓度之间有很好的相关性。在信噪比为3的基础上,10种分析物的检测限为0.027~0.042 $\mu\text{mol/L}$ 。

在上述最优化条件下考察迁移时间与峰面积重现性,迁移时间相对标准偏差(RSD)为0.34%~0.52%,峰面积RSD为1.36%~1.94%,表明本实验建立的方法对脂肪酸的测定是可行的。

2.3 方法的应用

按前述优化条件,对10种脂肪酸标准品衍生物进行毛细管分离分析,结果见图2(A);卷柏实际样品按1.3节方法衍生化,典型电泳谱图见图2(B)。卷柏中含 $C_1, C_2, C_4, C_6, C_8, C_9, C_{10}$ 脂肪酸。卷柏实际样品中各脂肪酸含量见表1。

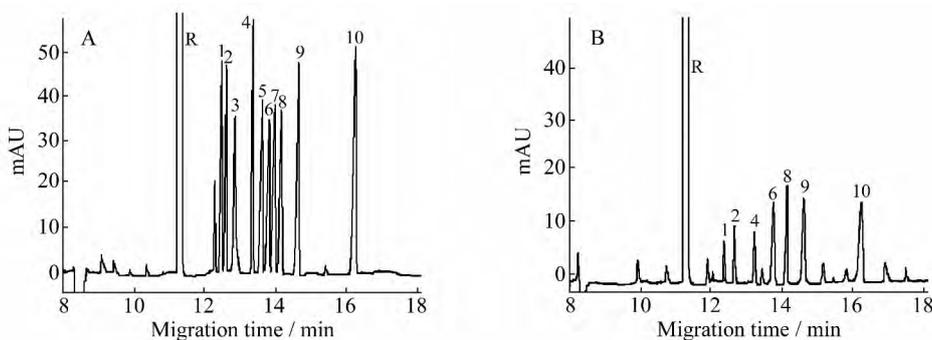


图2 标准品(A)和卷柏样品(B)电泳谱图

Fig. 3 Electropherograms of standard solution (A) and selaginella sample (B)

Peaks: 1. formic acid; 2. acetic acid; 3. propionic acid; 4. butyric acid; 5. valeric acid; 6. hexanoic acid; 7. heptonic acid; 8. octoic acid; 9. pelargonic acid; 10. decaic acid; R, 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid.

在优化条件下做回收率实验,数据见表1。在卷柏中10种脂肪酸的回收率分别在96.7%~101.9%之间,RSD在1.3%~3.4%之间,结果显示该方法对于上述分析物的同时测定是比较准确的。

表1 卷柏中脂肪酸含量测定($n=3$)

Table 1 The contents of fatty acids, recoveries and relative standard deviations for fatty acids spiked in the selaginella ($n=3$)

Fatty acids	Selaginella					Fatty acids	Selaginella				
	Contents ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Added ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)		Contents ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Added ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)
C_1	2.06	9.2	11.1	97.9	3.4	C_6	4.28	23.2	27.6	100.7	1.3
C_2	2.93	12.0	14.6	97.3	2.8	C_7	*	26.0	26.5	101.9	1.7
C_3	*	14.8	15.0	101.2	1.7	C_8	3.99	28.8	32.6	99.2	2.3
C_4	1.91	17.6	19.4	99.1	2.1	C_9	3.30	31.6	33.9	96.8	2.2
C_5	*	20.4	19.7	96.7	2.6	C_{10}	2.64	34.4	36.9	99.7	1.7

* not detected.

3 结论

本实验建立了一种用于测定蕨类植物中脂肪酸成分的毛细管电泳-紫外检测方法。10种脂肪酸在17 min内实现完全基线分离。该方法分离效果好,具有良好的线性关系,较高的精密度和回收率,为进一步分离研究长链脂肪酸奠定了基础,对发掘蕨类植物潜在的经济价值提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] HE Shun-zhi(何顺志), WANG Yue-yun(王悦云). Guizhou Science(贵州科学)[J], 2005, **23**(4): 68.
- [2] YUN Xue-lin(云雪林), ZHAO Neng-wu(赵能武). Journal of Anhui Agri Sci(安徽农业科学)[J], 2009, **37**(33): 16317
- [3] Rosenfeld, J. M. Analytica Chimica Acta[J], 2002, **465**: 93.
- [4] Wang H L, Suo Y R, Wang X Y, Li Y L, You J M, Zhao X A. Sep Purif Technol[J], 2007, **56**: 371.
- [5] Pichini S, Pellegrini M, Gareri J, Korenb G, Garcia A O, Vall O, Vagnarelli F, Zuccaroa P, Marcheia E J. Pharm Biomed Anal[J], 2008, **48**: 927.

- [6] Kenney B F. J Chromatogr[J],1991,**546**:423.
- [7] Maria-Pilar S,María T T,Purificación F. Food Chem[J],2009,**115**:766.
- [8] Tezcan F,Gultekin-Ozguven M,Diken Tug-ba,Ozcelik B,Erim F. B Food Chem[J],2009,**115**:873.
- [9] Arellano M,Jomard P,Kaddouri S E,Roques C,Nepveua F,Coudercd F. J Chromatogr B[J],2000,**741**:89.
- [10] Mechref Y,Rassi Z E. Electrophoresis[J],1997,**18**:220.
- [11] Lin S L,Lin C E. J Chromatogr A[J],2004,**1032**:213.
- [12] Wang P,Ren J C. J Pharm Biomed Anal[J],2004,**34**:277.

Determination of Fatty Acids(C₁-C₁₀) in Bryophyte by Capillary Electrophoresis

BAI Xin-wei^{*1}, CHEN Ding-mei¹, GAO Yong-Ping², TIAN Ling¹, WANG Li-hua¹

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Liupanshui Normal University,
Liupanshui 553004;

2. Department of Technique, Xinyang Normal University, Huarui College, Xinyang 464000)

Abstract: A simple method for the determination of fatty acids(C₁~C₁₀) based on capillary electrophoresis has been developed. A 58.5 cm × 50 μm i. d. (50 cm effective length) untreated fused-silica capillary was used. Under the established conditions, 10 fatty acid derivatives were well separated within 17 min. The linearity was in the range of 0.07-5.0 μmol/L, and the detection limits(at a signal-to-noise ratio of 3) were in the range of 0.027-0.042 μmol/L. The fatty acids from funaria hedw and selaginella samples were determined under the optimum conditions with satisfactory results.

Keywords: Fatty acids; Pre-column derivation; Selaginella