

林蛙籽与四种滋补品中不饱和脂肪酸的比较研究

李楠¹, 张常丽¹, 徐东亮¹, 张建秋¹, 王钟瑶¹, 王诗涵², 王永生^{1*}

¹ 吉林大学药学院, 长春 130021; ² 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118

摘要: 为了比较分析林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝和冬虫夏草中不饱和脂肪酸的差异, 本文应用高效液相色谱法 (HPLC) 同时测定了其中六种常见不饱和脂肪酸的含量。研究发现, 林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝和冬虫夏草中不饱和脂肪酸的含量存在着显著的差异。林蛙籽和哈蟆油中检测到六种不饱和脂肪酸, 包括二十碳五烯酸 (EPA)、 α -亚麻酸 (ALA)、二十二碳六烯酸 (DHA)、花生四烯酸 (ARA)、亚油酸 (LA)、油酸 (OA)。而海参样品中检测出五种不饱和脂肪酸, 包括 EPA、DHA、ARA、LA 和 OA, 其含量普遍低于林蛙籽中相应成分的含量。在燕窝中检测出两种不饱和脂肪酸, 包括 LA 和 OA; 而在冬虫夏草中检测出三种不饱和脂肪酸, 包括 ALA、LA 和 OA, 但是它们都低于林蛙籽和哈蟆油中相应成分的含量。结果表明, 与其他四种滋补品相比, 在不饱和脂肪酸的种类和含量上, 林蛙籽都具有明显的优势, 该研究结果为林蛙籽的开发利用奠定了理论基础。

关键词: 林蛙籽; 哈蟆油; 不饱和脂肪酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0097-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.014

Comparative study on unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum and four kinds of tonics

LI Nan¹, ZHANG Chang-li¹, XU Dong-liang¹,
ZHANG Jian-qiu¹, WANG Zhong-yao¹, WANG Shi-han², WANG Yong-sheng^{1*}

¹ School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;

² College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: To compare and analyze the differences of unsaturated fatty acid in *Rana chensinensis* ovum, Oviductus Ranae, sea cucumber, bird's nest and *Cordyceps sinensis*, this work simultaneously determined the contents of six common unsaturated fatty acid by using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that there were significant differences in the contents of unsaturated fatty acid in *Rana chensinensis* ovum, Oviductus Ranae, sea cucumber, bird's nest and *Cordyceps sinensis*. Six kinds of unsaturated fatty acids were detected in *Rana chensinensis* ovum, Oviductus Ranae, including eicosapentaenoic acid (EPA), α -linolenic acid (ALA), docosahexaenoic acid (DHA), arachidonic acid (ARA), linoleic acid (LA) and oleic acid (OA). Five kinds of unsaturated fatty acids, including EPA, DHA, ARA, LA and OA, were detected in sea cucumber samples, which were generally lower than those in *Rana chensinensis* ovum. Two kinds of unsaturated fatty acids, including LA and OA, were detected in bird's nest, while three kinds of unsaturated fatty acids, including ALA, LA and OA, were detected in *Cordyceps sinensis*, but they were lower than those in *Rana chensinensis* ovum, Oviductus Ranae. The results showed that compared with the other four tonics, *Rana chensinensis* ovum had relatively rich types and higher contents of unsaturated fatty acid, laying a theoretical foundation for the development and utilization of *Rana chensinensis* ovum.

Key words: *Rana chensinensis* ovum; Oviductus Ranae; unsaturated fatty acids; HPLC

长链不饱和脂肪酸是人体必需的脂肪酸, 参与机体的代谢活动, 具有广泛的药理活性, 不仅能够调

节血脂、清理血栓、预防心脑血管疾病, 而且能够改善内分泌、增强机体免疫力、提高免疫系统抵御癌细胞的能力、协调人体自身免疫系统^[1-4]。但由于大多数的不饱和脂肪酸不能在体内合成, 需要通过饮食来获取, 因此在饮食中摄入必需量的不饱和脂肪

收稿日期: 2021-04-15 接受日期: 2021-05-06

基金项目: 吉林省科学发展计划 (20200404037YY)

* 通信作者 Tel: 86-013944165683; E-mail: wys@jlu.edu.cn

酸是维持人体正常生理机能所不可或缺的^[5-7]。我们所熟知的滋补类营养品,例如哈蟆油、海参、燕窝和冬虫夏草中就富含不饱和和脂肪酸,林蛙籽作为哈蟆油生产过程中的主要副产物,也含有丰富的不饱和和脂肪酸。

