

气相色谱法测定牛蒡子脂肪油中 3 种脂肪酸含量

卢淑君,杨燕云,许亮,康廷国*,王海波
(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:建立气相色谱法(GC)测定不同产地牛蒡子脂肪油中亚油酸、油酸、棕榈酸含量的方法。方法:采用 PEG-20M 弹性石英毛细管柱(0.5 μm×0.32 mm×30 m);气化室温度 280℃,FID 检测器,温度 300℃,柱温初温 165℃,保持 3 min,以 3.5℃·min⁻¹升至 205℃,然后以 35℃·min⁻¹升至 230℃,保持 22 min。载气氮气(99.99%)。以石油醚为提取溶媒,提取 10 批不同产地牛蒡子药材生品及 5 批不同产地炮制品中的脂肪油,经甲酯化后,以十七烷酸甲酯为内标物,进行测定比较。结果:亚油酸在 0.122 3~1.958 1 μg 线性关系良好($r=0.999\ 8$);油酸在 0.039 2~0.626 4 μg 线性关系良好($r=0.999\ 8$);棕榈酸在 0.037 2~0.596 4 μg 线性关系良好($r=0.999\ 8$)。各产地牛蒡子脂肪油中均以亚油酸含量为最高,炮制前后对脂肪酸含量的影响较大。结论:方法准确、可靠、重复性好,可用于牛蒡子脂肪油中亚油酸、油酸、棕榈酸的质量控制。

[关键词] 气相色谱法;内标法;脂肪油;牛蒡子

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)20-0056-05

Determination of 3 Kinds of Fatty Acids in Arctium Fructus by GC

LU Shu-jun, YANG Yan-yun, XU Liang, KANG Ting-guo*, WANG Hai-bo
(College of Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To assay linoleic acid, oleic acid and stearic acid in the fatty oil of Arctium Fructus from different areas by GC. **Method:** The GC separation was performed on a PEG-20M quartz capillary column (30 m×0.32 mm×0.5 μm) and the initial temperature was programmed from 165℃ to 205℃ at 3.5℃·min⁻¹ and kept for 3 min, then raised to 230℃ at 30℃·min⁻¹ and maintain for 22 min, inject temperature at 280℃, FID detector temperature was at 300℃, carrier gas was N₂(99.99%). Petroleum ether was used to extract the fatty oil from both crude and processed Arctium Fructus of different areas and after methyl esterification, determination and comparison were carried out by taking margaric acid methyl ester as internal standard. **Result:** The standard curves of linoleic acid, oleic acid and stearic acid were linear within the range of 0.122 3-1.958 1 μg, 0.039 2-0.626 4 μg, 0.037 2-0.596 4 μg and the coefficient were 0.999 8, 0.999 8, 0.999 8 respectively. The content of linoleic acid was the highest in fatty oil of Arctium Fructus from all areas, and the content of fatty acids would be significantly affected by processing. **Conclusion:** The method can be used to control the quality of linoleic acid, oleic acid and stearic acid in the fatty oil of Arctium Fructus, which is accurate, reliable and repeatable.

[Key words] GC; internal standard method; fatty oil; Arctium Fructus

牛蒡 *Arctium lappa* L. 为菊科牛蒡属植物,全国 各地普遍分布,生于山坡、山谷、林缘、林中、灌木丛

[收稿日期] 20110619(001)

[基金项目] 国家十一五科技支撑计划(2006BAI009B02-6);辽宁省教育厅课题(2009A496);辽宁中医药大学青年药学人才基金(YXRC0920)

[第一作者] 卢淑君,在读硕士研究生,研究方向:中药资源与鉴定的研究及开发,E-mail:lsj110101@163.com,Tel:13898183719

[通讯作者] *康廷国,教授,博士研究生导师,研究方向:中药鉴定与品质评价,Tel:0411-87586028

中、河边潮湿地、村庄路旁或荒地,其干燥成熟果实即为常用中药牛蒡子,具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效,用于风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛、疔腮丹毒、痈肿疮毒^[1]。牛蒡子中除了活性成分木脂素类外,还含有大量脂肪油,其中大部分为脂肪酸类成分,具有潜在的医疗保健价值^[2],因而本实验对牛蒡子脂肪油中的亚油酸、油酸、棕榈酸等脂肪酸类成分进行含量测定,旨在为牛蒡子脂肪油的进一步开发利用提供有价值的参考信息。

