

# 大花黄牡丹种子的质量评价及初步抗氧化活性研究

秦伟瀚<sup>1</sup>, 兰小中<sup>3</sup>, 瞿显友<sup>2</sup>, 樵星芳<sup>2</sup>, 刘翔<sup>2</sup>, 徐元江<sup>2</sup>, 邹佳佳<sup>1</sup>, 何丹<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学药学院, 重庆 400016; <sup>2</sup>重庆市中药研究院, 重庆 400065; <sup>3</sup>西藏农牧学院, 林芝 860000

**摘要:** 结合一测多评(QAMS)和指纹图谱建立大花黄牡丹种子的质量评价方法, 并对其抗氧化活性进行初步评价。采用 Agilent DB-FATWAX 柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm), 载气为高纯氮气, 程序升温, 检测器为氢火焰离子化检测器。以油酸甲酯为内参, 所建相对校正因子重现性良好, 采用 *t* 检验计算出 QAMS 与外标法所测含量结果的 *P* 值均大于 0.05; 不同产地大花黄牡丹样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.99; 表明 QAMS、指纹图谱可用于大花黄牡丹种子的质量评价。主成分分析(PCA)结果显示, 大花黄牡丹与牡丹样品数据点可区分为 2 类。通过 DPPH 和 Fe<sup>3+</sup> 还原法对比分析发现, 大花黄牡丹种皮的自由基清除率和 Fe<sup>3+</sup> 还原能力要高于牡丹品种, 而籽油的抗氧化能力则与牡丹无明显差异。本研究建立的测定分析方法准确、简便、可行。将一测多评结合指纹图谱可以有效评价不同产地大花黄牡丹种子的质量。大花黄牡丹种皮和种仁的抗氧化效果明显, 可以用作食品、化妆品等新产品研发。

**关键词:** 大花黄牡丹; 一测多评; 指纹图谱; 质量评价; 抗氧化活性

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)11-1919-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.11.013

## Quality evaluation and preliminary antioxidant activity of *Paeonia ludlowii* seeds

QIN Wei-han<sup>1</sup>, LAN Xiao-zhong<sup>3</sup>, QU Xian-you<sup>2</sup>,

QIAO Xin-fang<sup>2</sup>, LIU Xiang<sup>2</sup>, XU Yuan-jiang<sup>2</sup>, ZHOU Jia-jia<sup>1</sup>, HE Dan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2</sup>Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400065, China;

<sup>3</sup>Tibet College of Agriculture and Animal Husbandry, Nyingchi 860000, China

**Abstract:** A method for quality evaluation of *Paeonia ludlowii* seeds was established by combining QAMS and fingerprints, and its antioxidant activity was preliminarily evaluated. The analyses were performed on Agilent DB-FATWAX column (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm), the carrier gas was high-purity nitrogen, temperature was programmed, and hydrogen flame ionization detector was used. Using methyl oleate as internal reference, the relative correction factor has good reproducibility. The *P* values of QAMS and external standard method are both >0.05 by *t*-test. The similarity between the fingerprints of *P. ludlowii* samples from different habitats and the control fingerprints was >0.99; The results showed that QAMS and fingerprints could be used for quality evaluation of *P. ludlowii* seeds. The results of principal component analysis (PCA) showed that the data points of *P. ludlowii* and *P. suffruticosa* could be divided into two categories. Through the comparative analysis of DPPH and Fe<sup>3+</sup> reduction methods, it was found that the free radical scavenging rate and Fe<sup>3+</sup> reduction capacity of the seed coat of *P. ludlowii* were higher than *P. suffruticosa*, while the antioxidant capacity of seed oil was not significantly different with *P. suffruticosa*. The analytical method established in this study is accurate, simple and feasible. One test and multiple evaluation combined with fingerprint can effectively evaluate the quality of *P. ludlowii* seeds from different habitats. The seed coat and kernel of *P. ludlowii* have obviously antioxidant effect, and can be used for research and development of new products such as food and cosmetics.

**Key words:** *Paeonia ludlowii*; QAMS; fingerprints; quality evaluation; antioxidant activity

收稿日期: 2022-06-22 接受日期: 2022-09-20

基金项目: 国家重大新药创制项目(2017ZX09101002-002-004); 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0464); 国家中医药传承创新工程重庆配套资金资助项目(ca-19-02)

\* 通信作者 E-mail: ildocor@163.com

大花黄牡丹(*Paeonia ludlowii*)是我国芍药科芍药属牡丹组(*sect. Moutan* DC.)中8个品种之一,为西藏特有植物,属丛生落叶灌木,仅见于西藏东南部林芝地区<sup>[1,2]</sup>。大花黄牡丹花朵硕大,色彩绚丽,是极珍贵的牡丹观赏品种,其根及花瓣均可入药,具有一定食用、药用价值<sup>[3]</sup>。虽然大花黄牡丹具有较高的育种价值和观赏价值,却由于分布狭窄,种群持续减少,被《中国物种红色名录》列为濒危植物,已处于极危状态<sup>[4]</sup>。牡丹的化学成分研究主要集中在根部,对其他部位研究很少。自1753年以来,已有共180多个的化合物被分离出来。其化学成分主要包括:单萜类、单萜苷类、三萜类、酚类、鞣酸类、黄酮类等<sup>[5,6]</sup>。棕榈酸是生产蜡烛、肥皂、润滑脂、软化剂和合成洗涤剂的原料<sup>[7]</sup>。油酸有得天独厚的抗氧化功能,是目前最安全的健康脂肪酸。油酸能调节血脂水平,降低胆固醇,防止记忆力下降;同时对代谢紊乱、皮肤损伤等都有很好的疗效<sup>[8]</sup>。亚油酸可以软化心脑血管,降低血压与血脂,加快人体新陈代谢,能有效预防动脉硬化发生,能提高人体免疫力,促进骨骼发育,提高记忆力,也能延缓衰老<sup>[9]</sup>。亚麻酸是人体必需脂肪酸之一,能够降解血栓,预防心脑血管病、抑制癌症的发生和转移、抑制过敏反应和抗炎作用、抑制衰老、增强智力和保护视力等<sup>[10]</sup>。

