

质谱特征结合等效链长定性分析植物油中的脂肪酸

梁楠楠 张良晓 王向利 谭斌斌 梁逸曾*

(中南大学化学化工学院中药现代化研究中心,长沙 410083)

摘要 建立了质谱特征结合等效链长快速定性植物油中脂肪酸的方法。首先根据质谱特征判断脂肪酸的类型并鉴定出其中的饱和脂肪酸甲酯,然后利用它们的保留时间信息计算得到不饱和脂肪酸甲酯的等效链长值,与已建立的脂肪酸甲酯数据库对照实现不饱和脂肪酸甲酯的结构鉴定。用 NaOH-甲醇对 5 种常见植物油(花生调和油、茶籽调和油、菜籽油、葵花籽油、大豆油)中的脂肪酸进行衍生和提取,采用 DB-23 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)分离脂肪酸甲酯的同系物和异构体,气相色谱质谱法(GC/MS)测定,结果表明,5 种样品中所含不饱和脂肪酸的组成和含量上均存在明显差异。本方法无需标准品即可快速定性检测脂肪酸同系物及异构体,适用于油脂、食品中脂肪酸的成分分析。

关键词 脂肪酸; 质谱特征; 等效链长(ECL); 植物油; 气相色谱/质谱

1 引言

气相色谱质谱法因其灵敏度高,检出限低等优点广泛应用于食品医药分析、代谢组学和环境化学等领域^[1~5]。气相色谱质谱相对液相色谱质谱的优势在于其重现性好,噪声和背景影响小,有利于建立标准物质质谱数据,继而利用相似度搜索的方法进行智能化的结构鉴定。由美国国家标准技术研究院推广和维护的标准物质质谱数据库 NIST (National Institute of Standards and Technology) 就是一个成功的例子。然而,利用相似度匹配时往往受到来自库内相似质谱的干扰,这些干扰可能来源于同系物、同分异构体或库内其它类型的化合物,从而难以从相似度非常接近的列表中选出正确的定性结果。在这种情况下,仅通过质谱库相似度检索无法准确鉴定有机化合物的结构。此时,一般需要将标准品在与样品相同的色谱条件下进行分析,通过与标准脂肪酸甲酯的保留时间和质谱进行比较,确定样品中各脂肪酸甲酯的组成^[6,7]。这造成价格昂贵的标准品在不同实验条件下重复使用,能否结合保留指数信息建立脂肪酸甲酯标准质谱和保留指数数据库,尽可能多的利用样本本身的信息计算保留指数成为保证定性结构准确度并避免标准品使用的关键。

植物油与人体健康密切相关,主要成分为甘油三酯,经人体消化分解为甘油和脂肪酸。植物油中含有丰富的不饱和脂肪酸,甲酯化得到脂肪酸甲酯,其双键数目相同,但位置不同的异构体的质谱规律基本一致,得到的质谱图十分相似,不能用质谱相似度匹配确定双键的位置^[8],因此有必要发展新的定性方法,以满足脂肪酸的定性分析的需求。本研究借助色谱保留指数(等效链长, Equivalent chain length, ECL),结合质谱裂解规律^[9,10],根据质谱特征离子确定正构饱和脂肪酸甲酯组成,利用其保留时间计算植物油 GC/MS 总离子流图中不饱和脂肪酸甲酯的等效链长,与已建立的数据库对照,得到不饱和脂肪酸甲酯的分子结构,不使用标准品即可实现脂肪酸甲酯的准确鉴定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

可调微量移液器(美国赛默-飞世尔公司);WH-2 微型涡旋混合器(上海沪西分析仪器有限公司);B3200S-T 超声波清洗机(必能信超声(上海)有限公司);JY2001 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);DZ-1BC 真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);GCMS-QP2010 型气相色谱质谱联用仪(日

2011-01-13 收稿;2011-04-18 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 20875104, 21075138)资助