HPLC 是用于识别和量化天然药物提取物和生物样品中的化合物的最广泛使用的方法,可以提供快速可靠的结果,具有高灵敏度和高可重复性。本研究应用 HPLC 法同时测定林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝和冬虫夏草中的主要不饱和脂肪酸^[8],分别对其中的不饱和脂肪酸进行分析和比较,为其质量评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(安捷伦,匹兹堡,美国);Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(安捷伦,匹兹堡,美国);CPA-225D 十万分之一天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);WP-UP-III-10 超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司);DRHHW 数显恒温水浴锅(上海双捷实验设备有限公司);RE-52-99 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品与试剂

二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、花生四烯酸(ARA)(北京坛墨质检科技有限公司), α -亚麻酸(ALA)、亚油酸(LA)、油酸(OA)(上海安谱实验科技股份有限公司)。石油醚、甲醇(化学纯,西陇化工股份有限公司);乙腈(色谱纯,Fisher 公司)。

1.3 实验样品

哈蟆油、林蛙籽、海参、燕窝、冬虫夏草(白山市三宝堂生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)和 1% 磷酸水溶液(B);梯度洗脱:0 ~ 10 min 内 86% → 93% 流动相 A, 10 ~ 20 min 内 93% 流动相 A, 20 ~ 30 min 内 93% → 100% 流动相 A;流速:0 ~ 14 min 内 1.0 ~ 0.5 mL/min, 14 ~ 30 min 内 0.5 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取适量 EPA、ALA、DHA、ARA、LA

和 OA 的标准品置于 2 mL 容量瓶中,加入甲醇定容至刻度,摇匀。在 HPLC 进样前,使用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,取滤液,即得标准品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝、冬虫夏草样品于研钵中研磨成粉末。将每个样品平行称取 0.80 g 粉末,用滤纸包裹置于索氏提取器中。取 300 mL 石油醚加入 500 mL 圆底烧瓶中,与索氏提取器组装,将提取装置置于 90 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中 8 h。萃取完成后,使用旋转蒸发器于 45 $^{\circ}$ C 减压回收石油醚。将提取物用甲醇溶解,并在 2 mL 容量瓶中定容,作为供试品溶液。

2.2.3 空白溶液的制备

以甲醇作为空白溶液。

2.3 样品的测定

分别精密称取林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝、冬虫夏草粉末 0.80 g,按“2.2.2”项下的方法制备样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以线性回归方程计算 6 种不饱和脂肪酸成分在林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝、冬虫夏草中的含量。

3 结果与讨论

3.1 不饱和脂肪酸标准曲线的绘制

结果见表 1。

表 1 六种不饱和脂肪酸标准曲线的回归方程

Table 1 Regression equation of standard curve of six unsaturated fatty acids

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	R^2	线性范围 Linear range(μ g)
EPA	$y = 11\ 198x + 94.40$	0.999 9	14.59 ~ 116.74
ALA	$y = 6\ 244x + 91.95$	0.999 9	21.76 ~ 174.07
DHA	$y = 14\ 151x + 34.20$	1.000 0	7.20 ~ 57.57
ARA	$y = 10\ 379x + 505.69$	0.999 6	38.34 ~ 306.73
LA	$y = 4\ 221x + 522.27$	0.999 4	68.35 ~ 546.82
OA	$y = 817x + 866.82$	0.998 2	303.56 ~ 2 428.48

注:EPA:二十碳五烯酸;ALA: α -亚麻酸;DHA:二十二碳六烯酸;ARA:花生四烯酸;LA:亚油酸;OA:油酸。

Note: EPA: Eicosapentaenoic acid; ALA: α -Linolenic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; ARA: Arachidonic acid; LA: Linoleic acid; OA: Oleic acid.

3.2 不饱和脂肪酸的含量测定

3.3 不同药材中不饱和脂肪酸的种类、含量分析

通过对林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝、冬虫夏草中不饱和脂肪酸的含量测定,从图 1 中可以看出其不饱和脂肪酸的组成和含量差异较大。从表 2 中可以看出林蛙籽、哈蟆油中检测到六种不饱和脂肪酸。

哈蟆油中六种不饱和脂肪酸的含量较为均衡,其中 OA 的含量最高,而 OA 能够提高细胞中脂肪酸的氧化速率,可参与脂质失调相关的代谢疾病治疗^[9]。这说明了哈蟆油可能具有一定治疗脂质代谢紊乱疾病的功效,为开发哈蟆油脂质代谢疾病相关产品提供了理论依据。林蛙籽中六种不饱和脂肪酸的含量

差异较大,其中 OA 含量最高,ALA、LA 次之。其中 ALA 属于 ω -3 多不饱和脂肪酸,LA 属于 ω -6 多不饱和脂肪酸。有研究表明 ω -3 和 ω -6 不饱和脂肪酸在恶性肿瘤的治疗中有着显著作用,包括乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝脏癌和胰腺癌^[10,11],为林蛙籽产品成为恶性肿瘤共治剂提供理论依据。

