薄壳山核桃仁油甘油三酯成分分离鉴定

许培源, 袁 博, 左 飞, 李永荣, 蒋继宏* (江苏师范大学 江苏省药用植物生物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘 要:对薄壳山核桃仁油进行提取,利用制备型液相色谱-蒸发光散射-质谱联用技术分离和鉴定。分离得到7个单体化合物,通过核磁与质谱数据比对,7个单体化合物均为甘油三酯,分别为三亚油酸甘油酯、二亚油酸油酸甘油酯、棕榈酸二亚油酸甘油酯、亚油酸甘油酯、棕榈酸亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、棕榈酸二油酸甘油酯。

关键词: 薄壳山核桃油; 分离鉴定; 甘油三酯

Identification of Triacylglycerols from Pecan (Carya illinoensis) Oil

XU Pei-yuan, YUAN Bo, ZUO Fei, LI Yong-rong, JIANG Ji-hong*

(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Seven monomeric compounds from pecan (*Carya illinoensis*) oil were separated and identified by preparative high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection combined with mass spectrometry (HPLC-ELSD-MS). All these compounds were confirmed as triglycerides by comparison of their NMR and MS data with those of authentic standards or literature data, namely trilinolein, dilinolein, 1,2-dilinoleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol, dioleoylglycerol, 1-palmitin-2-olein-3-linolein, glycerol trioleate, dioleoyl 2-palmitoyl triglyceride, respectively.

Key words: Carya illinoensis oil; separation and identification; triacylglycerols

中图分类号: O623.612

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 06-0159-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201406034

薄壳山核桃 (Carva illinoensis) 为胡桃科山核桃 属,原产美国和墨西哥,是世界著名的干果之一,又名 长山核桃、碧根果、长寿果、美国山核桃,是珍贵的干 果和木本产油经济树种[1-2]。薄壳山核桃坚果壳薄、出仁 率高、保健价值高, 是榨取高级食用油和制作冰淇淋等 的原料,具有重要的经济价值。薄壳山核桃于1900年引 入我国, 先后在江苏、浙江、福建等地种植。薄壳山核 桃果仁中含油脂72%、蛋白质11%、碳水化合物13%,且 含有对人体有益的氨基酸、VB₁,具有重要的食用和经 济价值意义[3]。薄壳山核桃仁含有丰富的营养素,其中所 含脂肪的主要成分是亚油酸甘油脂[4],食用后可减少肠道 对胆固醇的吸收,可作为高血压、动脉硬化患者的保健 品。此外,这些油脂还可满足大脑基质的需求。薄壳山 核桃种仁内所含多种活性酯, 具有有明显的抗癌、防止 心血管被氧化、防止心脑血管动脉粥样硬化作用,对冠 心病、心肌梗塞、心绞痛、脑血栓、脑溢血、中风等疾 病的预防和治疗有明显的效果^[5-6]。同时由于其产油量较大,可用于食用油替代和食品保健开发。

目前对薄壳山核桃的研究只是局限于对其原产地及其分布、生态要求、生物学特性、品种类型、繁殖培育、病虫害防治、栽培技术、植物生长物质、遗传多样性、品种鉴定、化学成分的研究和综合利用等方面,对其有效成分研究几乎为空白,对薄壳山核桃甘油三酯化学成分的研究就更少^[7-8]。由于其甘油三酯成分比较复杂且含量较低的成分难鉴定,本研究采用液相色谱-蒸发光散射-质谱联用技术对含量高的成分进行核磁鉴定、对含量较少的成分进行质谱数据比对,推测其可能成分。研究结果可为薄壳山核桃的成分研究提供一定的参考依据,为其作为食品保健功能食品的进一步研究提供重要研究基础。

收稿日期: 2013-06-02

基金项目: 江苏师范大学自然科研基金项目(12XLB04); 江苏省高校青蓝工程优秀科技创新团队资助项目(药用微生物前期开发); 江苏省研究生教育创新工程项目(CXLX11_0911)

作者简介:许培源(1989—),男,硕士研究生,研究方向为天然产物化学。E-mail: xpyxupeiyuan@163.com*通信作者:蒋继宏(1962—),男,教授,博士,研究方向为药用植物生物技术。E-mail: jjh669@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

薄壳山核桃购于徐州市场,去壳,晒干,粉碎,过 100目筛,备用。

石油醚(分析纯)、乙腈(色谱纯)、四氢呋喃(色谱 纯) 天津市康科德科技有限公司。

1.2 仪器与设备

1260高效液相色谱 美国Agilent公司;蒸发光散射检测器 上海通微分析技术有限公司;AB SCIEX 5500质谱仪 美国AB SCIEX公司;W2-100旋转蒸发仪上海申生科技有限公司;SZF-06C脂肪酸提取仪 浙江托普仪器有限公司;AV 400型傅里叶变换核磁共振波谱仪 德国Bruker公司。

