

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0147-05

甲酯化-GC 法测定石榴籽油脂肪酸含量

申元福^{1,2},沈 灵²,谢贞建²,李小红²,罗金华²,姚 倩^{2*}¹成都大学 药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室;²成都大学 药学与生物工程学院,成都 610106

摘要:对石榴籽油脂肪酸进行甲酯化处理,采用 GC-MS 法鉴别,并定量测定其中 5 种脂肪酸含量,考察甲酯化方法、酯化时间和提取次数对测定的影响。结果显示,以 0.5 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液为甲酯化试剂,在 70 ℃ 下反应 5 min 后,加入内标正癸酸甲酯,用正己烷提取 3 次,脂肪酸甲酯可提取完全,测定结果准确度高,重复性好。用此法检测了 5 个厂家的石榴籽油脂肪酸含量,系统聚类分析将厂家分为高、低石榴酸含量组二大类。本实验表明,选择在提取甲酯前加入内标,经过 3 次重复提取,可准确测定油中脂肪酸含量。

关键词:石榴籽油;脂肪酸;甲酯化;GC 法;含量测定

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.021

Determination of Fatty Acids in Pomegranate Seed Oil by GC with Methyl Esterification

SHEN Yuan-fu^{1,2}, SHEN Ling², XIE Zhen-jian², LI Xiao-hong², LUO Jin-hua², YAO Qian^{2*}¹Key Laboratory of Medicinal and Edible Plant Resources Development of Sichuan Education Department, Chengdu University;²School of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Fatty acids in pomegranate seed oil were methyl esterified, identified by GC-MS, and five fatty acids in the oil were quantitatively determined by GC. The effects of methyl esterification methods, esterification agents, and extraction times on the assay were examined. The results showed that when 0.5 mol/L sodium hydroxide methanol solution was chosen as a methyl esterifying agent and the reaction was maintained at 70 ℃ for 5 min, followed by the addition of internal standard of n-capric acid methyl ester, fatty acid methyl esters were recovered completely by being extracted with n-hexane for three times. The method was accurate with good repeatability. The fatty acid contents in pomegranate seed oils from five manufacturers were determined by this approach. Cluster analysis of the manufacturers was conducted based on the fatty acid concentrations. It divided the manufacturers into two groups, including high and low content of punicic acid, respectively. The study indicated that fatty acids in plant oils can be accurately measured if internal standard was introduced before methyl ester extraction, along with three repeated extraction.

Key words:pomegranate seed oil;fatty acid;methyl esterification;GC;determination

石榴(*Punica granatum L.*)为石榴科石榴属植物,原产于巴尔干半岛至伊朗及其邻近地区。我国石榴种植主要集中在陕西临潼、安徽怀远、山东枣庄、云南蒙自和四川会理等地区。石榴不仅是一种鲜美的水果,也是我国的一种传统中药,主要以其根、叶、皮、花和种子入药,用于治疗红白痢疾、肠炎、白带、月经过多、宫颈糜烂等症状^[1,2]。据有关研究报道^[3,4],石榴籽油(pomegranate seed oil, PSO)占石榴籽总重的 20% 左右,含有大量不饱和脂肪酸,如

石榴酸、亚麻酸、亚油酸和油酸等。PSO 具有抗氧化、降血脂、降血糖、抗癌、保护免疫系统和预防动脉粥样硬化等多种药理作用^[5-8]。

目前,PSO 中脂肪酸含量的定量测定少见文献报道,大多是采用 GC-MS 法对脂肪酸的种类进行鉴定,并使用面积归一化法计算脂肪酸的相对含量^[9,10]。PSO 的品质不仅与其脂肪酸的相对含量相关,单位体积油中脂肪酸的质量高低对 PSO 生物活性的发挥具有更重要的意义。本文建立了 PSO 中脂肪酸含量的 GC 定量测定方法,主要考察甲酯化方法、酯化时间和提取次数等对脂肪酸含量测定的影响,为 PSO 的质量评价提供实验基础。

1 仪器与材料

7890B 气相色谱仪(美国安捷伦公司); Clarus 680 气相色谱质谱联用仪(美国 PerkinElmer 公司); VORTEX-5 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SHZ-B 水浴恒温振荡器(上海博讯实业有限公司); FA1004B 电子天平(上海越平科学仪器制造有限公司)。

棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯和正癸酸甲酯,含量大于 99.0%,购自上海麦克林生化科技有限公司;石榴酸甲酯为实验室自制,含量大于 95.0%;其它试剂均为分析纯,购自成都市科龙化工试剂厂。

