

GC 内标法同时测定油菜花粉中 6 种脂肪酸成分

周鑫^{1,2}, 范杰¹, 徐斌^{1,2}, 吴飞群^{1,2}, 庄翠华^{1,2}, 王建方^{1,2*}

(1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 GC 内标法同时测定油菜花粉中肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯的含量。方法 油菜花粉氢氧化钠甲醇提取物采用 HP-INNOWAX 毛细管柱 (30.0 m \times 320 μ m \times 0.25 μ m); 载气氮气; 进样口温度 210 $^{\circ}$ C; 分流比 5:1; FID 检测器温度 250 $^{\circ}$ C; 气体体积流量 1.3 mL/min (N_2)、40 mL/min (H_2)、400 mL/min (空气); 进样量 4 μ L。结果 肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯分别在 0.012 7~0.126 7 mg/mL、0.064 2~0.642 4 mg/mL、0.010 9~0.108 8 mg/mL、0.011 7~0.116 5 mg/mL、0.016 9~0.168 9 mg/mL、0.095 5~0.954 9 mg/mL 范围内线性关系良好 ($r\geq 0.999 7$), 6 种脂肪酸的精密度、稳定性、重复性实验 RSD $<5\%$, 平均加样回收率 (RSD) 分别为 100.74% (0.96%)、100.95% (0.85%)、105.65% (1.14%)、98.11% (1.35%)、98.45% (0.80%)、95.50% (0.69%)。结论 该方法简便准确, 专属性好, 可用于油菜花粉的质量控制。

关键词: 油菜花粉; 脂肪酸; 气相色谱法; 内标法

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)08-2760-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.053

油菜花粉是十字花科植物油菜 *Brassica campestris* Linn. 的花粉, 经蜜蜂科昆虫中华蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 等工蜂采集, 干燥制成, 是我国分布面积最广、产量最大的花粉品种。油菜花粉中含有蛋白质、脂肪酸、氨基酸、维生素等多种营养成分及甾醇、黄酮、皂苷、多肽、辅酶等多种活性物质^[1-2], 被视为名贵药材和“完全营养食品”, 以油菜花粉为单一主药制剂普乐安片收载于 2020 年版《中国药典》一部^[3], 可用于肾气不固所致腰膝痠软、排尿不畅、尿后余沥或失禁, 慢性前列腺炎及前列腺增生等症。

油菜花粉中含有单不饱和脂肪酸 (油酸)、多不饱和脂肪酸 (如亚油酸、 α -亚麻酸) 与饱和脂肪酸 (如肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、煤焦油酸)^[4], 与油菜花粉降血脂、促进血液微循环、排毒养颜功效相关。目前针对药品和食品中脂肪酸的检测技术已较为成熟^[5], 常见检测方法有气相色谱法、气相色谱-串联质谱法、高效液相色谱法^[6]、高效液相色谱-串联质谱法^[7-8]、红外光谱法^[9-10]、核磁共振法等。曾广胜等^[11]利用气相色谱法对油菜花粉脂肪酸类成分进行指纹图谱分析并将其用于油菜花粉鉴别和质量控制。潘建国等^[12]用 GC-MS 技术分离鉴定出油菜花粉中 10 种脂肪酸, 该方法提取粗脂肪较为耗时, 且稳定性、重现性不够理想。江赞博等^[13]经 HPLC 分析鉴定出油菜蜂花粉油中 16 种脂肪酸, 该法可粗略估算脂肪酸在粗脂肪中所占比

例。杨艺婷等^[14]使用 GC-MS 分析鉴定后通过混合标准品的外标法进行绝对定量。杨必成等^[15]采用 HPLC-ELSD 法建立了 4 种脂肪酸类化合物分析方法, 该法响应值与被测物质呈复杂的非线性关系, 且不适用于油菜花粉。本实验采用气相色谱法, 以十九烷酸甲酯为内标, 建立了一种准确、快速测定油菜花粉中 6 种脂肪酸含量的检测方法, 为油菜花粉质量标准建立提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 6890 气相色谱仪, 配制 FID 检测器、HP-INNOWAX 毛细管柱 (30.0 m \times 320 μ m \times 0.25 μ m) (美国 Agilent 公司); SPH-300 氢气发生器、SPB-3 全自动空气源 (北京中惠普分析技术研究所); GPI 空气净化器 (杭州科晓化工仪器设备有限公司); BS210S 电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; AX205DR 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); DK-S26 型恒温水浴锅 (上海精密科学仪器有限公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); R 系列旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司)。

