

邻氨基苯酚化学修饰试剂用于气相色谱/质谱分析花粉脂肪酸

邹耀洪

(常熟理工学院化学系,常熟 215500)

摘 要 采用邻氨基苯酚作为脂肪酸的化学修饰试剂,将羧基修改为含氮杂环,使在 EI 源中避免链烯基中碳碳双键的移动。以气相色谱/EI 质谱分析花粉脂肪酸,解析脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰产物的 EI 质谱图;讨论了烯酸中碳碳双键的定位规则;鉴定出巨日花粉 12 种脂肪酸,由 C₁₂ ~ C₂₄ 脂肪酸组成,不饱和脂肪酸的含量占 73.94%,其中多不饱和脂肪酸含量占 47.61%,多不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸之比达 1.85,还检出了在其他花粉中极为少见的人体必需脂肪酸 15-二十四烯酸(神经酸)。

关键词 气相色谱/质谱,花粉,脂肪酸,化学修饰,邻氨基苯酚

1 引 言

花粉是植物的雄性生殖细胞,蜂花粉是蜜蜂从植物花蕊内采集的花粉。花粉营养丰富且含有多种生理活性成分,如多不饱和脂肪酸、黄酮类化合物及多糖等,具有抗衰老、抗菌、抗癌、降血脂及促进大脑发育等功能,可用于治疗心血管病、高血脂症、高血压、前列腺炎、关节炎等^[1]。花粉资源极为丰富,仅马尾松一年可产花粉三千万吨。花粉虽已被用于制药、生产保健品和美容化妆品等,但始终处于低级利用阶段,其潜在的开发价值还没有得到充分重视,深度研究与利用尚未涉及。如花粉的功能因子——多不饱和脂肪酸的研究至今仍是块处女地,虽有个别蜂花粉脂肪酸甲酯的 GC/EIMS 分析的报道^[2],但由于脂肪酸或其甲酯在 EIMS 条件下碳碳双键可以移动,难以对不饱和脂肪酸中的碳碳双键进行正确定位^[3],因而在研究各种植物花粉的脂肪酸以及花粉脂肪酸的精细结构与其功能的关系时存在着不定因素。

测定烯酸中的双键位置常用氧化断链法,但只适用于单不饱和脂肪酸^[4]。邻氨基苯酚具有一个含氮原子的氨基和一个邻位的羟基,用它对脂肪酸进行化学修饰,可以将官能团羧基修改为含氮杂环,从而将一个含氮杂环“嵌入”脂肪酸中,达到避免烯基中双键的移动以正确确定烯酸中双键位置。本研究报道了以邻氨基苯酚为化学修饰试剂,选择脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰的优化条件,采用 GC/EIMS 测定美国巨日花粉中脂肪酸,讨论了解析 EI 质谱以确定碳碳双键位置的规则,给出了巨日花粉 12 种脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰产物的 EI 质谱图。用该法分析花粉脂肪酸为首次报道,不仅对花粉的深度开发利用具有重要意义,而且也分析脂肪酸的精细结构提供了新的手段。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

邻氨基苯酚(美国 Aldrich 公司),花粉(深圳巨日商贸公司)。所用试剂皆为分析纯。2010 型气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司),索氏抽提器,具塞试管,恒温水浴。

2.2 花粉脂肪酸的提取和化学修饰

将 5 g 巨日花粉粉碎后过 0.37 mm 筛后,置于滤纸包中,放入索氏抽提器,用体积比为 1:1 的石油醚-乙醚混合试剂抽提 5 h。取下接受器,回收溶剂,并用氮气吹干得脂肪^[2],取 0.5 g 脂肪于具塞试管中,加入 10 mL 2 mol/L KOH 的乙醇溶液,充满氮气后旋紧试管塞,在 80 °C 水浴中反应 1 h,冷至室温后滴加 2 mol/L 盐酸至 pH = 2,用医用注射器吸掉水层,再边用蒸馏水洗涤边吸掉水层至 pH = 7。

取上述脂肪酸 100 mg 于具塞试管中,加入 150 mg 邻氨基苯酚,充满氮气后旋紧试管塞,在 180

2003-07-24 收稿;2004-01-05 接受

油浴中反应 1.5 h, 冷却后水洗去杂, 加入 3 mL 氯仿, 振摇 1 min 后再加入 5 mL 蒸馏水, 放置分层后取下层氯仿液于 10 mL 具塞试管中, 加入无水硫酸钠少许, 充氮气保存于冰箱中, 并及时分析。

