

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)05-0077-03

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.018



高效液相色谱法测定炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸含量*

李志霞, 李翠华, 侯金良, 李正国[△]

(山东省济宁市食品药品检验检测研究院, 山东 济宁 272000)

摘要:目的 建立测定炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(78:22, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 203 nm, 进样量为 10 μL。结果 亚油酸和油酸的进样量分别在 0.282 3~2.258 2 μg、0.115 9~0.927 4 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好($R^2 = 1.000\ 0, 1.000\ 0, n = 8$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 加样回收率分别为 99.83% 和 97.95%, RSD 分别为 1.79% 和 1.67%($n = 9$)。除含量明显偏低和明显偏高的各 1 批样品外, 其余 11 批样品中亚油酸和油酸的总含量为(0.65 ± 0.34)%。结论 该方法操作简便、结果准确, 可用于炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸的含量测定。建议炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸的总含量不得低于 0.30%。

关键词: 高效液相色谱法; 炒榧子仁; 亚油酸; 油酸; 含量测定

Content Determination of Oleic Acid and Linoleic Acid in Torreya Semen Tostum by HPLC

LI Zhixia, LI Cuihua, HOU Jinliang, LI Zhengguo

(Jining Institute for Food and Drug Control, Jining, Shandong, China 272000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of oleic acid and linoleic acid in Torreya Semen Tostum. **Methods** The chromatographic column was Thermo Hypersil Gold C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (78:22, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 203 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of linoleic acid and oleic acid were 0.282 3-2.258 2 μg and 0.115 9-0.927 4 μg ($R^2 = 1.000\ 0, 1.000\ 0, n = 8$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recoveries of linoleic acid and oleic acid were 99.83% and 97.95%, with RSDs of 1.79% and 1.67% ($n = 9$), respectively. Except for one batch of samples with significantly lower content and one batch with significantly higher content, the total content of linoleic acid and oleic acid in the remaining 11 batches of samples was (0.65 ± 0.34)%. **Conclusion** This method is simple and accurate, which can be used for the content determination of oleic acid and linoleic acid in Torreya Semen Tostum. It is recommended that the total content of oleic acid and linoleic acid in Torreya Semen Tostum should not be lower than 0.30%.

Key words: HPLC; Torreya Semen Tostum; linoleic acid; oleic acid; content determination

榧树主要分布于长江流域以南地区的浙江、安徽、江苏、福建、湖南、湖北、江西、四川、云南、贵州等省, 其中浙江省资源最多^[1-2]。榧树的主要产区为会稽山的诸暨、绍兴、东阳、嵊州、磐安等, 诸暨市种植面积最广, 产量最大, 品质最佳, 有“中国榧树之乡”之称^[3-5]。榧子为红豆杉科植物榧 *Torreya grandis* Fort. 的干燥成熟种子^[6], 炒制加工后香脆味美, 营养价值极高。榧子仁中富含脂肪油、蛋白质、碳水化合物^[7-10], 其中脂肪酸多为不饱和脂肪酸, 并含有 19 种氨基酸和 192 种矿物元素^[11-13]。榧子为我国传统驱虫中药, 同时又是特有的珍稀干果, 营养丰富, 为药食同源中药^[14]。榧子的营养价值及其药效均与榧子所含成分直接相关, 受采种时间及种子成熟度的影响, 榧子所含成分的含量波动较

大^[15]。研究表明, 榧子油具有调血脂、降低血清胆固醇的作用, 可软化血管, 促进血液循环, 调节老化的内分泌系统^[16-17], 对动脉粥样硬化形成的预防作用明显^[18]。目前, 市场上的榧子产地较多, 而各地炮制规范中的榧子仁只进行了常规定性检验, 无法控制其内在质量。榧子仁油脂中含有 7 种脂肪酸, 以亚油酸、油酸等不饱和脂肪酸为主, 不饱和脂肪酸占脂肪酸总数的 79.41%^[19]。故本研究中建立了测定炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸含量的高效液相色谱(HPLC)法, 以有效控制饮片质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030C 3D 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu

*基金项目: 山东省食品药品检验研究院中药材及饮片标准研究课题[2020-025]。

第一作者: 李志霞, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)731744949@qq.com。

[△]通信作者: 李正国, 男, 博士, 主任中药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)lzgwh123@sina.com。

公司),配有二极管阵列检测器;XS205DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);SK8200LHC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为53 kHz)。

1.2 试药

乙腈、甲醇(色谱纯,德国Merck公司);磷酸(色谱纯,美国Tedia公司);水为娃哈哈纯净水;亚油酸对照品(批号为111622-201704,含量为99.8%),油酸对照品(批号为111621-201707,含量为99.9%),均购于中国食品药品检定研究院;榧子仁饮片(编号为1-13,样品信息见表1),其中7批药材为生品,6批药材按2020年版《中国药典(四部)》通则0213项下炮制通则及2012年版《山东省中药饮片炮制规范》项下方法,委托山东嘉泰中药饮片有限公司炒制。

