微波-超声波协同一步提取衍生化-气相色谱-质谱联用
快速分析中药材猫爪草中的脂肪酸

詹汉英, 刘瑞林, 王德金, 袁 静, 胥生杰, 张志琪*
(药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西师范大学化学化工学院, 陕西 西安 710100)

摘要:建立了一种微波-超声波协同一步提取衍生化-气相色谱-质谱联用快速测定中药材猫爪草中低含量脂肪酸的方法。以总脂肪酸的色谱峰面积为响应指标,采用响应曲面法优化了主要工艺参数,其结果为:猫爪草粉末 5.0 g,正己烷 50.0 mL,微波功率 500 W,反应温度 50 ℃,催化剂用量 0.30 g,甲醇用量 4.0 mL,提取衍生化时间 8 min。以内标法定量各个脂肪酸的含量,一步提取衍生化法获得的总脂肪酸峰面积 $((3.327 \pm 0.023) \times 10^7, n = 3)$ 和总不饱和脂肪酸含量 $((13.59 \pm 0.30) \text{ mg/g}, n = 3)$ 明显高于传统方法 $((2.410 \pm 0.036) \times 10^7 (n = 3)$ 和 $(12.05 \pm 0.34) \text{ mg/g} (n = 3))$ 。该方法简化了复杂的样品处理过程,缩短了反应时间,降低了分析成本,改善了提取和衍生化效率,尤其是减少了不饱和脂肪酸的氧化和分解。该方法具有简单、快速和实用性的特点,是一种极具应用潜力的中药材中低含量脂肪酸的快速分析方法。

关键词:一步提取衍生化;微波-超声波协同作用;气相色谱-质谱联用;响应曲面优化法;脂肪酸;猫爪草
中图分类号:O658 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8713(2013)03-0240-09

Rapid determination of fatty acids in *Ranunculus ternatus* Thunb. by microwave-ultrasonic synergistic one-step extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry

ZHAN Hanying, LIU Ruilin, WANG Dejin, YUAN Jing, XU Shengjie, ZHANG Zhiqi*
(Key Laboratory of Medicinal Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry of Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710100, China)

Abstract: A rapid and simple microwave-ultrasonic synergistic one-step extraction-derivatization (MUED) method and gas chromatography-mass spectrometry was established for the determination of low content fatty acids (FAs) profile in *Ranunculus ternatus* Thunb. The critical experimental parameters for MUED method were optimized with response surface methodology by taking the chromatographic peak areas of total FAs as a major response index. The best technological parameters were determined as 5.0 g of *Ranunculus ternatus* Thunb. powder, 50.0 mL of *n*-hexane, 500 W of microwave power, 50 ℃ of reaction temperature, 0.30 g of catalyst (KOH), 4.0 mL of derivatization reagent (methanol) and the time of extraction-derivatization of 8 min. The contents of individual FAs were quantified by internal standard method. The results showed that the chromatographic peak areas of the total FAs and the total unsaturated FAs contents obtained with MUED were $(3.327 \pm 0.023) \times 10^7 (n = 3)$ and $(13.59 \pm 0.30) \text{ mg/g} (n = 3)$ respectively. They were markedly higher than those obtained by the conventional method which were $(2.410 \pm 0.036) \times 10^7 (n = 3)$ and $(12.05 \pm 0.34) \text{ mg/g} (n = 3)$ respectively. The MUED method simplified the complicated sample handling steps, shortened the sample preparation time, reduced the cost of analysis, and improved the extraction and derivatization efficiency of the lipids, especially weakened the oxidization and decomposition of

* 通讯联系人. E-mail: zqzhang@snnu.edu.cn.
基金项目: 国家自然科学基金项目(21275098).
收稿日期: 2012-11-05

the unsaturated FAs. The simplicity, speed and practicability suggest the proposed method has significant potential for the determination of low content FAs in herbal medicines.

Key words: one-step extraction-derivatization; microwave-ultrasonic synergistic action; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); response surface methodology; fatty acids; *Ranunculus ternatus* Thunb.