1.2 试剂与药物 油菜花粉购自青海省花宝蜂业股份有限公司, 均为当年蜜蜂采集, 产地分别为青海西宁 (批号 1208006、1208032)、甘肃 (批号 1208010、HS120901)、内蒙 (批号 1208033、HS120802); 普乐安片购自浙江康恩

收稿日期: 2021-10-07

基金项目: 重大科技专项重点社会发展项目 (2013C03005)

作者简介: 周鑫 (1980—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药研发与大品种二次开发研究。Tel: 15068788464, E-mail: zhouxin1@conbapharm.com

* **通信作者:** 王建方 (1983—), 男, 硕士, 高级工程师, 从事中药新药研发与大品种二次开发研究。E-mail: wangjf@conbapharm.com

贝制药股份有限公司(批号190705、190809、190910、200802、200803、200927、210107、210419、210420、210421)。肉豆蔻酸甲酯(批号P5580200)、棕榈酸甲酯(批号H9350100)、硬脂酸甲酯(批号K8620100)、油酸甲酯(批号R1750100)、亚油酸甲酯(批号Q1670200)、 α -亚麻酸甲酯(批号E2780300)对照品(纯度>99%)和十九烷酸甲酯(批号N5370050,色谱纯,纯度>99.5%)均购自上海安谱实验科技股份有限公司。甲醇(色谱纯,德国Merck公司);正己烷(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);氢氧化钠、三氟化硼、氯化钠、无水硫酸钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 取十九烷酸甲酯适量,精密称定,加正己烷制成2.209 mg/mL的溶液,作为内标溶液。精密称定肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯对照品适量,置同一25 mL量瓶中,加正己烷至刻度,摇匀,配制成质量浓度分别为0.501 7、2.543 9、0.430 8、0.461 3、0.668 8、3.781 4 mg/mL的贮备液,精密量取贮备液1 mL、内标溶液1 mL,置于同一10 mL量瓶中,加正己烷至刻度,摇匀,即得(肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯质量浓度分别为0.050 2、0.254 4、0.043 1、0.046 1、0.066 9、0.378 1 mg/mL,十

