

螺旋藻脂肪酸 2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰 气相色谱-质谱分析

邹耀洪

(常熟理工学院化学系, 江苏 常熟 215500)

摘 要: 采用 2-氨基-2-甲基丙醇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 质谱分析螺旋藻脂肪酸, 解析了螺旋藻脂肪酸-2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的 EI 质谱图, 讨论了烯酸中碳碳双键的定位规则, 确定了螺旋藻脂肪酸中碳碳双键的位置, 鉴定出螺旋藻中 11 种脂肪酸, 由 $C_{14} \sim C_{22}$ 脂肪酸组成, 饱和脂肪酸相对含量为 68.34%, 多不饱和脂肪酸相对含量为 54.48%, 其中 9, 12, 15-十八碳三烯酸相对含量达 36.22%, 还首次检出了 9-十四碳烯酸, 6-十八碳烯酸, 11-二十碳烯酸及 4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸。本方法为不饱和脂肪酸中碳碳双键的定位提供了新的技术手段。

关键词: 2-氨基-2-甲基丙醇; 化学修饰; 螺旋藻; 脂肪酸; 气相色谱-EI 质谱

Analysis of Fatty Acids in Spirulina by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Chemical Modifying Reagent 2-Amino-2-Methylpropanol

ZOU Yao-hong

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

Abstract: 2-Amino-2-methylpropanol was developed as chemical modifying reagent of fatty acids so as to modify carboxyl group into nitrogen-containing heterocycle which effectively suppressed 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 was located was referred to electron impact analyzing spectra of the chemical products modified by 2-amino-2-methylpropanol of the fatty acids in spirulina. 11 fatty acids were identified according to the analysis of GC-EIMS and the position of double bonds of the fatty acids from spirulina was located. Spirulina consists of the fatty acids of $C_{14} \sim C_{22}$. The contents of the unsaturated fatty acids and the polyunsaturated fatty acids are 68.34% and 54.48% respectively, and the main component of the polyunsaturated fatty acids is 9, 12, 15-linolenic acid whose relative content is 36.22%. Besides, 9-tetradecenoic acid, 6-octadecenoic acid, 11-eicosenoic acid and 4, 7, 10, 13, 16, 19-

收稿日期: 2005-04-13

作者简介: 邹耀洪 (1948-), 男, 教授, 研究方向为天然产物活性因子分析。

了保证食品中的栀子黄含量测定的准确性, 建议用藏红花素为对照品来定性、定量栀子黄素 (为研究的另一部分), 与国际市场接轨。

参考文献:

- [1] 阎少辉, 张德权. 栀子色素研究与开发[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(6): 28-31.
- [2] Lee J y, Hahn T R, Paik Y S. Physicochemical characteristics for the transformation of blue pigments from amino acids[J]. Agric Chem Biotechnol, 1998, 41: 399-404.
- [3] 车双辉, 杜琪珍, 钟立人. 栀子成分的开发研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 57-58.
- [4] GB/T5009.149-2003, 食品中栀子黄的测定[S].
- [5] 王建新, 徐静钰. 栀子黄色素纯化研究[J]. 中国食品添加剂, 2002, (6): 16-18
- [6] 王海棠, 王忠东, 陈海涛, 等. 丹参红色素的研究(I)—化学成分及提取工艺[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 86-91.

docosahexenoic acid are first identified. Therefore, this method provides a new technical tool for the location of double bonds in the unsaturated fatty acids.

