

文章编号:1009-038X(2004)02-0090-04

鲨鱼肝油中烷氧基甘油的成分分析

王林祥, 王利平, 秦 昉, 陶冠军

(江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 对澳洲塔斯玛尼亚湾生长的鲨鱼肝脏中提取的油, 经氢氧化钾的甲醇溶液皂化, 萃取出不皂化物并与乙酸酐酯化, 采用气质联用技术检出了其中含有 6 种烷氧基甘油. 采用气相色谱内标法对其各组分进行定量分析, 通过加标回收试验得出回收率为 96.28%, 初步建立了一种简便的检测方法.

关键词: 鲨鱼肝油; 烷氧基甘油; 二脂肪酰基甘油醚

中图分类号: TS 254.7

文献标识码: A

Analysis of Alkoxyglycerols Components in Shark Liver Oil

WANG Lin-xiang, WANG Lli-ping, QIN Fang, TAO Guan-jun

(Testing and Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A gas chromatography/mass spectrometry method was developed for the identification of 6 alkoxyglycerols components in shark oil (ocean near Tasmania of Australia). The sample was saponified with potassium hydroxide in aqueous methanol and non-saponifiable neutral lipids (e. g. alkoxyglycerols) was extracted into hexane/chloroform. The non-saponifiable neutral lipids fractions were treated by acetic anhydride to convert alkoxyglycerols to their corresponding acetic ester. The alkoxycerols were quantified with internal standard by gas chromatography.

Key words: shark liver oil; alkoxyglycerols; diacylglyceryl ether

早在 1936 年, 就有人对鲨鱼肝油的化学成分进行了研究. 由于其活性成分对维持机体的正常生理平衡有重要的调节作用, 如增强机体的免疫力、一定的抗癌活性等, 因此, 国内外对鲨鱼肝油的研究日益增多. 近年来, 人们发现鲨鱼肝油含有与抗癌有关的活性物质^[1,2]; 主要包括多烯不饱和脂肪酸、萜烯类、烷氧基甘油类 (Alkoxyglycerols, 简称 AKGs). 脂肪酸和角鲨烯等萜烯化合物检测已有报道^[4,5], 但烷氧基甘油类的分析国内尚未见报道.

鲨鱼体积庞大, 肝占体重的 20%~25%, 肝含

油量达 70% 以上^[3], 鲨鱼肝油的主要成分是二脂肪酰基甘油醚 (Diacylglyceryl ether, 简称 DAGE), 占肝油总质量的 50% 以上. DAGE 皂化成 AKGs, 此外有少量三甘油酯 (Triacylcerol) 和碳氢化合物 (Hydrocarbon) 如角鲨烯, 还有一些微量维生素和极性油酯等. 国外对鲨鱼及其抗体的研究比较系统^[5,6], 认为其能激活体内免疫细胞, 从而杀灭侵入体内的细菌、病毒. AKGs 能穿透细胞膜, 在细胞内中和自由基, 具有非凡的抗氧化能力, 能显著降低放疗化疗对机体的损伤. 我国有丰富的鲨鱼肝油资

收稿日期: 2003-06-04; 修回日期: 2003-07-12.

作者简介: 王林祥 (1962-), 男, 江苏常州人, 高级工程师.
万方数据

源,本研究对合理开发这一资源有着积极的意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 澳洲塔斯玛尼亚湾(Tasmania of Australia)深海鲨鱼肝油,由无锡今朝伟业生物工程有限公司提供.

1.1.2 仪器与试剂 Finnigan Trace MS 气质联用仪;美国 Finnigan 公司制造;GC-14 气相色谱仪;日本 Shimadzu 公司制造;SBXZ-1 旋转蒸发器;上海玻璃厂制造.十八烷氧基甘油(Sigma),十九酸甲酯(Aldrich),纯甲醇,正己烷,氯仿,乙酸酐及普氮,均为分析纯试剂.

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 精确称取约 0.5 000 g 鲨鱼肝油样品于 50 mL 烧瓶中,加 10 mL(5 g/dL)氢氧化钾的甲醇溶液,在 80 ℃充氮气保护下回流皂化 3 h,冷却;用 V(正己烷):V(氯仿)=4:1 混合溶剂 8 mL 萃取不皂化物,重复 3 次;合并萃取液,用旋转蒸发器减压蒸干,加 2 mL 乙酸酐 90 ℃酯化 0.5 h,冷却后转移至 25 mL 容量瓶中,进行 GC/MS 分析.如果定量分析先加 1 mL 十九酸甲酯内标溶液,再用正己烷定容后进行气相色谱分析.

