

鱼油中不饱和脂肪酸 2-烯基苯并噁唑 衍生物的 EIMS 和 CID 谱研究

董振温 孙琢璠 曹忠民

(大连理工大学化工学院分析中心 116012)

方 原

(大连市中心医院 116033)

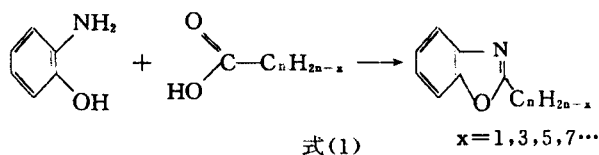
〔摘要〕本文利用 EIMS 和 MIKE 谱研究了不饱和脂肪酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的双键定位规则,并对鱼油中具有重要营养和医药价值的 ω -3 型多不饱和脂肪酸进行了定性和定量分析。

关键词:脂肪酸 碰撞诱导解离 电子轰击 质谱

鱼油与其它动植物油的不同在于它含有更多的不饱和脂肪酸(UFA),特别是 ω -3 型多不饱和脂肪酸(PUFAs),其中全顺-二十碳五烯酸[EPA, 20: 5(5, 8, 11, 14, 17)]和二十二碳六烯酸[DHA, 22: 6(4, 7, 10, 13, 16, 19)]经动物实验和流行病学调查等证明对心血管疾病有重要防治作用,作为营养和医药品自六十年代初期以来就已引起人们的极大重视^[1]。鱼油中含有数十种脂肪酸,由于脂肪酸或其甲酯等简单衍生物在质谱条件下双键可以自由移动,所以不饱和脂肪酸中双键的定位工作相当困难^[2]。本文以邻-氨基苯酚为远端官能团化学修饰试剂,研究了用不饱和脂肪酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的 EIMS 和碰撞诱导分解-质量分离离子动能谱(CID-MIKE)进行双键定位的方法^[3,4],并在鱼油中不饱和脂肪酸的分析应用中取得了满意的结果。

1 实验

1.1 样品处理:鱼油经皂化和除去不皂化物后,在硫酸酸化条件下用乙醚抽出混合脂肪酸,再与醋酸铅-乙醇溶液在低于 15℃ 的温度下反应 24hr(脂肪酸/醋酸铅/乙醇 $\approx$ 1/0.5/4),滤除饱和脂肪酸铅,再加稀醋酸酸化并用乙醚抽出可得饱和脂肪酸。在 80~100℃ 和四聚磷酸乙酯(PPE)存在下,脂肪酸与邻-氨基苯酚按式(1)反应生成 2-烯基苯并噁唑衍生物:



1993 年 12 月 23 日收

产物经纯化后供 GC/EIMS 作不饱和脂肪酸定性分析用。MIKE 谱试样可不分离饱和脂肪酸用混合脂肪酸直接衍生化。鱼油中脂肪酸的定量分析用其甲酯衍生物由气相色谱的峰面积归一化法确定。

1.2 分析条件

质谱条件: EIMS 加速电压 3kV, 电子能量 70eV, 源温 $\sim 200^{\circ}\text{C}$, 全部测试均由 Finuigan MAT 312/SS 200 质谱计完成;

不饱和脂肪酸 2-烯基苯并噁唑衍生物 GC/EIMS 定性分析条件: 0.24mm $\times$ 30m DB-5 石英毛细管柱, 起始温度 200°C , 程升 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 350°C , 质谱条件同上。

鱼油中脂肪酸定量分析用脂肪酸甲酯衍生物的 GC 分析条件: 0.25mm $\times$ 30m PEG20M 交联石英毛细管柱, 起始温度 100°C , 程升 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 250°C , 岛津 C-R3A 色谱数据处理机记录和计算;

CID-MIKE 谱条件: EI 源第二无场区靶气 He, 电场电压 $E_0 = 505\text{V}$, 降低电压扫描, 电压值用 VICTORIA DM-100 型数字万用表读取, MIKE 谱图用 C-R3A 记录。