Key words 2-Amino-2-methylpropanol; chemical modification; spirulina; fatty acids; gas chromatography-electron impact mass spectrometry

中图分类号: TS201.22

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0202-05

螺旋藻(Spirulina)富含不饱和脂肪酸,自20世纪70年代被重新发现以来,受到营养界、医学界的推崇,在食品及保健医药行业得到广泛应用。对螺旋藻的功能因子不饱和脂肪酸的检测,已有甲酯化GC^[1]和甲酯化GC-EIMS^[2]的报道,但GC法采用对照标准品定性,此法一般不能鉴定碳数相同而碳碳双键位置不同的不饱和脂肪酸,而GC-EIMS分析也无法准确给出不饱和脂肪酸中碳碳双键的位置。因在甲酯化GC-EIMS分析中,不饱和脂肪酸甲酯在EIMS条件下,一般给出电荷定域在碳碳双键位置的离子,当双键上无多取代基或不与其它双键共轭时,中间烯因重排使双键位置发生移动,由质谱裂片峰不能确定链烯基中双键位置的异构体,使双键位置难以正确定位^[3,4]。故脂肪酸甲酯化GC和甲酯化GC-EIMS分析均不能正确鉴定脂肪酸的精细结构。

由于在EIMS条件下,分子离子化时电荷位置优先发生在电离电位低的电子上^[5],因此将脂肪酸进行化学修饰,将羧基修改为比碳碳双键中 π 电子电离电位低的含有未成键电子的N或O、S等杂原子基团,可在EI源中给出电荷定域在杂原子而不是双键位置上的离子,避免中间烯因重排时双键移动,从而抑制脂肪酸中碳碳双键的移动。考虑到N原子的未成键电子的电离电位比O、S的低^[5],故本文选择了分子中含有1个N原子的氨基和一个邻位羟基的化合物——2-氨基-2-甲基丙醇作为脂肪酸的化学修饰试剂,将脂肪酸转化为具有含N杂环的噁唑衍生物,达到避免在EI源中链烯基中双键的移动。本文以2-氨基-2-甲基丙醇作为脂肪酸的化学修饰试剂,采用GC-EIMS分析螺旋藻中脂肪酸,讨论了解析EI质谱以确定碳碳双键位置的规则。用该法分析鉴定螺旋藻脂肪酸为首次报道,不仅正确鉴定了螺旋藻脂肪酸,而且为分析脂肪酸精细结构提供了新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

日本岛津2010型气相色谱-质谱联用仪;索氏抽提器;具塞试管。2-氨基-2-甲基丙醇美国Aldrich公司;螺旋藻干粉 青岛海洋研究所;其余试剂皆为分析纯。

1.2 螺旋藻脂肪酸的制备和化学修饰

取5g螺旋藻干粉置于滤纸包中,放入索氏抽提器用体积比为1:1的石油醚(30~60℃)-乙醚混合试剂抽提

8h。取下接受器,回收溶剂,并用氮气吹干得脂质。取0.3g螺旋藻脂质于具塞试管中,加入5ml 2mol/L KOH的乙醇溶液,充满氮气后旋紧试管塞,在60℃水浴中反应1h,冷却后滴加2mol/L盐酸至pH2,用医用注射器吸掉水层后,再用蒸馏水不断洗涤不断吸掉水层至pH7。取上述脂肪酸50mg于具塞试管中,加入150mg 2-氨基-2-甲基丙醇,充满氮气后旋紧试管塞,在170℃液态石蜡浴中反应1.5h,冷却后水洗去杂,加入3ml CHCl₃,摇动1min后再加入5ml蒸馏水,放置分层后取CHCl₃液层于10ml具塞试管中,加入少许无水硫酸钠,充氮气0℃以下保存,并及时进行GC-EIMS分析。

1.3 气相色谱-质谱条件

气相色谱条件:FFAP 30m×0.25mm×0.25 μ m石英毛细管色谱柱,载气为高纯氮气,流速1ml/min,分流比1:50,进样量为1 μ l。进样口温度260℃。柱升温程序:初温为150℃(保持2min),以5℃/min速率升至220℃(保持24min)。

质谱条件:电离方式EI,电子能量70eV,离子源温度220℃,GC/MS接口温度230℃,发射电流0.25mA,电子倍增器电压1.5kV,扫描范围m/z:100~400。

