

夏枯草种子与奇亚籽、兰香子的性状、膨胀度和化学组成比较

武少茹¹, 冯伟红¹, 杨立新¹, 陈凯明^{1,2}, 陈两绵¹, 刘晓谦¹, 高慧敏^{1*}, 王智民^{1,2*}

(1. 中国中医科学院中药研究所中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;

2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:为了充分挖掘夏枯草药用部位果穗在采收加工、储存和运输过程中脱落的夏枯草种子的利用价值,对其进行性状、膨胀度和化学组成研究,并与市售的奇亚籽和兰香子进行比较。方法:性状采用直接观察法;膨胀度按照2020年版《中华人民共和国药典》(四部)通则2101方法测定;采用超高效液相色谱法(UPLC)测定其中6种酚酸类成分(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸)的含量,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~7 min, 2%~8%A; 7~13 min, 8%A; 13~14 min, 8%~17%A; 14~30 min, 17%A),检测波长280 nm;采用正己烷提取脂溶性成分,利用气相色谱-质谱法(GC-MS)鉴定其中的脂肪酸,并对5种含量较高的棕榈酸、油酸、硬脂酸、亚油酸和 α -亚麻酸进行含量测定, DB-35MS毛细管柱(0.25 mm \times 60 m, 0.25 μ m),进样温度250 $^{\circ}$ C,载气为高纯氮气,流速1.0 mL \cdot min⁻¹,分流比50:1;采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,GC-MS鉴定其挥发性成分组成,WM-5MS毛细管柱(0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m),进样温度250 $^{\circ}$ C,流速1.0 mL \cdot min⁻¹,分流比10:1。结果:夏枯草种子较奇亚籽、兰香子略小,三者种皮颜色明显不同;夏枯草种子具有较强的吸水膨胀特性,膨胀度17.4 mL \cdot g⁻¹,低于奇亚籽的25.2 mL \cdot g⁻¹和兰香子的35.6 mL \cdot g⁻¹。夏枯草种子含有丰富的酚酸和脂肪酸,挥发油含量极低,其中酚酸类成分以异迷迭香酸苷和迷迭香酸为主,二者质量分数分别为0.579%和0.392%;正己烷提取物中5种脂肪酸总量90.1%,总不饱和脂肪酸质量分数80.6%,其中 α -亚麻酸质量分数50.0%,略低于奇亚籽的57.2%,与兰香子的50.0%相当。结论:夏枯草种子吸水膨胀性好,酚酸和不饱和脂肪酸含量丰富,特别是具有高含量的 α -亚麻酸,可对其进行功能食品开发,从而实现夏枯草废弃资源的综合利用。

[关键词] 夏枯草种子; 奇亚籽; 兰香子; 膨胀度; 酚酸; 脂肪酸; 挥发油

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0018-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220553 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220530.2022.010.html>

[网络出版日期] 2022-05-31 16:01

Comparison of Character, Turgidity and Chemical Composition of *Prunellae Spica* Seeds, Chia Seeds and Basil Seeds

WU Shaoru¹, FENG Weihong¹, YANG Lixin¹, CHEN Kaiming^{1,2}, CHEN Liangmian¹,

LIU Xiaoqian¹, GAO Huimin^{1*}, WANG Zhimin^{1,2*}

(1. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Materia Medica, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** In order to explore the utilization value of the seeds dropped in the harvesting, processing, storage and transportation of *Prunellae Spica*, the character, turgidity and chemical composition of the seeds were analyzed and compared with those of the commercially available varieties, such as chia seeds and

[收稿日期] 2022-04-07

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1701900);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04401, CI2021A04407)

[第一作者] 武少茹,在读硕士,从事中药化学与质量评价研究, E-mail: 203454669@qq.com

[通信作者] *高慧敏,博士,研究员,从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax: 010-84014128, E-mail: hmgao@icmm.ac.cn;

*王智民,博士,研究员,从事中药化学与质量评价研究, E-mail: zhmw123@263.net

basil seeds. **Method:** Character was observed directly. The turgidity was determined according to the method of general rule 2101 of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV, the 2020 edition). The contents of six phenolic acids (danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, salviaflaside and rosmarinic acid) were determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC), acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) was used as mobile phase for gradient elution (0-7 min, 2%-8%A; 7-13 min, 8%A; 13-14 min, 8%-17%A; 14-30 min, 17%A), the detection wavelength was at 280 nm. The liposoluble components were extracted by *n*-hexane and identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the contents of five fatty acids, namely palmitic acid, oleic acid, stearic acid, linolic acid and α -linolenic acid, were determined on a DB-35MS capillary column (0.25 mm \times 60.0 m, 0.25 μ m), the injection temperature was 250 $^{\circ}$ C, the carrier gas was high-purity helium with a flow rate of 1.0 mL \cdot min $^{-1}$ and the splitting ratio of 50:1. The volatile oil was extracted by steam distillation method and its components were identified by GC-MS on a WM-5MS capillary column (0.25 mm \times 30.0 m, 0.25 μ m) with the injection temperature of 250 $^{\circ}$ C, the flow rate of 1.0 mL \cdot min $^{-1}$ and the splitting ratio of 10:1. **Result:** Prunellae Spica seeds were slightly smaller than chia seeds and basil seeds, and their color of seed coat was obviously different. Prunellae Spica seeds had strong water absorption and swelling characteristics, and the turgidity was 17.4 mL \cdot g $^{-1}$, which was lower than that of chia seeds (25.2 mL \cdot g $^{-1}$) and basil seeds (35.6 mL \cdot g $^{-1}$). Prunellae Spica seeds were rich in phenolic and fatty acids, while the content of volatile oil was very low. The main phenolic acids were salviaflaside and rosmarinic acid, with the contents of 0.579% and 0.392%, respectively. The total content of five fatty acids in *n*-hexane extract was 90.1%, and total content of unsaturated fatty acids was 80.6%, among which content of α -linolenic acid was 50.0%, which was slightly lower than 57.2% of chia seeds and similar to 50.0% of basil seeds. **Conclusion:** Prunellae Spica seeds have good turgidity, rich in phenolic acids and unsaturated fatty acids, and especially with high amount of α -linolenic acid. It is worthy of being developed as functional food to realize comprehensive utilization of the waste resources of Prunellae Spica.