棕榈酸、油酸、棕榈油酸、亚油酸、花生四烯酸和 DHA 等标样的衍生化和测试条件同上。

2 结果和讨论

2.1 2-烯基苯并噁唑衍生物的 EIMS 谱

与脂肪酸或其甲酯相比, 由于出现能苯并噁唑 $\text{C}=\text{C}<\text{酯}$, 所以 2-烯基苯并噁唑在 EI 源中主要给出电荷定域在含氮环而不是双键位置上的离子, 通过连续的自由基引发 C—C 单裂反应产生系列碎片离子, 可以避免烯基中双键的移动。

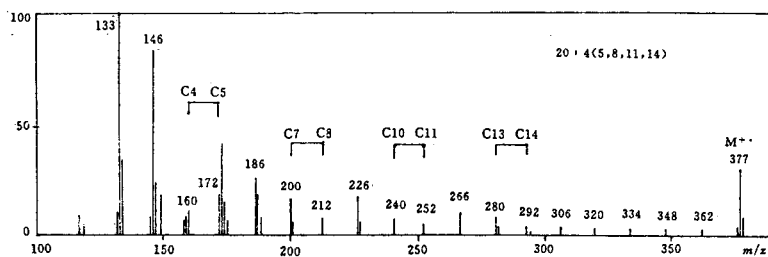


图 1 花生四烯酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的 EIMS 谱

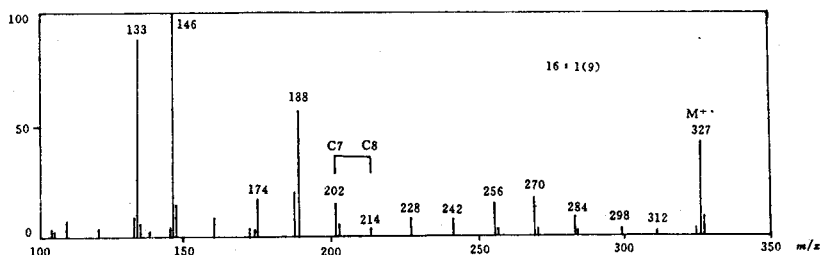


图 2 棕榈油酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的 EIMS 谱

不饱和脂肪酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的典型 EIMS 谱示于图 1 和 2。由花生四烯酸 20:4(5,8,11,14)衍生物的 EIMS 谱(图 1)可见:其谱图可用由高质量端开始的分子离子和系列簇离子表征,各簇中丰度最大的离子都是由连续消除含碳原子集团后形成的碎片离子。例如分子离子 m/z 377 和下一个碎片离子 m/z 362 相差 15amu,相当于丢失甲基(CH_3),大多数相邻碎片离子峰(例如从衍生化前脂肪酸的羧基碳数起第 19 和 18 位碳键断裂消除第 19 位碳时产生的 m/z 362 和 348)相差 14amu 可由丢失次甲基(CH_2)说明。但这里有 4 对相邻碎片峰(例如第 14 位和 13 位碳键断裂消除第 14 位碳时产生的 m/z 292 和 280)有反常质量差 12amu,而且相邻碎片峰有反常质量差的数目与原宗不饱和脂肪酸中所含双键的数目一致。为了便于从直观上理解质谱断裂和双键位置的关系,我们可以设想在位于 C_n 和 C_{n+1} 碳原子间的双键断裂之前,一个氢原子从 C_n (碳原子保留)移动到 C_{n+1} (碳原子脱除),这样双键断裂导致丢失 CH_2 即 C_n 和 C_{n+1} 峰相差 14amu,这时若进一步脱除 C_n 则只丢失一个碳原子,即 C_n 和 C_{n-1} 峰之间质量差为 12amu。由此可建立 EIMS 的双键定位规则如下:在饱和脂肪酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的 EIMS 谱中,由 C-C 单键断裂丢失 CH_2 得到的相邻离子峰的质量数相差 14amu。对 PUFAs,如果原始酸的 $\text{C}=\text{C}$ 双键位于 C_n 和 C_{n+1} 之间,则 C_{n-1} 和 C_n 碎片离子峰的质量将相差 12amu,但如棕榈油酸 16:1(9)衍生物的谱图(图 2)所示,这一规则对单不饱和脂肪酸有例外,当双键位于 C_n 和 C_{n+1} 时, C_{n-2} 和 C_{n-1} 碎片峰的质量数相差 12amu。利用上述规则,鱼油中多数不饱和脂肪酸都可以用 GC/EIMS 方法加以鉴定。