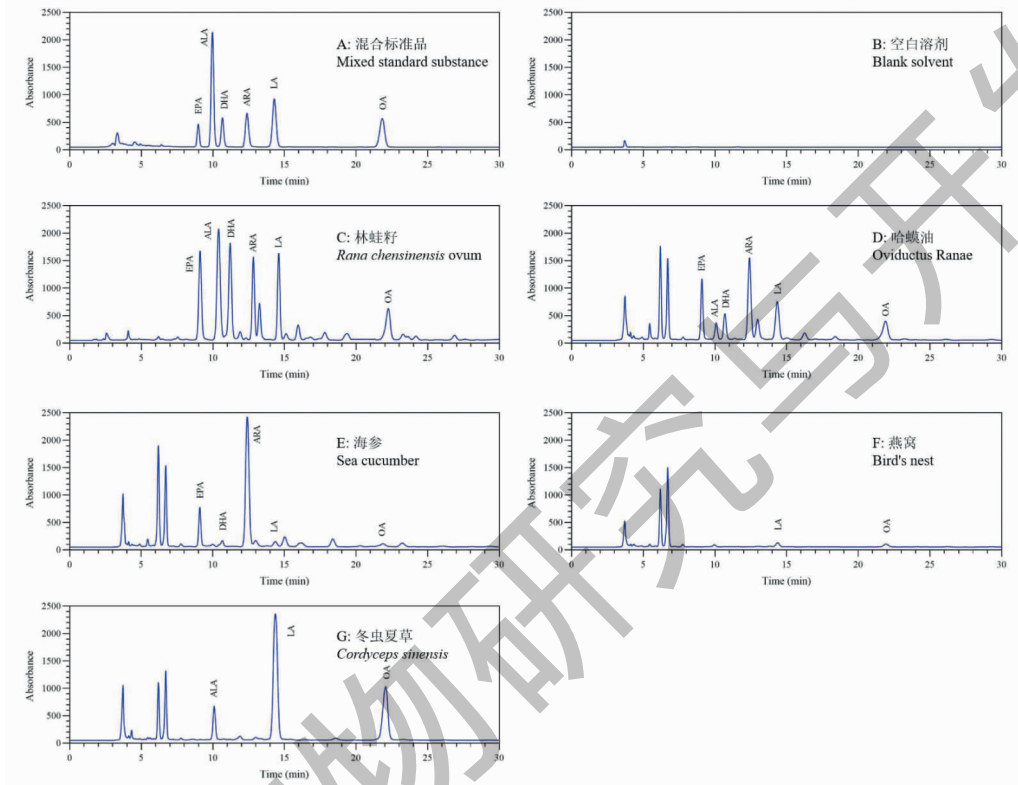


图1 混合标准品、空白溶剂、林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝、冬虫夏草高效液相色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatogram of mixed standard substance, blank solvent, *Rana chensinensis ovum*, *Oviductus Ranae*, sea cucumber, bird's nest, *Cordyceps sinensis*

表2 哈蟆油、林蛙籽、海参、燕窝、冬虫夏草中不饱和脂肪酸的含量

Table 2 Contents of unsaturated fatty acid in *Oviductus Ranae*, *Rana chensinensis ovum*, sea cucumber, bird's nest, *Cordyceps sinensis* ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid	哈蟆油 <i>Oviductus Ranae</i>	林蛙籽 <i>Rana chensinensis ovum</i>	海参 Sea cucumber	燕窝 Bird's nest	冬虫夏草 <i>Cordyceps sinensis</i>
二十碳五烯酸 EPA	0.25	1.98	0.16	-	-
α -亚麻酸 ALA	0.15	5.28	-	-	0.27
二十二碳六烯酸 DHA	0.11	1.86	0.03	-	-
花生四烯酸 ARA	0.49	1.71	0.89	-	-
亚油酸 LA	0.67	4.45	0.09	0.07	2.47
油酸 OA	2.41	14.89	0.48	0.4	6.34

海参样品中检测出五种不饱和脂肪酸,且除 ARA 外,其他四种不饱和脂肪酸含量普遍低于哈蟆

油中相应的成分含量。其中,ARA 的含量最高,而 ARA 具有抗炎等生理活性,可产生多种生物学效

应,对代谢紊乱和癌症的治疗具有积极作用^[12]。此外,在海参中未检测出 ALA,而 ALA 是人体脑细胞和组织细胞的重要组成成分,具有抑制心脑血管疾病,预防和抑制癌症发生和转移的作用^[13]。同时 ALA 属于 ω -3 多不饱和脂肪酸,有提高记忆力,降血脂等作用。这说明海参可能并不具备调节血脂、抑制心脑血管疾病的功效,而在抗炎方面可能具有显著的疗效。