脂肪酸在生物系统中扮演着诸多重要的角色,包括提供能量、充当信号分子等,同时也是细胞膜的重要组成部分^[1]。脂肪酸分析的瓶颈是样品的制备技术。脂肪酸分析的传统方法一般包括脂类物质的提取、脂肪酸衍生化、衍生化产物的提取及分析等步骤。采用不同溶剂和方法从不同基质中提取和衍生化脂肪酸的制备方法已有报道^[2,3]。研究表明,微波和超声波均能促进和改善脂类以及生物活性物质的提取,微波辐射也可获得更高的衍生化效率以及更短的样品制备时间,同时微波亦可以提供一个舒适、安全、清洁的化学反应环境^[4]。微波加热与传统的加热方法相比具有操作简单、耗能低、加热快等优点^[5,6]。超声波辐射可以有效地促进分析物质的乳化和质量转移,故在超声波条件下酯化反应速率比在搅拌条件下更快^[7]。每一种方法都有它的优点和缺点,例如微波辐射往往会产生不均匀的加热。微波-超声波协同提取,这样一种将微波提取和超声波提取相结合互补的技术已显示出更多的优势^[8-11]。已有文献报道,微波-超声协同提取油脂的效率明显高于微波辅助提取、索氏提取以及有机溶剂回流提取^[12]。

近年来,为了简化脂肪酸分析的样品制备过程,已建立了一些一步提取衍生化的方法,如 Abdulkadir 与 Tsuchiya^[13] 利用 14% BF₃ 甲醇溶液作为衍生化试剂,在加热 100 ℃、120 min 的条件下,建立了海洋生物样品脂肪酸的一步提取衍生化定性、定量分析方法;Li 等^[14] 采用超声辅助技术在 NaOH-甲醇-正己烷体系中建立了对斑马鱼卵中脂肪酸的一步提取衍生化分析;作者所在研究小组以紫苏籽为研究模型,建立了微波辅助一步提取衍生化气相色谱-质谱联用快速分析中药中脂肪酸的分析方法^[15],结果表明该方法较传统的方法不仅缩短了样品的制备时间、提高了提取和衍生化效率,而且降低了不饱和脂肪酸的氧化和异构化现象。

猫爪草为毛茛科植物小毛茛 (*Ranunculus ternatus* Thunb.) 的干燥块根,作为一味传统的中草药,它具有清热解毒、散结消淤之功效,用于治疗淋巴结核、肺结核、淋巴结炎、淋巴瘤以及甲状腺肿瘤等^[16]。已有研究表明猫爪草提取物中含有肉豆蔻

酸、棕榈酸、谷甾醇、低含量脂肪油以及丰富的不饱和脂肪酸^[17]。本研究以猫爪草中脂肪酸为分析对象,采用微波-超声波协同技术,建立一种简单、快速、可靠、准确的中药材中低含量脂肪酸的方法,即微波-超声波协同一步提取衍生化 (MUED) 的气相色谱-质谱联用分析方法。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

FW400A 高速万能粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司); XO-SM200 微波-超声波组合反应系统 (南京先欧仪器制造有限公司); RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); QP2010 气相色谱-质谱联用仪 (日本岛津公司); FA 电子分析天平 (上海恒平科学仪器有限公司); 高速离心机 (长沙英泰仪器有限公司)。

猫爪草 (购于西安百姓大药房,经药用资源与天然药物化学教育部重点实验室任毅教授鉴定)。甲醇、正己烷、氯化钠、盐酸、氢氧化钾 (国药集团化学试剂有限公司); 十九烷酸甲酯 (纯度为 99.5%, 美国 Sigma 公司), 使用前用正己烷将其配制为 5.0 g/L 作为内标溶液,并将其储备于 5 ℃ 棕色容量瓶中。

1.2 样品前处理

1.2.1 MUED 程序

准确称取 5.00 g 猫爪草粉末 (40 目) 与 0.30 g 固体 KOH 于 100 mL 专用玻璃反应器内,随后加入 50.0 mL 正己烷、4.0 mL 甲醇、2.5 mL 内标溶液,按照图 1 所示,连接好回流装置,设定微波辐照功率为 500 W、超声功率为 240 W,反应温度为 50 ℃,并在此条件下固定反应 8 min。待反应完成后,立即加入 10.0 mL 饱和 NaCl 溶液,阻止衍生化反应的继续进行。待混合液冷却 1 min 左右,用高速离心机在 3 500 r/min 的转速下离心 3 min,收集上层有机相;另外用 10.0 mL 正己烷重复 3 次萃取下层混合液中的脂肪酸甲酯,最后将所有上层有机相进行浓缩、定容至 2.0 mL,紧接着用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤,然后取 1 μL 滤液进行 GC 或 GC-MS 分析。