[Keywords] Prunellae Spica seeds; chia seeds; basil seeds; turgidity; phenolic acids; fatty acids; volatile oil

夏枯草来源于唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* 的干燥果穗,具有清肝泻火、明目和散结消肿的功效,用于目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰疬、癭瘤、乳疔、乳癖、乳房胀痛等^[1]。除了作为饮片供临床调剂使用,夏枯草单方制剂也应用广泛,对甲状腺疾病^[2]和乳腺疾病^[3]有较好的临床治疗效果,此外,夏枯草是王老吉、加多宝等多种凉茶饮料的重要原料之一。随着大健康产业的快速发展,市场对夏枯草的需求量大幅度增长,目前已在河南确山、湖北蕲春和江西新余等地开展大规模种植。现阶段夏枯草的采收加工方式为割取地上部分晒干后再剪取果穗入药,干燥成熟的果穗在采收、干燥、仓储和运输过程中,果穗开裂致使部分种子(特别是成熟种子)脱落,产生大量的种子资源被丢弃^[4]。因此,明确夏枯草种子的特性和化学组成,挖掘其使用价值,锁定开发方向,对于夏枯草种子等废弃资源的综合利用具有重要意义。

奇亚籽为唇形科植物莢欧鼠尾草 *Salvia*

hispanica 的种子,原产于墨西哥南部和危地马拉北部地区^[5],2014年被原国家卫生和计划生育委员会批准为新食品原料。兰香子又名光明子、罗勒籽等,为唇形科植物罗勒 *Ocimum basilicum* 的干燥成熟种子,原产于印度和伊朗,目前我国台湾、山东、河南等地多有种植^[6]。奇亚籽和兰香子含有丰富的不饱和脂肪酸^[7-8],其中包括高含量的 α -亚麻酸, α -亚麻酸可在体内转化为二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)发挥益智功能,被世界粮农组织称作“植物脑黄金”。两者种皮遇水膨胀,食用后能够增加饱腹感,利用其开发的代餐品和减肥产品受到市场的大力追捧^[9-10]。本课题组前期研究发现,夏枯草种子与奇亚籽、兰香子具有相似的外观性状和吸水膨胀特性,为了评价夏枯草种子在相似研发方向上的利用潜力,本研究拟对三者的外观性状、膨胀度和化学组成(酚酸、脂肪酸和挥发性成分)进行分析,探讨夏枯草种子用于开发相关功能食品的可行性,为其综合利用提供科学数据支撑。

已有研究采用气相色谱-质谱法(GC-MS)定性分析了夏枯草种子^[4]、奇亚籽^[11]和兰香子^[12]的脂肪油组成,运用高效液相色谱法(HPLC)测定了奇亚籽中 α -亚麻酸和亚油酸的含量^[13],基于此,本研究拟采用GC-MS定量比较三者中5种脂肪酸(棕榈酸、油酸、硬脂酸、亚油酸和 α -亚麻酸)的含量差异。曾有研究采用HPLC测定奇亚籽中异迷迭香酸苷、迷迭香酸的含量^[14],以及夏枯草种子中原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量^[15],利用超高效液相色谱法(UPLC)测定奇亚籽中没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸乙酯和迷迭香酸的含量^[16],但尚无采用UPLC同步测定上述3种种子中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量的报道。因此,本研究拟采用UPLC比较6种酚酸在夏枯草种子、奇亚籽、兰香子中的含量差异。尽管已有研究采用GC-MS对兰香子^[17]和夏枯草种子^[18]的挥发油组成进行定性分析,但通过追溯原文献,发现针对夏枯草种子挥发油的研究实际是对其石油醚提取物的分析,为了明确夏枯草种子是否含有大量挥发性成分,本研究拟采用GC-MS进行验证分析。此外,本研究还考察了炒制对上述3种种子膨胀度和成分的影响,可为夏枯草种子进行开发时原料加工方式的选择提供依据。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),GCMS-QP2010 Ultra型气相色

谱-质谱仪(日本岛津公司),LG-01型高速中药粉碎(瑞安市百信制药机械有限公司),1-14型台式离心机(美国 Sigma 公司),BSA2245-CW型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],MS105DU型1/10万电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为RFS-D03611806004、RFS-Y03111812016、RFS-Y-03211804027、K-003-161216、Y-089-171216、RFS-M02402002017,纯度均>98%),正十五烷对照品(乐美天医药/德思特生物公司,批号DST200817-132,纯度 \geq 98%),棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和 α -亚麻酸甲酯对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为MKCM4819、MKCK7423、BCCD6969、BCCF5497、SLCK0468,纯度均>99%),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱级,其他试剂均为分析纯。

