

干燥工艺对林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量的影响

张常丽¹,李楠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:为了探究干燥工艺对林蛙籽中二十碳五烯酸(EPA)、 α -亚麻酸(ALA)、二十二碳六烯酸(DHA)、花生四烯酸(ARA)、二十二碳五烯酸(DPA)、亚油酸(LA)和油酸(OA)含量的影响,本文利用高效液相色谱法(HPLC)对自然干燥、冷冻干燥和热风干燥(40、50、60和80℃)后的林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量进行测定。对于不同的干燥方式,林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量为50℃热风干燥>冷冻干燥>自然干燥。对于热风干燥不同温度,林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量为50℃热风干燥>40℃热风干燥>60℃热风干燥>80℃热风干燥。结果表明,不同的干燥工艺会对林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量产生不同程度的影响,50℃热风干燥为林蛙籽最佳干燥工艺,其次为冷冻干燥(损失率0.22%~5.64%),然后是40℃热风干燥(损失5.15%~7.39%)。本研究为林蛙籽的加工和利用提供了参考依据。

关键词:林蛙籽;自然干燥;冷冻干燥;热风干燥;不饱和脂肪酸含量

中图分类号:R286.0

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0063-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.010

Effects of drying process on the content of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum

ZHANG Chang-li¹, LI Nan¹, WANG Zhong-yao¹, WANG Shi-han², WANG Yong-sheng^{1*}¹School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;²College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: To investigate the effects of drying process on the contents of eicosapentaenoic acid (EPA), α -linolenic acid (ALA), docosahexaenoic acid (DHA), arachidonic acid (ARA), docosapentaenoic acid (DPA), linoleic acid (LA) and oleic acid (OA) in *Rana chensinensis* ovum, the content of seven unsaturated fatty acids was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) after natural drying, freeze drying and hot air drying (40, 50, 60 and 80 °C). For different drying methods, the content of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum was 50 °C hot air drying > freeze drying > natural drying. The content of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum at different temperatures of hot air drying was 50 °C hot air drying > 40 °C hot air drying > 60 °C hot air drying > 80 °C hot air drying. The results showed that different drying processes can affect the content of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum to different degrees, with 50 °C hot air drying being the best drying process for *Rana chensinensis* ovum, followed by freeze drying (loss rate 0.22% - 5.64%), and then 40 °C hot air drying (loss rate 5.15% - 7.39%). This study provided a reference for the processing and utilization of *Rana chensinensis* ovum.

Key words: *Rana chensinensis* ovum; natural drying; freeze drying; hot air drying; content of unsaturated fatty acids

林蛙(*Rana temporaria chensinensis* David),又称雪蛤,是吉林省长白山地区的特色资源,是集药、食和补于一体的经济蛙^[1]。林蛙中以林蛙油(哈蟆油)最负盛名,已被广泛地研究与开发^[2,3]。林蛙籽

作为林蛙油产业化过程中的副产物,也具有很高的药用和保健价值。研究表明林蛙籽具有抗疲劳、调节免疫、调节血脂、抗焦虑和延缓衰老等药理作用^[4]。在营养成分上,林蛙籽与林蛙油有相似的组成,包括蛋白质及氨基酸类、不饱和脂肪酸类和多糖类^[5],其中在不饱和脂肪酸含量上林蛙籽是林蛙油数倍,林蛙籽有望成为一种不饱和脂肪酸的新兴

收稿日期:2022-01-04 接受日期:2022-01-14

基金项目:吉林省科技发展计划(20200404037YY)

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

来源^[6]。目前林蛙籽的研究与开发已经引起关注,对其成分及药理作用展开了研究,并已开发出林蛙籽膳食布丁、林蛙籽油软胶囊、林蛙籽油护肤乳等产品^[4,5,7-9]。林蛙籽未来在食品、药品和化妆品开发方面具有广阔前景。

干燥是林蛙籽存储、加工及开发利用的重要工序。干燥的目的是降低林蛙籽的含水量,避免储存过程中腐败和变质以保证其质量的稳定性^[10]。已有研究表明不同的干燥工艺对中药活性物质具有重要影响^[11,12]。目前不同干燥工艺对林蛙籽中重要的活性物质不饱和脂肪酸含量的影响尚无研究,因此我们以 HPLC 分析自然干燥、冷冻干燥和热风干燥不同温度对林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量的影响,旨在为林蛙籽的加工和利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 林蛙籽样品

