

# Application News

## No. L492

高效液相色谱  
High Performance Liquid Chromatography

### Nexera-e 和 ELSD/LCMS-IT-TOF 联用对植物油中的甘油三酯进行全二维分离

Comprehensive 2D Separation of Triglycerides in Vegetable Oil with ELSD/LCMS-IT-TOF Detection

甘油三酯是 3 分子长链脂肪酸和甘油组成的脂肪分子。动物油和植物油均为甘油三酯类脂肪化合物。因为甘油三酯难溶于水性溶剂，所以通常使用银离子载体的正相分析或者有机溶剂的反相分析进行分离。但是，由于脂肪酸中存在非常多的分子种类，使用单一液相系统将很难对天然油脂中的甘油三酯进行分离。为了对复杂样品进行高效分离，使用全二维液相色谱仪 Nexera-e 非常有效。

Nexera-e 使用全二维液相色谱法，具有一维和二维两种不同的分离模式，通过组合多维分离系统，可对常规一维 LC 难以分离的组分进行分离。本次分析对含多个甘油三酯的琉璃苣油，在一维系统中使用银离子色谱柱（正相条件）进行微尺度分离，在二维系统中使用无水性溶剂的有机溶剂的二元梯度进行反相分离，并联用蒸发光散射检测器（ELSD）和离子阱飞行时间质谱仪（LCMS-IT-TOF）。表 1 为分析条件。

通常，天然油脂中的甘油三酯特性取决于 3 个烷基链的长度以及双键的位置和数量。因为持有双键的甘油三酯具有抗氧化作用，所以根据有无双键对甘油三酯进行分离的需求较多。在形成银离子的氧化物中烷基链的双键之间具有强烈的相互作用。利用该特性，使用浸渍银离子的固定相选择性地保留具有双键的化合物，该方法在 HPLC 中比较常用。Nexera-e 将双键保留率较大的银离子色谱柱（正相条件）用于一维分离，将反相分析超快速色谱柱用于二维分离，并使用 ELSD 进行检测。

蒸发光散射检测（ELSD）方法是色谱柱中溶出的洗脱液进行蒸发，从而对目标化合物进行微粒化，这种测定散射光的方法对无紫外吸收的甘油三酯检测很有效。图 1 为使用专用分析软件 ChromSquare 对琉璃苣油进行全二维分离得到的图谱（横轴：使用一维银离子色谱柱的分离 × 纵轴：二维反相分离）。由图可知，全二维分离可以完成单一液相系统难以实现的高效分离，并检测到 37 个色谱峰。

#### ■ 使用 ELSD 对琉璃苣油中的甘油三酯进行全二维分离检测

Comprehensive Separation of Triglycerides in Borage Oil with ELSD Detection

琉璃苣油是从琉璃苣种子中提取的植物油。其富含亚油酸、 $\gamma$ -亚麻酸、油酸和棕榈酸等带有脂肪酸链的甘油三酯，具有保湿、防晒等多种功效。与其他植物油相比， $\gamma$ -亚麻酸的含量高，对保持女性荷尔蒙的平衡也有一定效果。

表 1 分析条件  
Analytical Conditions

[色谱柱 1] : Ag custom 色谱柱 (150 mm L. × 1.0 mm I.D., 5.0 mm)	
流动相	A; 1.5 % v/v 丁腈-正己烷 B; 2.4 % v/v 丁腈-正己烷
时间程序	B Conc. 0 % (0 min) → 100 % (40 min) → 100 % (150 min)
流速	: 0.007 mL/min (分流)
柱温	: 30 °C
进样体积	: 2 $\mu$ L
调制周期	: 1.5 min
[色谱柱 2] : Ascentis Express C18 色谱柱 (Supelco, 50 mm L. × 4.6 mm I.D., 2.7 mm)	
流动相	A; 乙腈 B; 异丙醇
时间程序	B Conc. 30 % (0 min) → 30 % (0.08 min) → 40 % (0.1 min) → 70 % (1.2 min) → 30 % (1.21 min) → 30 % (1.5min)
流速	: 4 mL/min
检测器	: Shimadzu ELSD LT-II / LCMS-IT-TOF (APCI 正离子模式)