近年来大花黄牡丹的研究主要集中在植物分类、生境群落以及栽培繁殖等领域<sup>[11-16]</sup>;化学成分及活性评价的相关报道较少,仅Zeng等<sup>[17]</sup>采用GC-MS法分析大花黄牡丹种子中棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的含量。Zhang等<sup>[18-20]</sup>在大花黄牡丹仁油中鉴定出了20种脂肪酸,而采用QAMS定量分析大花黄牡丹种仁中的棕榈酸、油酸、亚油酸、亚麻酸则未见报道。本研究将一测多评与指纹图谱相结合建立大花黄牡丹种子的质量评价方法,并通过DPPH法、Fe<sup>3+</sup>还原法对大花黄牡丹及油用牡丹种子的抗氧化活性进行对比评价。该实验结果有助于后续大花黄牡丹籽油、种皮的新产品研发,为

大花黄牡丹深入综合利用提供科学依据,同时也为不同品种牡丹种子的质量评价提供有益思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与设备

Agilent 6890N型气相色谱仪(美国,安捷伦科技有限公司);TSQ 8000 Evo型三重四级杆气质联用仪(美国,赛默飞世尔科技公司);Infinte M200 Pro型酶标仪(中国,北京五洲东方科技发展有限公司);BJ-100型超高速中药粉碎机(中国,德清拜杰电器有限公司);VGT-2013QT型超声清洗机(中国,固特超声公司);BSA224S-CW型万分之一分析天平(德国,赛多利斯公司);UV-3600i型紫外分光光度计(日本,岛津公司);H3-18K型台式高速离心机(中国,湖南可成仪器设备有限公司);SG60-1型榨油机(中国,通雨机械设备有限公司);普及型pH计(德国,赛多利斯公司);BHW-09C型恒温加热器(中国,上海博通化学科技有限公司);Milli-Q Integral5型纯水仪(美国,Millipore公司)。

### 1.2 材料与试剂

对照品棕榈酸甲酯(批号:A12A6L17796,含量≥97%)、油酸甲酯(批号:S16M9B61466,含量≥98%)、亚油酸甲酯(批号:K25N10S101770,含量≥98%)、亚麻酸甲酯(批号:S09O11B126531,含量≥98%)、十七烷酸甲酯(批号:S15H18C146523,含量≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;维生素C(批号:1353736)购自上海泰坦科技股份有限公司。正己烷为农残级,三氟化硼、氢氧化钾、二甲基亚砜、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙醇、甲醇均为分析级。高纯氮气、氢气、氦气和干燥空气体积分数均为99.999%(重庆高德气体有限公司)。本研究所收集样品经重庆市中药研究院生药研究所刘翔副研究员鉴定为大花黄牡丹(*Paeonia ludlowii* D. Y. Hong)和油用牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的种子,样品信息见表1。

表1 牡丹种子样品信息表

Table 1 Information of Peony seed sample

样品编号 Sample No.	样品名称 Sample name	样品产地 Sample origin
S1	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	巴宜区米瑞乡 Mirui Township, Bayi District
S2	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	巴宜区米瑞乡 Mirui Township, Bayi District
S3	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	巴宜区米瑞乡 Mirui Township, Bayi District

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品编号 Sample No.	样品名称 Sample name	样品产地 Sample origin
S4	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	巴宜区米瑞乡 Mirui Township, Bayi District
S5	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	米林县扎西绕登乡 Zaxi raodeng Township, Milin County
S6	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	米林县扎西绕登乡 Zaxi raodeng Township, Milin County
S7	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	米林县南伊洛巴乡 Nanyiluoba Township, Milin County
S8	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	米林县南伊洛巴乡 Nanyiluoba Township, Milin County
S9	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	米林县丹娘乡 Danniang Township, Milin County
S10	大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	西藏农牧学院 Tibet agriculture and Animal Husbandry College
S11	牡丹 <i>P. suffruticosa</i>	安徽省铜陵市 Tongling City, Anhui Province
S12	牡丹 <i>P. suffruticosa</i>	河南省洛阳市 Luoyang City, Henan Province
S13	牡丹 <i>P. suffruticosa</i>	山东省菏泽市 Heze City, Shandong Province
S14	牡丹 <i>P. suffruticosa</i>	江苏省常熟市 Changshu City, Jiangsu Province

### 1.3 方法

#### 1.3.1 GC-MS 质谱条件

色谱柱采用 Agilent DB-1701MS 柱(0.25 mm × 0.25 μm × 30 m);载气为高纯氮气;不分流模式;程序升温:起始温度 50 °C,保持 3 min,以 10 °C/min 的升温速率升至 280 °C,保持 3 min;进样口温度 250 °C;传输线温度 280 °C;离子源为 EI 源;离子源温度 300 °C;质谱扫描范围 40 ~ 500 Da;溶剂峰切除时间 4 min;进样体积:1 μL。采用上述方法对甲酯化样品进行定性分析,共鉴定出 5 个色谱峰(见图 1),与其他几个成分相比较,十八烷酸甲酯的峰面积过小,不适合作为一测多评的含量检测指标。

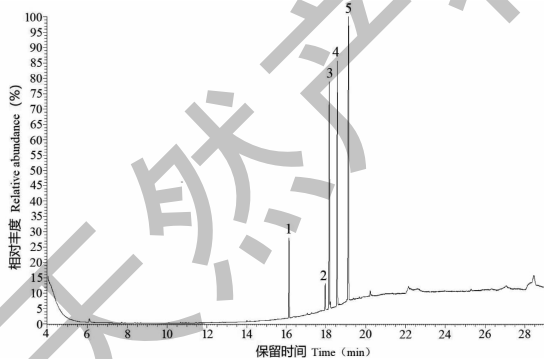


图 1 甲酯化样品的气质联用总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of methyl esterified sample

注:1. 棕榈酸甲酯;2. 十八烷酸甲酯;3. 油酸甲酯;4. 亚油酸甲酯;  
5. 亚麻酸甲酯。Note:1. Methyl palmitate;2. Methyl stearate;3.

Methyl oleate;4. Methyl linoleate;5. Methyl linolenate.