2 结果与分析

2.1 螺旋藻脂肪酸2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的EI质谱解析

螺旋藻脂肪酸2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的GC-MS总离子流图见图1。

2-氨基-2-甲基丙醇将螺旋藻脂肪酸化学修饰成2-烷

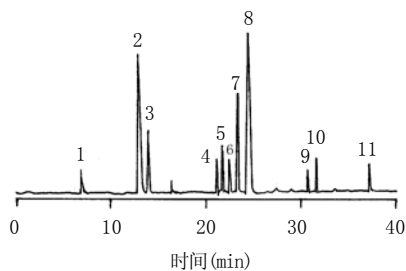
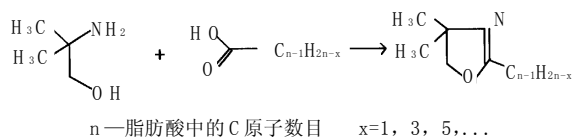


图1 螺旋藻脂肪酸2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的总离子流图
Fig.1 Total ion current chromatogram of the chemical products modified by 2-amino-2-methylpropanol of the fatty acids from spirulina

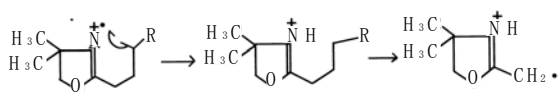
(烯)基-4, 4-二甲基噁唑^[6]。



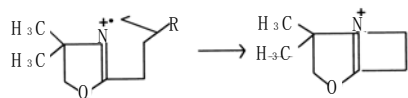
2-氨基-2-甲基丙醇将螺旋藻脂肪酸化学修改为含N杂环, 含N杂环提高了电荷稳定性, 使在EI源中给出电荷定域在含N杂环的N原子上而不是双键位置上的离子, 不会产生中间烯因重排导致双键发生移动, 避免了脂肪酸中碳碳双键的移位, 并使EI质谱呈现规范的易辨认的显示双键位置的离子峰, 从而为确定不饱和脂肪酸中双键的位置提供准确的信息。

解析总离子流图上各峰对应的EI质谱(图2)得到以下六类离子峰:

(A) 基峰: m/z 113, 为2-烷(烯)基-4, 4-二甲基噁唑重排生成



(B) 第二大峰: m/z 126, 为2-烷(烯)基-4, 4-二甲基噁唑经环化反应生成



(C) 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- CH_3 。

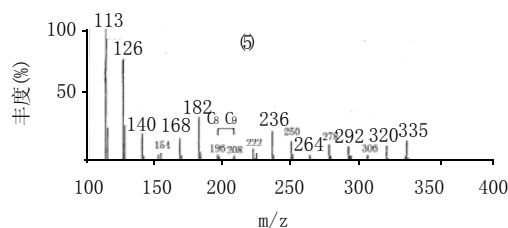
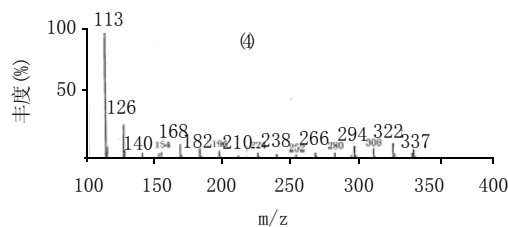
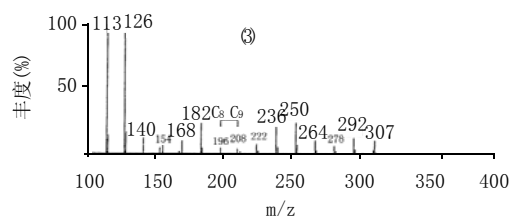
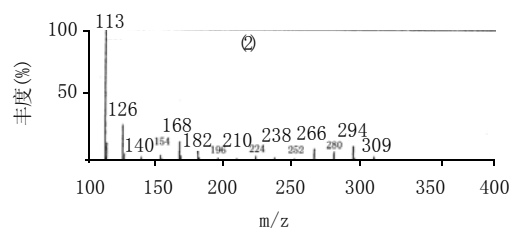
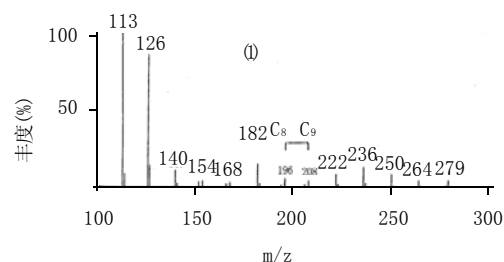
(D) m/z 间距相差14的碎片离子峰, 相当于丢失亚甲基- CH_2 。