2.3 气相色谱/质谱分析

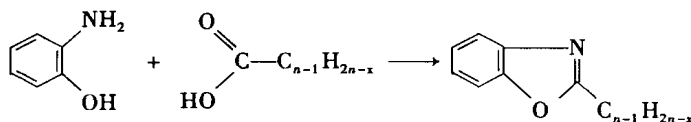
气相色谱条件: FFAP 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m 弹性石英毛细管柱, 载气: 高纯氦气, 流速 1 mL/min, 进样量 1 μ L, 分流比 150。柱初温 200 $^{\circ}$ C, 保持 5 min, 以 8 $^{\circ}$ C/min 速率升至 270 $^{\circ}$ C, 保持 15 min。进样口温度 280 $^{\circ}$ C。

质谱条件: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, GC-MS 接口温度 280 $^{\circ}$ C, 发射电流 0.25 mA, 电子倍增器电压 2.2 kV, 扫描范围 m/z : 100 ~ 450。

3 结果与讨论

3.1 花粉脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰产物的 EI 质谱

巨日花粉抽提 5 h 所得的脂肪占花粉干重的 18.5%, 邻氨基苯酚将脂肪皂化得到的脂肪酸化学修饰生成 2-烯(烷)基苯并咪唑:



n : 脂肪酸中的 C 原子数目, $x = 1, 3, 5, \dots$

含氮杂环提高了电荷的稳定性, 使在 EI 源中给出电荷定域在含氮环的氮原子上而不是双键位置上的离子, 通过连续的自由基引发 C-C 均裂反应产生系列碎片离子, 抑制了脂肪链中碳碳双键的迁移, 并产生易辨认的显示双键位置信息的质谱。花粉脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰产物的 GC/MS 总离子流图见图 1。

各峰对应的 EI 质谱图(图 2)具有以下 5 类离子峰:

(1) 基峰: m/z 133, 由 2-烯(烷)基苯并咪唑重排产生

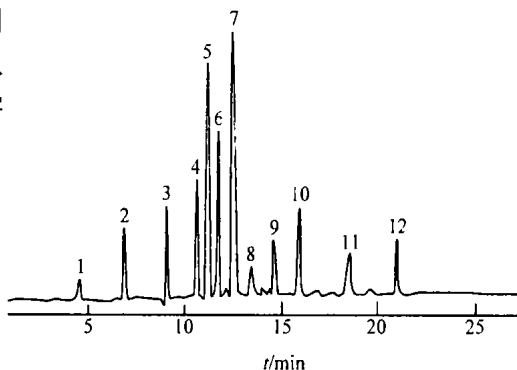
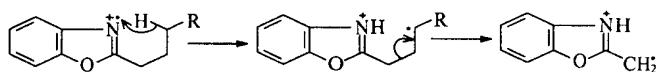
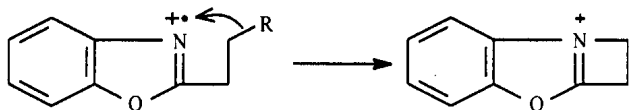


图 1 巨日花粉脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰产物的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of the chemical products modified by ortho-aminophenol of the fatty acids from Juri pollen

(2) 第二大峰: m/z 146, 由 2-烯(烷)基苯并咪唑通过环化反应生成



(3) m/z 间距相差 15 的与分子离子峰相邻的碎片离子

峰, 相当于丢失甲基 $-\text{CH}_3$ 。(4) m/z 间距相差 14 的碎片离子峰, 相当于丢失亚甲基 $-\text{CH}_2-$ 。

(5) m/z 间距相差 12 的碎片离子峰。包含 $n-1$ 和 n 碳原子的碎片离子峰的 m/z 间距为 12 时, 则碳碳双键位于 C_n 和 C_{n+1} 之间。可以设想 C_n 和 C_{n+1} 间的双键断裂之前, C_n 上一个 H 转移到 C_{n+1} 上, 碳碳双键断裂时则丢失亚甲基 $-\text{CH}_2-$, 即包含 n 和 $n+1$ 碳原子的碎片离子峰的 m/z 间距也是 14, 但再脱掉 C_n 时只丢失 1 个 C 原子, 故包含 $n-1$ 和 n 碳原子的碎片离子峰的 m/z 间距为 12。