#### 1.3.2 GC 色谱条件

色谱柱采用 Agilent DB-FATWAX 柱(0.25 mm

× 0.25 μm × 30 m);载气为高纯氮气;分流模式,分流比为 10:1;程序升温:起始温度 160 °C,不保持,以 5 °C/min 的升温速率升至 250 °C,保持 2 min;进样口温度 270 °C;氢火焰离子化检测器,检测器温度 270 °C;进样体积 2 μL。

#### 1.3.3 对照品溶液制备

精密称取棕榈酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、亚麻酸甲酯标准品适量于 10 mL 容量瓶中,加入正己烷溶解并定容至 10 mL 刻度线,混匀,即得质量浓度分别为 2.01、1.97、1.99、1.95 mg/mL 的混合溶液。再将上述混合对照品溶液以 2 倍体积逐级稀释至质量浓度为 0.13 mg/mL 的混合溶液。

#### 1.3.4 供试品溶液制备

##### 1.3.4.1 质量评价用供试品溶液制备方法

甲酯化反应是气相分析时常用的一种衍生化手段,是指在催化剂作用下使含羧基等沸点较高物质转变为气相可检测的甲酯的化学方法。可以使脂肪酸类成分在气相色谱中出峰更加对称尖锐,并且有利于保护气相色谱柱。

精密称取牡丹种仁粉末样品 0.40 g 于锥形瓶中,精密移入正己烷 50 mL,称定重量,超声提取(功率 300 W,频率 40 kHz)1 h,再次称定重量,用正己烷补足减失重量,摇匀后过滤,取滤液 4 mL 于 15 mL 具塞玻璃试管中,精密加入 2 mL 氢氧化钾甲醇溶液(2 mol/L),涡旋 1 min,再精密加入 1 mL 三氟化硼溶液,涡旋 1 min,静置 5 min,取上层溶液,即得。

##### 1.3.4.2 抗氧化活性评价用供试品溶液制备方法

牡丹种皮样品:称取 10 批次大花黄牡丹种皮各

20.0 g,混合后于中药高速粉碎机中粉碎成细末,过80目筛,作为大花黄牡丹抗氧化活性评价用样品。称取不同产地牡丹种皮各200.0 g,于中药高速粉碎机中粉碎成细末,过80目筛,作为牡丹抗氧化活性评价用样品。精密称取上述牡丹种皮粉末0.5 g于具塞锥形瓶中,精密移入70%乙醇20 mL,称定重量,超声提取(功率300 W,频率40 kHz)30 min,再次称定重量,用70%乙醇补足减失重量,摇匀后以8 000 r/min离心5 min,取10 mL上清液于蒸发皿中,水浴挥干,用50%乙醇溶解定容至5 mL容量瓶,0.22 μm滤膜过滤,即得牡丹种皮样品的乙醇溶液。

牡丹籽油样品:称取10批次大花黄牡丹种仁各100.0 g,混合后作为大花黄牡丹抗氧化活性评价用样品。称取不同产地牡丹种仁各1 000.0 g,作为牡丹抗氧化活性评价用样品。将上述牡丹种仁匀速倒入榨油机中,在榨膛温度为240 °C条件下进行冷榨。将榨得的牡丹籽油在高速离心机中以8 000 r/min离心10 min。精密称取上述牡丹籽油0.50 g,加入5 mL的二甲基亚砷(DMSO)溶液,混匀,即得牡丹籽油样品的DMSO溶液。

### 1.3.5 抗氧化活性评价方法

#### 1.3.5.1 DPPH 自由基清除能力测定方法

精密吸取“1.3.4.2”项下供试品溶液(0.05 g/mL)60 μL和3.94 mL DPPH溶液(0.1 mmol/L)于10 mL的EP管中混匀,室温避光孵育30 min后,取200 μL混合液于96孔板中,在517 nm处检测其吸光值( $A_{\text{样品}}$ )。以未加样品的溶剂作为空白对照,同法操作,检测空白对照的吸光值( $A_{\text{空白}}$ ),并取50 μL的维生素C( $V_c$ ,0.60 g/mL)作参比,每组样品重复

试验3次。牡丹籽样品对DPPH自由基清除率的计算公式:清除率 =  $[(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$  ( $A_{\text{空白}}$ :空白对照组吸光度; $A_{\text{样品}}$ :试验组吸光度)。

#### 1.3.5.2 $Fe^{3+}$ 还原能力的测定方法

精密吸取“1.3.4.2”项下供试品溶液(0.10 g/mL)5 μL与2 mL 0.20 mol/L的磷酸盐缓冲溶液(pH=6.6)于10 mL的EP管中混匀,再加入2 mL 0.03 mol/L  $K_3Fe(CN)_6$ 溶液,混匀。在50 °C下孵育20 min后,加入200 μL 0.60 mol/L的 $C_2H_2Cl_2O_2$ 溶液,混匀,1 000 r/min离心10 min。取35 μL上清液、115 μL超纯水于96孔板中,混匀,再加100 mL 0.006 mol/L的 $FeCl_3$ 溶液,混匀后,在700 nm处检测吸光度( $A_{\text{样品}}$ ),以未加样品的溶剂作为空白对照,同法操作,检测空白对照的吸光值( $A_{\text{空白}}$ ),并取1 mL的丁基羟基茴香醚(BHA 600 μg/mL)作参比,每组样品重复检测3次。牡丹籽样品对 $Fe^{3+}$ 还原能力的计算公式: $Fe^{3+}$ 还原能力 =  $A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}$  ( $A_{\text{样品}}$ :试验组吸光度, $A_{\text{空白}}$ :空白对照组吸光度)。

## 2 结果与分析

### 2.1 QAMS法测定牡丹种子中4种成分含量

#### 2.1.1 外标法方法学考察

外标法方法学分别考察了线性、精密度、稳定性、重复性、回收率、检测限和定量限,结果显示(见表2)四个甲酯类成分在0.12~2.00 mg/mL浓度范围内线性关系良好;连续进样6次,所测成分RSD均小于1.5%,表明仪器精密度良好;样品制备后分别于0、2、4、8、12、24 h进样,所测成分RSD均小于2.0%,表明样品在24 h内稳定;重复性和回收率的RSD均小于2.0%,表明样品制备方法准确可靠。