(E) m/z 间距相差12的碎片离子峰, 相当于丢失C原子。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- 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, 即包含 $n-1$ 和 n 碳原子的碎片离子峰的 m/z 间距为12。故包含 $n-1$ 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。

(F) 对单不饱和脂肪酸, 有包含 $n-2$ 和 $n+2$ 碳原子的碎片离子强峰, 则 $\text{C}_n \sim \text{C}_{n+1}$ 处存在碳碳双键。这对很难区别碎片离子峰的 m/z 间距是12或14时, 或碎片离子峰的 m/z 不够丰富时, 碳碳双键的位置可由此来确定。

图2(8)为十八碳三烯酸2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的EI质谱图。其中 m/z 113, 126分别为基峰和第二大峰。分子离子峰 m/z 331(C_{18})和相邻碎片离子峰 m/z 316

(C_{17})相差15, 则为丢失甲基- CH_3 。相邻碎片离子峰 m/z 316(C_{17})和302(C_{16}), 302(C_{16})和288(C_{15}), 276(C_{14})和262(C_{13}), 262(C_{13})和248(C_{12}), 236(C_{11})和222(C_{10}), 222(C_{10})和208(C_9), 196(C_8)和182(C_7), 182(C_7)和168(C_6), 168(C_6)和154(C_5), 154(C_5)和140(C_4), 140(C_4)和126(C_3)质量间距均为14, 则为丢失亚甲基- CH_2 。 m/z 196(C_8)和208(C_9), 236(C_{11})和248(C_{12}), 276(C_{14})和288(C_{15})的质量间距均为12, 则表明 C_9 和 C_{10} , C_{12} 和 C_{13} , C_{15} 和 C_{16} 间各有1个碳碳双键, 故(8)鉴定为9, 12, 15-十八碳三烯酸。