夏枯草种子(江西新余夏枯草种植基地,经色选机除杂)、兰香子(福州秋实园贸易有限公司)、奇亚籽(福建乐佰康食品科技有限公司)分别采用文火清炒约10 min,炒至变色、膨起得炒制品,样品信息见表1,均经中国中医科学院中药研究所王智民研究员鉴定,分别为唇形科植物夏枯草 *P. vulgaris*、苋科鼠尾草 *S. hispanica*、罗勒 *O. basilicum* 的干燥种子。

表1 夏枯草种子、奇亚籽和兰香子样品信息、性状、膨胀度和正己烷提取率

Table 1 Sample information, character, turgidity and *n*-hexane extraction rate of *Prunellae Spica* seeds, chia seeds and basil seeds

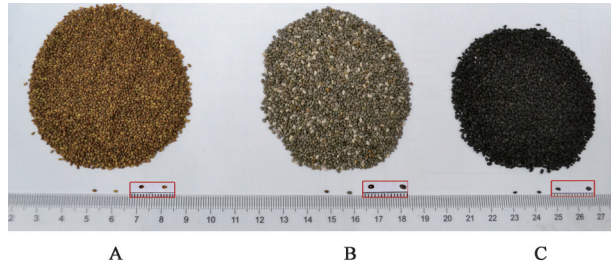
编号	品种	加工方式	膨胀度 ($\bar{x}\pm s, n=3$)/mL·g ⁻¹	正己烷提取率 ($\bar{x}\pm s, n=3$)/%	性状		
					颜色	大小	气味
I	夏枯草种子	生品	17.4±0.20	18.3±0.26	淡黄褐色或棕色,有光泽,微具沟纹 ^[19]	长1.8 mm,宽约0.9 mm	无味
II		炒制品	3.73±0.058	20.1±0.31	颜色加深,有光泽		芝麻油香味
III	奇亚籽	生品	25.2±1.2	31.1±0.61	棕色、灰色,间杂着少量黑色和白色 ^[5]	长约2.0 mm	无味
IV		炒制品	3.87±0.23	33.8±0.15	颜色加深,略微泛黄		芝麻油香味
V	兰香子	生品	35.6±1.0	21.2±0.20	黑色	长约1.8 mm	淡淡的清香
VI		炒制品	3.13±0.12	21.5±0.72	灰色		特殊气味

2 方法与结果

2.1 性状比较 夏枯草种子、奇亚籽和兰香子分别为唇形科植物夏枯草属、鼠尾草属和罗勒属植物的种子,3种种子的性状见图1,夏枯草种子表皮呈淡黄褐色或棕色,有光泽;奇亚籽种子表面多呈灰色,有少量棕褐色纹路,间杂着白色和黑色;兰香子种皮黑色;三者外种皮颜色差别较大,能够明显区分。

3种种子长度约1.5~2.0 mm,比较而言,奇亚籽最大,夏枯草种子最小。同时,三者外观形状略有差异,夏枯草种子呈三角状卵圆形或长圆状卵珠形,奇亚籽呈略扁椭圆形,兰香子与夏枯草种子相似,两侧一般不对称,背面微隆起,腹面较平坦。兰香子生品具有淡淡清香,其他2种种子则无明显气味;3种种子炒制后,表皮油性增加,颜色变深,易结块,

气味变化明显,散发出芝麻油的香味,其中,夏枯草种子气味最为明显,兰香子由于其本身具有一定香味,气味与夏枯草种子和奇亚籽稍有不同,见表1。



注:A.夏枯草种子;B.奇亚籽;C.兰香子

图1 夏枯草种子、奇亚籽和兰香子的样品性状

Fig. 1 Character of Prunellae Spica seeds, chia seeds and basil seeds

2.2 膨胀度测定 参照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(四部)通则2101方法测定。称取样品适量(夏枯草种子约1.0 g,奇亚籽和兰香子各约0.5 g),置膨胀度测定管中,精密加水25 mL,密塞,室温振摇,静置。开始的1 h内每10 min剧烈振摇1次,使供试品充分被水浸润并沉于测定管底部,除去气泡,静置4 h,读取供试品膨胀后的体积,再静置1 h,再次读数,至连续2次读数差异不超过0.1 mL为止。每份供试品平行测定3份,求其平均值,见表1。膨胀度=药物膨胀后体积/供试品按干燥品计算的质量。结果发现3种种子的生品均有明显吸水膨胀特性,膨胀度大小排序依次为兰香子>奇亚籽>夏枯草种子,炒制后3种种子的膨胀度均显著降低。因此,在开发润肠通便的产品时,应选用生品。

2.3 酚酸类成分的含量测定

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相选择乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~7 min, 2%~8%A; 7~13 min, 8%A; 13~14 min, 8%~17%A; 14~30 min,

17%A),流速0.3 mL·min⁻¹,柱温35 °C,检测波长280 nm,进样量1 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸对照品适量,加甲醇使溶解并定容,分别配制成质量浓度分别为0.602、0.106、0.135、0.214、0.408、0.992 g·L⁻¹的对照品储备液,分别定量吸取适量的对照品储备液于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得上述6个成分质量浓度分别为0.060 2、0.010 6、0.013 5、0.021 4、0.040 8、0.099 2 g·L⁻¹的混合对照品溶液,备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 取各样品粉末(过二号筛)约0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,每份样品平行3份,精密加入50%乙醇25 mL,称定质量,加热回流45 min,取出,放冷,加50%乙醇补足减失的质量,摇匀,离心10 min(转速12 000 r·min⁻¹,离心半径6.5 cm),取上清液,即得。