* E-mail: yizeng_liang@263.net

本岛津公司)。

十七烷酸甲酯(C17:0 甲酯, >99.0%, Sigma 公司); 脂肪酸甲酯混合标准品(No. 47885-U, >99.0%, Sigma 公司); 甲醇(色谱纯), NaOH、正己烷(分析纯)。

2.2 样品及其处理

市售植物油:花生调和油(配料为花生油, 菜籽油, 芝麻油); 茶籽调和油(配料为油茶籽油, 菜籽油)、菜籽油、葵花籽油、大豆油, 购自当地超市。

分别准确移取 5 种不同的油样 25 μL , 加入内标(175 μL C17:0 甲酯, 10 g/L), 涡旋 30 s; 再加入 1 mL 0.4 mol/L NaOH-CH₃OH 溶液, 在超声条件下反应 15 min; 然后用 1 mL 正己烷分别萃取两次, 合并正己烷相, 此为酯化的脂肪酸甲酯。样本在真空干燥箱中挥干。分析时, 用正己烷稀释到 1 mL 进样。

2.3 气相色谱-质谱条件

DB-23 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 分流比 100:1; 气化温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 柱初始温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 150 $^{\circ}\text{C}$, 接着以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 180 $^{\circ}\text{C}$, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 220 $^{\circ}\text{C}$, 保持 6 min; 载气为高纯氦气; 柱流量 1.0 mL/min; 进样量 1 μL 。EI 源; 电子能量: 70 eV; 离子源温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 质量范围 m/z 35~450 amu; 扫描间隔: 0.2 s/scan。

2.4 方法与原理

采用质谱特征结合色谱保留指数的方法对植物油样品中的脂肪酸进行定性分析。首先, 对得到的 GC/MS 总离子流图进行背景扣除, 并利用直观推导式渐进特征投影法(HELP)^[11, 12] 获得各组分的纯色谱和纯质谱。通过 m/z 74, 87, 55, 67 和 79 的离子碎片信息, 准确定性正构饱和脂肪酸甲酯, 包括以下 3 个步骤: (a) 根据质谱信息在 GC/MS 谱图中自动搜寻正构饱和脂肪酸甲酯; (b) 利用式(1)^[6, 13], 以正构饱和脂肪酸甲酯的保留时间计算不饱和脂肪酸甲酯的等效链长(ECL); (c) 将计算的 ECL 值与本实验室建立的脂肪酸甲酯保留指数数据库^[14] 对照, 得到样品中脂肪酸的准确定性结果。

$$\text{ECL}(x) = n + \frac{R_T(x) - R_T(n)}{R_T(n+1) - R_T(n)} \quad (1)$$

式中, n 和 $n+1$ 分别表示在目标化合物之前和之后流出色谱柱的正构饱和脂肪酸甲酯的碳原子数目。

2.5 数据处理

采用直观推导式渐进特征投影法(HELP), 自动识别正构饱和脂肪酸甲酯、计算 ECL 并与专用数据库匹配等程序均在 MATLAB 6.5 环境下运行。

3 结果与讨论

3.1 脂肪酸甲酯的质谱特征

正构饱和脂肪酸广泛存在于天然脂类中, 它们的质谱规律较为简单, 易于准确识别。首先, 寻找特征离子 m/z 55, 67, 74, 79, 87 的色谱峰, 运用质谱特征(质谱中基峰, 高强度峰和分子离子峰的质荷比)确定样本中的饱和脂肪酸甲酯。通常质谱图中会出现分子离子峰, 据此可确定脂肪酸的碳原子数目。如图 1a 所示, 正构饱和脂肪酸甲酯质谱图中的基峰, 碎片离子 m/z 74, 是经麦氏重排, 即 γ 氢通过六元环过渡态迁移到羰基氧上产生的^[15, 16]。经历置换反应(图 1b)可产生 m/z 87 离子。甲氧基(CH₃O \cdot)的失去引起特征的 31 质量单位的中性丢失。 $[\text{M}-43]^+$ 离子是失去烷基 C₃H₇(C₂ 和 C₄ 间的键断裂)得到的(图 1d)。