1 材料

1.1 仪器 JD60-4 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司)、TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、Agilent 6820 气相色谱仪系统、工作站: CERITY NDS QA/ QC 系统(石化)、氢火焰离子化检测器(FID)。

1.2 试剂 石油醚(30~60℃)、甲醇、盐酸、正己烷、氢氧化钾、氯化钠均为分析纯。

1.3 试药 对照品:亚油酸甲酯(纯度>99%,批号 20101021,美国 NU-CHEK 公司),油酸甲酯(纯度>99%,批号 20101117,美国 NU-CHEK 公司),棕榈酸甲酯(纯度>99%,批号 20101117,美国 NU-CHEK 公司), γ -亚麻酸甲酯(纯度>99%,批号 20090408,美国 NU-CHEK 公司)。内标物:十七烷酸甲酯(纯度>99%,批号 20100816,美国 NU-CHEK 公司)。10 批不同产地牛蒡子药材部分为自采,部分为商品,炮制品炮制方式均为清炒。经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为牛蒡 *A. lappa* 的干燥成熟果实。见表 1、2。

表 1 不同产地样品编号,采集地点,收集方式

No.	采集地点	收集方式
1	吉林省抚松县	采集
2	甘肃省岷县	采集
3	天津蓟县	采集
4	山东省苍山	采集
5	四川省雅安县	采集
6	陕西省西安咸阳市	采集
7	河北安国振宇中药饮片有限公司	市场采集
8	河北康派中药材有限公司	市场收集
9	辽宁沈阳成大方圆医药连锁有限公司	市场收集
10	辽宁沈阳浩天大药房	市场收集

表 2 不同产地炮制品编号及来源

No.	产地	来源	批号
11	吉林	安国市昌达中药材饮片有限公司	0801001
12	天津	天津南开区平湖药店	080328
13	山东	浙江中医药大学中药饮片厂	080723
14	四川	天津中医药大学中药学院提供	自制
15	西安	陕西中医学院药学系提供	自制

2 方法与结果

2.1 脂肪油的提取 取样品药材适量,除杂,干燥,粉碎,过 40 目筛,备用。取药材粉末 10 g,精密称定,记录为 M_1 。将粉末置于圆底烧瓶中,加入适量石油醚(30~60℃),水浴回流 6 h,过滤,残渣干燥称重,记录为 M_2 ,回收溶剂至无石油醚味,并且连续两次称重的差异不超过 5 mg,所得淡黄色脂肪油,即是。计算脂肪油收率,脂肪油收率 = $(M_1 - M_2) / M_1 \times 100\%$,本试验测得牛蒡子脂肪油平均收率为 15.26% ($n=6$)。

2.2 色谱分离条件 PEG-20M 弹性石英毛细管柱(0.5 $\mu\text{m} \times 0.32 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$),气化室温度 280℃。柱温初温 165℃,保持 3 min,以 3.5℃·min⁻¹升至 205℃,然后以 35℃·min⁻¹升至 230℃,保持 22 min,检测器温度 300℃,载气氮气(99.99%),燃气氢气,助燃气空气,进样量 2.0 μL 。