表2 检测成分的方法学考察结果

Table 2 Methodological investigation results of detected components

检测成分 Detecting ingredient	线性 Linearity		RSD(%)			重复性 Repeatability (%)	回收率 Recovery rate (%)	检测限 Limit of detection (μg/mL)	定量限 Limit of quantification (μg/mL)
	回归方程 Regression equation	$R^2$	线性范围 Linear range (mg/mL)	稳定性 Stability	精密度 Precision				
棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	$Y = 1661X - 18.458$	0.999 9	0.13 ~ 2.01	1.11	1.47	2.56	101.2	0.06	0.12
油酸甲酯 Methyl oleate	$Y = 1330.4X - 15.642$	0.999 8	0.12 ~ 1.97	1.58	1.14	14.50	98.7	1.01	4.79
亚油酸甲酯 Methyl linoleate	$Y = 794.94X - 6.3708$	0.999 9	0.12 ~ 1.99	1.69	1.43	9.22	99.1	1.01	4.78
亚麻酸甲酯 Methyl linolenate	$Y = 1367.6X - 9.2583$	0.999 9	0.12 ~ 1.95	1.64	1.34	8.75	98.2	1.01	4.83

### 2.1.2 相对校正因子确定

精密吸取“1.3.3”项下不同质量浓度的混合对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 采用“1.3.2”项下色谱条件进样, 记录不同质量浓度对照品的峰面积, 按公式  $f_{k_x} = A_k C_x / (A_x C_k)$  计算各成分的相对校正因子, 其中  $A_k$ 、 $C_k$  分别为内参物峰面积和浓度,  $A_x$ 、 $C_x$  分别为待测成分对照品的峰面积和浓度。相较于其他几个检测物, 油酸甲酯峰面积最大、分离度高且理论塔板数高, 因此选择以油酸甲酯为内参物, 分别计算棕榈酸

甲酯、亚油酸甲酯、亚麻酸甲酯的相对校正因子, 结果见表 3。

### 2.1.3 校正因子重现性考察

精密吸取“1.3.3”项下不同质量浓度的混合对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 进样分析; 在 2 个实验室分别考察了 Agilent 6890N、Shimadzu GC2010 两种气相色谱仪, 分流比 5:1、20:1, 柱流速 0.80、1.20 mL/min, 对相对校正因子的影响, 结果 RSD 均 < 2%, 表明一测多评方法具有良好的重现性, 结果见表 4。

表 3 相对校正因子计算结果

Table 3 Results of relative correction factor

考察浓度 Investigation concentration (mg/mL)	相对校正因子 Relative correction factor		
	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	亚麻酸甲酯 Methyl linolenate
2	1.25	0.60	1.03
1	1.25	0.60	1.04
0.5	1.25	0.60	1.04
0.25	1.25	0.60	1.05
0.125	1.24	0.60	1.04
平均值 Average value	1.25	0.60	1.04
RSD (%)	0.26	0.45	0.65

表 4 校正因子重现性考察结果

Table 4 Results of reproducibility investigation of correction factors

考察项目 Investigation item	相对校正因子 Relative correction factor		
	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	亚麻酸甲酯 Methyl linolenate
Agilent 6890N	1.25	0.60	1.03
Shimadzu GC2010	1.23	0.59	1.02
分流比 Split ratio(5:1)	1.25	0.60	1.04
分流比 Split ratio(20:1)	1.25	0.61	1.03
柱流速 Column velocity(0.8 mL/min)	1.26	0.61	1.03
柱流速 Column velocity(1.2 mL/min)	1.24	0.60	1.02
平均值 Average value	1.25	0.60	1.03
RSD (%)	0.83	1.25	0.73

### 2.1.4 色谱峰定位

分别考察在“1.3.2”项中各色谱条件下, 以油酸甲酯为内参物, 分别计算棕榈酸甲酯、亚油酸甲

酯、亚麻酸甲酯组分相对保留时间的重现性, 结果表明相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 可用于待测成分色谱峰的定位, 结果见表 5。

表5 相对保留时间考察结果

Table 5 Results of relative retention time investigation

考察项目 Investigation item	相对保留时间 Relative retention time		
	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	亚麻酸甲酯 Methyl linolenate
Agilent 6890N	0.73	1.06	1.14
Shimadzu GC2010	0.73	1.05	1.12
分流比 Split ratio(5:1)	0.73	1.06	1.14
分流比 Split ratio(20:1)	0.73	1.06	1.13
柱流速 Column velocity(0.8 mL/min)	0.72	1.05	1.13
柱流速 Column velocity(1.2 mL/min)	0.74	1.06	1.14
平均值 Average value	0.73	1.06	1.13
RSD(%)	0.87	0.49	0.72

### 2.1.5 QAMS 法与外标法结果比较

将产于西藏、山东、安徽、江苏、河南的牡丹种子样品,按照“1.3.4.1”项下方法制备供试品,按照“1.3.2”项下色谱条件采集峰面积,分别采用外标法和 QAMS 计算 4 种成分含量,结果见表 6。将 10 个产地大花黄牡丹含测结果进行平均后,棕榈酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的含量分别为 2.40%、13.65%、8.62%、8.10%;将 4 个主产区牡丹含测结果平均后,棕榈酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的含量分别为 1.13%、10.85%、16.70%、18.96%。棕榈酸为饱和脂肪酸,在大花黄牡丹种子中棕榈酸的含量要超过牡丹约 2 倍,含量最高的是 S2 批,为 2.61%,含量最低的是江苏产牡丹,为 1.01%。油酸为单不饱和脂肪酸,大花黄牡丹种子中油酸的含量要略高于牡

丹,而其中 S9 批(米林县丹娘乡)含量为所有批次样品中最低,达 10.43%;牡丹中油酸含量最高的是河南产牡丹,为 11.26%。亚油酸和亚麻酸同为多不饱和脂肪酸,牡丹含量约为大花黄牡丹含量的 2 倍,亚油酸含量最高的是山东产牡丹,为 17.68%,最低的是 S9 批,为 6.81%;而亚麻酸含量最高的是山东产牡丹,为 19.37%,最低是 S9 批,为 6.92%。