2.3.4 样品测定 取样品粉末约0.5 g,按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下条件测定,色谱图见增强出版附加材料,实验数据见表2。结果显示,3种种子在酚酸类成分分布上具有一定相似性,其中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛和咖啡酸含量均较低,异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量较高。利用SPSS 21.0进行单因素方差分析和配对t检验,结果发现夏枯草种子中异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量高于其他2种种子,奇亚籽中迷迭香酸含量低于兰香子,且差异均具有统计学意义(P<0.01)。3种种子炒制后,丹参素含量均显著升高(P<0.01),异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量呈现不同程度的降低,其中奇亚籽和夏枯草种子中异迷迭香酸苷、奇亚籽中迷迭香酸炒制前后差异具有统计学意义(P<0.05),这可能是炒制过程中导致异迷迭香酸苷或迷迭香酸分解所致。

表2 夏枯草种子、兰香子和奇亚籽中6种酚酸的质量分数($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Contents of 6 phenolic acids in Prunellae Spica seeds, chia seeds and basil seeds ($\bar{x}\pm s, n=3$)

编号	丹参素	原儿茶酸	原儿茶醛	咖啡酸	异迷迭香酸苷	迷迭香酸
I	0.007 85±0.000 051	<LOD	<LOD	0.003 23±0.000 054	0.579±0.003 7	0.392±0.003 2
II	0.034 0±0.000 90 ²⁾	<LOQ	0.003 05±0.000 036 ²⁾	<LOQ ²⁾	0.557±0.004 6 ¹⁾	0.388±0.004 6
III	<LOD	<LOD	<LOQ	0.002 30±0.000 024	0.237±0.006 3	0.103±0.002 4
IV	0.017 4±0.000 53 ²⁾	<LOD	<LOQ	<LOQ ²⁾	0.201±0.003 7 ¹⁾	0.090 6±0.001 7 ¹⁾
V	0.004 55±0.000 030	<LOD	<LOQ	0.006 88±0.000 16	0.233±0.004 2	0.289±0.005 9
VI	0.010 2±0.000 23 ²⁾	<LOD	<LOQ	0.004 80±0.000 098 ²⁾	0.233±0.003 2	0.288±0.004 3

注:与相应生品比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表5同);LOQ.定量限;LOD.检测限

2.4 脂肪酸成分分析

2.4.1 正己烷提取率 取各样品粉末约20 g,精密称定,平行3份,分别加入10、8倍量正己烷,超声提取2次(100 W, 40 kHz),每次40 min,合并提取液,回收溶剂得正己烷提取物,计算提取率,公式为正己烷提取率=提取物质量/称样量×100%,见表1。结果发现正己烷提取率大小排序为奇亚籽>兰香子>夏枯草种子。3种种子炒制后提取率变化不明显,但炒制后提取物香味浓,颜色较生品提取物深。

2.4.2 检测条件 DB-35MS毛细管柱(0.25 mm×60 m, 0.25 μm),进样温度250 °C,柱温215 °C,保持25 min,流速1.0 mL·min⁻¹,柱前压力207.5 kPa,分流比50:1,进样量1 μL,载气为高纯氮气。接口温度280 °C,电子轰击离子源(EI),电子能量70 eV,离子源温度230 °C,四极杆温度150 °C,标准调谐,溶剂延迟时间4 min,扫描范围*m/z* 50~550。

2.4.3 内标溶液的配制 取正十五烷96.7 mg,精密称定,置于250 mL量瓶中,加正己烷使溶解并定容至刻度,摇匀,得0.387 g·L⁻¹内标溶液,备用。

2.4.4 对照品溶液的配制 分别取棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和α-亚麻酸甲酯对照品适量,精密称定,用内标溶液制成质量浓度分别为16.0、40.5、8.03、45.7、69.2 g·L⁻¹的单个对照品储备液。分别吸取上述对照品储备液适量,置于同一量瓶中,加内标溶液定容,制成质量浓度分别

为1.60、8.10、0.803、9.14、13.8 g·L⁻¹的1号混合对照品溶液。将1号混合对照品溶液用内标溶液依次稀释得2~7号混合对照品溶液,5个成分质量浓度分别为2号:0.8、4.05、0.402、4.57、6.90 g·L⁻¹;3号:0.400、2.03、0.201、2.29、3.45 g·L⁻¹;4号:0.2、1.02、0.101、1.15、1.73 g·L⁻¹;5号:0.10、0.51、0.050 5、0.575、0.865 g·L⁻¹;6号:0.05、0.255、0.025、0.288、0.433 g·L⁻¹;7号:0.025、0.128、0.012 7、0.144、0.217 g·L⁻¹。

2.4.5 供试品溶液的制备 参照2020年版《中国药典》(四部)通则0713脂肪酸组成测定法,采用三氟化硼催化甲酯化法。称取样品I~VI的正己烷提取物约0.1 g,精密称定,置于烧瓶中,加0.5 mol·L⁻¹氢氧化钠甲醇溶液8 mL,80 °C加热回流至透明(约需10 min),加14%三氟化硼甲醇溶液7 mL,回流提取2 min,取下烧瓶迅速冷却,加入内标溶液10 mL,振荡2 min,加入饱和食盐水10 mL,振荡后静置分层,取上层清液,加入无水硫酸钠3 g进行脱水干燥,振荡1 min,静置5 min使分层,取上清液,即得。

2.4.6 线性关系考察 分别取2.4.4项下1~7号混合对照品溶液适量,按2.4.2项下条件测定。以各成分的质量浓度为横坐标,各成分峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标,绘制标准曲线,得相关系数(*r*)等数据,对7号混合对照品溶液依次稀释后进样分析,以各成分信噪比(S/N)为3时的质量浓度为LOD, S/N=10时的质量浓度为LOQ,见表3。