2.3 溶液的制备

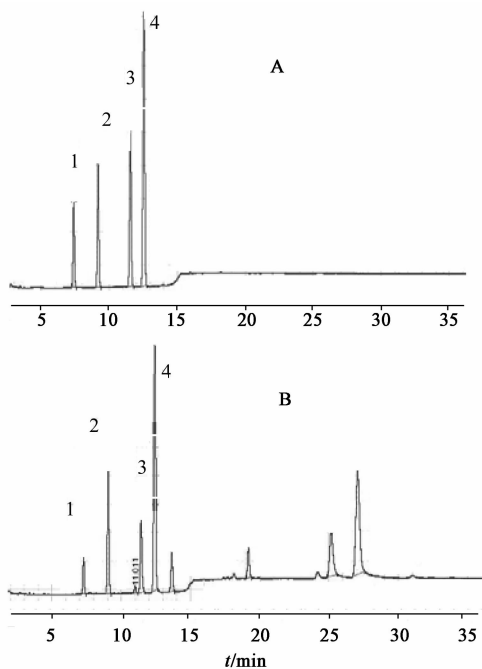
2.3.1 内标溶液的制备 精密称取十七烷酸甲酯,加正己烷溶解,制成 11.31 g·L⁻¹的内标溶液备用。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密量取棕榈酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯对照品,用正己烷定容,分别制成 2.13,2.61,9.79 g·L⁻¹的溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备^[3] 取脂肪油样品 0.5 g,精密称定。各置于具塞圆底烧瓶中,加入 0.5 mol·L⁻¹氢氧化钾-甲醇溶液 20 mL,于 60℃水浴中皂化 15 min,冷却后加入 25% 的盐酸溶液 40 mL,60℃水浴中放置 15 min。冷却后加入正己烷 20 mL。振摇,加入饱和氯化钠溶液 20 mL,离心取上清液即得,备用。从中取正己烷层 12.5 mL,置于 25mL 量瓶,加 1 mL 内标溶液,用正己烷定容至刻度。

2.4 色谱分离条件的选择 经过试验,在 2.3 项下色谱条件下,所测定成分之间达到完全分离,并与内标物的分离度良好。见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取 2.3.2 中制备的储备液,棕榈酸甲酯溶液 8.75 mL,油酸甲酯溶液 7.50



A. 混合对照品对照;B. 加入内标物的样品

1. 棕榈酸甲酯;2. 十七烷酸甲酯;3. 油酸甲酯;4. 亚油酸甲酯

图 1 牛蒡子脂肪油的 GC

mL,亚油酸甲酯溶液 6.25 mL 混置于 25 mL 量瓶中,加正己烷定容至刻度,作为混合对照品溶液。再精密量取上述混合溶液 8.0,4.0,2.0,1.0,0.5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,精密加入 1 mL 内标溶液,用正己烷定容至刻度,制成系列浓度对照品溶液。精密吸取 2 μ L,按 2.2 项下色谱条件进行测定,记录色谱峰面积。以各对照品峰面积与内标物峰面积之比对各对照品浓度和内标物浓度之比进行回归分析。结果见表 3。

表 4 棕榈酸甲酯回收率(n=6)

称样量/g	样品中含量/mg·g ⁻¹	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.256	6.608	6.39	12.91	98.62	95.53	2.29
0.255	6.546	6.39	12.79	97.72		
0.253	6.239	6.39	12.19	93.12		
0.257	6.279	6.39	12.27	93.76		
0.252	6.367	6.39	12.44	95.04		
0.250	6.356	6.39	12.42	94.89		

2.10 样品测定 取 10 个不同产地牛蒡子药材及 5 个批次的牛蒡子炮制品,按 2.3.3 项制备,在 2.2 项色谱条件下,进样量 2 μ L,记录色谱图。以内标法计算棕榈酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯的含量。

表 3 3 种脂肪酸甲酯的线性关系			
脂肪酸甲酯名称	线性范围/ μ g	回归方程	r
棕榈酸甲酯	0.037 2~0.596 4	$Y = 1.034 5X + 0.009 7$	0.999 8
油酸甲酯	0.039 2~0.626 4	$Y = 0.489 1X + 0.007 4$	0.999 8
亚油酸甲酯	0.122 3~1.958 1	$Y = 0.735 7X + 0.022 2$	0.999 8

2.6 精密度试验 精密量取 2.5 项下制备的中间浓度对照品溶液 2 μ L,按 2.2 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱峰面积。结果棕榈酸甲酯,油酸甲酯,亚油酸甲酯峰面积与内标物峰面积比值的 RSD 分别为 0.91%,0.62%,0.30%。