图 1 MUED 装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus of MUED method

1.2.2 传统的多步提取及衍生化过程

油脂的传统提取及衍生化方法均按照国际标准化 (International Organization for Standardization, IOS) 方法进行^[15]。传统提取方法如下:准确称取约 50.00 g 经干燥、粉碎、过 40 目筛后的猫爪草样品置于索氏提取器内。同时连接好回流装置,使用 500 mL 正己烷作为溶剂进行回流、萃取 8 h。然后用旋转蒸发器将提取物在 50 ℃ 真空下蒸发、冷却至室温,得到亮黄色的油状物,称重、备用。

传统的衍生化过程:称取猫爪草油约 90 mg (等量于 5.0 g 猫爪草)置于装有 10.0 mL 正己烷的锥形瓶中溶解,然后加入 2.0 mL 内标溶液、2.0 mL 氢氧化钾的甲醇溶液 (2 mol/L),振荡 30 s 后置于 37 ℃ 的水浴中加热 10 min。待冷却后将 2.0 mL 盐酸水溶液 (2 mol/L) 加入至混合液进行中相,待分层后收集上层清液,同时加入 5.0 mL 正己烷萃取下层混合液中的脂肪酸甲酯。将所得脂肪酸甲酯进行浓缩、定容至 2.0 mL,用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤,取 1 μL 滤液进行 GC 或 GC-MS 分析。

1.3 GC-MS 分析条件

色谱柱:RTX-5 MS 5% 联苯-95% 二甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。柱温升温程序:从 80 ℃ 开始,先以 60 ℃/min 升至 200 ℃,保留 4 min 后,以 3 ℃/min 升至 230 ℃,保留 6 min。柱前压:99.8 kPa;载气:高纯度氦气 (99.999%);柱内载气流量:3.0 mL/min;分流比:20:1。汽化室温度:250 ℃;进样量:1 μL。

离子源:电子轰击源;离子源温度:200 ℃;接口温度:250 ℃;电子能量:70 eV;倍增器电压:0.9 kV;溶剂延时:4 min;扫描范围: m/z 40 ~ 600。

1.4 定性和定量

对总离子流图中的各峰经质谱扫描后得到质谱图,经人工解析及 LC solution 工作站 NIST27 和 NIST147 标准质谱图检索定性,采用内标法定量各种脂肪酸的含量。样品中各个脂肪酸含量 (C_{FA} , mg/g) 的计算方法如式 (1)^[13]:

$$C_{FA} = \frac{A_s}{A_{IS}} \times \frac{C_{IS} \times V_{IS}}{W} \quad (1)$$

式 (1) 中, A_s 为样品溶液中脂肪酸甲酯的峰面积, A_{IS} 为内标物的峰面积, C_{IS} 为内标溶液的质量浓度 (mg/mL), V_{IS} 为内标溶液的体积 (mL), W 为样品的质量 (g)。

1.5 响应曲面法优化 MUED 程序

响应曲面分析法 (response surface methodology, RSM) 以较少的试验次数和较短的时间对所选试验参数进行全面的研究,在天然药物有效成分研究等领域有广泛的应用^[2,15,18]。根据单因素试验结果,选取微波功率 (X_1 , W)、反应温度 (X_2 , ℃)、甲醇用量 (X_3 , mL) 和催化剂用量 (X_4 , g) 4 个主要影响 MUED 方法的因素进行考察,每个因素选取高、中、低 3 个水平,采用响应曲面法中的 Box-Behnken 设计方案 (见表 1) 进行试验,以总脂肪酸的色谱峰面积 (Y) 作为响应值,对试验结果进行分析,建立二次多项式数学模型:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^{k+1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2)$$

式 (2) 中, X_i 和 X_j 为自变量, β_0 为常数项, β_i 为线性系数, β_{ij} 为交互项系数, β_{ii} 为二次项系数, ε 为误差。