在燕窝中检测出两种不饱和脂肪酸 LA 和 OA,且含量低于林蛙籽、哈蟆油中样品含量。其中,LA 的含量仅为 0.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。燕窝中未检测出的五种不饱和脂肪酸包括 EPA、ALA、DHA、ARA。而这几种成分,增加 EPA 的吸收对治疗冠状动脉心脏病、高血压和炎症具有显著的作用^[14],DHA 则具有增强记忆与思维能力、提高智力等作用^[15]。由于燕窝中含有的不饱和脂肪酸仅包括 LA 和 OA,且含量均不高,药理活性不明显,因此燕窝在大多数情况下仅作为营养滋补品使用。

在冬虫夏草中检测出三种不饱和脂肪酸(ALA、LA、OA),比林蛙籽、哈蟆油中相应成分含量均高,其中 LA 含量高达 2.47 $\mu\text{g}/\text{mg}$,OA 含量高达 6.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$,因此冬虫夏草具有显著的药理活性,在调节免疫力、抗炎、抗衰老方面具有显著疗效。但冬虫夏草中未检测出 EPA、DHA、ARA。其中 EPA 和 DHA 都属于 ω -3 多不饱和脂肪酸,能降低血脂,减少心血管疾病的风险,促进神经突生长和神经元存活,对抗肿瘤也有积极作用^[16,17]。这说明冬虫夏草的药理活性可能具有一定的局限性,在调节免疫方面疗效显著,但在调节血脂、心血管疾病方面疗效甚微。

结果显示,相比于哈蟆油、海参、燕窝、冬虫夏草,林蛙籽样品中含有六种不饱和脂肪酸,种类多样,且普遍含量略高,在不饱和脂肪酸的含量和种类上占有明显优势。各系列脂肪酸在机体的保护和调节方面都起着重要的作用,上述六种不饱和脂肪酸作为林蛙籽中的有效成分,使林蛙籽具有更显著的药理活性,赋予了林蛙籽更广泛的应用途径。

4 结论

本研究应用 HPLC 同时分析了林蛙籽、哈蟆油、海参、燕窝和冬虫夏草中不饱和脂肪酸的种类和含量。结果显示,林蛙籽与四种滋补品中不饱和脂肪酸的种类及含量表现出显著差异,为其质量评价和控制提供了理论参考。其中,林蛙籽中同时检测出六种主要的不饱和脂肪酸,包括 EPA、ALA、DHA、

ARA、LA 和 OA。与其他四种滋补品相比,林蛙籽拥有相对丰富的不饱和脂肪酸种类和含量,表现出优越的开发应用价值,为不饱和脂肪酸的获取提供了新的途径。

参考文献

- Xu Q, Dou C, Liu X, et al. *Oviductus Ranae* protein hydrolysate (ORPH) inhibits the growth, metastasis and glycolysis of HCC by targeting miR-491-5p/PKM2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1692-1704.
- Lan XC, Qu XB, Luo CL, et al. Protection of rana oil extract on hydrogen peroxide-induced MC3T3-E1 injury [J]. *J Food Saf Qual* (食品安全质量检测学报), 2019, 10: 6630-6636.
- Li M, Lv SW, Guo QX, et al. Pharmacological effect and mechanism of lyophilized oil powder of wood frog in treating pulmonary fibrosis in rats [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2021, 38(1): 33-37.
- Sui X, Li XH, Duan MH, et al. Investigation of the anti-glioma activity of *Oviductus Ranae* protein hydrolysate [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 176-181.
- Gong J, Xiao M. The regulation of oxylipids produced by polyunsaturated fatty acid metabolism on oxidative stress [J]. *China Feed* (中国饲料), 2021(3): 1-6.
- Li JL, Lin LL, Li ZH. Effects of unsaturated fatty acids on biological characteristics of human adipose mesenchymal stem cells [J]. *Life Sci Res* (生命科学研究), 2021, 25(1): 15-23.
- Chen X, Liang KH, Wang J, et al. Progress in prevention and treatment of cardiovascular diseases by dietary polyunsaturated fatty acids [J]. *China Oils Fats* (中国油脂), 2020, 45(10): 87-94.
- Wang SH, Gan YS, Kan H, et al. Exploitation of HPLC analytical method for simultaneous determination of six principal unsaturated fatty acids in *Oviductus Ranae* based on quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) [J]. *Molecules*, 2021, 26(2): 479.
- Martins CA, Santos MCBd, Gonçalves-de-Albuquerque CF, et al. The relationship of oleic acid/albumin molar ratio and clinical outcomes in leptospirosis [J]. *Heliyon*, 2021, 7(3): e06420.
- Shahidi F, Miraliakbari H. Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part 1-cardiovascular disease and cancer [J]. *J Med Food*, 2004, 7: 387-401.
- Bougnoux P. n-3 Polyunsaturated fatty acids and cancer [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1999, 2: 121-126.