2.7 重复性试验 精密称取同一样品(第 2 号样品),照 2.3.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件,进样 2 μ L,进行测定,记录色谱图。以棕榈酸甲酯,油酸甲酯,亚油酸甲酯的含量测定结果做为评价指标。结果表明棕榈酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯含量的 RSD 分别为 0.83%,0.51%,0.35%。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(第 2 号样品),分别于制备 0,2,4,6,8 h 后,按 2.2 项下色谱条件测定,进样量 2 μ L。记录色谱峰面积。结果供试品中棕榈酸甲酯,油酸甲酯,亚油酸甲酯峰面积与内标物峰面积之比,RSD 分别为 1.29%,1.02%,0.26%,表明样品在制备后 8 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收试验 精密称取按 2.1 项下制备的已知含量的脂肪油样品 0.25 g(选用第 2 号样品),共 6 份,每份分别加入桐酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯对照品,按 2.3.3 项下制备供试品溶液,在 2.2 色谱条件下,进样量 2 μ L,测定。结果见表 4~6。

2.11 脂肪酸类成分含量计算方法^[4] 棕榈酸相对分子质量为 256,棕榈酸甲酯相对分子质量为 270,因此棕榈酸含量计算方法如下:

棕榈酸含量 = 棕榈酸甲酯含量 $\times$ 256/270

油酸相对分子质量为 282,油酸甲酯相对分子

表 5 油酸甲酯回收率 (n = 6)

称样量/g	样品中含量/mg·g ⁻¹	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.256	5.423	5.22	10.31	93.62	95.18	2.32
0.255	5.414	5.22	10.29	93.41		
0.253	5.478	5.22	10.41	94.48		
0.257	5.438	5.22	10.33	93.72		
0.252	5.728	5.22	10.88	98.69		
0.250	5.638	5.22	10.71	97.16		

表 6 亚油酸甲酯回收率 (n = 6)

称样量/g	样品中含量/mg·g ⁻¹	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.256	39.952	34.26	72.03	93.63	99.81	1.46
0.255	40.268	34.26	72.27	93.41		
0.253	38.511	34.26	70.88	94.48		
0.257	39.022	34.26	71.13	93.72		
0.252	36.069	34.26	69.88	98.69		
0.250	36.533	34.26	69.82	97.16		

质量为 296,因此油酸含量计算方法如下:

油酸含量 = 油酸甲酯含量 × 282/296

亚油酸相对分子质量为 280,亚油酸甲酯相对分子质量为 294,因此亚油酸含量计算方法如下:

亚油酸含量 = 亚油酸甲酯含量 × 280/294

结果见表 7,8。

表 7 10 批不同产地牛蒡子脂肪油中脂肪酸含量 (n = 3)

No.	棕榈酸	油酸	亚油酸
1	11.18 ± 0.10	11.72 ± 0.03	76.76 ± 0.20
2	13.34 ± 0.07	11.60 ± 0.11	73.75 ± 0.35
3	11.20 ± 0.05	14.66 ± 0.02	63.93 ± 0.08
4	5.13 ± 0.03	10.27 ± 0.05	32.02 ± 0.07
5	12.98 ± 0.13	15.71 ± 0.05	86.36 ± 0.26
6	15.51 ± 0.30	16.01 ± 0.14	94.84 ± 0.35
7	10.67 ± 0.11	12.48 ± 0.09	78.22 ± 0.15
8	12.46 ± 0.15	13.24 ± 0.13	62.37 ± 0.18
9	8.08 ± 0.03	10.32 ± 0.05	68.93 ± 0.06
10	3.27 ± 0.02	3.92 ± 0.03	20.83 ± 0.03

3 结论与讨论

本实验在色谱柱选择方面共比较了 DB-1 (0.25 μm × 0.25 mm × 30 m), DB-5 (1.50 μm × 0.53 mm × 30 m) 以及 PEG-20M (0.5 μm × 0.32 mm × 30 m) 3 种色谱柱。由于牛蒡子脂肪油中多数脂肪酸

表 8 5 批不同产地牛蒡子清炒品脂肪油中脂肪酸含量 (n = 3)

No.	棕榈酸	油酸	亚油酸
11	14.08 ± 0.16	17.49 ± 0.02	100.45 ± 0.30
12	12.20 ± 0.15	18.88 ± 0.20	44.47 ± 0.18
13	8.97 ± 0.08	20.08 ± 0.12	7.19 ± 0.04
14	19.20 ± 0.61	29.94 ± 0.23	13.31 ± 0.42
15	7.31 ± 0.05	7.23 ± 0.04	7.86 ± 0.04