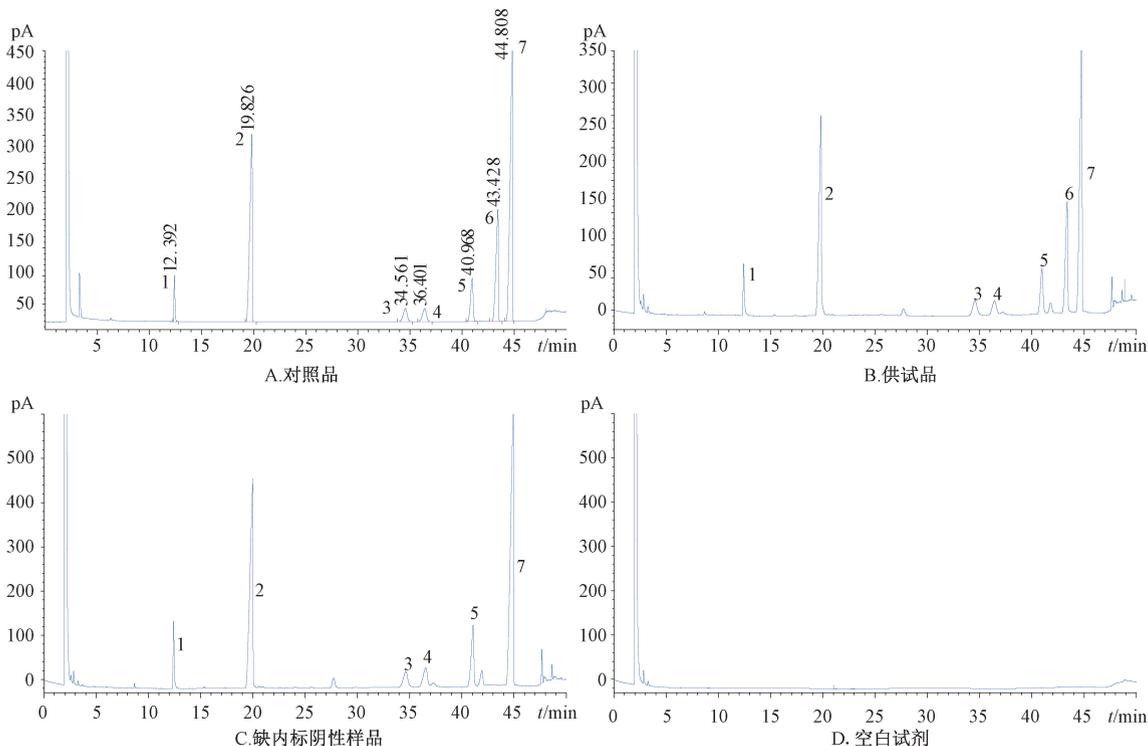
九烷酸甲酯内标质量浓度为0.220 9 mg/mL)。

2.1.2 供试品溶液 精密称定油菜花粉0.15 g于100 mL圆底烧瓶中,加0.5 mol/L氢氧化钠甲醇溶液10 mL,70℃回流45 min,通过冷凝管加10%三氟化硼甲醇溶液20 mL,回流20 min,再加入正己烷10 mL,回流1 min,放冷,加15 mL饱和氯化钠溶液,精密加入内标溶液1 mL并剧烈振摇,静置分层后移取上层正己烷溶液适量于具塞试管中,加无水硫酸钠脱水,即得。

2.1.3 缺内标阴性样品溶液 取油菜花粉适量,按“2.1.2”项下方法制备,内标溶液用正己烷替代,即得。

2.1.4 空白试剂 不称取油菜花粉样品,按“2.1.2”项下方法制备,即得。

2.2 色谱条件 HP-INNOWAX毛细管柱(30.0 m \times 320 μ m \times 0.25 μ m);载气氮气;程序升温(初始120℃保持4 min;10℃/min升至160℃,保持30 min;5℃/min升至190℃,保持3 min;50℃/min升至240℃,保持13 min);进样口温度210℃;分流进样,分流比5:1;FID检测器温度250℃;氮气、氢气、空气体积流量1.3、40、400 mL/min;理论板数按肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、十九烷酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯峰计算应不低于30 000;进样量4 μ L,色谱图见图1。由此可知,各成分色谱峰与相邻峰均能达到基线分离,阴性无干扰;十九烷酸甲酯为油菜花粉中不含有的脂肪酸甲酯,分离度好,故选择此峰为内插参照峰。



1. 肉豆蔻酸甲酯 2. 棕榈酸甲酯 3. 硬脂酸甲酯 4. 油酸甲酯 5. 亚油酸甲酯 6. 十九烷酸甲酯(内标) 7. α -亚麻酸甲酯

图1 各成分GC色谱图

2.3 线性关系考察 按“2.1.1”项下方法制备对照品溶液,精密吸取0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、

2.5 mL,置于10 mL量瓶中,各加入内标溶液1 mL,加正己烷至刻度,摇匀,在“2.2”项色谱条件下进样测定,以

对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 对照品与内标峰面积比为纵坐标 (Y) 进行回归, 得回归方程分别为肉豆蔻酸甲酯 $Y=4.2003X+0.0020$ ($r=0.9997$), 线性范围 $0.0127\sim 0.1267$ mg/mL; 棕榈酸甲酯 $Y=4.3564X+0.0099$ ($r=0.9997$), 线性范围 $0.0642\sim 0.6424$ mg/mL; 硬脂酸甲酯 $Y=4.4597X+0.0012$ ($r=0.9998$), 线性范围 $0.0109\sim 0.1088$ mg/mL; 油酸甲酯 $Y=4.4000X+0.0010$ ($r=0.9997$), 线性范围 $0.0117\sim 0.1165$ mg/mL; 亚油酸甲酯 $Y=4.4768X+0.0011$ ($r=0.9997$), 线性范围 $0.0169\sim 0.1689$ mg/mL; 亚麻酸甲酯 $Y=4.4451X+0.0108$ ($r=0.9997$), 线性范围 $0.0955\sim 0.9549$ mg/mL, 表明各脂肪酸甲酯在各自范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验 取“2.1.2”项下供试品溶液 $4\mu\text{L}$, 在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯含量 RSD 分别为 0.22%、0.10%、0.09%、0.24%、0.12%、0.07%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 于 0、4、8、14、18、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 测得肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯含量 RSD 分别为 0.54%、0.30%、0.21%、0.12%、0.18%、0.09%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 精密称定 6 份油菜花粉于 100 mL 圆底烧瓶中, 每份约 0.15 g, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得肉豆蔻酸甲酯平均含量为 0.267%, RSD 为 0.37%; 棕榈酸甲酯平

均含量为 1.780%, RSD 为 0.36%; 硬脂酸甲酯平均含量为 0.298%, RSD 为 0.84%; 油酸甲酯平均含量为 0.229%, RSD 为 0.40%; 亚油酸甲酯平均含量为 0.462%, RSD 为 0.37%; α -亚麻酸甲酯平均含量为 2.517%, RSD 为 0.31%, 表明该方法重复性良好。