1.2.2 GC/MS 联用色谱条件 OV-1701 弹性石英毛细管柱,柱长 30 m, I. D 0.25 mm, 液膜厚度 0.25 μm,载气为氦气,体积流量 1 mL/min,分流比 30:1,气化室温度 300 ℃,起始温度 200 ℃,保留 2 min,以 10 ℃/min 升温至 280 ℃,保留 20 min.

1.2.3 质谱条件 电离方式 EI,电子能量 70 eV,离子源温度 200 ℃.电子倍增器电压 350 V,质量扫描范围 33~500 amu.

1.2.4 气相色谱定量分析条件 载气:氮气,检测器:FID,燃气(氢气)压力 0.65 kg/cm²,助燃气(空气)压力 0.50 kg/cm²,其它色谱条件同 GC/MS 联用色谱条件.

2 结果与讨论

2.1 烷氧基甘油的定性分析

烷氧基甘油类化合物(AKGs)结构通式为 CH₂(OH)—CH(OH)—CH₂—OR,R 为高级饱和或不饱和烷烃,是鲨鱼肝油中主要成分 DAGE 的皂化产物.由于 AKGs 没有紫外吸收,折光检测器灵敏度太低,建立高效液相色谱分析方法在分离和检测上都比较困难.以气相色谱或气质联用分析,样品必须衍生化,鲨鱼肝油皂化后的 AKGs 上的二

个羟基衍生化可以有三甲基硅烷化、三氟乙酰化和醋酐乙酰化等,作者采用醋酐作为酰化试剂,效果较好(见图 1).

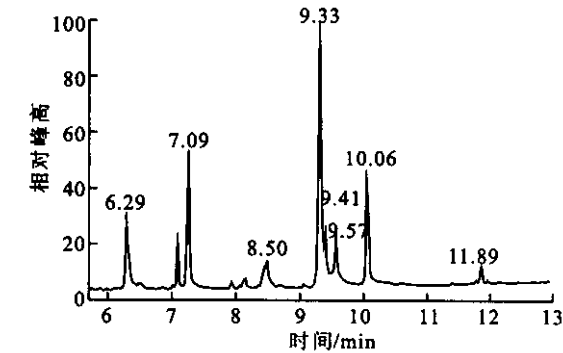


图 1 烷氧基甘油的 GC/MS 总离子流色谱图

Fig. 1 The GC/MS chromatogram of alkoxyglycerols

根据质谱重构离子色谱图中各出峰的质谱,对每个峰进行鉴定,经计算机自动检索和质谱裂分规则确定出 6 种烷氧基甘油类化合物(见表 1).在图 1 中除检出 6 种烷氧基甘油类化合物外,出峰较早的是脂肪酸甲酯类,保留时间 10.06 min 出的峰经库谱检索为角鲨烯.

表 1 烷氧基甘油 GC/MS 鉴定结果

Tab. 1 The identification of alkoxyglycerols by GC/MS

保留时间/min	分子式	相对分子质量	鉴定结果
7.09	C ₂₃ H ₄₂ O ₅	398.3	二乙酰基十一烷氧基甘油
7.26	C ₂₃ H ₄₄ O ₅	400.3	二乙酰基十六烷氧基甘油
9.33	C ₂₅ H ₄₆ O ₅	426.3	二乙酰基十八烷氧基甘油
9.57	C ₂₅ H ₄₈ O ₅	428.4	二乙酰基十八烷氧基甘油
11.89	C ₂₇ H ₅₀ O ₅	454.4	二乙酰基二十一烷氧基甘油
11.99	C ₂₇ H ₅₂ O ₅	456.4	二乙酰基二十烷氧基甘油