林蛙籽(吉林省通化市通化县石湖镇永安村)。

1.1.2 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、柱温箱和紫外检测器(安捷伦,美国);Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(安捷伦,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);FA1104 电子分析天平(上海精科天平有限公司);GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅实业);FreeZone 4.5 Plus 冷冻干燥机(LABCONCO,美国);KQ-400KDE 高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);H2050R-1 离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);RE-52-99 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);WP-UP-III-10 超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司)。

不饱和脂肪酸标准品二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、二十二碳五烯酸(DPA)和油酸(OA)(成都埃法生物科技有限公司,批号分别为 AF21022403、AF21022404、AF21022402 和 AF21022409), α -亚麻酸(ALA)(上海安谱实验科技股份有限公司,批号为 M7510100),亚油酸(LA)(上海麦克林生化科技有限公司,批号为 C12378803),花生四烯酸(ARA)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为 D2123133)。色谱级甲醇、乙腈(Fisher 公司);分析级石油醚、无水乙醇(西陇化工股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 干燥处理

自然干燥:林蛙籽样品放置于通风良好处 20 ~ 25 °C 干燥,两次称量质量差 < 0.1 g 为干燥终点。

冷冻干燥:林蛙籽样品于 -20 °C 预冻 24 h,置于冷冻干燥机(温度 -80 °C)干燥,两次称量质量差 < 0.1 g 为干燥终点。

热风干燥不同温度:林蛙籽样品分别于 40、50、60 和 80 °C 的电热鼓风干燥箱干燥,两次称量质量差 < 0.1 g 为干燥终点。

1.2.2 不饱和脂肪酸 HPLC 含量测定

1.2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)。流动相:乙腈(A)和 0.1% 磷酸水溶液(B)。梯度洗脱:0 ~ 18 min, 87% 流动相 A; 18 ~ 20 min, 87% → 90% 流动相 A; 20 ~ 22 min, 90% → 96% 流动相 A; 22 ~ 26 min, 96% 流动相 A; 26 ~ 30 min, 96% → 100% 流动相 A。流速:0.8 mL/min。检测波长:203 nm。柱温:30 °C。进样量:10 μ L。

1.2.2.2 空白溶液的制备

以无水乙醇作为空白溶液。

1.2.2.3 对照品溶液的制备

精密称取 EPA、ALA、DHA、ARA、DPA、LA 和 OA 标准品于 2 mL 容量瓶中,加入无水乙醇定容至刻度,摇匀得七种不饱和脂肪酸标准品储备液。分别取适量各不饱和脂肪酸储备液于容量瓶中加无水乙醇定容至刻度,摇匀得不饱和脂肪酸标准品溶液。

1.2.2.4 供试品溶液的制备

取不同干燥方式处理后的林蛙籽于研钵中研磨至粗细均匀的粉末。精密称取 1.00 g 林蛙籽粉末于具塞锥形瓶内,加入 12 mL 石油醚,置于超声波清洗器中提取 60 min。以 8 000 r/min 离心 10 min,弃去林蛙籽残渣,提取液 50 °C 旋转蒸发除去溶剂石油醚。提取物用无水乙醇溶解并定容得林蛙籽供试品溶液。

1.2.2.5 HPLC 含量测定

取“1.2.2.4”项下方法制备的林蛙籽供试品溶液,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后按“1.2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以线性回归方程计算不同干燥工艺处理后林蛙籽中七种不饱和脂肪酸的含量。