图 2(10) 为花生四烯酸邻氨基苯酚化学修饰产物的 EI 质谱图。 m/z 133、146 分别为基峰和第二大峰; 分子离子峰 m/z 377 (C_{20}) 和相邻碎片离子峰 m/z 362 (C_{19}) 相差 15, 则为丢失甲基 $-\text{CH}_3$; 相邻碎片离子峰 m/z 362 (C_{19}) 和 348 (C_{18}), 348 (C_{18}) 和 334 (C_{17}), 334 (C_{17}) 和 320 (C_{16}), 320 (C_{16}) 和 306 (C_{15}), 306 (C_{15}) 和 292 (C_{14}), 280 (C_{13}) 和 266 (C_{12}), 266 (C_{12}) 和 252 (C_{11}), 240 (C_{10}) 和 226 (C_9), 226 (C_9) 和 212 (C_8), 200 (C_7) 和 186 (C_6), 186 (C_6) 和 172 (C_5), 160 (C_4) 和 146 (C_3) 质量间距均为 14, 则为丢失亚甲基 $-\text{CH}_2-$; m/z 160 (C_4) 和 172 (C_5), 200 (C_7) 和 212 (C_8), 240 (C_{10}) 和 252 (C_{11}), 280 (C_{13}) 和 292

(C_{14})的质量间距均为 12,则表明 C_5 和 C_6 , C_8 和 C_9 , C_{11} 和 C_{12} , C_{14} 和 C_{15} 间各有一个碳碳双键,故(10)为 5,8,11,14-二十碳四烯酸。