表1 Box-Behnken 试验设计和响应结果
Table 1 Box-Behnken design (BBD) and observed responses

Run	Microwave power (X_1)/W	Reaction temperature (X_2)/℃	Amount of methanol (X_3)/mL	Amount of catalyst (X_4)/g	Responses (total fatty acid peak area, Y)/10 ⁵	
					Experimental	Predicted
1	300 (−1)	30 (−1)	3 (0)	0.2 (0)	3.19	2.78
2	700 (+1)	30 (−1)	3 (0)	0.2 (0)	4.12	3.60
3	300 (−1)	70 (+1)	3 (0)	0.2 (0)	2.521	3.53
4	700 (+1)	70 (+1)	3 (0)	0.2 (0)	1.064	1.95
5	500 (0)	50 (0)	1 (−1)	0.05 (−1)	2.07	1.90
6	500 (0)	50 (0)	5 (+1)	0.05 (−1)	0.9	1.80
7	500 (0)	50 (0)	1 (−1)	0.35 (+1)	2.859	2.44
8	500 (0)	50 (0)	5 (+1)	0.35 (+1)	5.074	5.72
9	300 (−1)	50 (0)	3 (0)	0.05 (−1)	3.36	2.65
10	700 (+1)	50 (0)	3 (0)	0.05 (−1)	0.416	0.28
11	300 (−1)	50 (0)	3 (0)	0.35 (+1)	3.027	2.89
12	700 (+1)	50 (0)	3 (0)	0.35 (+1)	4.07	4.50
13	500 (0)	30 (−1)	1 (−1)	0.2 (0)	2.258	2.75
14	500 (0)	70 (+1)	1 (−1)	0.2 (0)	2.394	2.36
15	500 (0)	30 (−1)	5 (+1)	0.2 (0)	4.637	4.40
16	500 (0)	70 (+1)	5 (+1)	0.2 (0)	4.658	3.89
17	300 (−1)	50 (0)	1 (−1)	0.2 (0)	2.153	2.44
18	700 (+1)	50 (0)	1 (−1)	0.2 (0)	2.252	2.09
19	300 (−1)	50 (0)	5 (+1)	0.2 (0)	4.098	4.05
20	700 (+1)	50 (0)	5 (+1)	0.2 (0)	4.148	3.65
21	500 (0)	30 (−1)	3 (0)	0.05 (−1)	1.528	2.03
22	500 (0)	70 (+1)	3 (0)	0.05 (−1)	1.881	1.49
23	500 (0)	30 (−1)	3 (0)	0.35 (+1)	3.987	4.17
24	500 (0)	70 (+1)	3 (0)	0.35 (+1)	4.512	3.81
25	500 (0)	50 (0)	3 (0)	0.2 (0)	5.152	5.16
26	500 (0)	50 (0)	3 (0)	0.2 (0)	5.471	5.16
27	500 (0)	50 (0)	3 (0)	0.2 (0)	4.862	5.16

Numbers in the brackets are the coded values of the independent variables in the experimental design.

1.6 数据统计分析

采用 SPSS15.0 统计分析软件进行数据统计分析,取 $P < 0.05$ 或者 $P < 0.01$ 作为差异显著性的临界值。试验结果以平均值 $\pm$ 标准误差 (mean $\pm$ SE) 表示。

2 结果与讨论

2.1 MUED 方法超声波功率的优化

按照 1.2.1 节的实验方法,称取 5.00 g 猫爪草粉末,50.0 mL 正己烷,5.0 mL 甲醇,0.30 g KOH (固体),微波功率 450 W,反应温度 60 ℃,固定反应时间 6 min,考察不同超声波功率 (120、180、240、300、360 W) 对 MUED 方法的影响。从图 2 可以看出,随着超声波功率的逐渐升高,总脂肪酸峰面积呈现先增大后减小的趋势,以超声波功率为 240 W 时的总脂肪酸峰面积最大。这种现象可以解释为,随着超声波功率的增加,空化作用增强,提取和衍生化效率也随着改善,油脂的提取以及界面间的质量传递增大,使油和甲醇更容易混合。但是随着超声波

功率的进一步增加,提取和衍生化效率降低,这可能是由于在较高的超声波功率下,超声波自身的缓冲效应降低了空化作用^[19]。同时,由于有副反应 (诸如皂化反应) 伴随着酯交换反应的同时发生,从而减小了总脂肪酸的峰面积。

图2 超声波功率对于脂肪酸测定的 MUED 方法的影响
Fig. 2 Effect of ultrasonic power on the MUED method for the determination of fatty acids