表1 榧子仁饮片样品信息

Tab. 1 Information of Torreyae Semen Tostum samples

编号	批号	产地	药材状态	编号	批号	产地	药材状态
1	20201103	浙江嵊州	饮片	8	20200609	湖北恩施	生品
2	20200914	浙江诸暨	生品	9	20200820	浙江诸暨	生品
3	20200610	安徽黄山	饮片	10	20201012	浙江诸暨	生品
4	20201101	浙江东阳	生品	11	20201104	浙江嵊州	饮片
5	20201102	浙江嵊州	饮片	12	20200508	浙江嵊州	饮片
6	20200607	湖北恩施	生品	13	20200604	浙江磐安	饮片
7	20200608	湖北恩施	生品				

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Thermo Hypersil Gold C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液(78:22, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。理论板数按亚油酸峰计应不低于5 000,且分离度不小于1.5。色谱图见图1。

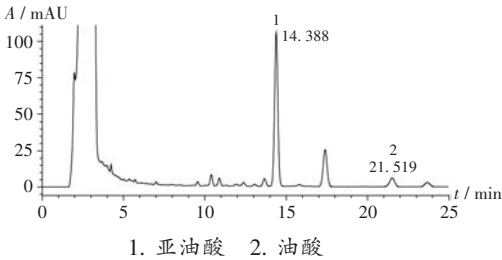


图1 系统适用性试验高效液相色谱图
1. Linoleic acid 2. Oleic acid

Fig. 1 HPLC chromatogram of the system suitability test

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取亚油酸对照品47.14 mg、油酸对照品58.02 mg,精密称定,分别置100 mL棕色容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,即得亚油酸和油酸对照品贮备液。分别精密吸取亚油酸对照品贮备液

15.00 mL、油酸对照品贮备液5.00 mL,置同一50 mL棕色容量瓶中,加甲醇制成每1 mL分别含亚油酸0.141 14 mg、油酸0.057 96 mg的混合溶液,即得混合对照品溶液A。分别精密吸取亚油酸对照品贮备液15.00 mL、油酸对照品贮备液5.00 mL,置同一100 mL棕色容量瓶中,加甲醇制成每1 mL分别含亚油酸0.070 57 mg、油酸0.028 98 mg的混合溶液,即得混合对照品溶液B。

供试品溶液:取样品粉末(过2号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声处理(功率为500 W,频率为53 kHz)60 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液A 2,4,6,8,10,12,14,16 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品进样量(X, μg)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,得亚油酸回归方程 $Y = 1\,617\,755X + 19\,734$ ($R^2 = 1.000\,0, n = 8$),得油酸回归方程 $Y = 445\,735.49X - 731.36$ ($R^2 = 1.000\,0, n = 8$)。结果表明,亚油酸的进样量在0.282 3~2.258 2 μg、油酸的进样量在0.115 9~0.927 4 μg范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液B 10 μL,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果亚油酸峰面积的RSD为0.56% ($n = 6$),油酸峰面积的RSD为0.12% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为20201103)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果亚油酸平均含量为4.787 mg/g, RSD为0.69% ($n = 6$),油酸平均含量为1.576 mg/g, RSD为0.50% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为20201103)0.5 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,100,200,300,400,500,600,700 min时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果亚油酸峰面积的RSD为0.33% ($n = 8$),油酸峰面积的RSD为0.91% ($n = 8$),表明供试品溶液在室温下放置700 min内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20201103)9份,每份约0.25 g,精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入亚油酸对照品溶液(质量浓度为0.559 0 mg/mL)和油酸对照品溶液(质量浓度为0.210 7 mg/mL)1,2,3 mL,各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表2。

表2 炒榧子仁饮片中亚油酸和油酸加样回收试验结果($n = 9$)

Tab.2 Results of the recovery test of linoleic acid and oleic acid in *Torreya Semen Tostum* ($n = 9$)

取样量 (g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	亚油酸	油酸	亚油酸	油酸	亚油酸	油酸	亚油酸	油酸	亚油酸	油酸	亚油酸	油酸
0.253 8	1.215	0.403	0.559	0.210 7	1.772	0.609	99.64	97.77				
0.250 7	1.201	0.398	0.559	0.210 7	1.764	0.606	100.72	98.72				
0.249 5	1.195	0.396	0.559	0.210 7	1.752	0.607	99.64	100.14				
0.248 4	1.190	0.395	1.118	0.421 4	2.337	0.804	102.59	97.06				
0.250 9	1.202	0.399	1.118	0.421 4	2.295	0.800	97.76	95.16	99.83	97.95	1.79	1.67
0.252 5	1.209	0.401	1.118	0.421 4	2.289	0.805	96.60	95.87				
0.248 1	1.188	0.394	1.677	0.632 1	2.870	1.020	100.30	99.03				
0.253 3	1.213	0.402	1.677	0.632 1	2.889	1.025	99.94	98.56				
0.250 9	1.202	0.399	1.677	0.632 1	2.901	1.026	101.31	99.19				

2.4 样品含量测定

取样品(编号为1-13)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定2次,记录峰面积,并计算含量。结果见表3。