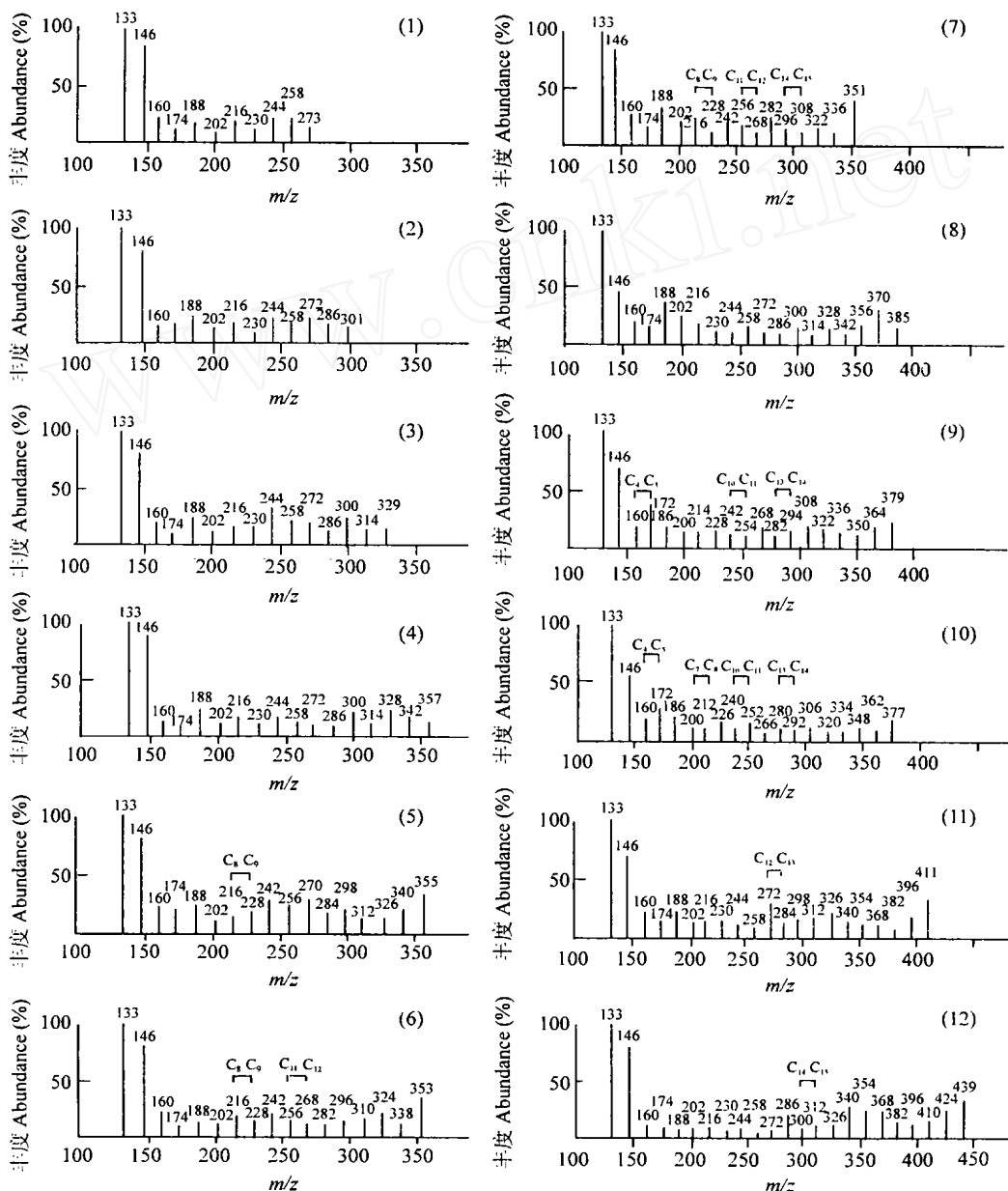


图 2 巨日花粉脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰产物的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of the chemical products modified by ortho-aminophenol of the fatty acids from Juri pollen

3.2 花粉脂肪酸 GC/ EIMS 分析鉴定结果

对总离子流检测到的 12 个组分峰采集质谱图,由各色谱峰相应的质谱数据及上述碳碳双键定位规则进行人工解析,鉴定了 12 种脂肪酸的结构,用峰面积归一化计算了它们的相对含量,结果见表 1。鉴定组分占总组分相对含量的 99.68%。

巨日花粉由多种蜂花粉组成,其花粉壁已用先进的光子技术打碎。分析结果表明,花粉破壁后脂肪酸种类比未破壁花粉增多,如花生四烯酸、5,11,14-二十碳三烯酸和 13-二十二烯酸。可以看出巨日花粉脂肪酸由 $C_{12} \sim C_{24}$ 脂肪酸组成,不饱和脂肪酸含量占 73.94%,其中多不饱和脂肪酸占 47.61%,主要为亚麻酸(21.63%)、亚油酸(13.70%)、花生四烯酸(7.83%)和 5,11,14-二十碳三烯酸(4.45%),多不

饱和脂肪酸与饱和脂肪酸之比达 1.85,必需脂肪酸亚油酸、花生四烯酸和 15-二十四烯酸(神经酸)含量占 26.45%,而 15-二十四烯酸(神经酸,4.92%)在花粉中极为少见。

表 1 巨日花粉脂肪酸组成及含量

Table 1 The identified chemical components of fatty acids from Juri pollen

峰号 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	脂肪酸 Fatty acids	分子量 Molecular weight	相对含量 Area percent (%)
1	4.61	十二酸(月桂酸) Dodecylic acid (lauric acid)	200	0.58
2	6.86	十四酸(肉豆蔻酸) Tetradecanoic acid (myristic acid)	228	7.21
3	8.93	十六酸(棕榈酸) Hexadecanoic acid (palmitic acid)	256	7.72
4	10.71	十八酸(硬脂酸) Octadecanoic acid (stearic acid)	284	8.05
5	11.14	9-十八烯酸(油酸) 9-Octadecenoic acid (oleic acid)	282	19.10
6	11.79	9,12-十八碳二烯酸(亚油酸) 9,12-Linoleic acid (linoleic acid)	280	13.70
7	12.50	9,12,15-十八碳三烯酸(亚麻酸) 9,12,15-Linolenic acid (linolenic acid)	278	21.63
8	13.57	二十酸(花生酸) Eicosanoic acid (arachidic acid)	312	2.18
9	14.64	5,11,14-二十碳三烯酸 5,11,14-Eicosatrienoic acid	306	4.45
10	15.89	5,8,11,14-二十碳四烯酸(花生四烯酸) 5,8,11,14-Arachidonic acid	304	7.83
11	18.51	13-二十二烯酸(芥酸) 13-Docosenoic acid (erucic acid)	338	2.31
12	21.07	15-二十四烯酸(神经酸) 15-Tetracosenoic acid (nervonic acid)	366	4.92