2.2 响应曲面法优化结果

2.2.1 回归模型方程的建立及显著性检验

根据响应曲面法 Box-Behnken 设计 (BBD), 共对 27 个试验点进行试验,得到的 MUED 方法总脂肪酸峰面积见表 1。使用 Design-Expert software 7.1.3 Trial (State-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) 软件进行数据分析,以总脂肪酸峰面积为响应值,得到的多元二次回归模型方程为:

$$Y = [-13.244 + 0.031X_1 + 0.301X_2 + 1.173X_3 + 5.390X_4 - 1.492 \times 10^{-4}X_1X_2 - 3.063 \times 10^{-5}X_1X_3 + 0.033X_1X_4 - 7.188 \times 10^{-4}X_2X_3 + 0.014X_2X_4 + 2.821X_3X_4 - 3.111 \times 10^{-5}X_1^2 - 2.382 \times 10^{-3}X_2^2 - 0.215X_3^2 - 59.379X_4^2] \times 10^5 \quad (3)$$

该模型的回归分析数据见表 2。根据模型的 $P = 0.0021 < 0.05$, $F_{模型} = 31.40$, 而 $F_{0.05}(26.3) =$

$8.53, F_{模型} > F_{0.05}(26.3)$, 说明实验所选用的二次多项模型具有高度的显著性。 $F_{失拟} = 7.09$, 失拟项的 $P = 0.1298, P > 0.05$, 表明失拟项不显著。由此可见,该模型能够较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该回归方程确定 MUED 的最佳条件。该回归模型的调整确定系数为 $R_{adj}^2 = 0.7215$, 即该模型能解释 72.15% 响应值的变化,模型拟合程度良好,试验误差小,说明采用响应曲面法优化一步提取衍生化的模型条件是可行的。此外,还可以明显看出, X_3 、 X_4 、 X_1X_4 、 X_3X_4 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 和 X_4^2 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 即甲醇用量、催化剂用量的一次项,微波功率与催化剂用量、甲醇用量与催化剂用量的交互项,微波功率、反应温度、甲醇的用量和催化剂用量的二次项均对 MUED 过程有显著的影响。

表 2 响应曲面分析法拟合回归方程的方差分析
Table 2 Analysis of variance for the response surface quadratic model

Source	DF ^{a)}	Sum of square	Mean square	F-Value	P-Value
Model	14	45.89	3.28	5.81	0.0021 ^{b)}
X_1	1	0.43	0.43	0.77	0.3982
X_2	1	0.6	0.6	1.07	0.3215
X_3	1	7.57	7.57	13.42	0.0032 ^{b)}
X_4	1	14.91	14.91	26.43	0.0002 ^{b)}
X_1X_2	1	1.42	1.42	2.53	0.138
X_1X_3	1	6.0×10^{-4}	6.0×10^{-4}	1.1×10^{-3}	0.9745
X_1X_4	1	3.97	3.97	7.05	0.0210 ^{b)}
X_2X_3	1	3.3×10^{-3}	3.3×10^{-3}	5.9×10^{-3}	0.9402
X_2X_4	1	7.4×10^{-3}	7.4×10^{-3}	0.013	0.9107
X_3X_4	1	2.86	2.86	5.08	0.0437 ^{b)}
X_1^2	1	8.26	8.26	14.64	0.0024 ^{b)}
X_2^2	1	4.84	4.84	8.58	0.0126 ^{b)}
X_3^2	1	3.93	3.93	6.98	0.0215 ^{b)}
X_4^2	1	9.52	9.52	16.88	0.0014 ^{b)}
Lack of fit	10	6.58	0.66	7.09	0.1298
Pure error	2	0.19	0.093		
Residual	12	6.77	0.56		
R^2	0.8715				
Adjusted R^2	0.7215				
Standard deviation	0.75				

a) DF; degree of freedom; b) significant ($P < 0.05$).

2.2.2 响应曲面分析与优化

根据模型方程绘制响应曲面及方差分析图, 结果见图 3。从图 3a 看出,微波功率对 MUED 过程的影响比较显著,其曲线呈先上升后缓慢下降的趋势; 反应温度的曲线较平缓,表明其对 MUED 过程影响较小;由图 3a 可确定最佳水平范围:微波功率 500 ~ 600 W,反应温度 50 ~ 60 ℃。从图 3b 可以看出,微波功率和甲醇用量对 MUED 过程的影响比较显著,其曲线呈现先增大后减小的趋势;由此可确定最佳的水平范围:微波功率 500 ~ 600 W,甲醇用量 3 ~