1.3 方法

1.3.1 桃仁油的提取

称取10.0 g粉碎后的薄壳山核桃桃仁粉,置于脂肪酸提取仪中,按料液比1:20 (g/mL)加入石油醚,60 °C提取1 h,过滤,残渣继续提取,重95 次,合并滤液,旋转蒸发,将蒸馏瓶中的提取物用石油醚溶解后,置于干燥器中放置1 周。

1.3.2 甘油三酯的提取分析

1.3.2.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 色谱柱(250 mm×1.0 mm, 5 μ m); 流动相A: 乙腈; 流动相B: 乙腈-四氢呋喃(1:1, V/V); 流速3 mL/min; 紫外检测器208 nm; 进样量0.5 mL; 分流比300:1; 蒸发光条件: 温度40 °C; 流速2.5 L/min; 洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序 Table 1 Gradient elution program

| Table 1 Gradient cration program | | | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|--|--|--|--|
| 时间/min | 流动相A/% | 流动相B/% | | | | |
| 0 | 50 | 50 | | | | |
| 24.00 | 40 | 60 | | | | |
| 43.00 | 10 | 90 | | | | |
| 43.01 | 0 | 100 | | | | |
| 80.00 | 0 | 100 | | | | |

1.3.2.2 质谱条件

大气压化学电离源;正离子模式;喷雾电压 $3\,000\,V$;毛细管温度250 \mathbb{C} ;蒸发温度400 \mathbb{C} ;电晕针电流4 μ A;鞘气(高纯液氮)压力35 kPa;质量扫描范围m/z $300\sim900$;扫描时间1 s。

1.3.2.3 薄壳山核桃油成分鉴定

利用分流器将制备液相色谱分离所得组分进行三重 四极杆质谱分析,通过质量分析器获得各个组分的相对 分子质量,同时分流器另一出口接入自动接收器中,根 据质谱信号以及蒸发光检测器接收各个组分,浓缩,得 到油状单体,采用液相色谱-蒸发光检测器对各个单体进 行纯度鉴定。

2 结果与分析

2.1 薄壳山核桃成分分离及含量测定

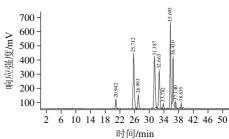


图 1 薄壳山核桃油液相色谱-蒸发光检测器图谱 Fig.1 HPLC-ELSD profile of pecan oil

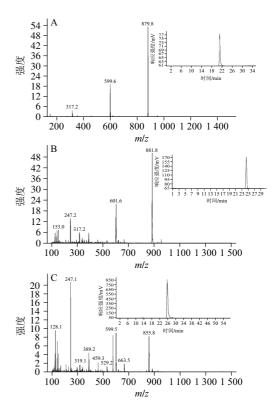
从图1可以看出,薄壳山核桃油各组分间样品分离情况较好,出现7个峰面积较大色谱峰,说明提取物中有7个主要成分。20.9(A)、25.7(B)、26.9(C)、31.4(D)、32.7(E)、35.7 min(G)和36.4 min(H)这7个峰峰面积较大且在紫外吸收谱图上也有明显吸收,这7种物质的相对含量如表2所示。

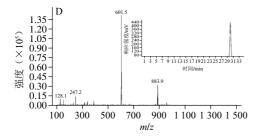
表 2 薄壳山核桃油油主要成分的相对含量
Table 2 Peak area percentages of 7 major components in pecan oil

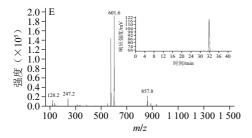
| | | | | | | | | % |
|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|
| 物质 | Α | В | С | D | Е | G | Н | 其他 |
| 相对含量 | 2.77 | 20.21 | 4.71 | 21.48 | 13.94 | 21.60 | 12.02 | 3.27 |