为确定 QAMS 的准确性,将两种方法计算结果进行 *t* 检验 (Microsoft Excel 软件;选择 T. TEST 函数,在 Array 中选中一组数据, Tails 选双尾检验, Type 选双样本等方差假设),两组结果的 *P* 值均 > 0.05,表明两种方法计算的质量分数结果差异无统计学意义,可见 QAMS 法以亚油酸甲酯作为参比来准确测定牡丹种仁中其它 3 种成分含量是可行的。

表6 QAMS 法与外标法的含量比较结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 6 Content comparison results of QAMS method and external standard method( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品编号 Sample No.	油酸 Oleic acid (%)	棕榈酸 Palmitic acid(%)		亚油酸 Linoleic acid(%)		亚麻酸 Linolenic acid(%)	
		外标法 ESM	一测多评法 QAMS	外标法 ESM	一测多评法 QAMS	外标法 ESM	一测多评法 QAMS
S1	14.54 ± 0.16	2.53 ± 0.05	2.50 ± 0.04	9.23 ± 0.10	9.20 ± 0.08	8.74 ± 0.09	8.73 ± 0.09
S2	14.80 ± 0.29	2.61 ± 0.06	2.54 ± 0.06	9.72 ± 0.19	9.76 ± 0.18	8.16 ± 0.16	8.10 ± 0.15
S3	14.23 ± 0.04	2.50 ± 0.03	2.50 ± 0.01	8.04 ± 0.02	8.08 ± 0.02	8.07 ± 0.02	8.02 ± 0.02
S4	14.07 ± 0.23	2.44 ± 0.07	2.44 ± 0.05	8.12 ± 0.13	8.17 ± 0.14	8.79 ± 0.14	8.71 ± 0.11
S5	14.01 ± 0.06	2.50 ± 0.01	2.41 ± 0.01	9.87 ± 0.04	9.95 ± 0.03	8.34 ± 0.04	8.34 ± 0.03
S6	14.07 ± 0.18	2.50 ± 0.04	2.42 ± 0.03	8.49 ± 0.11	8.41 ± 0.08	8.03 ± 0.11	8.11 ± 0.10
S7	14.61 ± 0.04	2.53 ± 0.02	2.53 ± 0.01	9.44 ± 0.03	9.32 ± 0.02	7.97 ± 0.03	7.97 ± 0.02

续表 6(Continued Tab. 6)

样品编号 Sample No.	油酸 Oleic acid (%)	棕榈酸 Palmitic acid(%)		亚油酸 Linoleic acid(%)		亚麻酸 Linolenic acid(%)	
		外标法 ESM	一测多评法 QAMS	外标法 ESM	一测多评法 QAMS	外标法 ESM	一测多评法 QAMS
S8	12.46 ± 0.19	2.21 ± 0.04	2.11 ± 0.04	8.48 ± 0.14	8.48 ± 0.13	7.87 ± 0.12	7.82 ± 0.13
S9	10.43 ± 0.12	1.91 ± 0.02	1.80 ± 0.03	6.81 ± 0.07	6.96 ± 0.08	6.97 ± 0.08	6.92 ± 0.07
S10	13.23 ± 0.07	2.26 ± 0.06	2.13 ± 0.05	8.01 ± 0.04	8.01 ± 0.02	8.01 ± 0.04	8.06 ± 0.04
S11	10.79 ± 0.16	1.15 ± 0.05	1.05 ± 0.05	16.36 ± 0.09	16.48 ± 0.06	19.11 ± 0.09	19.01 ± 0.06
S12	11.26 ± 0.09	1.21 ± 0.07	1.11 ± 0.05	17.68 ± 0.05	17.89 ± 0.04	19.28 ± 0.05	19.22 ± 0.04
S13	10.77 ± 0.07	1.16 ± 0.03	1.11 ± 0.04	16.23 ± 0.12	16.11 ± 0.08	19.37 ± 0.06	19.30 ± 0.06
S14	10.57 ± 0.11	1.01 ± 0.05	1.05 ± 0.05	16.52 ± 0.07	16.75 ± 0.08	18.06 ± 0.13	18.05 ± 0.08

## 2.2 大花黄牡丹指纹图谱研究

### 2.2.1 参照峰选择

牡丹种仁样品经过甲酯化后有 5 个共有峰,其中油酸甲酯色谱峰不仅分离度好,且峰面积较大,故选择 3 号峰(油酸甲酯)作为内参峰,用以计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

### 2.2.2 精密度试验

精密称取牡丹种仁样品(S1 批)0.40 g,采用“1.3.4.1”项下方法制备供试品溶液,采用“1.3.2”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,分别计算相对峰面积与相对保留时间的 RSD 值。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版),计算不同产地样品 GC 谱图的相似度。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.11%,相对峰面积的 RSD 均 < 0.27%,指纹图谱的相似度均 > 0.99。表明仪器精密度良好。

### 2.2.3 稳定性试验

精密称取牡丹种仁样品(S1 批)0.40 g,采用“1.3.4.1”项下方法制备供试品溶液,采用“1.3.2”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录

色谱图,分别计算相对峰面积与相对保留时间的 RSD 值。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.14%,相对峰面积的 RSD 均 < 1.17%,指纹图谱的相似度均 > 0.99。表明该方法稳定性良好。

### 2.2.4 重复性试验

精密称取牡丹种仁样品(S1 批)0.40 g,采用“1.3.4.1”项下方法平行制备六份供试品溶液,采用“1.3.2”项下色谱条件进样,记录色谱图,分别计算相对峰面积与相对保留时间的 RSD 值。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.08%,相对峰面积的 RSD 均 < 0.51%,指纹图谱的相似度均 > 0.99。表明该方法重复性良好。

### 2.2.5 指纹图谱建立

将 10 批不同产地的大花黄牡丹样品按照“1.3.4.1”项下方法制备供试品溶液,按照“1.3.2”项下色谱条件进行测定,将样品图谱中各共有峰积分后生成 AIA 格式文件,并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年 A 版),通过设参照谱、多点校正、自动匹配、生成对照等功能进行自动拟合,生成大花黄牡丹种子的指纹图谱(见图 2)。