4 mL。图 3c 表明催化剂用量及微波功率均对 MUED 过程影响均较大,且存在交互作用,从图 3c 中可确定最佳的水平范围:微波功率 400 ~ 500 W, 催化剂用量 0.20 ~ 0.27 g。图 3d 表明甲醇用量及反应温度对 MUED 过程的影响均较显著,由图 3d 可确定最佳的水平范围:反应温度 50 ~ 60 ℃, 甲醇用量 3 ~ 4 mL。由图 3e 可确定最佳的反应温度为 50 ~ 60 ℃,催化剂用量为 0.20 ~ 0.27 g。由图 3f 看出,甲醇用量和催化剂用量对 MUED 过程均有显著影响,且存在交互作用,从图 3f 中可确定最佳的水平

图 3 MUED 方法的响应曲面优化结果及方差分析图

Fig. 3 Response surface and analysis of variance plots for the optimization of MUED process

a. effects of microwave power and reaction temperature; b. effects of microwave power and amount of methanol; c. effects of microwave power and amount of catalyst; d. effects of reaction temperature and amount of methanol; e. effects of reaction temperature and amount of catalyst; f. effects of amounts of methanol and catalyst; g. normal plot of residual plots of BBD; h. residuals versus predicted values of BBD; i. experimental values versus predicted values of BBD; j. Cook's distance plots of BBD.

范围:甲醇用量为 3 ~ 4 mL, 催化剂用量为 0.20 ~ 0.27 g。

图 3g~j 为响应曲面残差分析图。从图 3g 可以看出, 响应值与实验值拟合较好 ($0.05 < P < F^{[18]}$)。从图 3h 可以看出, 残差点随机分布在 ± 1.5 范围, 表明实验数据与预测值得到了很好的拟合。从图 3i 可清晰看出, 实验值与预测值几乎在一条直线上, 表明模型能够较好地描述各因素与响应值之间的真实关系, 可以利用该模型确定最佳的工艺条件。从曲氏距离图(图 3j)明显看出, 所有试验运行点都汇集在 0 ~ 0.25 的范围, 表明实验模型能够很好地代表真实水平, 基本没有异常数据点的存在。

通过对模型方程进行求导计算, 得到 MUED 的最佳条件为: 微波功率 497.03 W, 反应温度 49.39 °C, 甲醇用量 3.29 mL, 催化剂用量 0.26 g。考虑到实际操作的便利, 将最佳的工艺参数修正为微波功率 500 W, 反应温度 50 °C, 甲醇用量 4.0 mL, 催化剂用量 0.30 g。在此最佳条件下得到的总脂肪酸峰面积为 $(5.321 \pm 0.07) \times 10^5$, 接近于模型计算值 5.542×10^5 。

2.3 MUED 方法最佳反应时间的优化

按照 1.2.1 节的实验方法, 称取 5.00 g 猫爪草、50.0 mL 正己烷、4.0 mL 甲醇、0.30 g KOH(固体), 设定微波功率 500 W、反应温度 50 °C、超声波功率 240 W, 考察不同反应时间(4、6、8、10、12 min)对 MUED 方法的影响。从图 4 可以看出, 随着反应时间的逐渐延长, 总脂肪酸峰面积呈现先增大后减小的趋势。结果表明, 最佳反应时间为 8 min, 与传统方法(8 h)相比样品处理时间明显缩短。这是由于初始的微波和超声波辐射引起的热效应和乳化效

应加速了样品基质中油脂的提取速率; 随着时间的延长, 微波和超声波协同作用使细胞壁破坏作用增强, 使油脂以更快的速率转移到萃取剂。另外, 由于油脂、CH₃OH、KOH 具有极性分子与离子组分, 在微波快速加热和超声空化作用下可获得足够的热转移和乳化特性。此外, 微波辐射使得分子热运动速度加快, 超声波辐射进一步加速了分子的碰撞和相互作用。当反应时间超过 8 min, 总脂肪酸峰面积明显降低, 这可能是由于反应物过热、溶剂的挥发以及副产物的形成等造成。可见, 微波-超声波协同作用不仅促进了猫爪草油的提取, 而且提高了脂肪酸的衍生化效率。

图 4 反应时间对 MUED 方法的影响
Fig. 4 Effect of reaction time on the MUED method

2.4 猫爪草油中脂肪酸的 GC-MS 分析

通过比较、分析 MUED 法与传统多步提取衍生化方法中脂肪酸甲酯的 GC-MS 分析的总离子流图(见图 5), 可以发现 MUED 法与传统方法测得猫爪草油中的总脂肪酸色谱峰面积分别为 $(3.327 \pm 0.023) \times 10^7$ 和 $(2.410 \pm 0.036) \times 10^7$ 。结果表明, MUED 方法较传统方法具有更高的提取和衍生化效率($n = 3, P < 0.05$)。

图 5 (a)传统方法与(b)MUED 法中脂肪酸甲酯的 GC-MS 分析总离子流图
Fig. 5 Total ion chromatograms of fatty acid methyl esters for (a) conventional method and (b) MUED method
IS: nonadecanoic acid methyl ester.