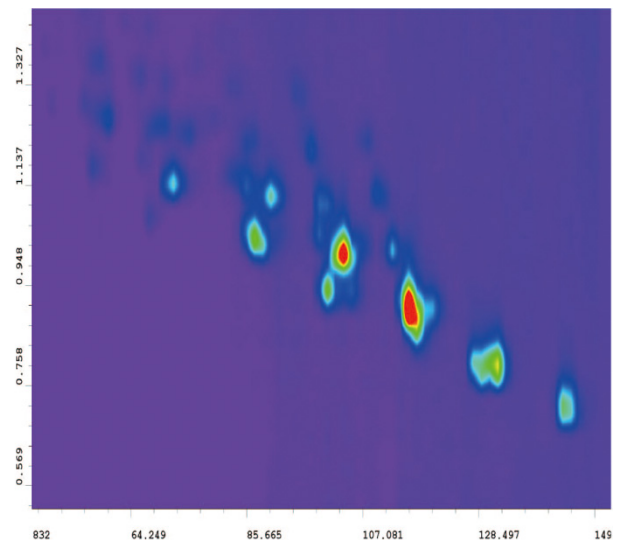


图 1 通过 ELSD 得到的琉璃苣油中甘油三酯的全二维分离图谱  
Comprehensive 2D Plot of Triglycerides in Borage Oil with ELSD Detection

## ■ 使用 LCMS-IT-TOF 对琉璃苣油中的甘油三酯进行全二维分离和检测

Comprehensive Separation of Triglycerides in Borage Oil with LCMS-IT-TOF Detection

如上所述，在本次分析中根据一维的脂肪酸侧链双键的有无以及数量的差异进行分离。如果使用银离子色谱柱，虽然双键越多的甘油三酯保留越强，但是保留亦受双键位置以及侧链长度的影响。在二维的反相分离中，根据甘油三酯的疏水性，采用了水或者缓冲液等无水性溶剂的有机溶剂的二元梯度洗脱溶液。在该分离模式下，洗脱将按照 Partition Number 参数的顺序执行，即甘油三酯的碳原子总数减去 2 倍双键数的数值顺序进行。图 2 上方为根据 LCMS-IT-TOF 质谱仪得到的数据绘制的二维图谱。为了更加方便识别按照上述顺序洗脱的甘油三酯，在图中绘制了网格线。由图可知，一维系统根据双键的数量差异进行分离，二维系统则根据 Partition Number 参数的差异进行分离。

本次分析使用可以精密测定质量值的 LCMSIT-TOF 作为二维检测器，对 Nexera-e 中分离出的多个洗脱成分进行详细的定性分析。

图 2 上图中白色椭圆勾画的峰 A、B 以及 C，其 MS 光谱分别显示在图 2 下图中。从脱离了 1 个侧链的甘油二酯峰中得到了结构信息，甘油三酯的结构归属如下：

A: POP

B: OOP

C: PyLnP

P: Palmitic acid

O: Oleic acid

γLn: γ-Linolenic acid

因为上述组分分别含有 1~3 个双键，所以将按照该顺序从一维色谱柱中逐个被洗脱。而脂质相关组分多数无紫外吸收，并且在示差折光检测中不适用梯度洗脱法，所以针对这一类复杂样品的分离，Nexera-e 和 ELSD、三重四级杆型质谱仪或 LCMSIT-TOF 联用就变得十分必要，可以得到更为详尽的分析结果。