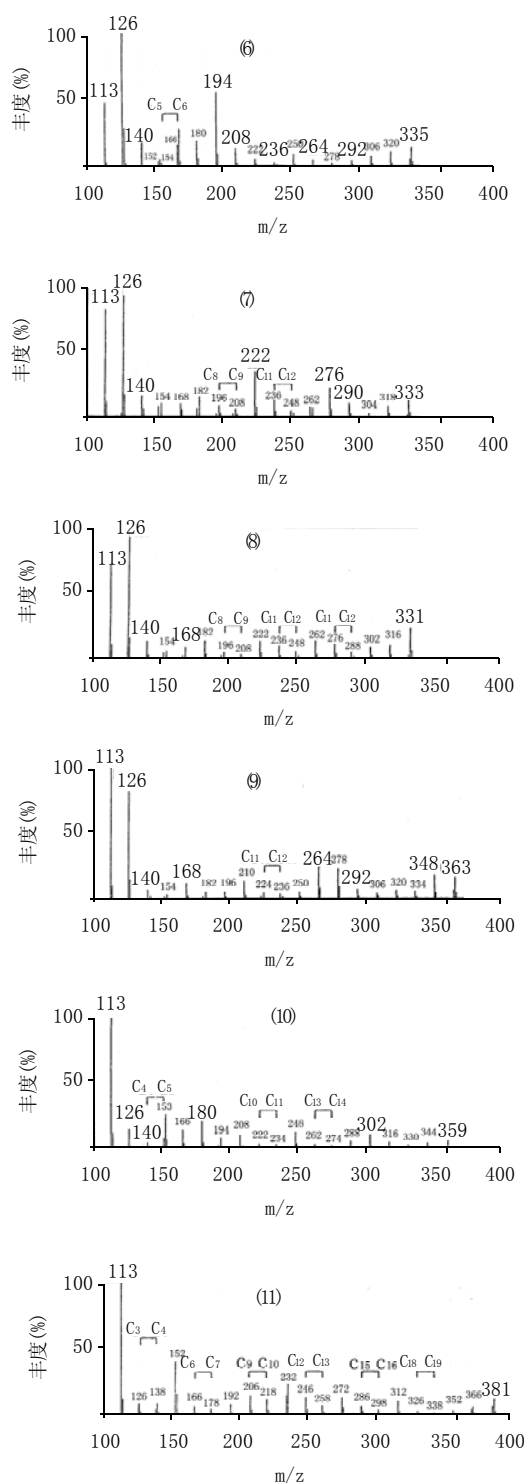


图2 螺旋藻脂肪酸2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的质谱图
Fig.2 Mass spectrum of the chemical products modified by 2-amino-2-methylpropanol of the fatty acids from spirulina

图2(5)为十八碳烯酸2-氨基-2-甲基丙醇化学修饰产物的EI质谱图。其中 m/z 113, 126分别为基峰和第二大峰。分子离子峰 m/z 335(C_{18})和相邻碎片离子峰 m/z 320(C_{17})相差15, 则为丢失 $-CH_3$ 。相邻碎片离子峰 m/z 320

(C_{17})和306(C_{16}), 306(C_{16})和292(C_{15}), 292(C_{15})和278(C_{14}), 278(C_{14})和264(C_{13}), 264(C_{13})和250(C_{12}), 250(C_{12})和236(C_{11}), 236(C_{11})和222(C_{10}), 222(C_{10})和208(C_9), 196(C_8)和182(C_7), 182(C_7)和168(C_6), 168(C_6)和154(C_5), 154(C_5)和140(C_4), 140(C_4)和126(C_3)质量间距均为14, 则为丢失 $-CH_2-$ 。 m/z 196(C_8)和208(C_9)质量间距为12, 但二者均不丰富, 然而包含 $n-2$ 和 $n+2$ 碳原子的碎片离子峰 m/z 182(C_7)和236(C_{11})为强峰, 可判定 C_9 和 C_{10} 间有一碳碳双键, 故(5)鉴定为9-十八碳烯酸。图2(1)、(3)中的 m/z 182(C_7)和236(C_{11}), 图2(9)中的 m/z 210(C_9)和264(C_{13})均为包含 $n-2$ 和 $n+2$ 碳原子的强碎片离子峰, 故可进一步判定(1)、(3)在 C_9 和 C_{10} 间, (9)在 C_{11} 和 C_{12} 间存在一个碳碳双键。图2(6)中 m/z 154与 m/z 152相比不够丰富, 难以区分碎片离子峰的 m/z 间距是12或14, 但有包含 $n-2$ 和 $n+2$ 碳原子的强碎片离子峰 m/z 140(C_4)和194(C_8)存在, 故可判定在 C_6 和 C_7 间有一碳碳双键。

2.2 螺旋藻脂肪酸GC-EIMS分析鉴定结果

对总离子流检测到的组分峰采集质谱图, 由各色谱峰相应的质谱数据及上述规则进行人工解析, 鉴定了11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98.67%。

表1 螺旋藻脂肪酸组成及含量

Table 1 The identified chemical components of fatty acids from spirulina

峰号	保留时间 (min)	脂肪酸	分子量	相对含量 (%)
1	6.71	9-十四碳烯酸	226	0.89
2	12.67	十六碳酸	256	28.12
3	14.09	9-十六碳烯酸	254	7.26
4	21.19	十八碳酸	284	2.21
5	21.78	9-十八碳烯酸	282	2.78
6	22.45	6-十八碳烯酸	282	2.16
7	23.57	9, 12-十八碳二烯酸	280	14.08
8	24.49	9, 12, 15-十八碳三烯酸	278	36.22
9	30.80	11-二十碳烯酸	310	0.77
10	31.72	5, 11, 14-二十碳三烯酸	306	2.37
11	37.21	4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸	328	1.81