2 方法与结果

2.1 GC 及 GC-MS 条件

GC 检测条件:固定相为 HP-5 毛细管柱($30\text{ m} \times 0.32\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$),载气为高纯氮气,柱流量 1.2 mL/min ,分流比 $20:1$,进样口温度 $270\text{ }^\circ\text{C}$,FID 检测器温度 $310\text{ }^\circ\text{C}$ 。毛细管柱程序升温: $90\text{ }^\circ\text{C}$ 开始,保持 3 min ,以 $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升到 $180\text{ }^\circ\text{C}$,保持 10 min ,再以 $2.5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升到 $250\text{ }^\circ\text{C}$ 。进样量 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。

MS 条件:EI 离子源,离子源温度 $200\text{ }^\circ\text{C}$,接口温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$,电子能量 70 eV ,溶剂延时 4 min ,扫描范围 $40\sim600\text{ Amu}$ 。

2.2 甲酯化方法的选择

2.2.1 氢氧化钠-甲醇法

取 PSO 15 mg ,置试管中,精密称定,加入 0.5 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液 4 mL ,加塞混匀,在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 5 min ,冷却至室温后,用稀盐酸调节 pH 至酸性,再用正己烷提取得上清液,进行 GC 分析。

2.2.2 三氟化硼-甲醇法^[11]

取 PSO 15 mg ,置试管中,精密称定,加入 0.5 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液 4 mL ,回流 10 min ,在回流液中加入 50% 三氟化硼-甲醇溶液 5 mL ,混合物回流 2 min ,冷却,加入正己烷 10 mL ,搅拌下加入饱和氯化钠溶液 5 mL ,分离正己烷层,用无水硫酸钠滤过除水,进行 GC 分析。

经三氟化硼-甲醇法处理,GC 色谱图出现许多杂峰,可能是三氟化硼-甲醇法反应条件剧烈,导致脂肪酸分解。经氢氧化钠-甲醇法处理,可有效检测出 PSO 中主要的脂肪酸,杂峰干扰少。因此选用氢氧化钠-甲醇法甲酯化 PSO 的脂肪酸。

2.3 GC-MS 鉴别

PSO 经甲酯化反应后,进行 GC-MS 分析,鉴定出 10 种脂肪酸,并按面积归一化法计算脂肪酸相对含量,结果见图 1 和表 1。由图表可知,石榴酸及其异构体十八碳三烯酸为 PSO 中最重要的脂肪酸,相对含量占到脂肪酸总量的 73.93% ;亚油酸和油酸分别为 6.49% 和 6.38% 。

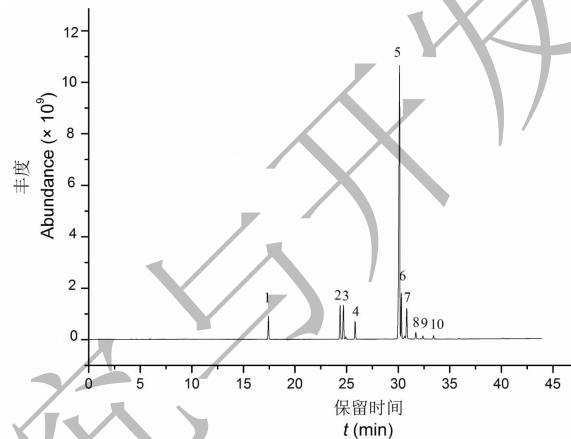


图 1 PSO 脂肪酸 GC-MS 总离子流色谱图

Fig. 1 The GC-MS total ion chromatogram of fatty acids in PSO

表 1 PSO 脂肪酸组成

Table 1 The identification of fatty acids in PSO

序号 No.	脂肪酸 Fatty acid	相对含量 Relative content(%)
1	棕榈酸 Palmitic acid	3.54
2	亚油酸 Linoleic acid	6.49
3	油酸 Oleic acid	6.38
4	硬脂酸 Stearic acid	3.28
5	石榴酸 Punicic acid	61.10
6	顺 6,顺 9,反 11-十八碳三烯酸 (6Z,9Z,11E)-Octadecatrienoic acid	6.52
7	顺 9,顺 12,顺 15-十八碳三烯酸 (9Z,12Z,15Z)-Octadecatrienoic acid	5.07
8	6,9,12-十八碳三烯酸 6,9,12-Octadecatrienoic acid	1.24
9	11-二十碳烯酸 11-Eicosenoic acid	0.59
10	二十烷酸 Eicosanoic acid	0.64