2 结果与分析

2.1 不饱和脂肪酸标准曲线的绘制

以不同的浓度(x , mg/mL)和对应的峰面积绘

制了七种不饱和脂肪酸的标准曲线($y = ax + b$)。线性回归方程、相关系数和线性范围见表1。七种

不饱和脂肪酸的标准曲线的线性相关系数(R^2)范围为0.999 5~1,在较宽的浓度范围内线性关系良好。

表1 七种不饱和脂肪酸标准曲线的回归方程

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

不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid	回归方程 Regression equation	R^2	线性范围 Linear range (mg/mL)
EPA	$y = 53\ 046x + 24.86$	0.999 8	0.040 0 ~ 0.479 4
ALA	$y = 28\ 666x + 877.10$	0.999 5	0.118 1 ~ 1.180 9
DHA	$y = 70\ 489x + 157.64$	0.999 9	0.025 9 ~ 0.407 7
ARA	$y = 49\ 166x + 467.74$	0.999 7	0.078 8 ~ 0.709 2
DPA	$y = 54\ 084x + 3.59$	1	0.014 1 ~ 0.140 7
LA	$y = 20\ 921x + 351.34$	0.999 8	0.123 7 ~ 1.113 3
OA	$y = 4\ 733x + 319.13$	0.999 6	0.296 8 ~ 2.670 8

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; DPA: 二十二碳五烯酸; LA: 亚油酸; OA: 油酸, 下同。

Note: EPA: Eicosapentaenoic acid; ALA: α -Linolenic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; ARA: Arachidonic acid; DPA: Docosapentaenoic acid; LA: Linoleic acid; OA: Oleic acid, the same below.

2.2 不饱和脂肪酸 HPLC 含量测定

将林蛙籽供试品液按照“1.2.2.5”项进行含量

测定,空白溶剂、七种不饱和脂肪酸标准品和林蛙籽高效液相色谱图见图1。

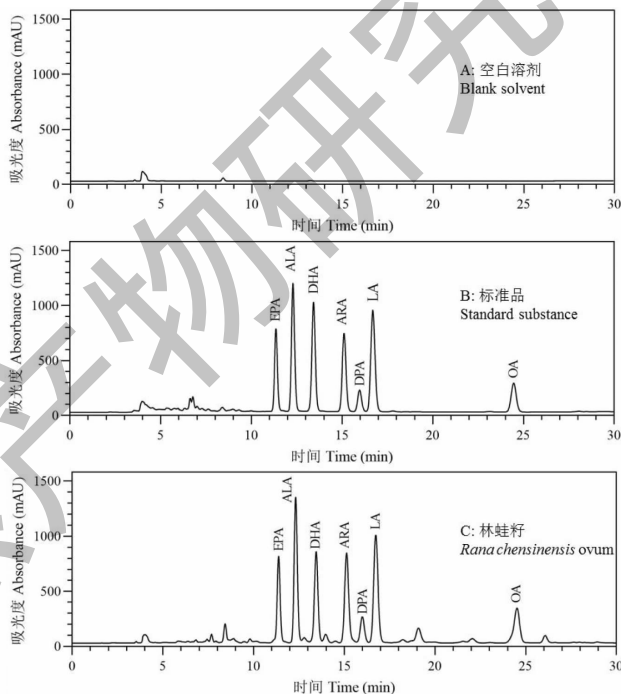


图1 空白溶剂、标准品和林蛙籽高效液相色谱图

Fig. 1 The high performance liquid chromatogram of blank solvent, standard substance and *Rana chensinensis* ovum

2.3 不同干燥工艺林蛙籽中不饱和脂肪酸含量分析

2.3.1 不同干燥方式

探究不同干燥方式对林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量影响,热风干燥温度选择 50 $^{\circ}\text{C}$ [13]。自然干燥、冷冻干燥和 50 $^{\circ}\text{C}$ 热风干燥林蛙籽中七种不饱和

脂肪酸含量及损失率见表2。不同干燥方式对林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量的影响呈相同趋势(见图2)。不同干燥方式七种不饱和脂肪酸含量为 50 $^{\circ}\text{C}$ 热风干燥 > 冷冻干燥 > 自然干燥。相比于自然干燥和冷冻干燥,50 $^{\circ}\text{C}$ 热风干燥具有最高的七种不饱和脂肪酸含量。以 50 $^{\circ}\text{C}$ 热风干燥为各不饱和脂

肪酸含量基准值,自然干燥七种不饱和脂肪酸损失率为 12.04% ~ 16.76%;冷冻干燥七种不饱和脂肪酸损失率为 0.22% ~ 5.64%。自然干燥相比于冷冻干燥损失率大,这可能是由于自然干燥主要利用流通的空气促使水分蒸发,林蛙籽长时间暴露于空气中导致了不饱和脂肪酸的氧化。冷冻干燥是将水