2.7 日间精密性试验 在不同的 6 个日期, 取同一份供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 测得肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯含量 RSD 分别为 2.95%、2.28%、3.26%、3.61%、1.77%、2.06%, 表明仪器日间精密性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称定各成分含量已知的油菜花粉 0.075 g 于 100 mL 圆底烧瓶中, 共 6 份, 加入对照品肉豆蔻酸甲酯 0.2534 mg、棕榈酸甲酯 1.2848 mg、硬脂酸甲酯 0.2176 mg、油酸甲酯 0.2330 mg、亚油酸甲酯 0.3378 mg、 α -亚麻酸甲酯 1.9098 mg, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次, 计算回收率。结果, 肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、 α -亚麻酸甲酯平均加样回收率 (RSD) 分别为 100.74% (0.96%)、100.95% (0.85%)、105.65% (1.14%)、98.11% (1.35%)、98.45% (0.80%)、95.50% (0.69%)。

2.9 样品含量测定 取 6 批油菜花粉和 10 批普乐安片, 粉碎后过 80 目筛, 称取样品适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 计算含量, 结果见表 1。

表 1 各成分含量测定结果 ($n=3$)

药物	批号	肉豆蔻酸甲酯/%	棕榈酸甲酯/%	硬脂酸甲酯/%	油酸甲酯/%	亚油酸甲酯/%	α -亚麻酸甲酯/%	总脂肪酸/%
油菜花粉	1208006	0.287	1.997	0.322	0.211	0.484	2.759	6.061
	1208032	0.284	1.921	0.315	0.238	0.501	2.725	5.984
	1208010	0.275	2.004	0.303	0.244	0.466	2.727	6.019
	HS120901	0.286	2.140	0.277	0.294	0.463	3.673	7.134
	1208033	0.245	1.919	0.297	0.197	0.481	2.361	5.499
	HS120802	0.226	1.823	0.271	0.194	0.471	2.347	5.331
普乐安片	190705	0.211	1.613	0.208	0.161	0.415	2.038	4.645
	190809	0.188	1.589	0.224	0.158	0.378	2.006	4.544
	190910	0.163	1.519	0.179	0.157	0.330	1.870	4.218
	200802	0.161	1.541	0.194	0.149	0.337	1.903	4.284
	200803	0.145	1.408	0.175	0.152	0.313	1.836	4.030
	200927	0.171	1.629	0.196	0.149	0.370	2.215	4.730
	210107	0.206	1.632	0.196	0.162	0.374	2.266	4.835
	210419	0.234	1.703	0.208	0.205	0.405	2.521	5.277
210420	0.215	1.671	0.233	0.172	0.372	2.261	4.925	
210421	0.217	1.635	0.238	0.151	0.416	2.585	5.241	

由此可知, 6 批来源不同油菜花粉总脂肪酸含量在 5.331%~7.134% 之间, 参考各批次油菜花粉总脂肪酸含量, 暂定油菜花粉中总脂肪酸含量不低于 4.5%, 该结论可作为油菜花粉质量标准参考依据。同时, 普乐安片主成分为油菜花粉, 由于其来源不同, 10 批普乐安片总脂肪酸含量在 4.030%~5.277% 之间, 可通过控制油菜花粉质量以实

现对普乐安片脂肪酸类成分进行质量控制。

3 讨论

3.1 色谱条件选择 本实验考察了色谱柱程序升温条件, 以使油菜花粉 6 种脂肪酸之间、内标十九烷酸甲酯与各脂肪酸之间, 均达到最佳分离, 最终确定最佳程序升温条件为 $120\text{ }^\circ\text{C}$, 保持 4 min; $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $160\text{ }^\circ\text{C}$, 保持

30 min; 5 °C/min 升至 190 °C, 保持 3 min; 50 °C/min 升至 240 °C, 保持 13 min。

3.2 供试品前处理方法优化 本实验分别比较了油菜花粉称样量 (0.1、0.15、0.2、0.25、0.5、1、1.5 g), 氢氧化钠甲醇溶液浓度 (0.25、0.5、1、2 mol/L) 及用量 (5、10、15、20、25 mL), 氢氧化钠甲醇溶液加入后反应温度 (50、60、70、80 °C) 及反应时间 (15、30、45、60 min), 10% 三氟化硼甲醇溶液用量 (5、10、15、20、25 mL) 及加入后反应时间 (2、10、20、30 min), 正己烷用量 (10、20、30、40 mL) 及萃取次数 (1、2、3 次), 综合考虑总脂肪酸与单个脂肪酸含量变化趋势及反应彻底性, 最终确定供试品前处理条件为油菜花粉称样量 0.15 g, 氢氧化钠甲醇溶液浓度 0.5 mol/L、用量 10 mL, 氢氧化钠甲醇溶液加入后 70 °C 回流 45 min, 10% 三氟化硼甲醇溶液用量 20 mL、加入后回流 20 min, 正己烷用量 10 mL、萃取 1 次。