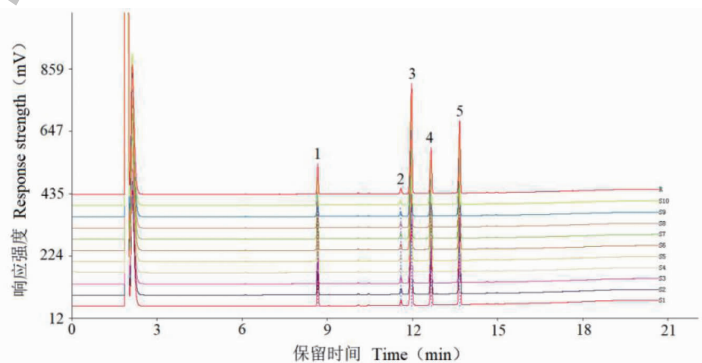


图 2 大花黄牡丹种仁的 GC 指纹图谱

Fig. 2 GC fingerprints of seed kernel of *P. ludlowii*

共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.14%, 相对峰面积的 RSD 均 < 1.28%。以标准指纹图谱 R 为对照对样品图谱进行相似度评价, 相似度结果见表 7。

相似度范围为 0.999 ~ 1, 表明不同产地大花黄牡丹种子相似度良好。

表 7 相似度计算结果

Table 7 Result of similarity calculation

样品编号 Sample No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱 Reference fingerprint
S1	1.000										
S2	0.999	1.000									
S3	0.999	0.999	1.000								
S4	0.999	0.998	0.999	1.000							
S5	0.999	0.999	0.998	0.998	1.000						
S6	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000					
S7	0.999	1.000	0.999	0.997	0.999	1.000	1.000				
S8	1.000	0.998	0.998	0.999	1.000	0.999	0.998	1.000			
S9	0.999	0.996	0.997	0.999	0.998	0.998	0.996	1.000	1.000		
S10	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999	1.000	
对照指纹图谱 Reference fingerprint	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000

## 2.2.6 共有峰归属指认

将油酸甲酯、亚油酸甲酯、十八烷酸甲酯等标准品采用“1.3.3”项下方法制备标准品溶液。精密称取 S1 批样品 0.40 g, 采用“1.3.4.1”项下方法制备供试品溶液。采用“1.3.2”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 通过比较样品与标准品各色谱峰的保留时间, 对共有峰进行成分归属, 结果见图 3。

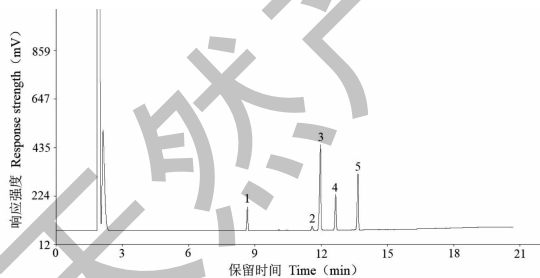


图 3 指纹图谱共有峰

Fig. 3 Fingerprint chromatogram of common peak

注: 1. 棕榈酸甲酯; 2. 十八烷酸甲酯; 3. 油酸甲酯; 4. 亚油酸甲酯; 5. 亚麻酸甲酯。Note: 1. Methyl palmitate; 2. Methyl stearate; 3.

Methyl oleate; 4. Methyl linoleate; 5. Methyl linolenate.

## 2.2.7 主成分分析(PCA)

将牡丹样品的气相色谱数据导入 SIMCA-P 软件(版本号: 14.1), 通过 Score Scatter Plot 分析(见

图 4) 发现, 大花黄牡丹样品(II 类)与牡丹样品(I 类)分别聚类, 表明西藏的大花黄牡丹种仁中主要成分含量与牡丹有较大差异, 这与定量分析结果一致。大花黄牡丹第九批(S9)样品的数据点远离聚类中心, 可能与该批样品采自米林县丹娘乡有关; 这也表明, 大花黄牡丹虽然产自西藏林芝地区, 但海拔、土壤、气候等地理环境的变化仍然可以较大影响其种子中化学成分。

## 2.3 牡丹种子抗氧化活性评价

### 2.3.1 DPPH 自由基清除能力测定

DP 是一种早期合成的有机自由基, 常用来评估抗氧化物的供氢能力, 它在有机溶剂中非常稳定, 呈紫色, 而且在处有一个特征吸收峰, 当遇到自由基清除剂时, DPPH 的孤对电子被配对而使其退色, 也就是在最大吸收波长处的吸光值变小。因此, 可通过测定吸光值的变化来评价样品对 DPPH 自由基的清除效果。

按照“1.3.5.1”项下方法进行实验, DPPH 实验结果见表 8。由结果可知, 籽油清除率最高的是江苏产牡丹, 为 37.56%, 大花黄牡丹籽油清除率(30.14%)虽然要低于江苏产牡丹, 但要高于河南产牡丹(27.33%)、山东产牡丹(17.27%)和安徽产牡丹(18.27%)。而大花黄牡丹种皮的清除率最高, 为



63.62%, 要明显高于牡丹样品。表明大花黄牡丹种皮有较强的自由基清除能力, 即抗氧化活性强。

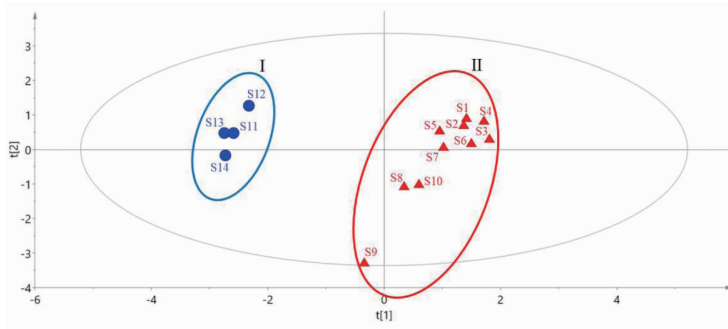


图4 主成分分析结果

Fig. 4 Results of PCA

表8 大花黄牡丹与牡丹样品的 DPPH 自由基清除率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 DPPH radical scavenging rate of *P. ludlowii* and *P. suffruticosa* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品名称 Sample name	籽油自由基清除率 Free radical scavenging rate of seed oil (%)	种皮自由基清除率 Free radical scavenging rate of seed coat (%)
大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	30.14 ± 1.25	63.62 ± 0.21 **
牡丹(河南) <i>P. suffruticosa</i> from Henan	27.33 ± 0.92	47.43 ± 0.56
牡丹(山东) <i>P. suffruticosa</i> from Shandong	17.27 ± 0.73	41.53 ± 1.09
牡丹(江苏) <i>P. suffruticosa</i> from Jiangsu	37.56 ± 0.51	45.23 ± 0.48
牡丹(安徽) <i>P. suffruticosa</i> from Anhui	18.27 ± 1.23	39.13 ± 0.78
维生素 C V <sub>c</sub>	80.42 ± 1.51	81.15 ± 0.49