3.3 脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰条件的优化

亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸在调节人体的各种基本生理活动中起重要作用,亚麻酸还可在体内合成 DHA(4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸)和 EPA(5,8,11,14,17-二十碳五烯酸)等极其生理活性的长链多不饱和脂肪酸,亚油酸和花生四烯酸还是最重要的人体必需脂肪酸,它们都是花粉的功能因子。本实验研究了花粉脂肪酸邻氨基苯酚化学修饰反应温度、反应时间及邻氨基苯酚用量对分析亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸的影响。测定了邻氨基苯酚与脂肪酸的摩尔数之比为 11;不同温度下反应 1h,亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸的相对含量(%)分别为 2.70、3.55、1.18(120),6.88、10.20、3.75(150),11.62、17.25、6.66(180),11.62、17.24、6.67(200),结果表明:测定值随反应温度提高而增大,当反应温度达 180 时测定值不变。维持邻氨基苯酚与脂肪酸的摩尔数之比为 11,在 180 下反应不同时间,上述三酸的相对含量(%)测定值分别为 9.81、15.64、5.87、(0.5 h),11.62、17.25、6.66(1 h),11.62、17.25、6.66(1.5 h),表明测定值随反应时间延长而增大,当时间超过 1h 时测定值不变。改变邻氨基苯酚与脂肪酸的摩尔数之比分别为 11,21,31 和 41,在 180 时反应 1.5 h,上述三酸相对含量(%)测定值分别为 11.62、17.25、6.66;12.80、20.15、7.28;13.70、21.63、7.83;13.71、21.63 和 7.83,可见随邻氨基苯酚用量增多,三酸测定值增大,当摩尔数之比超过 3 时测定值不变。为保证花粉脂肪酸充分被化学修饰,本实验采用过量的邻氨基苯酚(其与脂肪酸的摩尔数之比约为 4)在 180 下反应 1.5 h。

References

- 1 Wang Kaifa (王开发). *Nutrient Substance and Resource Utilization of Pollen* (花粉营养成分与花粉资源利用). Shanghai(上海): Fudan University Press (复旦大学出版社), 1993: 37
- 2 Pan Jianguo (潘建国), Duan Yi (段怡), Wu Huiqin(吴惠勤). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), 2003, 22(1): 74 ~ 75
- 3 Meng Lingzhi (孟令芝), He Yongbing (何永炳). *Organic Spectrum Analysis* (有机波谱分析). Wuhan(武汉): Wuhan

University Press(武汉大学出版社), 1996: 204 ~ 205

4 Minniken D E. *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 21:213

An Application of the Chemical Modifying Reagent Ortho-aminophenol to the Analysis of Fatty Acids in Pollen by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Zou Yaohong

(Department of Chemistry, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500)

Abstract Ortho-aminophenol was developed for chemical modifying reagent of fatty acids so as to modify carboxyl group into nitrogen-containing heterocycle which effectively suppresses the migration of double bonds of the alkenyl under the electron impact source. The empirical rule in which the position of double bonds of olefinic acids were located was referred to by analyzing electron impact mass spectra of the chemical products modified by ortho-aminophenol of the fatty acids in pollen. According to the results for pollen analysis by gas chromatography/electron impact mass spectrometry (GC/EIMS), 12 fatty acids in Juri pollen were identified. Juri pollen consists of the fatty acids of $C_{12} \sim C_{24}$. The contents of the unsaturated fatty acids and the polyunsaturated fatty acids are 73.94% and 47.61% respectively, and the ratio of the polyunsaturated fatty acids to the saturated fatty acids is 1.85, besides, 15-tetracosenoic acid (nervonic acid) which is essential fatty acid and exists rarely in other pollens was indentified.

Keywords Gas chromatography / electron impact mass spectrometry, pollen, fatty acids, chemical modification, ortho-aminophenol

(Received 24 July 2003; accepted 5 January 2004)

《色谱》征订启事

《色谱》(国际标准刊号 ISSN 1000-8713, 国际期刊 CODEN 编码 SEPUER, 国内统一刊号 CN 21-1185/O6) 是中国化学会主办、中国科学院大连化学物理研究所和国家色谱研究分析中心承办、科学出版社出版、国内外公开发行的专业性学术期刊。于 1984 年创刊。重点报道色谱学科的学术理论、色谱仪器与部件的研制开发、色谱及其相关技术在各领域应用的原始性、创新性科研成果。设有研究报告、研究快报、专论与综述、研究简报、技术与应用等多种栏目, 并载有色谱方面的书评与书讯、国内外学术活动简讯、色谱仪器及相关产品广告等内容。读者对象为从事色谱理论研究及分析工作的化学分析工作者、大专院校相关专业的师生、色谱仪器开发单位的有关人员。

《色谱》为双月刊, 每期 96 页, 大 16 开, 单价 15 元, 全年 90 元。广告经营许可证: 大临广审字 L000015。国内邮发代号 8-43, 可通过全国各地邮局订购。国外发行代号 DK21010, 可通过中国出版对外贸易总公司(北京 782 信箱) 订购。漏订的读者可直接与《色谱》编辑部联系补订。

地址: 大连市中山路 457 号, 邮编: 116023, 电话/传真: (0411) 4379021, E-mail: sepu@dicp.ac.cn, 网址: <http://www.sepu.dicp.ac.cn>