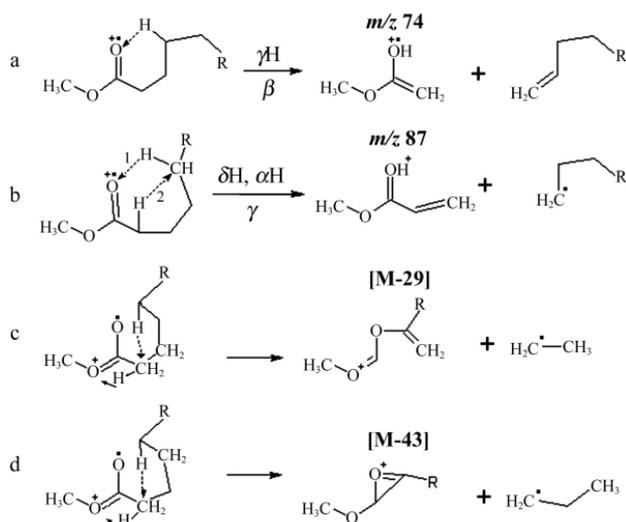


图 1 正构饱和脂肪酸甲酯的特征性离子碎片

Fig. 1 Fragmentation of characteristic ions of straight saturated fatty acid methyl esters

$[M-29]^+$ 离子是 C_3-C_4 的键断裂后以同样方式产生的(图 1c)。更多有关正构的和有支链的饱和脂肪酸甲酯的质谱差异可查询脂质库^[17]。归纳起来,即:饱和脂肪酸甲酯的质谱的基峰出现在 m/z 74 处,并且 m/z 87 处的质谱峰的相对强度明显高于除基峰外的其它特征离子;另外,一般分子离子峰会出现,并伴有 $[M-43]^+$, $[M-31]^+$ 和 $[M-29]^+$ 等碎片离子。根据以上的质谱信息,易于实现植物油样品中饱和脂肪酸的自动识别。根据式(1),利用 GC/MS 总离子流图中正构饱和脂肪酸甲酯的保留时间计算不饱和脂肪酸甲酯的保留指数(等效链长)。

对于丰富的天然脂肪酸,质谱图中的基峰是对不同类型进行区分的非常重要的质谱特征。通过基峰可确定脂肪酸甲酯的不饱和度(即双键数目):饱和脂肪酸甲酯基峰离子是 m/z 74,单不饱和脂肪酸甲酯基峰离子为 m/z 55,基峰 m/z 67 为双不饱和脂肪酸甲酯,含 3 个以上双键的多不饱和脂肪酸甲酯的基峰离子一般为 m/z 79^[18,19]。因此,以质谱图中基峰为何种碎片离子推断植物油样品中脂肪酸的类型,从而进一步验证等效链长定性结果的正确性。

3.2 植物油样品中脂肪酸的定性

5 种植物油样品中酯化脂肪酸的 GC/MS 总离子流图见图 2,提取出的脂肪酸取得了很好的分离效果,仅保留时间为 10.78 和 10.81 min 的两个色谱峰未达到完全的基线分离,可借助 HELP 法^[11,12]对其进行分辨解析,得到物质的纯色谱和纯质谱。分析所有信噪比(S/N)大于 3 的色谱峰,运行寻找 m/z 74,87,55,67,79 离子的程序,识别出 6 种正构饱和脂肪酸甲酯 14:0,16:0,17:0,18:0,20:0 和 22:0。