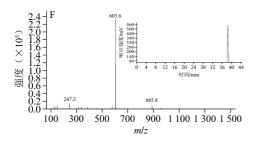
2.2 薄壳山核桃油成分鉴定

薄壳山核桃油各主要成分质谱分析如图2所示。









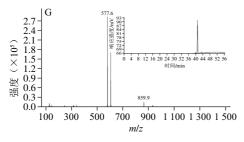


图 2 7 种主要成分的质谱图

Fig.2 MS spectra of 7 major components in pecan oil

据文献[9]报道,甘油三酯类物质的质谱图中会同时存在信号强度较大的分子离子峰[M+1]⁺和失去1个脂肪酸碎片的离子峰[M+1-脂肪酸]⁺。当甘油三酯含2种或者3种脂肪酸时,可以失去2种或者3种脂肪酸,因此可能存在2种或3种[M+1-脂肪酸]⁺的碎片离子峰。从得到的7个主要单体组份质谱图上看,分子离子与其最相近的离子之间失去的均为1分子脂肪酸,如亚油酸、油酸等,因此初步判定7种主要组分为甘油三酯。同时通过液相色谱-蒸发光检测器鉴定该7个单体组分均达到90%的纯度,可以进行核磁共振鉴定。

2.3 薄壳山核桃油甘油三酯成分鉴定

化合物A, 无色油状。质谱图显示879.8[M] $^+$, 其中碎片m/z 599.6代表[M+1-亚油酸] $^+$,

¹H-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 5.34(12 H,m,烯烃H),5.42(1 H,m,Gl-H₂),4.20(2 H,dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1a},H_{3a}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2b},H_{3b}),2.77(6 H,t,J=6.6 Hz,H_{a-11,β-11,α'-11}),231(2H,t,J=7.6 Hz,H_{a-1}),131(12H,m,H_{a-7,β-7,α'-7}),0.89(9 H,m,—CH₃)。¹³C-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 130.17(C_{a,a'-9}),129.65(C_{a,a'-10}),128.05(C_{a,a'-12}),127.87(C_{a,a'-13}),129.93(C_{β-9}),129.6(C_{β-10}),68.9(Gl-C_{β-2}),62.08(Gl-C_{a-2,a'-2}),173.2(C_{a-1,a'-1}),172.78(C_{β-1})。通过与文献[10]比对,该化合物为三亚油酸甘油酯。

化合物B,无色油状。质谱图显示峰881.8[M]⁺, 其中碎片m/z 601.6代表[M+1—油酸]⁺,特征峰分子式 $C_{57}\,H_{100}O_{6}$ 。 ¹H-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 5.34(8 H,m,烯烃 α H, α 'H),5.31(2 H,m,烯烃 β H),5.42(1H,m,Gl-H₂),4.20(2 H,dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1a},H_{3a}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2b},H_{3b}),2.77(4 H,t,J=6.6 Hz,H_{a-11, β -11, α -11),1.99(2 H,t,J=6.7 Hz,H_{β -11}),2.31(2 H,t,J=7.6 Hz,H_{α -2}),1.32(12 H,m,H_{α -7, β -7, α -7),0.88(9 H,m,—CH₃)。 ¹³C-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 130.12($C_{\alpha,\alpha}$ -9),128.02($C_{\alpha,\alpha}$ -10),127.85(C_{α -12),129.92(C_{α -13}),129.89(C_{β} -9),129.6(C_{β -10),68.8(Gl-C $_{\beta$ -2),62.04(Gl-C $_{\alpha$ -2, α -2),173.12(C_{α -1, α -1),172.71(C_{β -1})。 通过与文献[11-12]比对,该化合物为二亚油酸油酸甘油酯。

化合物C,无色油状。质谱图显示峰855.8[M]⁺,其中碎片m/z 599.5代表[M+1—亚油酸]⁺特征峰,分子式 $C_{55}H_{98}O_{60}$ ¹H-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 5.41(8 H,m,烯烃 α H, α ²H),5.42(1 H,m,Gl-H₂),4.21(2 H,dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1a},H_{3a}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2b},H_{3b}),2.71(4 H,t,J=6.6 Hz,H_{a-1}),1.29(12 H,m,H_{a-7,b-7,a-7),0.88(6 H,m,—CH₃),0.90(2 H,m,—CH₃)。 13 C-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 130.06($C_{a,a}$ -10),127.92($C_{a,a}$ -12),127.79($C_{a,a}$ -13),68.8(Gl-C $_{b$ -2),62.04(Gl-C $_{a$ -2,a-2),172.71(C_{a -1,a-1),173.16(C_{b -1)。以上数据与文献[13]报道一致,故初步鉴定为棕榈酸二亚油酸甘油酯。}

化合物 D , 无色油 状。 质谱 图显示峰 883.9[M]⁺,其中碎片m/z 601.5代表[M+1—油酸]⁺特征峰,分子式 C_{57} $H_{102}O_{6}$ 。 ¹ H-NMR (CDCl₃,500 MHz) δ 5.25(8 H, m,烯烃 α H, α 'H),5.41(1 H,烯烃 β -9 H),5.48