转变为冰在真空下将冰转变为蒸汽而除去的干燥方式,虽然冷冻干燥和自然干燥都需要较长的干燥时间,但冷冻干燥可能由于在低温条件下对林蛙籽进行处理,使得不饱和脂肪酸损失率明显降低。因此对于不同干燥方式,50 °C 热风干燥是林蛙籽最佳的干燥方式,冷冻干燥次之。

表 2 不同干燥方式林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量和损失率

Table 2 Content and loss rate of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum by different drying methods

不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid	自然干燥 Natural drying		冷冻干燥 Freeze drying		50 °C 热风干燥 50 °C hot air drying	
	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)
EPA	1.202 7	15.61	1.394 6	2.14	1.425 1	0.00
ALA	3.740 7	13.93	4.336 6	0.22	4.346 0	0.00
DHA	1.096 8	13.27	1.245 7	1.50	1.264 6	0.00
ARA	1.734 0	14.66	1.961 6	3.46	2.031 9	0.00
DPA	0.456 4	16.76	0.533 1	2.77	0.548 3	0.00
LA	5.430 3	12.04	5.950 6	3.61	6.173 7	0.00
OA	9.866 6	14.49	10.887 7	5.64	11.539 0	0.00

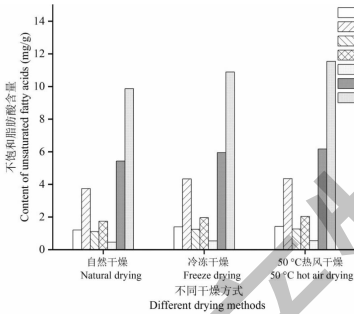


图 2 不同干燥方式林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量

Fig. 2 The content of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum by different drying methods

2.3.2 热风干燥不同温度

热风干燥是干燥箱内吹入热风使空气流通加快的干燥方式,操作方便,效率高,但会导致热敏性活性物质的降解,因此有必要对其干燥温度进行探究。热风干燥不同温度林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量及损失率见表 3。热风干燥不同温度林蛙籽中七种

不饱和脂肪酸的含量存在差异,四种不同干燥温度对七种不饱和脂肪酸含量均表现出相同的影响趋势(见图 3)。林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量为 50 °C 热风干燥 > 40 °C 热风干燥 > 60 °C 热风干燥 > 80 °C 热风干燥。50 °C 热风干燥林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量最高,与 55 °C 干燥林蛙油具有最高的林蛙油粗脂肪得到相近的结果^[14]。以热风干燥 50 °C 为各不饱和脂肪酸含量基准值,40、60 和 80 °C 热风干燥七种不饱和脂肪酸损失率分别为 5.15% ~ 7.39%、10.92% ~ 13.69% 和 16.68% ~ 22.35%。80 °C 热风干燥时不饱和脂肪酸损失率最高,其次是 60 °C,40 °C 林蛙籽的损失率小于 60 和 80 °C。40 °C 热风干燥时由于干燥时间比较长而导致了不饱和脂肪酸的氧化^[15]。而温度高于 50 °C 时,虽然加热时间减少,但高温可能使不饱和脂肪酸受到破坏而含量降低。但总体来看林蛙籽中不饱和脂肪酸低温对其含量的影响比高温小。热风干燥不同温度中 50 °C 为林蛙籽干燥的最适温度,其次是 40 °C。

表 3 热风干燥不同温度林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量和损失率

Table 3 Content and loss rate of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum by hot air drying at different temperatures

不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid	40 °C		50 °C		60 °C		80 °C	
	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)
EPA	1.319 7	7.39	1.425 1	0.00	1.247 0	12.50	1.187 4	16.68

续表 3(Continued Tab. 3)

不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid	40 °C		50 °C		60 °C		80 °C	
	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)	含量 Content (mg/g)	损失率 Loss rate (%)
ALA	4.052 8	6.75	4.346 0	0.00	3.792 2	12.74	3.427 0	21.15
DHA	1.178 6	6.80	1.264 6	0.00	1.091 4	13.69	1.007 8	20.31
ARA	1.927 2	5.15	2.031 9	0.00	1.779 5	12.42	1.671 9	17.72
DPA	0.514 8	6.11	0.548 3	0.00	0.481 3	12.22	0.425 8	22.35
LA	5.822 0	5.70	6.173 7	0.00	5.499 5	10.92	5.001 3	18.99
OA	10.846 0	6.01	11.539 0	0.00	10.160 2	11.95	9.148 0	20.72