2.4 甲酯化时间的选择

取 PSO 15 mg ,置试管中,精密称定,加入甲酯化试剂,在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴分别加热 $5\text{, }10$ 及 15 min ,冷却至室温后,调节 pH 至酸性,各加入内标正癸酸甲酯,用正己烷提取,取上清液,进行色谱分析,计算石榴酸甲酯峰面积与内标物峰面积的比值。结果显示,经 $5\text{, }10$ 和 15 min 甲酯化反应所得石榴酸峰面

积与内标物峰面积比值为 2.09、2.06 和 1.82。表明随着反应时间延长,石榴酸与内标物峰面积的比值逐渐减小,可能反应时间增加,石榴酸被破坏。因此甲酯化反应时间为 5 min。

2.5 提取次数的选择

取脂肪酸含量已知的 PSO 15 mg 两份,经甲酯

化反应后,分别加入内标正癸酸甲酯,再加入等量的各脂肪酸甲酯对照品,混匀,分别用正己烷提取 2 次和 3 次,每次 2 mL,合并提取液,进行 GC 分析,按不同提取次数下各脂肪酸的含量计算回收率,结果见表 2。由表 2 可知,提取 3 次各脂肪酸回收率接近 100%,提取更完全。因此,提取次数为 3 次。

表 2 提取次数对回收率的影响

Table 2 The effect of extraction times on the recovery of fatty acids

提取次数 Extraction times	回收率 Recovery (%)				
	棕榈酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid	石榴酸 Punicic acid
2	75.42	83.26	72.34	55.87	86.67
3	99.61	100.27	100.21	100.27	99.87

2.6 含量测定方法

取 PSO 15 mg,置试管中,精密称定,加入 0.5 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液 4 mL,加塞混匀,在 70 °C 水浴加热 5 min,冷却至室温后,用稀盐酸调节 pH 至酸性,用甲醇定容至 4 mL,精密加入 14 mg/mL 正癸酸甲酯 100 μL 作为内标,用正己烷提取 3 次,每次 2 mL,提取液经 5000 rpm 下离心 5 min,取上清液

1 μL 进行气相色谱分析。取棕榈酸甲酯(67.5 μg/mL)、亚油酸甲酯(110 μg/mL)、油酸甲酯(120.0 μg/mL)、硬脂酸甲酯(97.2 μg/mL)和石榴酸甲酯(1.85 mg/mL)对照品混合溶液 4 mL,加入内标后同法提取和测定。根据对照品与内标物的峰面积比计算样品中脂肪酸含量。样品和对照品色谱图如下图 2。

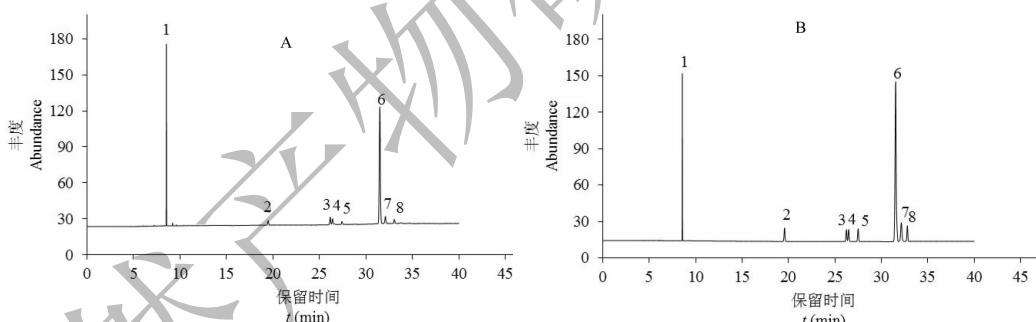


图 2 样品(A)和混合对照品(B)色谱图

Fig. 2 The chromatograms of the sample (A) and the mixed control (B)

注:1. 正癸酸甲酯;2. 棕榈酸甲酯;3. 亚油酸甲酯;4. 油酸甲酯;5. 硬脂酸甲酯;6-8. 石榴酸甲酯。

Note: 1. methyl caprate; 2. methyl palmitate; 3. methyl linoleate; 4. methyl oleate; 5. methyl stearate; 6-8. methyl punicic acid ester.