(1 H,烯烃 β -10 H),5.45(1 H,烯烃 β -12 H),5.40(1 H,烯烃 β -13 H),5.42(1 H,m,Gl-H₂),4.21(2 H,dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1a},H_{3a}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2b},H_{3b}),1.98(4 H,t,J=6.6 Hz,H_{α -11, α -11}),2.71(2 H,t,J=6.4 Hz,H_{β -11}),2.32(2 H,t,J=7.6 Hz,H_{α 2}),1.28(12 H,m,H_{α -7, β -7, α -7),0.88(9 H,m,—CH₃)。¹³C-NMR(CDCl₃,500 MHz)δ130.06(C_{α,α -9}),128.8(C_{α,α -10}),127.92(C_{α,α -12}),127.79(C_{α,α -13}),68.8(Gl-C_{β -2}),62.04(Gl-C_{α -2, α -2}),172.72(C_{α -1, α -1}),173.14(C β -1)。经过比对数据鉴定为亚油酸二油酸甘油酯^[14-18]。}

化合物E,无色油状。质谱图显示峰857.8[M]⁺,其中,碎片m/z 601.5代表[M+1-油酸]⁺特征峰,分子式 $C_{55}\,H_{100}O_{6}$ 。 ¹H-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 5.25(6H,m,烯烃 α H, α 'H),5.42(1 H,m,Gl-H₂),4.21(2 H,dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1a},H_{3a}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2b},H_{3b}),1.98(4 H,t,J=6.6 Hz,H $_{\alpha$ -11, α '-11</sub>),2.71(2 H,t,J=6.4 Hz,H $_{\beta$ -11),2.32(2 H,t,J=7.6 Hz,H $_{\alpha}$ 2),1.28(12 H,m,H $_{\alpha$ 7, β 7, α 7),0.88(9 H,m,—CH₃)。 ¹³C-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 129.95($C_{\alpha,\alpha'-9}$),128.03(C_{α -10),127.85(C_{β -10),130.16(C_{β -9),128.045(C_{β -12),129.96(C_{β -13),68.8(Gl-C $_{\beta$ -2</sub>),62.04(Gl-C $_{\alpha$ -2, α' -2),172.72(C_{α -1, α' -1),173.14(C_{β -1)。通过比对文献[19-20]可知,该化合物为棕榈酸亚油酸油酸甘油酯。

化合物G,无色油状。质谱图显示峰885.8[M]⁺,其中碎片m/z 601.5代表[M+1-油酸]⁺特征峰,分子式C₅₇ H₁₀₄O₆。 ¹ H-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 5.25(12 H,m,烯烃 α H, β H, α 'H),5.42(1 H,m,Gl-H₂),4.21(2 H,dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1a},H_{3a}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2b},H_{3b}),1.98(4 H,t,J=6.6 Hz,H_{a-11, α '-11}),2.71(2 H,t,J=6.4 Hz,H_{β -11}),2.32(2 H,t,J=7.6 Hz,H_{α -2}),1.28(12 H,m,H_{α -7, β -7, α '-7}),0.88(9 H,m,—CH₃)。¹³C-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 129.64(C_{α , β , α '-9}),129.89(C_{α , β , α '-10}),68.8(Gl-C_{β -2}),62.04(Gl-C_{α -2, α '-2}),172.72(C_{α -1, α '-1}),173.14(C_{β -1})。通过比对文献[21-22]可知,该化合物为三油酸甘油酯。

化合物 H, 无色油状。质谱图显示峰859.9[M]⁺,其中碎片m/z 601.5代表[M+1-油酸]⁺特征峰,分子式C₅₅ H₁₀₂O₆。 ¹H-NMR(CDCl₃,500 MHz) δ 5.25 (4 H, m, 烯烃 α H, α 'H),5.42(1 H, m, Gl-H₂),4.21(2 H, dd,J=11.9,4.3 Hz,Gl-H_{1 α},H_{3 α}),4.38(2 H,dd,J=11.9,6.0 Hz,Gl-H_{2 β},H_{3 β}),1.98(4 H,t,J=6.6 Hz,H_{α -11, α -11}),1.24(2 H,t,

3 结论

本研究通过液相色谱-蒸发光检测器-质谱联用技术,对薄壳山核桃油中的甘油三酯进行了分离、鉴定,通过核磁共振法确定了甘油三酯的结构,其主要成分为三亚油酸甘油酯、二亚油酸油酸甘油酯、棕榈酸二亚油酸甘油酯、亚油酸二油酸甘油酯、棕榈酸亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、棕榈酸二油酸甘油酯,为薄壳山核桃的质量监控提供了研究基础和方法。