以二乙酰基十八烷氧基甘油和二乙酰基十六烷氧基甘油的质谱图为例(见图 2 a,b)分析其碎片裂分机理,在图 2a 二乙酰基十八烷氧基甘油的质谱图中,有分子离子峰 M⁺(m/z 426.4),失去一个醋酸 M—Ac(m/z 366.4),失去一个十八烷氧基 M—OC₁₈H₃₅(m/z 159.1)以及碎片 C₁₈H₃₅—OCH₂⁺(m/z 281.2)等.在图 2 b 二乙酰基十六烷氧基甘油的质谱图中,分子离子峰 M⁺不明显,但有失去一个醋酸,再失去一个乙酰基 M—Ac—CH₃CO(m/z 297.4),失去一个十六烷氧基 M—OC₁₆H₃₃(m/z 159.1)以及碎片 C₁₆H₃₃—OCH₂⁺(m/z 255.3)等.在所有的二乙酰基烷氧基甘油质谱图中,有一个共同的碎片,分子离子失去一个烷氧基 M—OR(m/z 159.1).

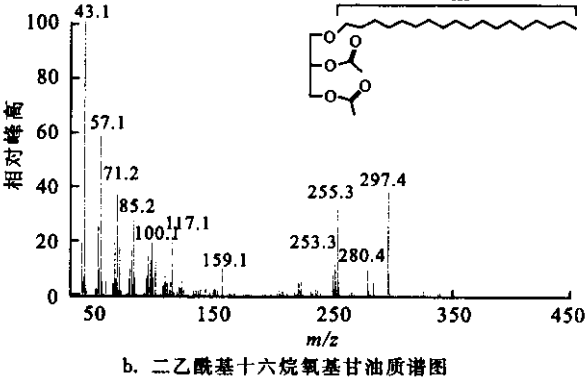
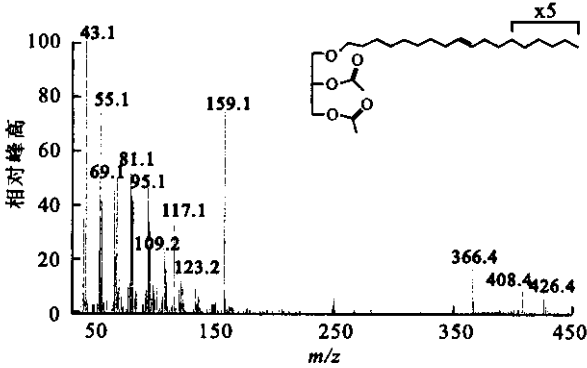


图 2 烷氧基甘油质谱图
Fig. 2 The mass spectrometry of alkoxyglycerols

2.2 烷氧基甘油的定量分析

用气相色谱内标法,对所鉴定的各烷氧基甘油组分进行定量分析.以 Sigma 公司的十八烷氧基甘油作为参照样,Aldrich 公司的十九酸甲酯作为内标,参照样和样品在相同的条件下样品预处理并加内标分析.定量分析气相色谱图见图 3,保留时间 10.7 min 的峰为十九酸甲酯内标,6 种烷氧基甘油出峰顺序与 GC/MS 定性结果一致.所有烷氧基甘油的定量响应值均以十八烷氧基甘油参照样的响应值计,计算公式为

$$\text{烷氧基甘油某组分的质量分数} = \frac{A_i/A_{\text{内}} \times m_s}{A_s/A_{\text{S内}} \times m_{\text{样}}}$$

式中: A_i 为烷氧基甘油某组分的峰面积;
 $A_{\text{内}}$ 为分析样品时十九酸甲酯内标的峰面积;
 A_s 为十八烷氧基甘油参照样的峰面积;
 $A_{\text{S内}}$ 为分析参照样时十九酸甲酯内标的峰面积;
 m_s 为十八烷氧基甘油参照样的质量;
 $m_{\text{样}}$ 为鲨鱼肝油样品的质量.