表3 夏枯草种子、兰香子和奇亚籽中5种脂肪酸甲酯含量测定的线性关系考察

Table 3 Linear relationships for determination of five fatty acid methyl esters in *Prunellae Spica* seeds, chia seeds and basil seeds

成分	回归方程	线性范围/g·L ⁻¹	<i>r</i>	LOQ/g·L ⁻¹	LOD/g·L ⁻¹
棕榈酸甲酯	$Y=3.245X-0.0283$	0.025 0~0.800	1.000 0	0.002 16	0.001 29
油酸甲酯	$Y=0.820X-0.0312$	0.128~4.05	0.999 9	0.010 95	0.006 57
硬脂酸甲酯	$Y=3.026X-0.0108$	0.012 7~0.402	0.999 9	0.003 01	0.001 81
亚油酸甲酯	$Y=1.330X-0.1154$	0.144~4.57	0.999 8	0.012 33	0.007 40
α-亚麻酸甲酯	$Y=1.765X-0.2181$	0.217~6.90	0.999 8	0.011 22	0.006 73

2.4.7 精密度试验 取2.4.4项下的3号混合对照品溶液适量,按2.4.2项下条件连续进样6次,计算棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和α-亚麻酸甲酯与内标物的峰面积之比的相对标准偏差(RSD)分别为1.2%、1.2%、1.5%、1.2%和1.4%,表明仪器精密度良好。

2.4.8 重复性试验 取样品I的正己烷提取物约0.1 g,精密称定,按2.4.5项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.4.2项下条件测定,计算棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和α-亚麻酸甲

酯的平均质量分数分别为7.66%、11.4%、1.77%、19.3%和50.3%,RSD分别为1.2%、1.7%、1.5%、1.4%和1.9%,表明该方法的重复性良好。

2.4.9 稳定性试验 取样品I的正己烷提取物约0.1 g,精密称定,按2.4.5项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、2、4、6、8、12、24 h按2.4.2项下条件测定,计算棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和α-亚麻酸甲酯与内标物的峰面积之比的RSD分别为0.7%、1.2%、1.3%、1.4%和1.4%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.10 加样回收试验 分别取棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和 α -亚麻酸甲酯对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为12.5、16.9、2.88、31.1、79.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品储备液,分别精密量取上述对照品储备液4.0 mL,置于量瓶中,加入氢氧化钠2 g,加甲醇使溶解并稀释至刻度,制成棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和 α -亚麻酸甲酯质量浓度分别为0.500、0.676、0.115、1.24、3.17 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠甲醇溶液。取样品I的正己烷提取物约0.05 g,精密称定,平行6份,分别加入上述混合对照品溶液8.0 mL,按2.4.5项下方法制备供试品溶液,按2.4.2项下条件测定,计算棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和 α -亚麻酸甲酯平均加样回收率分别为99.96%、98.79%、101.9%、97.18%和100.9%,RSD分别为1.8%、2.0%、2.8%、2.3%和2.2%,表明该方法的准确度较好,具体数据见增强出版附加材料。

2.4.11 样品测定 取样品I~VI的脂肪油甲酯化

样品,按2.4.2项下条件测定,总离子流图见增强出版附加材料,采用配置的美国国家标准与技术研究院(NIST)08.LIB和NIST08s.LIB谱库进行自动检索,结合相似度进行成分鉴定,共鉴别出12种成分,其中5种脂肪酸甲酯经对照品对照,确定为棕榈酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、亚油酸甲酯和 α -亚麻酸甲酯,各成分相对质量分数见表4,该条件下5种脂肪酸甲酯总相对质量分数>99%。利用5种脂肪酸甲酯成分与内标物的峰面积比值,计算5种脂肪酸的含量,见表5。结果发现3种种子中脂肪酸的组成相似,5种脂肪酸质量分数总和86.9%~92.7%,其中 α -亚麻酸>亚油酸>油酸>棕榈酸>硬脂酸。夏枯草种子生品正己烷提取物中油酸、亚油酸和 α -亚麻酸3种不饱和脂肪酸质量分数总和为80.6%, α -亚麻酸和亚油酸为人体必需脂肪酸,质量分数总和为69.2%。利用SPSS 21.0进行配对 t 检验,发现兰香子中棕榈酸炒制后比炒制前含量降低($P<0.05$),其他成分炒制前后差异均无统计学意义。

表4 夏枯草种子、奇亚籽和兰香子正己烷提取物成分的鉴定和相对质量分数($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Identification and contents of components in *n*-hexane extracts of *Prunellae Spica* seeds, chia seeds and basil seeds ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