注:与牡丹样品比较, \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Comparison with *P. suffruticosa* samples, \*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.3.2 Fe<sup>3+</sup> 还原能力的测定

还原力的测定是检验样品是否是良好的电子供体的方法, 还原力强的样品应该是良好的电子供应者, 它供应的电子不仅能使 Fe<sup>3+</sup> 还原为 Fe<sup>2+</sup>, 也可以与自由基反应。还原力的测定是用来评价抗氧化剂活性的常用方法。

按照“1.3.5.2”项下方法进行实验, Fe<sup>3+</sup> 还原能力实验结果见表9。由结果可知, 相较于牡丹样品, 大花黄牡丹籽油和种皮的 Fe<sup>3+</sup> 还原能力均为最高, 分别为 0.24 Abs 和 1.01 Abs, 但种皮的 Fe<sup>3+</sup> 还原能力是 BHA 对照的两倍, 而籽油则仅为 BHA 对照的一半, 表明大花黄牡丹种皮的抗氧化能力更为明显。

表9 大花黄牡丹与牡丹样品的 Fe<sup>3+</sup> 还原能力( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 9 Fe<sup>3+</sup> reduction ability of *P. ludlowii* and *P. suffruticosa* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品名称 Sample name	籽油还原能力 Seed oil reducing ability (Abs)	种皮还原能力 Seed coat reducing ability (Abs)
大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	0.24 ± 0.02 *	1.01 ± 0.05 **
牡丹(河南) <i>P. suffruticosa</i> from Henan	0.22 ± 0.03	0.45 ± 0.01
牡丹(山东) <i>P. suffruticosa</i> from Shandong	0.17 ± 0.01	0.35 ± 0.01
牡丹(江苏) <i>P. suffruticosa</i> from Jiangsu	0.22 ± 0.01	0.43 ± 0.01

续表 9(Continued Tab. 9)

样品名称 Sample name	籽油还原能力 Seed oil reducing ability(Abs)	种皮还原能力 Seed coat reducing ability(Abs)
牡丹(安徽) <i>P. suffruticosa</i> from Anhui	0.16 ± 0.01	0.35 ± 0.03
丁基羟基茴香醚 BHA	0.44 ± 0.02	0.48 ± 0.01

注:与牡丹样品比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。Note: Comparison with *P. suffruticosa* samples,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论与结论

经课题组实地考察和查阅文献可知,大花黄牡丹仅分布于西藏的林芝市。由指纹图谱结果可以看出,10个批次大花黄牡丹样品的相似度均高于0.99,说明林芝地区所产的大花黄牡丹相似度较高。结合相似度结果表明大花黄牡丹分布集中且变异较小;通过PCA分析结果可以看出,大花黄牡丹与其他几个产地的牡丹样品区分明显。QAMS法计算结果和外标法计算结果基本一致,说明QAMS法可以用于牡丹种仁中多成分的定量分析,同时也为全国其他品种牡丹籽的质量控制提供了一种新的可靠方法。由含量结果可以看出,山东、河南、安徽、江苏产牡丹种仁样品中4种成分含量接近,而大花黄牡丹与四个产地牡丹种仁中4种成分含量差异较大;大花黄牡丹样品中棕榈酸和油酸含量为四产区牡丹样品的2倍,而亚油酸、亚麻酸含量仅为牡丹样品的一半。亚油酸、亚麻酸属于不饱和脂肪酸,是评价成品油质量的重要影响因素,大花黄牡丹样品中不饱和脂肪酸含量较低,是否说明其籽油的质量低于牡丹品种,还有待进一步考证。

经DPPH自由基清除率测定和 $Fe^{3+}$ 还原能力测定,大花黄牡丹种皮的抗氧化活性要明显高于其他几个产地牡丹样品。大花黄牡丹生长在高海拔地区,其紫外线较内地要强,是否在种皮中产生了大量能够抵御强紫外线的活性成分,如黄酮类、花青素类、萜类等,这些成分所具有的抗氧化作用或许是造成大花黄牡丹种皮抗氧化活性高的原因。大花黄牡丹籽油的自由基清除率为30.14%,河南产牡丹与之接近为27.33%,山东产牡丹和安徽产牡丹的清除率不足20.00%,仅江苏产牡丹的清除率(37.56%)高于大花黄牡丹;而 $Fe^{3+}$ 还原能力测定结果表明,大花黄牡丹籽油的还原能力虽然最高,为0.24 Abs,但与其他几个产地牡丹样品测定结果相差不大,由此可见大花黄牡丹籽油的抗氧化活性与牡丹相较并不明显。

牡丹籽油无急性毒性、遗传性毒性和亚急性毒

性,食用安全性高。因此,牡丹籽油被营养学家称为“世界上最好的油”。亚麻酸是人体所需的重要营养物质,牡丹籽油富含亚麻酸,有广阔的发展前景。牡丹籽油中维生素E和角鲨烯具有较强抗氧化作用,而功能性脂肪酸和甾醇等活性物质也具有清除自由基作用,以上成分或是牡丹籽油抗氧化活性的来源<sup>[21]</sup>。研究发现,牡丹籽油极易被皮肤吸收,可广泛应用于食品化妆品领域,具有抗衰老、防紫外线、消炎等功能<sup>[22]</sup>;牡丹籽油的生产过程中还会产生大量副产品,如蛋白质和药用成分含量较高的牡丹籽饼。目前,已将其深加工为牡丹蛋白质粉、牡丹营养棒和牡丹休闲食品等。而籽饼中所含亚麻酸、亚油酸、牡丹酚和牡丹皂甙等药用成分,经过纯化后可作为医药原料。牡丹种皮具有较好的抗氧化功效,其制品已应用于药品、保健品和化妆品领域<sup>[23]</sup>。由此可见,将大花黄牡丹种子进一步加工成有长期经济效益的高附加值产品,必将产生良好的经济效益和社会效益。