3.3 结果分析 样品脂肪酸含量测定结果表明, 青海、甘肃、内蒙三地的油菜花粉总脂肪酸含量在 5.331%~7.134% 之间, 不饱和脂肪酸含量最高达到 4.430%, 其中批号为 HS120901 的甘肃油菜花粉中对人体有益的 α -亚麻酸甲酯含量高达 3.673%, 亚油酸甲酯含量也达到 0.463%。亚油酸、 α -亚麻酸均属多不饱和脂肪酸, α -亚麻酸具有防治血脂沉积、抑制血小板凝集的作用, 是很好的抗血栓剂和营养补充剂, 亚油酸可促进饱和脂肪酸及其衍生的脂类化合物和胆固醇等在血液中的运动, 以达到防治动脉硬化的目的^[16]。由此可见, 将脂肪酸成分作为油菜花粉质量检测指标具有一定意义, 油菜花粉作为主要资源值得引起人们重视。

本实验采用水浴加热回流提取法对油菜花粉中 6 种脂肪酸成分进行提取, 操作简便。6 种脂肪酸线性相关系数最小为 0.999 7, 精密度、稳定性、重复性实验 RSD<5%, 平均加样回收率良好。该方法线性关系良好, 精密度高, 稳定性与重复性好, 分离效果好, 检测灵敏度高, 能准确测定油菜花粉中 6 种脂肪酸成分, 可为油菜花粉的后续研究奠定基础。

参考文献:

[1] 戴志乔, 徐德平. 油菜蜂花粉中皂苷化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(3): 352-354.

[2] 杨必成, 刘 海, 杨义芳, 等. 油菜花粉中黄酮类化合物的提取与分析[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2451-2455.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1761.

[4] 牛德芳, 王 波, 陈玉勇, 等. 油菜蜂花粉及其蜂粮的营养成分[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 218-223.

[5] 周文斌, 吕春明, 张 宁, 等. 脂肪酸检测方法的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(2): 246-252.

[6] 郑振佳, 赵先恩, 迟炳海, 等. 花生油中游离脂肪酸的 HPLC-FLD 分析[J]. 分析试验室, 2011, 30(3): 23-27.

[7] Xie Y F, Li G L, You J M, *et al.* A novel labeling reagent of 2-(12-benzo [b] acridin-5- (12H) -yl) -acetohydrazide for determination of saturated and unsaturated fatty acids in traditional Chinese herbs by HPLC-APCI-MS [J]. *Chromatographia*, 2012, 75: 571-583.

[8] 胡 娜, 索有瑞, 韩丽娟, 等. 柱前衍生 HPLC-MS 法测定黑果枸杞果实中脂肪酸[J]. 分析试验室, 2014, 33(6): 698-701.

[9] Casale M, Oliveri P, Casolino C, *et al.* Characterisation of PDO olive oil *Chianti Classico* by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 712: 56-63.

[10] Vongsvivut J, Heraud P, Zhang W, *et al.* Quantitative determination of fatty acid compositions in micro-encapsulated fish-oil supplements using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy[J]. *Food Chem*, 2012, 135(2): 603-609.

[11] 曾广胜, 盛卫国, 叶剑锋, 等. 油菜花粉脂肪酸成分气相色谱纹图谱研究及聚类分析[J]. 医药导报, 2013, 32(5): 677-680.

[12] 潘建国, 段 怡, 吴惠勤, 等. 油菜蜂花粉中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2003, 22(1): 74-76.

[13] 江赞博, 张高扬, 韩 玲. 油菜蜂花粉油亚临界萃取及其 HPLC 分析[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 328-331.

[14] 杨艺婷, 张红城, 董 捷. 3 种甲酯化方法对 GC-MS 测定花粉中脂肪酸的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 248-254.

[15] 杨必成, 刘 海, 杨义芳, 等. HPLC-ELSD 测定油菜花粉抗前列腺增生活性部位中 4 种脂肪酸类化合物[J]. 中草药, 2012, 43(10): 1967-1970.

[16] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 44.