No.	成分	I	II	III	IV	V	VI
1	正十五烷(内标)	-	-	-	-	-	-
2	肉豆蔻酸甲酯	0.083 3 \pm 0.005 8	0.096 7 \pm 0.005 8	0.040 0 \pm 0	0.030 0 \pm 0	0.050 0 \pm 0	0.036 7 \pm 0.005 8
3	十五烷酸甲酯	0.020 0 \pm 0.017	0.026 7 \pm 0.005 8	0.013 3 \pm 0.012	0.023 3 \pm 0.005 8	-	0.013 3 \pm 0.012
4	棕榈酸甲酯 ¹⁾	7.47 \pm 0.21	7.92 \pm 0.074	6.69 \pm 0.087	6.59 \pm 0.21	7.85 \pm 0.095	7.43 \pm 0.11
5	14-甲基十六烷酸甲酯	-	-	0.143 \pm 0.005 8	0.157 \pm 0.005 8	0.086 7 \pm 0.005 8	0.086 7 \pm 0.012
6	十七酸甲酯	-	-	0.036 7 \pm 0.012	0.060 0 \pm 0.028	0.056 7 \pm 0.005 8	0.050 0 \pm 0
7	油酸甲酯 ¹⁾	11.5 \pm 0.031	11.9 \pm 0.015	6.95 \pm 0.026	6.80 \pm 0.17	12.9 \pm 0.038	13.9 \pm 0.005 8
8	硬脂酸甲酯 ¹⁾	2.46 \pm 0.025	2.55 \pm 0.012	4.09 \pm 0.026	4.05 \pm 0.071	4.34 \pm 0.026	4.21 \pm 0.020
9	亚油酸甲酯 ¹⁾	20.8 \pm 0.038	21.1 \pm 0.046	18.8 \pm 0.032	18.8 \pm 0.042	19.4 \pm 0.040	19.4 \pm 0.075
10	α -亚麻酸甲酯 ¹⁾	57.7 \pm 0.320	56.3 \pm 0.021	63.0 \pm 0.065	63.3 \pm 0.52	55.3 \pm 0.081	54.9 \pm 0.17
11	顺-7-十六碳烯酸甲酯	-	-	0.040 \pm 0.035	0.063 3 \pm 0.015	-	-
12	蜂蜡酸甲酯	-	-	0.157 \pm 0.012	0.170 \pm 0.010	0.033 3 \pm 0.029	0.053 3 \pm 0.005 8

注:¹⁾经对照品比对;-未检出(表6同)

表5 夏枯草种子、兰香子和奇亚籽正己烷提取物中5种脂肪酸的质量分数($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Contents of five fatty acids in *n*-hexane extracts of *Prunellae Spica* seeds, chia seeds and basil seeds ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

成分	I	II	III	IV	V	VI
棕榈酸	7.69 \pm 0.12	7.50 \pm 0.080	6.86 \pm 0.10	6.82 \pm 0.049	8.00 \pm 0.093	7.34 \pm 0.068 ¹⁾
油酸	11.4 \pm 0.28	11.0 \pm 0.089	6.90 \pm 0.14	6.87 \pm 0.051	12.7 \pm 0.24	13.1 \pm 0.27
硬脂酸	1.78 \pm 0.035	1.70 \pm 0.019	3.56 \pm 0.074	3.54 \pm 0.005 9	3.84 \pm 0.084	3.59 \pm 0.075
亚油酸	19.2 \pm 0.38	18.9 \pm 0.37	17.9 \pm 0.31	18.0 \pm 0.13	18.2 \pm 0.35	17.8 \pm 0.36
α -亚麻酸	50.0 \pm 1.2	47.8 \pm 1.1	57.2 \pm 1.1	57.1 \pm 0.55	50.0 \pm 1.0	47.9 \pm 0.95

2.5 挥发油组成分析

2.5.1 供试品溶液的制备 参照2020年版《中国药

典》(四部)通则2204挥发油测定法甲法。称取各样品粉末约100 g,精密称定,加水7 L,料液比1:70,

振摇,混匀,连接挥发油测定器与回流冷凝管。自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶时为止。置电热套加热提取6 h,至挥发油不再增加。由于出油量特别少,无法对挥发油进行准确读数而计算挥发油提取量。因此,仅对挥发油组成进行成分分析。将芳香水加适量乙酸乙酯萃取,经无水硫酸钠干燥后进行GC-MS分析。

2.5.2 检测条件 WM-5MS毛细管柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm),进样温度250 °C,程序升温(柱温60 °C,保持15 min;以升温速率5 °C·min⁻¹升至190 °C,保持15 min;以升温速率20 °C·min⁻¹升至270 °C,保持10 min),流速1.0 mL·min⁻¹,载气为高纯氮气,柱前压力65.8 kPa,分流比10:1。接口温度

280 °C, EI, 电子能量70 eV, 离子源温度230 °C, 四极杆温度150 °C, 标准调谐, 溶剂延迟时间3 min, 扫描范围 *m/z* 20~500。

2.5.3 挥发油成分鉴定 挥发油样品按2.5.2项下条件检测,总离子流图见增强出版附加材料。采用NIST08.LIB和NIST08s.LIB谱库进行自动检索,鉴定相对质量分数>2.0%的成分,共得21种化合物,样品I~VI中各化合物相对质量分数的总和分别为89.2%、86.9%、87.3%、91.1%、94.4%、80.9%,见表6。结果发现3种种子挥发性成分大部分相似,但不同种子间存在特异性,比如夏枯草种子中鲨烯含量明显高于其他2种种子;同时,炒制对种子挥发油影响明显,炒制后低沸点成分增多,尤其是兰香子。

表6 夏枯草种子、奇亚籽、兰香子中挥发油的鉴别及相对质量分数

Table 6 Volatile constituents and their relative contents in *Prunellae Spica* seeds, chia seeds and basil seeds

