

柱前衍生化 HPLC 测定石榴籽油中石榴酸的含量

李艳, 高英, 辛永涛, 张静, 李卫民*

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:石榴酸($C_{18:3}$)在结构上为顺9,反11,顺13-十八碳三烯酸,为长链烃类,在200~400 nm没有吸收,无法直接用紫外检测器进行检测,本实验采用柱前衍生化方法,使石榴酸带上一个强发色团,使其在200~400 nm有最大吸收,建立石榴籽油中指标性成分石榴酸的柱前衍生化 HPLC 分析方法。方法:以 ω -溴代苯乙酮作为衍生化试剂,以三乙醇胺为相转移催化剂,对石榴籽油进行柱前衍生化,色谱条件采用 Diamonsi C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),检测波长272 nm,以甲醇-乙腈-水(68.5:20:11.5)为流动相,柱温30 $^{\circ}$ C,流速1.0 mL \cdot min $^{-1}$ 。结果:石榴酸在0.026 6~0.133 0 g \cdot L $^{-1}$ ($r=0.999$)线性关系良好,平均加样回收率为98.7%,RSD 1.8%。结论:该法稳定性、重复性好,定量准确,可作为石榴籽油中石榴酸的定量方法,用于评价和控制石榴籽油的质量。

[关键词] 石榴籽油; 石榴酸; 柱前衍生化; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0068-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040068

Determination of Punicic Acid in Pomegranate Seed Oil by Precolumn Derivatization HPLC LI Yan, GAO Ying, XIN Yong-tao, ZHANG Jing, LI Wei-min* (School of Chinese Material Medical, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** As the long chain hydrocarbons, punicic acid ($C_{18:3}$) on the structure of 9 (*Z*), 11 (*E*), 13 (*Z*) -octadecatrienoic acid, which was in 200-400 nm absorption-free and can't be measured directly by UV detector. This experiment adopted column derivatization methods, made the punicic acid with a strong chromophore in maximum absorption in 200-400 nm. The determination method of punicic acid in pomegranate seed oil by HPLC was established in this thesis. **Method:** The punicic acid were derivatized with ω -bromoacetophenone as derivative reagent, triethanolamine as catalyst, the Diamonsi C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) was used. The detection wavelength was set at 272 nm, column temperature 30 $^{\circ}$ C, with methanol-acetonitrile-water (68.5:20:11.5) as eluent, the flow rate was 1.0 mL \cdot min $^{-1}$. **Result:** The standard curves of punicic acid is linear within in the range of 0.026 6-0.133 0 g \cdot L $^{-1}$ and the coefficient is 0.999. The average recovery of punicic acid is 98.7%, RSD is 1.8%. **Conclusion:** The method is reproducible and accurate, which can be used as the determination method of punicic acid in pomegranate seed oil, and used for the quality control of pomegranate seed oil.

[Key words] pomegranate seed oil; punicic acid; precolumn derivatization; HPLC

石榴籽作为常用的藏族药被收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》(第一册)^[1]。据报道^[2]石榴籽的出仁率为29.9%,而含油率高达40%~50%。1935年 Toyama 和 Tsuchiga 首次从石榴籽油中分离出石榴酸,接着 Takagi^[3]等指出石榴酸($C_{18:3}$)在结构上为顺9,反11,顺13-十八碳三烯

酸后,石榴籽油的药效被进一步发掘,国外学者对石榴酸的药理作用进行了广泛研究,发现石榴酸能够激活 PPAR γ ,改善肠道慢性炎症^[4],又可抑制肝甘油三酯(TAG)和 ApoB100 的合成与分泌,具有抗脂质过氧化作用^[5-6]。近年来越来越多的研究表明石榴籽油具有降血脂,预防动脉粥样硬化,降低癌变,

[收稿日期] 20140417(012)