表3 炒榧子仁饮片中亚油酸和油酸含量测定结果(%, $n = 2$)

Tab.3 Results of the content determination of linoleic acid and oleic acid in *Torreya Semen Tostum* (%, $n = 2$)

编号	亚油酸	油酸	总含量	编号	亚油酸	油酸	总含量
1	0.48	0.16	0.64	8	0.78	0.36	1.14
2	0.32	0.12	0.44	9	0.19	0.08	0.27
3	1.78	0.93	2.71	10	0.80	0.26	1.06
4	0.41	0.15	0.56	11	0.28	0.12	0.40
5	0.28	0.09	0.37	12	0.20	0.08	0.28
6	0.67	0.26	0.93	13	0.11	0.05	0.16
7	0.77	0.33	1.10	$\bar{X}$	0.54	0.23	0.77

3 讨论

3.1 含量限度拟订

由表3可知,不同产地和同一产地、不同批次的炒榧子仁饮片中亚油酸和油酸含量差异较大,这与药材不同产地的地理环境、气候条件、采收加工等直接相关。含量限度制订中,去除含量明显偏低的13号样品和含量明显偏高的3号样品,计算亚油酸和油酸的平均总含量为(0.65±0.34)%,则最小值为0.31%,故建议炒榧子仁饮片中亚油酸和油酸的总含量不得低于0.30%。

3.2 提取方法选择

曾对提取溶剂(甲醇、90%甲醇、80%甲醇)、提取方法(超声提取和加热回流提取)、提取时间(超声提取30,45,60 min)进行了考察。结果以甲醇为提取溶剂时提取效果较好;超声提取和加热回流提取效果相同,超声提取30 min提取不完全,提取45 min和60 min的效果相同,但炒榧子仁油性大,粉碎后黏度大,提取过程中不易分散。故最终确定样品提取方法为以甲醇为提取溶剂,超声提取60 min。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确,可用于炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸的含量测定。建议炒榧子仁饮片中油酸和亚油酸的总含量不得低于0.30%。

参考文献

[1] 贾姗姗. 不同品种榧树化学成分分析及生物活性研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2016.

[2] PATRICIA M, SUHAILA M, NOORDIN MM, et al. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20: 367-373.

[3] 程晓建,黎章矩,喻卫武,等. 榧树的资源分布与生态习性[J]. 浙江林学院学报,2007,24(4):383-388.

[4] 刘学斐,刘运壁. 岩泉自然保护区香榧调查初报[J]. 江西林业科技,2011(1):15-18.

[5] SAEED MK, DENG YL, PARVEEN Z, et al. Polyphenolic content, flavonoids and optimal recovery of 5, 7, 4-trihydroxyflavone from *Torreya grandis* Fort. ex. Lindl Wseas [J]. Transactions on Biology and Biomedicine, 2006, 3(2):484-491.

[6] 山东省食品药品监督管理局. 山东省中药饮片炮制规范[M]. 济南:山东科学技术出版社,2012:710.

[7] 严晓素,陈红星,喻卫武. 香榧——中国特有的珍稀干果树种[J]. 浙江林业,2022(12):24-25.

[8] 周炳江,李靖,马长乐,等. 基于广泛代谢组学的云南榧子营养成分分析[J]. 食品研究与开发,2020,41(12):42-47.

[9] 钟早荣,王镜琰,温远丽,等. 中国香榧的资源开发研究及产业化对策[J]. 浙江农业科学,2023,64(12):3020-3025.

[10] 李炎,高灿,刘凤路,等. 响应面法优化云南榧子多糖提取工艺研究[J]. 宜春学院学报,2023,45(3):14-18.

[11] EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, et al. Oxidative and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes[J]. Endocrine Reviews, 2002, 23(5): 599-622.

[12] 陈振德,谢立,许重远,等. 国产榧属植物种子氨基酸的测定[J]. 中药材,2000,23(8):456-457.

[13] 陈振德,郑汉臣,傅秋华,等. 国产榧属植物种子油含量及其脂肪酸测定[J]. 中国中药杂志,1998,23(8):8-9.

[14] 黎章矩,骆成方,程晓建,等. 香榧种子成分分析及营养评价[J]. 浙江林学院学报,2005,22(5):540-544.

[15] 陈振德,陈志良,侯连兵,等. 香榧子油对实验性动脉粥样硬化形成的影响[J]. 中药材,2000,23(9):551-553.

[16] 陈振德,郑汉臣,金山丛,等. 榧属植物的研究进展[J]. 国外医药:植物药分册,1996,11(4):150-153.

[17] 王小河,辜夕容,李杰,等. 榧树属植物的无性繁殖技术研究进展[J]. 生物技术通报,2020,36(12):178-187.

[18] 马长乐,周雅凡,李向南,等. 云南榧子和香榧子营养成分比较研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(14):92-94.

[19] 余象煜,冯耀南,李平,等. 香榧(*Torreya grandis* Fort. ex Lindl.)种子的油脂分析[J]. 杭州大学学报(自然科学版),1982,9(3):324-328.

(收稿日期:2023-02-21;修回日期:2023-11-02)