%

No.	化合物	I	II	III	IV	V	VI
1	3,5-辛二烯-2-酮	-	-	-	-	-	2.03
2	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇	-	-	-	-	-	2.53
3	N-甲酰基缩二脲	-	-	2.57	1.85	-	-
4	4-烯丙基苯甲醚	0.220	-	-	-	-	33.6
5	4-(1-异丙基)苯甲醛	-	-	-	-	-	2.72
6	(E)-2-十三烯醛	0.200	2.00	-	-	-	0.090 0
7	(E,E)-2,4-癸二烯醛	0.420	2.41	0.660	-	-	3.14
8	2-十一烯醛	0.140	2.95	-	-	-	0.150
9	4,11,11-三甲基-8-亚甲基-二环[7.2.0]4-十一碳烯	-	-	3.63	0.510	-	0.340
10	(Z,Z,Z)-1,5,9,9-四甲基-1,4,7-环十一烷三烯	-	-	-	-	-	2.05
11	石竹素	-	-	1.88	4.73	-	0.390
12	棕榈酸甲酯	0.770	0.950	1.88	4.15	8.19	7.06
13	十五烷酸乙酯	2.61	1.10	2.38	0.700	5.69	2.87
14	贝壳杉烯	-	-	5.39	14.7	-	-
15	亚油酸甲酯	1.87	1.52	3.37	3.57	9.12	3.62
16	11,14,17-顺-二十碳三烯酸甲酯	6.19	6.46	12.3	12.7	30.3	11.0
17	亚油酸乙酯	5.34	1.51	2.08	0.560	4.48	1.41
18	α-亚麻酸乙酯	17.9	3.99	6.43	2.73	15.3	4.44
19	α-亚麻酸	4.56	0.930	2.17	1.57	0.280	0.050 0
20	芥酸酰胺	20.1	23.4	41.9	42.9	20.6	3.46
21	鲨烯	28.9	39.7	0.610	0.380	0.430	0.100

3 讨论

夏枯草是重要的药食两用物质之一,在中医临床和大健康产品领域均有广泛应用。本研究针对夏枯草采收、贮藏过程中自然脱落的大量种子,从膨胀度、化学组成(酚酸和脂肪酸)等方面进行系统分析,并与市售的兰香子及新食品原料奇亚籽进行对比分析,以挖掘夏枯草种子的利用价值,为夏枯

草废弃资源的综合利用提供实验依据。

3.1 夏枯草种子具有吸水膨胀特性 膨胀度是物质膨胀性质的评价指标,本研究采用2020年版《中国药典》(四部)收录的膨胀度测定方法,首次比较了夏枯草种子、奇亚籽和兰香子的膨胀度,结果发现夏枯草种子生品的膨胀度虽低于奇亚籽生品和兰香子生品,但远高于2020年版《中国药典》规定的

车前子膨胀度(≥ 4.0)。奇亚籽和圆苞车前子壳是2014年原国家卫生和计划生育委员会批准的新食品原料^[20],两者均具有明显吸水膨胀特性,人体食用后在小肠吸水膨胀而增加肠容积,促进肠蠕动达到缓泻或润肠通便的功能^[21]。本研究首次发现夏枯草种子具有相似的吸水膨胀特性,有助于研发相似功能食品。同时,其炒制品膨胀度远低于生品,这一现象与车前子研究结果一致,可能与所含多糖类成分的变化有关^[22]。因此,夏枯草种子进行产品开发时若用其缓泻或润肠通便功效,建议选用生品。

3.2 夏枯草种子富含酚酸类成分 夏枯草种子丰富的酚酸类成分是其发挥药理作用的物质基础,其中迷迭香酸具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎等药理作用^[23-24],这一成分也是2020年版《中国药典》夏枯草药材质量评价的指标成分。本文采用UPLC对夏枯草种子、兰香子和奇亚籽的生品和炒制品中6种酚酸含量进行测定,结果发现3种种子中异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量均较高,丹参素和咖啡酸次之,原儿茶酸和原儿茶醛含量较低或未检出,这与前人报道的夏枯草种子^[15]、奇亚籽^[14,16]中主成分含量水平相符。种子炒制后异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量降低,丹参素含量升高,推测可能是炒制过程中热处理导致部分异迷迭香酸苷或迷迭香酸发生分解。就这3种种子的异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量而言,夏枯草种子显著高于奇亚籽、兰香子($P < 0.01$),提示夏枯草种子具有与奇亚籽、兰香子相似的开发价值,并且可能具有更好的抗氧化活性。

3.3 夏枯草种子富含不饱和脂肪酸 食用油作为人们日常生活必需品,其中的不饱和脂肪酸有助于保证细胞的正常生理功能,改善血液微循环,提高脑细胞活性,增强记忆力和思维能力,逐渐成为评价植物油品质的指标之一^[25]。本文利用GC-MS对夏枯草种子、兰香子、奇亚籽中脂肪酸进行定性和定量分析,在建立的GC-MS条件下,样品在正十五烷的保留时间处无色谱峰,为校正仪器进样量,选择正十五烷作为内标物。夏枯草种子生品脂肪油中不饱和脂肪酸的质量分数为80.6%,其中 α -亚麻酸的质量分数为50.0%,结合其正己烷提取物的提取率18.3%,折算夏枯草种子不饱和脂肪酸和 α -亚麻酸的质量分数分别为14.7%和9.15%。前人曾报道夏枯草种子的出油率为6.0%,其中 α -亚麻酸相对质量分数为88.25%^[4]。与之相比,本研究首次明确了夏枯草种子中 α -亚麻酸的绝对含量。本研究表

明奇亚籽与兰香子的正己烷提取物的提取率(出油率)分别在31.1%和21.2%左右,与文献报道的16.8%^[12]和27.5%^[7]不太一致,这可能与实验所用材料不同有关。从5种主要脂肪酸的含量来看,3种种子中含量高低排序均为 α -亚麻酸 $>$ 亚油酸 $>$ 油酸 $>$ 棕榈酸 $>$ 硬脂酸。目前熟知的 α -亚麻酸质量分数 $>$ 50%的植物油较为少见,仅有杜仲籽油和紫苏籽油^[26],本研究表明夏枯草种子、奇亚籽和兰香子均为高含量 α -亚麻酸的植物来源。考虑到其极高的营养价值,提示夏枯草种子在开发小众食用油方向具有一定潜力。