2.2 2-烯基苯并噁唑衍生物的 MIKE 谱

选择分子离子 m/z 377 为母离子,由花生四烯酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的 MIKE 谱(图 3)可见,有 3 对相邻碎片峰 $\text{C}_{14}-\text{C}_{13}$, $\text{C}_{11}-\text{C}_{10}$ 和 C_8-C_7 质量相差 12amu,即 MIKE 和 EIMS 有相同的双键定位规则。但在本例所示谱图中 C_5-C_4 之间相差 13amu,它主要是由人工读数引起的误差。为消除实验条件下记录和噪音引起的误差, EIMS 双键定位规则用于 MIKE 谱时可修正如下:若 $\text{C}=\text{C}$ 双键位于 C_n 和 C_{n+1} 处,则 C_{n-1} 和 C_{n+1} 碎片峰之间质量数将相差 26amu。如图 4 所示,这一规则也适用于单不饱和脂肪酸。以花生四烯酸为例,示意图(式 2)对 EIMS 和 MIKE 谱中断裂模式和定位规则间的关系进行了对比。

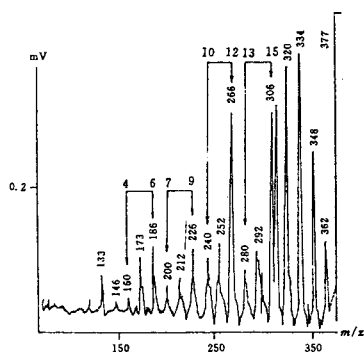
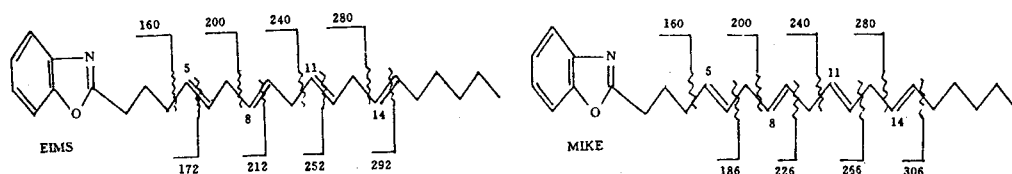


图 3 花生四烯酸 2-烯基苯并噁唑衍生物的 MIKE 谱



式(2)