### 参考文献

- Xu H, Tong KK, Sun KG, et al. Research progress on endangered plant *Paeonia ludlowii* [J]. Heilongjiang Agr Sci(黑龙江农业科学), 2022, 94: 99.
- Zhong ZC, Zhang CQ, Renzeng BM, et al. Extraction and quality analysis of *Paeonia ludlowii* seed oil in Tibet [J]. J Chin Cereals Oils Assoc(中国粮油学报), 2020, 35: 84-91.
- Zhang ZX, Liu QR. *Paeonia ludlowii* [J]. Bull Biol(生物学通报), 2019, 54: 7.
- Wang WH. Protection and utilization of the resources of *Paeonia ludlowii* in Tibet [J]. Mod Agr Sci Technol(现代农业科技), 2016: 188.
- Dong LM, Zhao XJ, Liu Y, et al. Research progress on chemical constituents and utilization of different parts of oil peony [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2021, 37: 348-361.
- Wang XT, Shi XF, Liu DY, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extract of *Paeonia rockii* pollen [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1912-1918.

- 7 Zhong ML, Li YZ. Research progress of palmitic acid in cardiovascular disease[J]. Jilin Med J(吉林医学), 2018, 39: 963-966.
- 8 Cao YQ, Xie PT, Dong LJ, et al. Research advancement on oleic acid content in soybean seed[J]. Soybean Sci(大豆科学), 2015, 34: 329-334.
- 9 Zhang CE, Zhang H, Liu CY, et al. Research progress of linoleic acid[J]. Grain Process(粮油加工), 2010: 18-21.
- 10 Tang JR, Wei B, Shi SS. Progress on separation and purification technology of  $\alpha$ -linolenic acid[J]. China Oils Fat(中国油脂), 2020, 45: 28-31.
- 11 Tang Y, Yuan T, Chen TQ. Flowering characteristics and breeding system of *Paeonia ludlowii*[J]. Acta Bot Bor-Occid Sin(西北植物学报), 2021, 41: 782-794.
- 12 Yin X, Zhang EH, Li F, et al. Study on rapid seedling-raising technology of embryos of the endangered species *Paeonia ludlowii*[J]. J Biol(生物学杂志), 2021, 38: 75-78.
- 13 Jia WQ, Wang YL, Guo YZ, et al. Characterization of pollen germination and storage of *Paeonia ludlowii*[J]. Forest Sci(林业科学), 2021, 57: 82-92.
- 14 Wang ZT, Tao W, Gu Y, et al. Studies on the population of *Paeonia ludlowii* and its related characteristics of seed germination[J]. Tibet Sci Technol(西藏科技), 2021: 12-14.
- 15 Zhao F, Zeng XL, Zhang SS. *Paeonia ludlowii* in Tibet stamens disc research[J]. Tibet J Agric Sci(西藏农业科技), 2018: 21-27.
- 16 Zhang H, Jia JT. Morphological and anatomical observation of vegetative organs of *Paeonia ludlowii*[J]. J Plateau Agric(高原农业), 2018, 2: 57-60.
- 17 Zeng XL, Zhang SS, Yang Y, et al. Analysis on seed oil composition of different *Paeonia ludlowii* populations in Tibet[J]. J Sichuan Agric Univ(四川农业大学学报), 2015, 33: 285-288.
- 18 Jiang LL. Study on the extraction, component analysis and bioactivity of the essential oil from the root bark of *Paeonia ludlowii* in Tibet[J]. Harbin: Heilongjiang University(黑龙江大学), 2017.
- 19 Jiang LL, Li PF, Jiang S, et al. Extraction and chemical constituents analysis of essential oil from cortical root of Tibetan medicinal herb *Paeonia ludlowii*[J]. J Eng Heilongjiang Univ(黑龙江大学工程学报), 2016, 7: 63-67.
- 20 Zhang CQ, Xu YJ, Lu YZ, et al. Study on the fatty acids, aromatic compounds and shelf life of *Paeonia ludlowii* kernel oil[J]. J Oleo Sci, 2020, 69: 1001-1009.
- 21 Hou TL, Wang SL, Mi SQ, et al. Progress on nutritional components and functional activities of peony seed oil[J]. China Oils Fat(中国油脂), 2021, 46: 51-55.
- 22 Liu ZY. Research progress on nutritional efficacy and product development of peony seed oil[J]. Nongcun Shiyong Jishu(农村实用技术), 2021: 93-94.
- 23 Li WY, Ji WL, Li R, et al. Optimization of ultrasound extraction of total flavonoids from peony seed shell by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. China Oils Fat(中国油脂), 2018, 43: 114-118.
- (上接第 1870 页)
- 20 Etsassala NGER, Adeloje AO, Ninon E, et al. Investigation of *in-vitro* antioxidant and electrochemical activities of isolated compounds from *Salvia chamelaeagnea* P. J. Bergius extract[J]. Antioxidants, 2019, 8: 98.
- 21 Lai CS, Lee JH, Ho CT, et al. Rosmanol potently inhibits Lipopolysaccharide-Induced iNOS and COX-2 expression through downregulating MAPK, NF- $\kappa$ B, STAT3 and C/EBP signaling pathways[J]. J Agr Food Chem, 2009, 57: 10990-10998.
- 22 Wang W, Song Y. Research progress on the anti-tumor activity mechanism of carnosol[J]. West Chin Pharm J(华西药学杂志), 2018, 33: 429-434.
- 23 Li LC, Pan ZH, Ning DS, et al. Rosmanol and carnosol synergistically alleviate rheumatoid arthritis through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B/MAPK pathway[J]. Molecules, 2021, 27: 78.