采用水蒸气蒸馏法提取夏枯草种子挥发油时发现,加入2~3倍量水后,由于吸水膨胀作用,物料膨胀为凝胶团,当持续增加加水量时,挥发油提取率极低,最终只能针对芳香水的乙酸乙酯萃取物进行挥发性成分鉴定。曾有研究报道夏枯草种子挥发油具有良好的抗炎作用^[18],本文研究结果提示其抗炎作用可能不是挥发油所致,实际可能是其所含的脂肪酸,这一推测进一步通过文献追溯其受试物的提取方法^[18]得到证实。

综上所述,夏枯草种子具有高膨胀度,以及丰富的酚酸类成分和高含量的 α -亚麻酸,提示夏枯草种子在开发功能食品方面具有较大潜力,开发前景良好。本研究为夏枯草在采收和贮藏过程中自然脱落的种子废弃资源的高值化利用指明了方向,但必须指出的是,夏枯草种子作为药用部位果穗的一部分,单独对其进行开发,在拓宽废弃资源的利用途径、减少资源浪费的同时,也需平衡夏枯草药材的整体质量,避免因种子产品的效益显著导致蓄意从果穗中剥取种子,进而降低药材质量的现象。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:292.
- [2] 李思思,华川,杨金月,等. 夏枯草治疗自身免疫性甲状腺炎的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(9):1018-1022.
- [3] 刘盛旺,陈映冰,林静怡,等. 夏枯草对乳腺疾病作用机制概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(5):250-255.
- [4] 李诗卉,邓静,粟倩,等. 夏枯草果实石油醚提取物GC-MS分析及抗炎活性研究[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(6):689-692.
- [5] MARCINEK K, KREJCIO Z. Chia seeds (*Salvia*

- hispanica*) : Health promoting properties and therapeutic applications-a review [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2017, 68(2):123-129.
- [6] NAZIR S, WANI I A, MASOODI F A. Extraction optimization of mucilage from Basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds using response surface methodology[J]. *J Adv Res*, 2017, 8(3):235-244.
- [7] PARKER J, SCHELLENBERGER A N, ROE A L, et al. Therapeutic perspectives on chia seed and its oil: A review[J]. *Planta Med*, 2018, 84(9/10):606-612.
- [8] GHALESHAHI A Z, EZZATPANAH H, RAJABZADEH G H, et al. Comparison and analysis characteristics of flax, perilla and basil seed oils cultivated in Iran[J]. *J Food Sci Technol*, 2020, 57(4):1258-1268.
- [9] KHAZAEI N, ESMAILI M, DJOMEH Z E, et al. Characterization of new biodegradable edible film made from basil seed (*Ocimum basilicum* L.) gum [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 102:199-206.
- [10] TAVARES L S, JUNQUEIRA L A, DE OLIVEIRA G Í C, et al. Cold extraction method of chia seed mucilage (*Salvia hispanica* L.): Effect on yield and rheological behavior [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55 (2) : 457-466.
- [11] 高妮娜,刘鸿铖,邹岩,等. 提取方法对奇亚籽油品质特性的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(6):284-291.
- [12] 胡尔西丹·伊麻木,马庆苓,阿布力米提·伊力,等. 罗勒籽脂肪酸及其对蛋白酪氨酸磷酸酯酶1B(PTP1B)抑制作用的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(9):1261-1263,1302.
- [13] LIU B B, YAN W D. Quantitative polyunsaturated fatty acid analysis of chia seed oil by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr Sci*, 2021, 59(2):120-127.
- [14] 肖治均. 奇亚籽化学成分表征及抗氧化与免疫活性分析[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [15] 冯伟红,李春,信伟梅,等. 生物测定法用于中药质量评价的探索研究——以夏枯草抗氧化活性与总酚酸含量相关性的研究为例[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(14):2660-2668.
- [16] MARTÍNEZ-CRUZ O, PAREDES-LÓPEZ O. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1346:43-48.
- [17] 孙莲,王康斌. 罗勒子挥发油的化学成分及多糖的单糖组成分析[J]. *国际药学研究志*, 2019, 46(7):538-545.
- [18] 雷思敏,夏伯候,张智敏,等. 夏枯草种子挥发油GC-MS指纹图谱及抗炎活性[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3):1466-1471.
- [19] 袁耿生. 葶苈子与夏枯草子的鉴别[J]. *基层中药杂志*, 2002, 16(6):32-32.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于批准塔格糖等6种新食品原料的公告(2014年第10号)[J]. *中国食品添加剂*, 2014, 25(5):202-204.
- [21] 王东,林力,袁昌鲁,等. 车前子及其炮制品膨胀度的分析[J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(12):902-903.
- [22] 李潮,温柔,严丽萍,等. 车前子的品种、炮制及质量评价研究概况[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5):224-232.
- [23] FENG L, JIA X B, ZHU M M, et al. Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. *in vitro* and in tumor-bearing mice[J]. *Molecules*, 2010, 15(12):9145-9156.
- [24] 陈立亚. 迷迭香酸的研究概况[J]. *中国药事*, 2007, 21(11):923-926,929.
- [25] 穆同娜,孙婷,吴燕涛,等. 三种食用植物油中不饱和脂肪酸含量调查[J]. *粮油食品科技*, 2011, 19(3):36-38.
- [26] 赵文红,范青生,肖小年,等. 杜仲籽油研究开发现状与利用展望[J]. *中国油脂*, 2006, 31(3):66-68.

[责任编辑 刘德文]