运用 HELP 方法扣除 GC/MS 总离子流图的背景,解析得到每个脂肪酸甲酯的色谱图和质谱图,根据质谱图中的基峰判断脂肪酸的类型。以色谱峰的顶点所在时间为保留时间,依次用 6 种正构饱和脂肪酸甲酯的保留时间计算出其余脂肪酸甲酯的保留指数。将得到的不饱和脂肪酸甲酯的 ECL 值与本实验室建立的脂类库中的数据^[14] 相对照,具有最相近 ECL 数值的被认定为目标化合物。在此数据库中,不饱和脂肪酸甲酯顺反异构体的等效链长差异大于 0.1,为了保证能够区分开顺反异构体,将实验 ECL 值与对应数据库中的 ECL 值的偏差限定在 0.1。以花生调和油中脂肪酸的定性为例(表 1),分别定性分析 5 种油样中主要的脂肪酸类型。其中,花生调和油中含有 12 种脂肪酸,茶籽调和油中含有 12 种脂肪酸,菜籽油中含 13 种脂肪酸,葵花籽油中含 11 种脂肪酸,大豆油中含 12 种脂肪酸。

表 1 花生调和油样品中脂肪酸定性结果

Table 1 Identification of fatty acids in peanut blended oil

保留时间 Retention time(min)	类型 Type	等效链长 Equivalent chain length (ECL)	脂类库中的等效链长值 ECL in database
7.153	C14:0	0	0
9.042	C16:0	0	0
9.326	C16:1	16.333	16.3305(C16:1 <i>n</i> -7c)
9.894	C17:0(内标, internal standard)	0	0
10.597	C18:0	0	0
10.777	C18:1	18.298	18.2647(C18:1 <i>n</i> -9c)
10.811	C18:1	18.354	18.3587(C18:1 <i>n</i> -7)
11.106	C18:2	18.843	18.7643(C18:2 <i>n</i> -6c)
11.324	C18:3	19.204	19.0925(C18:3 <i>n</i> -6c)
11.473	C18:3	19.450	19.4362(C18:3 <i>n</i> -3c)
11.805	C20:0	0	0
11.997	C20:1	20.269	20.2780(C20:1 <i>n</i> -9c)
13.234	C22:0	0	0

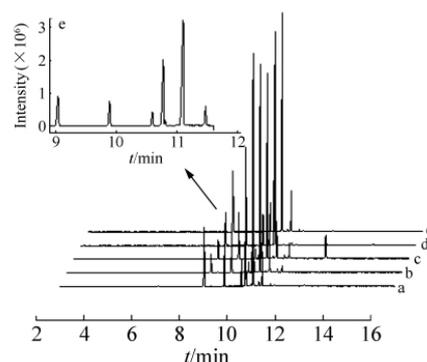


图 2 5 种植物油中酯化脂肪酸甲酯(EFA)GC/MS 总离子流图

Fig. 2 GC/MS total ion current (TIC) profile of EFA in five vegetable oils

(a)花生调和油(Peanut blended oil); (b)茶籽调和油(Tea seed blended oil); (c)菜籽油(Rape seed oil); (d)葵花籽油(Sunflower oil); (e)大豆油(Soybean oil)。