参考文献:

- [1] 吴耕民. 中国温带落叶果树[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 719-729
- [2] 习学良, 范志远, 张雨, 等. 美国山核桃在云南的引种表现及丰产栽培技术[J]. 中国南方果树, 2004, 33(5): 72-74.
- [3] 姚小华. 美国山核桃优新品种和无性系开花物候特性研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(5): 675-680.
- [4] 朱桃花, 范璐, 钱向明, 等. HPLC分析植物油脂甘油三酯结构组成的研究现状[J]. 中国油脂, 2011, 36(5): 59-63.
- [6] 俞春莲, 王正加, 夏国华, 等. 10个不同品种的薄壳山核桃脂肪含量及脂肪酸组成分析[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(5): 714-718.
- [7] 姚小华, 王开良, 任华东, 等. 薄壳山核桃优新品种和无性系开花物 候特性研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(5): 675-680.
- [8] 吴文龙, 闾连飞. 薄壳山核桃的引种栽培[J]. 江苏林业科技, 2003, 30(1): 11-13.
- [9] 向智敏, 祝明, 陈碧莲, 等. HPLC-MS分析薏苡仁油中的甘油三酯成分[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1436-1437.
- [10] ZOU Jianhua, DAI Jungui. Chemical constituents in marine fungus of Cladosporium cladosporioides[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2009, 44(6): 418-421.
- [11] BEERMANN C, WINTERLING N, GREEN A, et al. Comparison of the structures of triacylglycerols from native and transgenic mediumchain fatty acid-enriched rape seed oil by liquid chromatographyatmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry (LC-APCI-IT-MS)[J]. Lipids, 2007, 42(4): 383-394.
- [12] BI Yanlan, YANG Guolong, LI Hong, et al. Characterization of the chemical composition of lotus plumule oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(20): 7672-7677.
- [13] VLAHOV G, SCHIAVONE C, SIMONE N, et al. ¹³C NMR regiospecific analysis of olive *Olea europaea* L.' oil triglycerides[J]. International Symposium on Olive Growing, 2000, 586(2): 587-590.
- [14] TSYDENDAMBAEV V D, VLADIMIR D, VERESHCHAGIN, et al.

- Changes in triacylglycerol composition during ripening of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(5): 1278-1283.
- [15] YANG Luying, KUKSIS A, MYHER J J, et al. Contribution of de novo fatty acid synthesis to very low density lipoprotein triacylglycerols: evidence from mass isotopomer distribution analysis of fatty acids synthesized from [2H6]ethanol[J]. Journal of Lipid Research, 1996, 37(2): 262-274.
- [16] ZERININA O V, NECHAEV A P, GEIKO N S. Structure of sunflower oil triglycerides[J]. Maslozhirovaya Promyshlennost, 1982(7): 27-28.
- [17] MYHER J J, KUKSIS A, VASDEV S C, et al. Acylglycerol structure of mustard seed oil and of cardiac lipids of rats during dietary lipidosis[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1979, 57(11): 1315-1327.
- [18] KAUFMAN M, WIESMAN Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol finger printing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(25): 10405-10413.
- [19] ADHIKARI P, ZHU Xuemei, GAUTAM A, et al. Scaled-up production of zero-trans margarine fat using pine nut oil and palm stearin[J]. Food Chemistry, 2009, 119(4): 1332-1338.

- [20] RANALLI A, CONTENTO S, LUCERA L, et al. Characterization of carrot root oil arising from supercritical fluid carbon dioxide extraction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(15): 4795-4801.
- [21] HADDADA F M, MANAI H, OUESLATI I, et al. Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six tunisian olive varieties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(26): 10941-10946.
- [22] LESKINEN H, SUOMELA J P, KALLIO H. Quantification of triacylglycerol regioisomers in oils and fat using different mass spectrometric and liquid chromatographic methods[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, 21(14): 2361-2373.
- [23] KINTA Y, HATTA T. Composition and structure of fat bloom in untempered chocolate[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(7): 450-452.
- [24] FOUBERT I, VANROLLEGHEM P A, THAS O, et al. Influence of chemical composition on the isothermal cocoa butter crystallization[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(9): E478-E487.
- [25] CHAN P, KAO P F, TOMLINSON B. Cardiovascular effects of trilinolein, a natural triglyceride isolated from the herb Sanchi[J]. Acta Cardiologica Sinica, 2005, 21(2): 71-76.