2.7 方法学考察

2.7.1 线性范围

取硬脂酸甲酯 19.4 mg、棕榈酸甲酯 20.4 mg、亚油酸甲酯 22.0 mg、油酸甲酯 18.8 mg 和石榴酸甲酯 75.4 mg,用盐酸-甲醇溶液分别定容至 10 mL,作为贮备液。分别取石榴酸甲酯溶液 5 mL,其他对照品溶液 1 mL,置同一个 10 mL 量瓶中,用盐酸-甲醇溶液定容至刻度,摇匀,再 1/2 梯度稀释制备一系列

浓度的混合对照品溶液,分别取 4 mL,加入 14 mg/mL 正癸酸甲酯 100 μL 作为内标,按“2.6”项下操作,进行色谱分析,计算脂肪酸甲酯峰面积与内标物峰面积的比值,以峰面积比值为纵坐标,脂肪酸甲酯浓度为横坐标,绘制标准曲线。实验结果见表 3。由表 3 可知,各标准曲线的相关系数均大于 0.999 0,表明线性关系良好。

表 3 脂肪酸的线性范围
Table 3 The linear ranges of fatty acids

脂肪酸甲酯 Fatty acid methyl ester	浓度范围 Concentration range ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>
棕榈酸 Palmitic acid	12.75 ~ 204.00	$Y = 0.0049X - 0.0047$	0.9994
亚油酸 Linoleic acid	27.50 ~ 220.00	$Y = 0.0044X - 0.0071$	0.9996
油酸 Oleic acid	23.50 ~ 188.00	$Y = 0.0058X - 0.0684$	0.9996
硬脂酸 Stearic acid	12.13 ~ 194.00	$Y = 0.0057X + 0.0050$	0.9994
石榴酸 Punicic acid	235.63 ~ 3770	$Y = 0.0018X + 0.0738$	0.9999

2.7.2 重复性

取6份PSO,按“2.6”项下操作,进行气相分析,分别计算各脂肪酸与内标物峰面积的比值,考察测定方法的重复性。结果显示,同一批次PSO重复测定6次,棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、石榴酸甲酯与内标物峰面积比值的RSD分别为0.70%、2.37%、2.57%、2.58%和0.60%。RSD均小于3.0%,表明该方法重复性良好。

2.7.3 回收率

取3份脂肪酸浓度已知的PSO,按“含量测定”项下进行甲酯化反应,分别加入低、中、高浓度的脂肪酸甲酯对照品(棕榈酸甲酯81.60~183.6 μg ,亚油酸甲酯180.4~365.2 μg ,油酸甲酯118.4~398.6 μg ,硬脂酸甲酯52.38~122.2 μg ,石榴酸甲酯1.44~4.46mg),混匀,定量加入内标后,用正己烷提取并进行GC分析,计算各脂肪酸甲酯低、中、高浓度的回收率,棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯和石榴酸甲酯的平均回收率分别为100.34%±0.82%、100.22%±0.57%、100.16%±

0.83%、99.68%±0.52%和99.49%±0.79%,表明该方法的准确性较高。

2.7.4 稳定性

准确称取PSO 15mg,按“2.6”项下进行甲酯化处理,得到脂肪酸甲酯溶液,分别放置0、2、4、6和8h,进行GC分析,分别计算各脂肪酸峰面积与内标物峰面积的比值,考察测定方法的稳定性。结果显示,放置0、2、4、6和8h,棕榈酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯、硬脂酸甲酯、石榴酸甲酯与内标物峰面积比值的RSD分别为2.21%、1.53%、1.77%、2.96%和1.39%,均小于3.0%,表明PSO经甲酯化反应后,各脂肪酸甲酯在8h内稳定。

2.8 样品测定

2.8.1 含量测定

在安徽亳州中药材市场购买了来自5个厂家的PSO,测定了其中脂肪酸含量,结果见表4。由表可知,不同来源的PSO中油酸和石榴酸含量差异较大。

表 4 不同厂家 PSO 中脂肪酸的含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}, n=3$)

Table 4 The content of fatty acids in pomegranate seed oil from different sources ($\mu\text{g}/\text{mg}, n=3$)

厂家编号 No.	厂家名称 Manufacturers	棕榈酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid	石榴酸 Punicic acid
1	盛源药材公司	15.03 ± 0.09	32.66 ± 0.66	28.49 ± 0.56	11.87 ± 0.25	241.00 ± 1.31
2	中药世家	13.98 ± 0.08	30.07 ± 0.57	19.32 ± 0.37	8.73 ± 0.17	301.21 ± 1.63
3	鉴证贸易有限公司	20.68 ± 0.10	38.97 ± 0.68	27.55 ± 0.57	13.57 ± 0.29	496.17 ± 2.93
4	盛鑫药材公司	13.75 ± 0.09	37.25 ± 0.73	44.99 ± 0.91	12.90 ± 0.26	303.99 ± 1.59
5	海一堂药业	18.63 ± 0.12	40.66 ± 0.71	30.63 ± 0.63	11.98 ± 0.25	424.18 ± 2.54