采用 MUED 方法与传统方法所得猫爪草油中各个脂肪酸的含量及统计检验结果见表 3。结果显示,MUED 法共鉴定出 7 种主要的脂肪酸,分别为十六碳烯酸(C16:1)、棕榈酸(C16:0)、顺,顺-9,12-十八碳二烯酸(CC18:2)、顺-9-十八烯酸(C18:1)、硬脂酸(C18:0)、二十烷酸(C20:0)以及二十一烷酸(C21:0)。而传统方法仅得到 5 种主要的脂肪酸。

从表 3 亦可以看出,MUED 方法所得总脂肪酸(TFA)的含量明显高于传统方法($P<0.01$)。此外,单不饱和脂肪酸(MUFA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)

以及总不饱和脂肪酸(TUFA)含量均高于传统方法($P<0.05$)。而 MUED 方法所得总饱和脂肪酸(TSFA)的含量明显低于传统方法($P<0.05$)。同时还发现,除 C16:0($P<0.05$)、C18:0($P<0.01$)以及 TSFA($P<0.05$)之外,MUED 方法所得 C16:1($P<0.01$)、CC18:2($P<0.05$)、C18:1($P<0.05$)、MUFA($P<0.01$)、PUFA($P<0.05$)、TUFA($P<0.01$)以及 TFA($P<0.01$)的显著性很高,这种现象可以解释为传统方法中不饱和脂肪酸的氧化或者分解所致。因此,与传统方法相比,MUED 方法不仅具有更高的提取衍生化效率,同时具有更低的氧化和分解速率。

表 3 两种方法测定猫爪草油中脂肪酸含量的比较

Table 3 Comparison of the MUED and conventional methods for fatty acid contents in <i>Ranunculus ternatus</i> Thunb. oil						
Fatty acid	<i>m/z</i>	MUED method (<i>n</i> = 3)		Conventional method (<i>n</i> = 3)		SS
		Content (mean ± SD)/(mg/g)	RSD/%	Content (mean ± SD)/(mg/g)	RSD/%	
C16:1	55	0.84 ± 0.06	7.14	0.49 ± 0.07	14.28	***
C16:0	74	2.54 ± 0.02	0.78	2.71 ± 0.11	4.06	**
C18:0	74	0.93 ± 0.07	7.53	1.39 ± 0.17	12.23	***
C18:1	55	3.86 ± 0.24	6.22	3.13 ± 0.40	12.78	**
CC18:2	67	8.89 ± 0.17	1.91	8.43 ± 0.24	2.85	**
C20:0	74	0.19 ± 0.02	10.53	not detected	not detected	not detected
C21:0	79	0.17 ± 0.018	10.58	not detected	not detected	not detected
ΣTSFA		3.83 ± 0.06	1.57	4.10 ± 0.08	1.95	**
ΣMUFA		4.70 ± 0.45	9.57	3.62 ± 0.25	6.91	***
ΣPUFA		8.89 ± 0.23	2.59	8.43 ± 0.24	2.85	**
ΣTUFA		13.59 ± 0.30	2.21	12.05 ± 0.34	2.82	***
TFA		17.42 ± 0.23	1.32	16.15 ± 0.33	2.04	***

SS: statistical significance; **: significant difference at $P<0.05$; ***: significant difference at $P<0.01$. TFA: total fatty acid; MUFA: mono-unsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid; TUFA: total unsaturated fatty acid; TSFA: total saturated fatty acid.