[第一作者] 李艳,在读硕士,从事中药新药的研究与开发, Tel:13560258358, E-mail:apple2008yan@qq.com

[通讯作者] *李卫民,博士生导师,教授,从事中药新药的研究与开发, Tel:13925023915, E-mail:13925023915@139.com

帮助人体抵抗癌症、肥胖症、糖尿病和心脏病等多重功效^[6-8]。

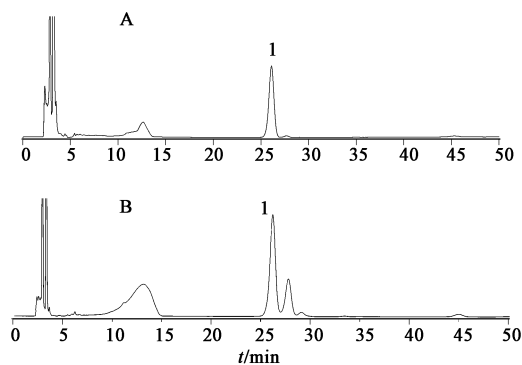
目前文献中关于石榴籽油脂酸的含量测定多采用气相色谱法^[9],甲酯化之后经 GC-MS 联机分析检测各化合物的结构,然而在分析过程中柱温很高(180 °C),易使脂肪酸的双键断裂或产生双键的异构化现象。HPLC 对植物油中脂肪酸的测定国内外已有不少报道^[10-12],多采用 C₁₈ 分析,时间长(60 min)或需要梯度洗脱。考虑到 HPLC 的通用性和普及性,本实验采用柱前衍生化、C₁₈ 反相柱等度洗脱进行分析,建立了石榴籽油中的特征成分石榴酸的 HPLC 测定方法。

1 材料

Uvmini-1240 型紫外分光光度计,LC-10AT 型 vpplus 高效液相色谱仪(包括 SPD-10A 型 vpplus 紫外检测器,CBM-10A vpplus 化学工作站,日本 Shimadzu);AUW220D 型电子分析天平(代古机电设备有限公司,岛津),N2000 色谱工作站(浙大信息工程有限公司)。石榴籽油,2 L 超临界二氧化碳萃取器(华安超临界萃取设备有限公司),石榴酸对照品(批号 LS-088,瑞典 Larodan 公司),甲醇、乙腈(色谱纯,德国 MERCK),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性 Diamonsi C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-水(68.5:20:11.5),紫外检测器,检测波长 272 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。供试品溶液色谱中与各对照品对应的吸收峰的理论塔板数均不低于 6 000,对应的色谱峰的分离度均 > 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.00。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 石榴酸

图 1 石榴籽油 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of pomegranate seed oil

2.2 溶液的配制 精密称定石榴酸对照品 1.33

mg, 置 2 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容至刻度,即得 0.665 g·L⁻¹ 的对照品溶液,低温保存。

精密称取一定量的 ω-溴苯乙酮和三乙醇胺分别配成质量浓度为 20, 25 g·L⁻¹ 丙酮溶液,另取冰乙酸适量配成 10 g·L⁻¹ 乙腈溶液,于 4 ~ 8 °C 避光保存。

2.3 对照品的衍生化处理 精密量取 0.665 g·L⁻¹ 的石榴酸甲醇溶液 50 μL,置于 5 mL 具塞离心试管中,N₂ 吹干,精密加入上述 ω-溴代苯乙酮和三乙醇胺溶液各 50 μL,乙腈 300 μL,混合摇匀,80 °C 水浴加热 15 min,冷却至室温后,精密加入冰乙酸乙腈溶液 75 μL,80 °C 水浴再加热 5 min,N₂ 吹干,精密加入甲醇 0.5 mL,振摇 1 min,离心(3 000 r·min⁻¹) 10 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,取 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录数据。

2.4 石榴籽油的衍生化处理 精密量取石榴籽油约 40 mg,置 10 mL 量瓶中,加丙酮溶解稀释至刻度。精密吸取 50 μL,加氢氧化钾-甲醇溶液(0.5 mol·L⁻¹)0.4 mL,振摇 1 min,60 °C 水浴加热 30 min。冷却后,加异丙醇-正庚烷-冰乙酸(40:10:1)溶液 2.5 mL,涡旋 1 min,间断超声 2 min,室温下放置 10 min,再精密加正庚烷 1 mL,水 1.5 mL,涡旋 1 min,间断超声 2 min,离心(3 000 r·min⁻¹) 10 min 后,精密吸取上清液 0.5 mL,N₂ 吹干,精密加入 ω-溴代苯乙酮和三乙醇胺溶液各 50 μL,乙腈 300 μL,试管密封,振摇 1 min。于 80 °C 加热 15 min,冷却至室温后,精密加入冰乙酸溶液 75 μL,80 °C 水浴加热 5 min,N₂ 吹干,精密加入甲醇 0.5 mL,振摇 1 min,离心 10 min,上清液经 0.45 μm 滤膜过滤,即得。

2.5 标准曲线的绘制 分别精密称取石榴酸对照品的甲醇溶液 20, 40, 60, 80, 100 μL 于 10 mL 具塞试管中,自“N₂ 吹干,精密加入上述 ω-溴代苯乙酮和三乙醇胺溶液各 50 μL”按 2.3 项下方法处理,以石榴酸峰面积(Y)与质量浓度(X)进行线性回归,求得回归方程 $Y = 20\ 056\ 902.3X + 36\ 548.2$ ($r = 0.999\ 9$), 0.026 6 ~ 0.133 0 g·L⁻¹ 呈良好线性关系。