类成极性较大,在考虑组分按沸点高低顺序出峰外,还应该考虑固定液的极性对组分分离度的影响,因而本实验采用 PEG-20M 极性柱进行测定分析,结果表明各组分分离效果较好。

本实验采用内标法进行测定,以消除甲酯化、手动进样等因素所造成的系统误差。在内标物的选择方面,大多数关于脂肪酸类成分测定的文献报道中,多选择 C_{11:0}, C_{17:0}, C_{19:0}, C_{23:0} 等含奇数碳的单不饱和脂肪酸甲酯进行测定^[5-9]。在经过综合分析比较,本实验选择 C_{17:0} 作为内标物,其保留时间与待测组分相近,分离度良好,且为样品中不含有的组分,因而符合要求。

为了考察炮制以后牛蒡子脂肪油组分的含量变化,本实验选取了 5 批的牛蒡子炮制品(清炒)进行炮制前后的比较分析。炮制后亚油酸含量普遍大幅降低,油酸含量普遍升高,含量差异十分明显,而饱和脂肪酸棕榈酸的含量只是略有变化。因而可以认

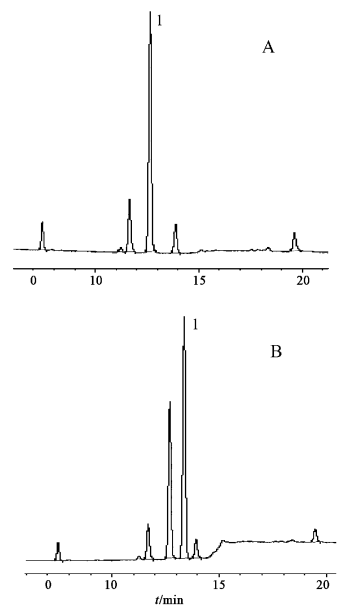
为,炮制过程中产生的高温对不饱和脂肪酸类成分的影响较为显著。

由于文献报道牛蒡脂肪油中含有亚麻酸^[2],故本实验购买了 6,9,12-十八碳三烯酸甲酯(γ -亚麻酸甲酯),向样品溶液中加入适量,按 2.2 项下色谱条件测定,结果该对照品与样品中各组分达到完全分离,但保留时间极为相近,见图 3,因此可以表明样品不含有 6,9,12-十八碳三烯酸甲酯(γ -亚麻酸甲

酯),但不排除可能存在其同分异构体,9,12,15-十八碳三烯酸甲酯(α -亚麻酸甲酯)。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010;66.
[2] 刘军海,崔庆新,程霜.牛蒡籽油脂理化特性及脂肪酸组成的研究[J].中国油脂,2000,25(2):51.
[3] 丁玉萍,崔兆杰,邱琴,等.牛蒡子脂肪油的超临界CO₂流体萃取及GC-MS分析[J].食品工业科技,2006,27(4):73.
[4] 谷锐,张艺,赖先荣,等.气象色谱法测定心迪软胶囊中亚油酸的含量[J].中成药,2007,29(1):155.
[5] 马彦玲,孙莲,张慧,等.气相色谱法测定茺菁子油脂中6种脂肪酸的含量[J].新疆医科大学学报,2010,33(11):1296.
[6] 裴瑾,颜永刚,万德光.桃仁中脂肪酸的含量分析研究[J].中药材,2009,32(6):908.
[7] 谷满仓,王辉,蒋国潮,等.气象色谱法测定月见草籽超临界流体萃取物中有效成分的含量[J].医学研究杂志,2009,38(2):57.
[8] 李洪英,方洪壮.水飞蓟油中4种脂肪酸的含量测定[J].食品工业科技,2010,31(7):360.
[9] 庄俊钰,冯志强,谢忠阳.气相色谱内标法测定深海鱼油中的EPA和DHA[J].现代食品科技,2009,25(11):1363.



A. 未加入对照品的样品; B. 加入对照品的样品

1. γ -亚麻酸甲酯

图2 牛蒡子脂肪油 GC

[责任编辑 蔡仲德]