分析结果见表 2.加十九酸甲酯内标是为了消除仪器分析时的误差,由于在分析样品和参照样时加入内标的质量和体积均相等,计算公式中内标的质量可消除方数据

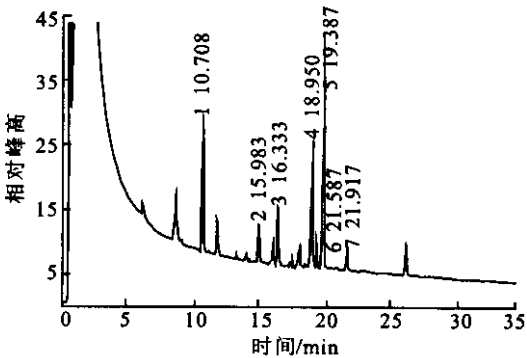


图 3 烷氧基甘油的定量分析气相色谱图
Fig. 3 The GC chromatogram of alkoxyglycerols

表 2 烷氧基甘油 GC 定量结果
Tab. 2 The quantitative result of alkoxyglycerols by GC

化合物	分子式	质量分数/%
十六一烷氧基甘油	C ₁₉ H ₃₈ O ₃	1.81
十六烷氧基甘油	C ₁₉ H ₄₀ O ₃	5.18
十八一烷氧基甘油	C ₂₁ H ₄₂ O ₃	17.63
十八烷氧基甘油	C ₂₁ H ₄₄ O ₃	1.79
二十一烷氧基甘油	C ₂₃ H ₄₆ O ₃	0.90
二十烷氧基甘油	C ₂₃ H ₄₈ O ₃	0.18
总烷氧基甘油		27.49

由表 2 可以看出,在烷氧基甘油中主要成分是十八一烷氧基甘油,占检出 6 种烷氧基甘油总质量的 64%.研究中还发现化学合成的烷氧基甘油,每个成分都有 D, L 二种空间构型,因为烷氧基甘油中甘油中间一个碳是手性碳,而鲨鱼肝油中的烷氧基甘油每个成分只有一种构型,其功效等方面有待进一步研究.

2.3 回收试验

对 3 个批号的鲨鱼肝油样检测十八烷氧基甘油含量的同时,分别在样品中添加 Sigma 公司十八烷氧基甘油参照样,样品处理按 1. 2. 1 进行,GC 分析结果见表 3.

表 3 十八烷氧基甘油回收试验
Tab. 3 The recovery experiment of octadecylglycerol

样 品 批 号	检测量/ (mg/g)	添加量/ (mg/g)	回收量/ (mg/g)	回收率/ %
021216	16.76	20.33	19.56	96.21
030107	16.42	21.45	20.28	94.55
030112	17.28	20.42	20.03	98.09

由回收试验得出检测十八烷氧基甘油的 3 次全过程平均回收率为 96.28%,说明该方法在皂化、

萃取、酯化等样品预处理环节比较完全,内标法定量检测结果比较正确。

定性检出 6 种烷氧基甘油化合物,对研究该类功能性有效成分具有较大的参考价值。

3 结 论

- 1)对鲨鱼肝油进行样品预处理后,经 GC/MS
- 2)通过气相色谱内标法对烷氧基甘油各种成分进行定量分析,初步建立了一种简便的检测方法。

参考文献:

[1] 张野平,赵润洲,赵笑梅. 姥鲨鱼肝油乳免疫作用的研究[J]. 沈阳药学院学报,1989,6(3):186—188.

[2] 张豁中,宋修俭,李玉山. 鲨鱼肝油研究概况[J]. 中国海洋药物,1991,10(1):30—31.

[3] 张豁中,金向群,宋修俭. 国产姥鲨鱼肝油中脂肪酸和角鲨烯的成分分析及含量测定[J]. 中国海洋药物,1991,10(3):7—9.

[4] 宋修俭,顾茂书,陈少龙. 国产阔口真鲨鱼肝油中脂肪酸和角鲨烯的成分分析及含量测定[J]. 中国海洋药物,1994,13(4):26—28.

[5] Ohta Y, Haliniewski D E, John Hansen. Isolation of transporter associated with antigen processing genes, TAP1 and TAP2, from the horned shark *Heterodontus francisci*[J]. **Immunogenetics**, 1999, 49:981—986.

[6] Diaz M, Stanfield R L, Greenberg A S. Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development[J]. **Immunogenetics**, 2002, 54:501—512.

(责任编辑:朱 明)

(上接第 89 页)

[3] Kenji Dobashi. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from seaweed *Hizikia fusiforme*[J]. **Carbohydrate Res**,1989,194: 315—320.

[4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999.

[5] Gibbons M N. The determination of methylpentoses[J]. **Analyst**,1955,80:267—276.

[6] Bitter T. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. **Analytical Biochemistry**,1962,(4):330—334.

[7] 张龙翔. 生物实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社,1981.

[8] Rees D A. Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides[J]. **J Chem Soc**, 1961:5168—5171.

[9] Lloyd A G. Infrared studies on sulphate esters[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1961,46:108—115.

(责任编辑:朱 明)