2.6 精密度试验 按 2.4 项下方法处理样品,按照 2.1 项下色谱条件测定,取衍生化对照品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,重复 6 次,记录峰面积,结果石榴酸峰面积的 RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密吸取同一石榴籽油样品溶液 6 份,按 2.4 项下方法制得待测供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,进样 10 μL 进行检测,记录

峰面积, 结果石榴酸平均质量分数为 55.08%, RSD 1.1%。

2.8 稳定性试验 取衍生化处理样品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 于室温下 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10 μ L 测定, 记录峰面积, 结果石榴酸峰面积的 RSD 1.2%, 表明供试品溶液在室温下 10 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 称取同批次石榴籽油 6 份, 精密称定, 分别精密加入石榴酸对照品溶液适量, 同前述方法处理样品, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 石榴籽油样品中石榴酸的加样回收率试验

Table 1 Recovery of punicic acid

取样量 /mg	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
10.15	5.59	10.41	96.41		
10.11	5.57	10.49	98.47		
10.30	5.67	10.61	98.70		
10.17	5.60	10.50	97.89	98.86	1.8
10.24	5.64	10.70	101.24		
10.22	5.63	10.65	100.44		

注: 加入量均为 5.00 mg。

2.10 测定结果 分别吸取对照品溶液和供试品溶液, 按 2.4 项下方法处理石榴籽油样品, 按 2.1 项下色谱条件, 注入 10 μ L 测定, 按回归方程计算石榴酸的含量。3 批石榴籽油中石榴酸质量分数分别为 55.16%, 54.70%, 55.38%, 没有明显差异性, 证明提取工艺条件的重复性良好。

3 讨论

脂肪酸为长链烃类, 在 200~400 nm 没有吸收, 无法直接用紫外检测器进行检测, 所以采用柱前衍生化方法, 使脂肪酸带上一个强发色团, 使其在 200~400 nm 有最大吸收^[13]。

除确定合适的衍生化试剂外, 衍生化温度、流动相、检测波长均对测定结果有影响, 尤其是温度。在其他参数相同, 2.1 项色谱条件下系统地比较了乙腈-水、甲醇-水和甲醇-乙腈-水对石榴酸衍生物的分离效果。结果表明, 甲醇-乙腈-水(68.5:20:11.5)为流动相可以使石榴酸衍生物得到较为理想的分离。

国内对石榴籽油中脂肪酸含量的测定多使用 GC 法, 笔者未见有关 HPLC 测定石榴酸含量的报道。故本实验建立了柱前衍生化 HPLC 法测定石榴酸含量的方法, 采用 ω -溴代苯乙酮和三乙醇胺进行

相转移催化反应, 测定其中石榴酸质量分数为 55.08%, 结果表明此种方法重复性好, 定量准确, 可作为测定石榴籽油中石榴酸含量的定量方法, 用于石榴籽油的质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药. 第一册[S]. 北京: 卫生部药典委员会, 1995:26.

[2] 瞿文俊, 岳红. 超微粉碎辅助提取石榴籽油的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(4):164-166.

[3] Takagi, T. Stearic configurations of parinaric and punicic acids[J]. Amer Oil Chemist's Soc, 1966, 43(4):249.

[4] Josep B R, Margaret D, Montse C, et al. Activation of PPAR γ and δ by dietary punicic acid ameliorates intestinal inflammation in mice[J]. Brit J Nutr, 2011, 106:878-886.

[5] Keisuke A, Hiroaki Y, Seo Y H, et al. The 9cis, 11tran, 13cis isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B100 secretion and triacylglycerol synthesis in HepG2 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(12):2643-2645.

[6] Walid E, Nizar T, Nizar N, et al. Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian Pomegranate (Punica granatum) Fruits[J]. J Food Sci, 2011, 76(5):707-713.

[7] Keisuke A, Yu M W, Nao I, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats[J]. Lipids in Health and Disease, 2004, 3(24):1-7.

[8] Suzanne D Johanningsmeier, G Keith Harris. Pomegranate as a functional food and nutra ceutical source[J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2011, (2):181-201.

[9] 魏立新, 杜玉枝. 藏药材石榴籽超临界 CO₂ 萃取成分的 GC-MS 分析 [J]. 中药材, 2007, 30(11):1401-1403.

[10] 项琪, 周莉玲, 姚崇舜, 等. HPLC 法测定鸦胆子油中脂肪酸[J]. 中草药, 2006, 37(3):383-385.

[11] Puttmann M, Krug H, Von O E, et al. Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range[J]. Clin Chem, 1993, 39(5):825-832.

[12] 朱琳, 宋起滨, 窦德强. 獐子油的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22):108-110.

[13] 丁怡, 唐星. 柱前衍生 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸含量[J]. 中草药, 2004, 35(9):988-991.

[责任编辑 顾雪竹]