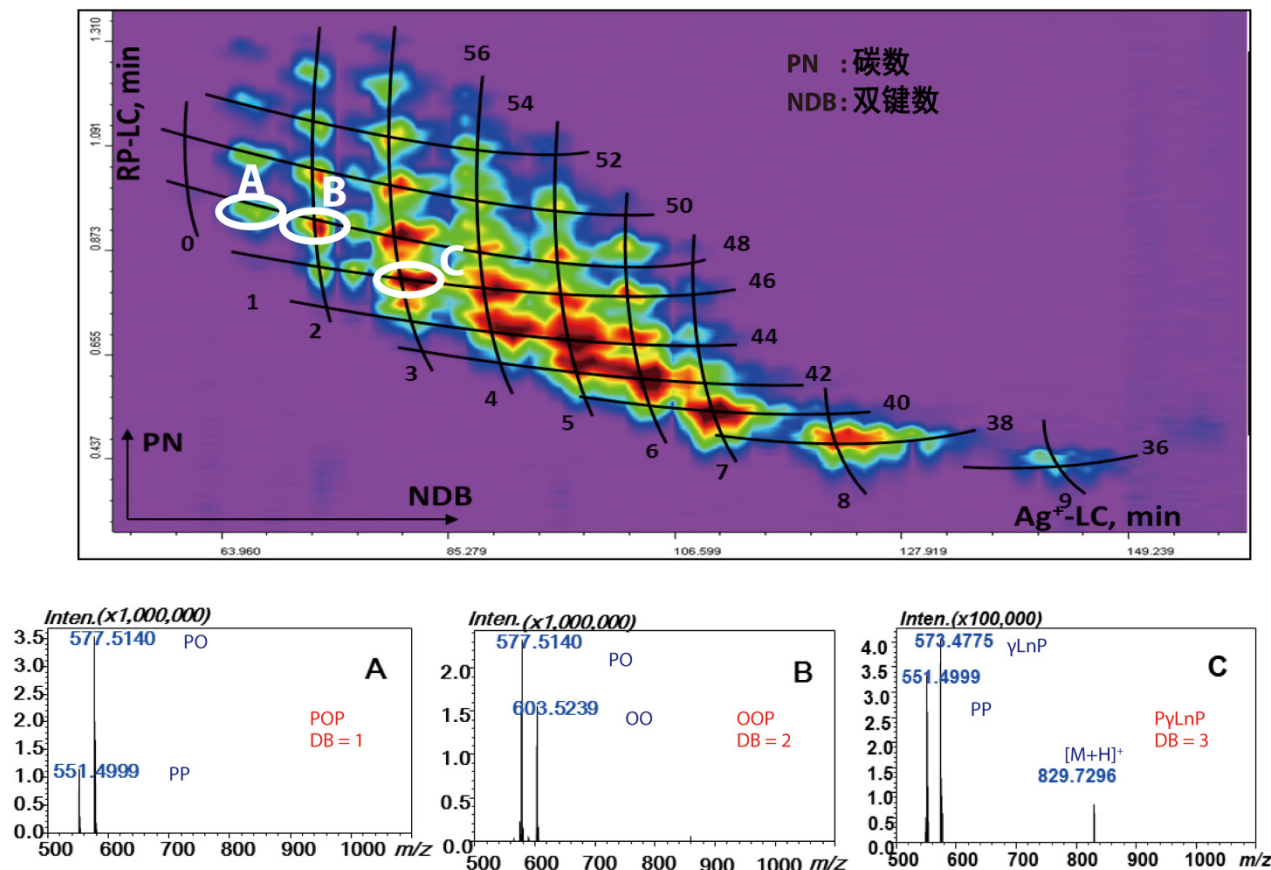


图 2 通过 LCMS-IT-TOF 得到的琉璃苣油中甘油三酯的全二维分离图谱和特定部分的 MS 光谱  
Comprehensive 2D Plot of Triglycerides in Borage Oil with LCMS-IT-TOF in Addition to the Mass Spectra of Assigned Blobs

数据提供: University of Messina, Prof. Luigi Mondello and Chromaleont S.r.l



岛津企业管理(中国)有限公司  
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2015 年 5 月