分析结果表明, 螺旋藻脂肪酸由 $C_{14} \sim C_{22}$ 脂肪酸组成, 不饱和脂肪酸相对含量为68.34%, 其中多不饱和脂肪酸主要为9, 12, 15-十八碳三烯酸(相对含量36.22%)和9, 12-十八碳二烯酸(相对含量14.08%), 它们均为重要的必需脂肪酸, 在调节人体的各种基本生理活动中起重要作用, 具有相当的保健和药用价值。与文献[1, 2]报道相比, 9-十四碳烯酸, 6-十八碳烯酸, 11-二十碳烯酸及4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸为首次检测到。

参考文献:

HPLC 法测定黑米皮提取物中 花色苷成分及含量

夏效东¹, 凌文华¹, 郑琳¹, 张名位²

(1. 中山大学公共卫生学院营养系, 广东 广州 510080

2. 广东省农业科学研究院, 广东 广州 510640)

摘要: 目的: 用高效液相色谱法测定黑米皮提取物中花色苷的成分及含量。方法: 采用 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (250 × 4.6mm, 5μm), 以乙腈—4% 磷酸 (15:85) 为流动相, 流速 0.8ml/min, 检测波长 530nm, 用外标法定量。结果与结论: 黑米皮提取物中主要含两种花色苷: 矢车菊定-3-葡萄糖苷和芍药定-3-葡萄糖苷, 其含量分别为 25.7% 和 1.7%。

关键词: 黑米皮; 花色苷; 高效液相色谱法

Determination of Anthocyanin Component and Content in Black Rice Extract by HPLC

XIA Xiao-dong¹, LING Wen-hua¹, ZHENG Lin¹, ZHANG Ming-wei²

(1. Department of Medical Nutriology, Public Health School, ZhongShan University,

Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective: To determine the component and content of anthocyanins in black rice extract. Methods: The HPLC method was used to determine the component and content of anthocyanins in black rice extract. The analysis was carried on Hypersil BDS C₁₈ column. The mobile phase was acetonitrile-4% H₃PO₄ (15:85), flow-rate 0.8ml/min and wave-length 530nm. Results and conclusion: There are two major anthocyanins in black rice extract: cyanindin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside, the content of which are 25.7% and 1.7% of the whole extract respectively.

Key words: black rice; anthocyanin; HPLC

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0206-03

黑米被认为是稻米中的珍品, 它是近年国际流行的“健康食品”之一。黑米有滋阴补肾、健脾开胃、补中益气、活血化瘀等功效。黑米具有的很多生理功能可能都与其所含的花色苷类色素有关^[1,2]。花色苷是一种

黄酮类的化合物, 也是黑米呈现黑色的主要原因。黑米中的花色苷类物质除可作为色素广泛使用外, 同时还具有多种生理功能, 包括抗氧化、抗炎以及调节血脂、抗动脉粥样硬化等功能^[3,4]。目前国内对于花色苷含量的

收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371215)

作者简介: 夏效东 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养与健康。

[1] 胡亚芹, 薛长湖, 蔡跃飘. 螺旋藻单半乳糖二酰甘油酯脂肪酸分子组成分析[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 542-548.

[2] 邓青, 张晓梅. 气相色谱/质谱联用分析螺旋藻脂肪酸组成[J]. 云南民族学院学报, 2003, 12(1): 37-38.

[3] 陈耀组, 涂亚平. 有机质谱原理及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 145-146.

[4] 常建华, 董绮功. 波谱原理及解析[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 281-282.

[5] 孟令芝, 何永炳. 有机波谱分析[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1997. 198, 204-205.

[6] 赵燕来, 何森泉, 徐长德. 杂环化学导论[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 219-220.