2.5 方法学考察

2.5.1 线性和稳定性

按照 1.2.1 节 MUED 优化的最佳实验方法,对所建立的方法进行了线性和稳定性考察。根据所制备的样品,以总脂肪酸的峰面积(*Y*)对 GC 进样量(*X*, μL)做线性回归分析^[20]。分别取 0.5、0.8、1.2、1.5 及 2.0 μL 进行 GC 分析,得到的线性方程为 $Y = (2.8954X - 0.5287) \times 10^5$, 相关系数(r^2)为 0.9946,表明所建立的方法在 0.5~2.0 μL 范围内线性关系良好。此外,对所制备的样品在 0、8、16、24、38 以及 48 h 进行稳定性考察,结果表明样品在 24 h 内稳定(RSD < 5%)。

2.5.2 精密度

按照 1.2.1 节 MUED 优化的最佳实验方法,平行进样 3 次,求出总脂肪酸的峰面积的 RSD 为 6.13%。

2.5.3 重复性

取 MUED 最佳条件下制备的样品溶液 3 份进行重复性试验。结果(见表 3)表明,MUED 方法中

除 C20:0、C21:0 之外,其余脂肪酸的重复性较好(RSD < 10%)。由表 3 也可见传统方法中部分不饱和脂肪酸(C16:1、C18:1)的重复性较差(RSD > 10%),这是由于在传统方法中部分不饱和脂肪酸被氧化和分解为饱和脂肪酸、衍生化试剂与反应物未彻底反应以及脂肪酸损失等导致。猫爪草的含油率不足 2%,可见 MUED 方法用于准确、快速测定中药材中低脂肪油、高不饱和脂肪酸具有一定的可靠性和实用性。

3 结论

本文建立了一种微波-超声波协同一步提取衍生化-气相色谱-质谱联用快速分析中药中低含量脂肪酸的新方法。通过与传统方法比较,发现该方法满足了脂肪酸分析的一般要求,同时在中药脂肪酸分析中表现出了更多的优势。该方法降低了分析成本,缩短了样品的制备时间,提高了脂肪酸的提取和衍生化效率,尤其是降低了不饱和脂肪酸的氧化和分解现象,特别适宜于中药中低含油率、高不饱和脂

肪酸的分析。总之,该方法在高通量快速分析中药脂肪酸领域不仅提供了新的分析策略,更具有重要的实用价值。

参考文献:

- [1] Yang K, Zhao Z, Gross R W, et al. *Anal Chem*, 2011, 83: 4243
- [2] Zhang Q A, Zhang Z Q, Yue X F, et al. *Food Chem*, 2009, 116: 513
- [3] Kim Y H, Choi Y K, Park J, et al. *Bioresour Technol*, 2012, 109: 312
- [4] Balasubramanian S, Allen J D, Kanitkar A, et al. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 3396
- [5] Koopmans C, Iannelli M, Kerep P, et al. *Tetrahedron*, 2006, 62: 4709
- [6] Fu X H, Chen H, Yang F Q, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (傅小红, 陈华, 杨丰庆, 等. 色谱), 2012, 30 (5): 515
- [7] Wozniakiewicz M, Wietecha-Posluszny R, Garbacik A, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1190: 52
- [8] Hsiao M C, Lin C C, Chang Y H, et al. *Fuel*, 2010, 89 (12): 3618
- [9] Cheng X L, Wan J Y, Li P, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 5774
- [10] Zou S Y, Li T, Wang R. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory* (邹时英, 李涛, 王蓉. 光谱实验室), 2012, 29 (5): 3157
- [11] Lou Z, Wang H, Zhu S, et al. *Anal Chim Acta*, 2012, 716: 28
- [12] Tang J, Li C, Zheng Y, et al. *Food Science* (唐佳伟, 李超, 郑义, 等. 食品科学), 2009, 30(22): 104
- [13] Abdulkadir S, Tsuchiya M. *J Exp Marine Biol Ecol*, 2008, 354: 1
- [14] Li J, Yue Y, Li T, et al. *Anal Chim Acta*, 2009, 650: 221
- [15] Liu R L, Zhang J, Mou Z L, et al. *Analyst*, 2012, 137: 5135
- [16] Kupeli Akkol E, Sutar I, Fafal Erdogan T, et al. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139: 478
- [17] Xiong Y, Deng K Z, Gao W Y, et al. *Chin Chem Lett*, 2007, 18: 1364
- [18] Liu R L, Zhan H Y, Chen T, et al. *Food Science* (刘瑞林, 詹汉英, 陈钊, 等. 食品科学), 2012, 33(12): 1
- [19] Hingu S M, Gogate P R, Rathod V K. *Ultrason Sonochem*, 2010, 17(5): 827
- [20] Petrovic M, Kezic N, Bolanca V. *Food Chem*, 2010, 122: 285