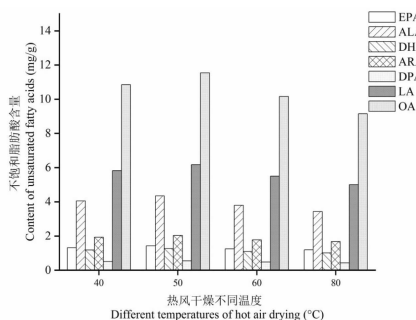


图 3 热风干燥不同温度林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量

Fig. 3 The content of seven unsaturated fatty acids in *Rana chensinensis* ovum by hot air drying at different temperatures

3 结论

本研究应用 HPLC 分析了自然干燥、冷冻干燥和热风干燥(40、50、60 和 80 °C)对林蛙籽中 EPA、ALA、DHA、ARA、DPA、LA 和 OA 含量的影响。结果显示,不同干燥工艺处理的林蛙籽中七种不饱和脂肪酸的含量具有差异性。对于不同的干燥方式,七种不饱和脂肪酸含量为 50 °C 热风干燥 > 冷冻干燥 > 自然干燥。对于热风干燥不同温度,七种不饱和脂肪酸含量为 50 °C 热风干燥 > 40 °C 热风干燥 > 60 °C 热风干燥 > 80 °C 热风干燥。不同干燥工艺七种不饱和脂肪酸损失率均与含量呈相反趋势。从不同干燥工艺林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量和损失率来看,50 °C 热风干燥为林蛙籽最佳干燥工艺,其次是冷冻干燥(损失率 0.22% ~ 5.64%),然后是 40 °C 热风干燥(损失率 5.15% ~ 7.39%)。本研究首次探究了干燥工艺对林蛙籽中七种不饱和脂肪酸含量的影响,为林蛙籽的加工和利用提供了参考依据。

参考文献

1 Zhu LT, Yang YY, Xu L, et al. Textual research on *Ranae*

Oviductus [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2021,27(10):126-132.

2 Guo HY, Gan YS, Liu M, et al. Quality evaluation of *Oviductus Ranae* based on PUFAs using HPLC fingerprint techniques combined with chemometric methods [J]. Foods, 2019,8(8):322.

3 Zhang Y, Wang YF, Li MZ, et al. Traditional uses, bioactive constituents, biological functions, and safety properties of *Oviductus ranae* as functional foods in China [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019;4739450.

4 Wang CQ, Zheng HY, Lu SC, et al. Pharmacological effects and development and utilization of *Rana chensinensis* [J]. Heilongjiang J Anim Sci Vet Med(黑龙江畜牧兽医),2016(2):131-132.

5 Liu JM, Wu SY, Wang DY, et al. Advances in research of the nutritional value and health function of ovum of *Rana chensinensis* [J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2018,39(11):220-224.

6 Zhang JQ, Wang ZY, Wang H, et al. Determination and chemometrics-assisted comparative analysis of active components in different tissue of *Rana chensinensis* [J]. Separations, 2021,8(10):164.

7 Jin LM. Development of *Rana chensinensis* ovum dietary pudding [J]. Agr Sci Jiangsu(江苏农业科学),2013,41:217-219.

8 Chen NN, Wei GQ, Chang L, et al. Preparation of cosmetic with fatty acids from ovum oil of *Rana dybowskii* [J]. J Econ Anim(经济动物学报),2018,22(3):160-167.

9 Zhu LF. Preliminary study on the hypolipidemic effect of *Rana chensinensis* ovum oil soft capsule on hyperlipidemic rats [J]. Heilongjiang Sci Technol Inf(黑龙江科技信息),2013(31):65-66.

10 Irma AG, David BA, Luis CG, et al. Effect of different drying methods on the composition of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves [J]. Int Agrophys, 2017, 31(1):139-144.

(下转第 108 页)