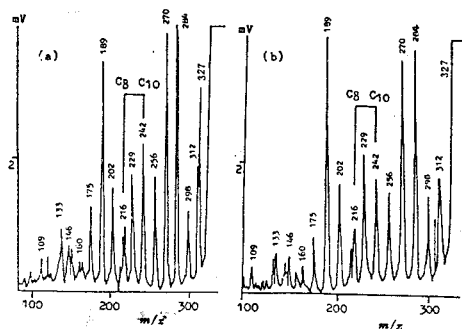


图 4 沙丁鱼油脂脂肪酸混合物中
(a)和标样(b)棕榈油酸 2-烯基苯
并噻唑衍生物的 MIKE 谱

用 MIKE 谱进行双键定位的优点是:首先 26amu 质量差包括由三个连续的离子峰 C_{n-1} 、 C_n 和 C_{n+1} 形成的峰簇,其丰度比有一定规律,即 C_{n-1} 峰的丰度总是最低,这个峰丰度规律也可帮助进行双键定位,而且这一定位规则与 EIMS 不同,对单和多不饱和脂肪酸都适用。其次 MIKE 谱尤其在高质量区有极易鉴别的高强度碎片峰,可与 EIMS 互相补充。最后 MIKE 可不经分离对混合物进行直接分析。选择 m/z 327 为母离子,图 4 的沙丁鱼油脂脂肪酸混合物中(a)和标样(b)棕榈油酸 2-烯基苯并噻唑衍生物的 MIKE 谱基本相同,即当仪器有足够分辨能力和灵敏度时,CID-MIKE 将为脂肪酸混合物直接分析提供一个良好的方法。

2.3 鱼油中脂肪酸的组成

如表 1 所示,鱼油中不饱和脂肪酸(UFA)约占 50~60%,其中亚麻酸 18:3(9,12,5)、EPA 和 DHA 等 ω -3 型多不饱和脂肪酸占 20~30%。鱼油中脂肪酸的组成依鱼种和油的存放时间而异,例如除鱿鱼外,经济鱼类中上海马面鲷油富含 DHA(16.48%),而沙丁鱼油中 EPA 的含量最高(13.23%),这两种鱼油可以补充其它鱼油或食品等中 EPA 和 DHA 的不足。此外长期放置例如马面鲷和鳕鱼油中的 PUFAs 特别是 EPA 含量下降,为在储存和加工利用过程中如何保持有效营养成分提出了新的课题。

表 1 鱼油中脂肪酸的组成(%重量)

	鱿鱼	马面鲷 *	上海马面鲷	沙丁鱼	鳕鱼 * *	小提鱼
14:0	3.56	4.51	2.34	0.33	2.70	4.91
16:0	15.06	20.25	18.34	18.80	22.01	23.66
16:1	3.44	8.07	8.85	6.69	10.06	7.63
18:0	3.25	5.01	5.29	2.53	6.03	5.86
18:1	15.62	20.33	17.87	12.45	20.72	20.04
18:2	1.31	1.73	4.25	1.44	3.88	1.60
18:3	2.04	2.72	3.46	4.79	3.18	2.47
20:4	1.81	0.98	1.09	1.06	0.79	0.85
20:5	10.56	8.02	6.84	13.23	5.10	7.28
22:6	19.22	13.01	16.48	9.36	10.52	11.44
其它	24.13	15.37	15.19	29.32	15.01	14.26
UFA	54.00	54.86	58.84	49.02	54.25	51.31
ω -3 型	31.82	23.75	26.78	27.38	18.80	21.19

* 放置一个月

* * 放置五个月

参 考 文 献

- 1 金田尚志. 日本水产学会志, 1964, 30: 419
- 2 张继跃等. 质谱学报, 1987, 8(1): 1
- 3 Yu Qitao *et al.* Biomed Mass Spectrom, 1986, 13: 211
- 5 孙琢琰, 董振温编著. 有机光波谱分析的原理和应用, 第一版, 大连: 大连理工大学出版社, 1993

A Study on Unsaturated Fatty Acids in Fish Oil by EIMS and CID Spectroscopy of 2-Alkenylbenzoxazoles

Dong Zhenwen, Sun Zhuolian, Cao Zhongmin

(Dalian University of Technology, Dalian 116012, China)

Fang Yuan

(Dalian Center Hospital, Dalian 116033, China)

Received 1993-12-23

Abstract

In this paper o-aminophenol was used to derivatize the unsaturated fatty acid so as to fix the double bond whose positions were determined by GC/EIMS and CID/MIKE spectroscopy. It was found that the amount of ω -3 PUFAs in fish oil differs with the kinds of fish and changes with the time of storage.

Key Words: fatty acid, collision induced dissociation, electron impact, mass spectrometry