另外,用脂肪酸甲酯混标进行了验证,证明定性结果是准确可靠的。

3.3 不同植物油中脂肪酸的组成

脂肪酸代谢谱中检测到的各脂肪酸($S/N > 5$)相对含量由色谱峰面积与内标峰(十七酸甲酯)峰面积的比值求得。不同植物油样品中脂肪酸的组成见表 2; 5 种植物油的主要成分均为不饱和脂肪酸,其中花生调和油、葵花籽油和大豆油中含量最高的成分为多不饱和脂肪酸,含量分别为 55.9%, 51.0% 和 55.6%, 主要为亚油酸,其含量分别为 49.5%, 50.7% 和 49.2%; 茶籽调和油和菜籽油中不饱和脂肪酸含量高达 92.2% 和 91.6%, 单不饱和脂肪酸含量分别为 66.0% 和 66.1%, 主要成分油酸的含量分别为 61.4% 和 52.3%。5 种食用油在脂肪酸种类和含量上存在一定差异,其中芥酸仅存在于菜籽油中,占脂肪酸含量的 7.47%, 菜籽油中花生烯酸的含量(3.4%)是 5 种被检测食用油中最高的; 葵花籽油中含有丰富的亚油酸和油酸(34.2%), 未检测到 γ -亚麻酸, α -亚麻酸的含量也远低于其它 4 种植物油。临床研究证实, γ -亚麻酸有助于治疗关节炎、前列腺炎、心脏病等疾病,可由亚油酸在人体内经过一系列代谢途径生成; 而 α -亚麻酸是一种必需脂肪酸,它进入人体后,在酶(脱氢酶和碳链延长酶)的催化下,转化成二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),是构成细胞膜和生物酶的基础物质,对人体健康非常重要。

表 2 不同植物油样品中脂肪酸组成分析

Table 2 Analysis of fatty acids in five vegetable oils

脂肪酸 Fatty acids	花生调和油 Peanut blended oil	茶籽调和油 Tea seed blended oil	菜籽油 Rape seed oil	葵花籽油 Sunflower oil	大豆油 Soybean oil
肉豆蔻酸(C14:0)	0.022	0.019	0.025	0.023	0.022
棕榈酸(C16:0)	1.466	0.452	0.479	0.788	1.453
棕榈油酸(C16:1 n-7c)	0.027	0.029	0.035	0.015	0.027
硬脂酸(C18:0)	0.508	0.199	0.196	0.602	0.521
油酸(C18:1 n-9c)	2.936	6.014	5.023	3.818	2.813
异油酸(C18:1 n-7)	0.180	0.310	0.240	0.068	0.174
亚油酸(C18:2 n-6c)	5.913	1.772	1.703	5.660	5.674
γ -亚麻酸(C18:3 n-6c)	0.089	0.033	0.045	—*	0.036
α -亚麻酸(C18:3 n-3c)	0.671	0.761	0.700	0.030	0.704
花生酸(C20:0)	0.055	0.068	0.056	0.044	0.045
花生烯酸(C20:1 n-9c)	0.020	0.115	0.331	0.021	0.024
山芋酸(C22:0)	0.054	0.026	0.046	0.095	0.037
芥酸(C22:1 n-9c)	—	—	0.717	—	—
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid(SFA)	17.63%	7.80%	8.36%	13.90%	18.02%
单不饱和脂肪酸 Mono-unsaturated fatty acid(MUFA)	26.49%	66.01%	66.13%	35.13%	26.35%
多不饱和脂肪酸 Poly-unsaturated fatty acid(PUFA)	55.9%	26.2%	25.5%	51.0%	55.6%
不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid(UFA)	82.4%	92.2%	91.6%	86.1%	82.0%

* Undetected.

4 结 论

采用 NaOH-CH₃OH 溶液超声衍生和提取 5 种食用植物油中的酯化脂肪酸,建立了 GC/MS 对 13 种脂肪酸甲酯的分离检测方法。通过质谱规律和色谱等效链长相结合的方法,求得不饱和脂肪酸甲酯的 ECL 值并与本实验室建立的数据库对照,实现了在不使用标准品的情况下对脂肪酸甲酯的准确鉴定;采用内标法进行定量分析,比较了不同植物油样本中脂肪酸含量的差异。本方法分离效果好,操作简便,结果可靠,消除了色谱时间漂移对定性的影响,不需要标准品即可自动定性脂肪酸甲酯,适用于各种植物油及油脂中脂肪酸的组成分析。

References

- 1 Jonsson P, Johansson A I, Gullberg J, Trygg J, A J, Grung B, Marklund S, Sjöström M, Antti H, Moritz T. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(17): 5635~5642