2.8.2 聚类分析

采用SPSS19.0软件,对各厂家脂肪酸含量进行数据标准化处理,选择系统聚类分析对厂家分类。使用欧式距离计算,用Ward法连接,得树状图(图

3)。由图可知,可将5个厂家分为二大类,第3家和第5家被聚为一类,其特点是石榴酸含量较高,其他三家为另一类。

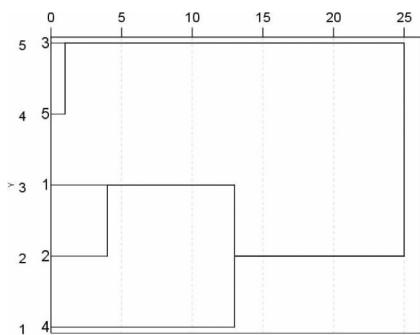


图3 PSO 厂家聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram from cluster analysis of PSO manufacturers

3 讨论

3.1 酸性调节

GC 检测脂肪酸的原理为:PSO 所含脂肪酸多以甘油酯、糖酯和磷脂的形式存在,在碱性条件下,与甲醇发生酯交换反应生成相应的甲酯,用正己烷提取后进行 GC 分析。甲酯化反应完成后需要将溶液调成酸性,以防生成的脂肪酸酯水解。研究发现,选择盐酸调节 pH,正己烷对脂肪酸甲酯的提取效率明显高于采用硫酸调节 pH,可见,酸的种类对提取影响较大。

3.2 加热方式

本研究曾采用文献报道的蒸汽浴加热方式进行酯化反应^[12],然而在实验过程中发现重复性不好,可能原因是蒸汽浴加热使样品受热温度不稳定,导致每次酯化反应程度不一致。因而改用水浴加热方式反应,与蒸汽浴加热相比,样品加热温度稳定,实验重复性更好。

3.3 含量测定

PSO 各脂肪酸含量差异较大,在内标浓度的选择上,主要侧重于考虑石榴酸的含量,并在提取前加入。实验结果发现,虽然内标峰面积相对于低含量的油酸、亚油酸等脂肪酸来说偏大,但测定的准确度和精密度仍在误差允许范围内。

参考文献

- 1 Elfalleh W, Ma Y, Nasri N, et al. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate(L.) seeds[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2011, 62:200-206.

- 2 Wang XY(王晓瑜), Gao XL(高晓黎), Mai EM. (买尔旦·马合木提). Advances in pharmacological studies of Punica granatum L[J]. *Chin Med Herald*(中国医药导报), 2008, 5:13-15.
- 3 Zhao WY(赵文亚), Sun L(孙蕾), Zhao DC(赵登超), et al. Supercritical CO₂ fluid extraction of pomegranate seed oil [J]. *China Oils Fats*(中国油脂), 2015, 40:12-14.
- 4 Yuan Y(袁妍), Li MM(李懋鸣), Li CB(李成倍), et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil using response surface methodology and the composition analysis[J]. *Food Sci Technol*(食品科技), 2013, 38: 179-184.
- 5 Li W(李薇), Hao J(郝吉), Zhang L(张浪), et al. Antioxidant activity of punica granatum seed oil on aging model mice induced by D-galactose[J]. *China Oils Fats*(中国油脂), 2018, 43:55-59.
- 6 He B(贺斌), Xu LP(许丽萍). Research and analysis of present applications of anti-inflammatory and antidiabetic of pomegranate seed oil[J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2015, 35:181-184.
- 7 Li WM(李文敏), Ao MZ(敖明章), Wang JH(汪俊汉), et al. Adjustment effects of seed oil of punica granatum L. on blood-lipid and lipid-hyperoxidation in hyperlipidemia rats [J]. *Food Sci*(食品科学), 2007, 28:309-312.
- 8 Gommersall LM, Albrecht M, Jiang W, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth and invasion of human prostate cancer cells [J]. *J Med Food*, 2004, 2:138.
- 9 Yuan B(袁博), Ge QM(戈群妹), Feng YJ(冯友建), et al. Fatty acid composition and biological and physical properties of pomegranate seed oil[J]. *Food Sci*(食品科学), 2010, 31:170-173.
- 10 Du J(杜洁), Cao Y(曹庸), Dai WJ(戴伟杰), et al. Extraction of pomegranate seed oil by low-temperature continuous phase transition and the analysis of its fatty acid[J]. *Food Machinery*(食品与机械), 2010, 33:148-151.
- 11 GB/T 17376-2008, Animal and vegetable fats and oils—Preparation of methyl esters of fatty acids(动植物油脂脂肪酸甲酯制备)[S] Beijing:2008.
- 12 Yu W, Zhao Y, Chen J, et al. Comparison of two kinds of pumpkin seed oils obtained by supercritical CO₂ extraction [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2004, 106:355-358.