- 2 YU Rui-Peng, WANG Li-Ping, WU Sheng-Fang, CHE Jin-Shui, LIU Yang-Min(虞锐鹏, 王利平, 吴胜芳, 车金水, 刘杨岷). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(9): 1342~1344
- 3 Christensen J H, Tomasi G. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1169(1-2): 1~22
- 4 JIANG Jin-Hua, CHEN Tao (江锦花, 陈涛). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(11): 1627~1632
- 5 Zhang L X, Liang Y Z. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(27): 5272~5283
- 6 Miwa T K, Mikolajczak K L, Earle F R, Wolff I A. *Anal. Chem.*, **1960**, 32(13): 1739~1742
- 7 Mjos S A. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1061(2): 201~209
- 8 Zhang L X, Liang Y Z, Chen A M. *Analyst*, **2009**, 134(8): 1717~1724
- 9 Mjos S A. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2004**, 106(8): 550~560
- 10 Mjos S A, Grahl-Nielsen O. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1110(1-2): 171~180
- 11 Kvalheim O M, Liang Y Z. *Anal. Chem.*, **1992**, 64(8): 936~946
- 12 Liang Y Z, Kvalheim O M, Keller H R, Massart D L, Kiechle P, Erni F. *Anal. Chem.*, **1992**, 64(8): 946~953
- 13 Christie W W. *Journal of Chromatography*, **1988**, 447: 305~314
- 14 Zhang L X, Ji X Y, Tan B B, Liang Y Z, Liang N N, Wang X L, Dai H. *Food Chem.*, **2010**, 121(3): 815~819
- 15 Colnaghi Simionato A V, Da Silva D S, Lambais M R, Carrilho E. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42(10): 1375~1381
- 16 MacLafferty F W, Turecek F. *Interpretation of Mass Spectra*. 4th ed. California: University Science Books, **1993**: 251
- 17 Christie W W. Lipidlibrary, <http://www.lipidlibrary.co.uk>, **2009**
- 18 WU Hui-Qin, HUANG Xiao-Lan, LIN Xiao-Shan, HUANG Fang, ZHU Zhi-Xin, MA Ye-Fen (吴惠勤, 黄晓兰, 林晓珊, 黄芳, 朱志鑫, 马叶芬). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(7): 998~1003
- 19 WANG Guang-Hui, XIONG Shao-Xiang (王光辉, 熊少祥). *Organic Mass Spectroscopy Interpretation* (有机质谱解析). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2005**: 107~112

Identification of Fatty Acids in Vegetable Oils by Mass Spectrometry and Equivalent Chain Length

LIANG Nan-Nan, ZHANG Liang-Xiao, WANG Xiang-Li, TAN Bin-Bin, LIANG Yi-Zeng*
(Research Center of Modernization of Chinese Herbal Medicines, College of Chemistry and
Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083)

Abstract To automatically identify fatty acids in vegetable oils, a method was proposed using mass spectrometry and equivalent chain length (ECL). According to mass spectral characteristics, the type of fatty acids in the sample and its saturated fatty acid methyl esters were identified, then the retention time of saturated fatty acid methyl esters was used to calculate the ECL value of the unsaturated ones, and the ECL values of the interest were compared to the database established in our lab to indentify the molecular structure of all the components in the samples. The fatty acids of five vegetable oils were extracted and esterified by NaOH-CH₃OH, and subsequently analyzed by GC/MS. Sufficient separation for the homologous and isomers of fatty acid methyl esters was obtained with DB-23(30 m×0.25 mm×0.25 μm) capillary column. The result indicated that unsaturated fatty acids extracted from the five vegetable oils were different in chemical composition and relative content. Using this method, contents of homologues and different isomers of fatty acid methyl esters can be automatically determined without standards. The method can be applied to the investigation of the compositions of fatty acids in lipid and food samples.

Keywords Fatty acid; Mass spectral characteristics; Equivalent chain length; Vegetable oils; Gas chromatography/mass spectrometry

(Received 13 January 2011; accepted 18 April 2011)