

马 力,陈永忠,钟海雁,等.油茶籽油中角鲨烯的高效液相色谱分析[J].江苏农业科学,2016,44(8):353-356.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.102

油茶籽油中角鲨烯的高效液相色谱分析

马 力^{1,2},陈永忠¹,钟海雁²,周 波²,彭邵锋¹,李志钢¹,王湘南¹,王保明¹,彭映赫¹,王 瑞¹

(1.湖南省林业科学院,湖南长沙 410004; 2.中南林业科技大学,湖南长沙 410004)

摘要:建立了油茶籽油中角鲨烯的 HPLC 测定方法。样品采用硅胶柱提纯处理优于皂化处理、皂化处理后硅胶柱提纯处理,得到的色谱峰杂峰少、角鲨烯峰型对称、峰面积较大。最佳色谱条件为 C_{18} 柱,流动相 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲醇}}$ 为 40:60,检测波长 210 nm,流速为 1 mL/min,柱温为 40 ℃。该方法下角鲨烯在 0.01~0.4 mg/mL 范围内浓度和面积呈现良好的线性关系,相关系数为 0.999 6;平均回收率 100.28% ($RSD=1.9$);精密度 $RSD(n=6)$ 为 1.24%;可用于实验室检测油茶籽油中角鲨烯的含量。

关键词:油茶籽油;角鲨烯;高效液相色谱;流动相;色谱条件

中图分类号: O657.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0353-04

油茶籽油含角鲨烯、维生素 E 等活性成分,赋予其与众不同的营养保健作用。角鲨烯是具有促进血液循环、细胞修复、抗氧化和消炎杀菌等功能的天然活性成分^[1-3],广泛用于医疗保健品和化妆品等方面。目前角鲨烯软来源主要是深海鱼类,植物性来源的角鲨烯较少。已知菟属植物种子油中角鲨烯含量可达 5%~8%,甘草根、带皮种子和去皮种子中角鲨烯含量分别为 0.2%、0.104 5%、0.078 1%,橄榄油、棕榈油、玉米油和米糠油等也含一定量的角鲨烯。角鲨烯的检测尚未有相关国家标准或者规范性文件^[4],在现有的研究中大多采用薄层层析法(TCL)、气相色谱法(GC)和液相色谱法(HPLC)^[5]。但薄层层析法人工影响因素较多;气相色谱法需要前期对检测物进行衍生处理,易引入新的杂质,费时费力。本试验采用 TCL 定性测定油茶籽油中是否含有角鲨烯,采用 waters C_{18} 反相极性色谱柱考察流动相及流动相比、流速及柱温对油茶籽油中角鲨烯分离效果的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料、仪器与试剂

1.1.1 试验材料 供试的油茶籽由湖南省林业科学院提供。

1.1.2 试剂 甲醇、乙腈和正己烷,均为色谱纯;无水乙醇、氢氧化钠、硝酸银、石油醚、氢氧化钾、硫酸钠和角鲨烯,均为分析纯;柱层析硅胶,为试剂级。

1.1.3 试验仪器 榨油机,湖南省林业科学院自制;DHG-9070A 型电热恒温箱,北京佳源兴业科技有限公司生产;SZF-06GI 粗脂肪测定仪,上海新嘉电子有限公司生产;KQ-700DV 数控超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司生产;P10-Y 实验室超纯水器(国之源);LC-2010AHT 液相色谱仪,日本岛津公司生产。

收稿日期:2016-02-15

基金项目:湖南省科技厅重大专项(编号:2013FJ1006)。

作者简介:马 力(1982—),女,湖南湘潭人,博士,助理研究员,主要从事油脂加工研究。Tel:(0731)85592846;E-mail:276841095@qq.com。

1.2 试验方法

1.2.1 测定油样的制取 称取 1~1.5 kg 油茶籽,置于干燥箱 105 ℃干燥至恒质量后,用压榨机提油,将油静置、除杂后,备用。

1.2.2 角鲨烯测定条件优化

1.2.2.1 角鲨烯的定性分析 用 10 cm×20 cm 硅胶 GF254 薄层层析薄板鉴定油茶籽油中是否含有角鲨烯。

点样:在距薄层层析板 1 侧的底部 1 cm 处画好 1 条直线作为起点线,用毛细管分别吸取标准角鲨烯溶液和油茶籽油样品垂直轻轻地接触到起点线上,样点间距为 1~1.5 cm。

显色:将展开剂加入到层析缸中,将层析缸密封 1 h,然后将薄层层析板放入进行展开,当展开剂的前沿已到达薄层层析板上端 0.5~1 cm 时,迅速取出薄层层析板,晾干。将除去展开剂的层析板,碘缸显色 20~30 min,即出现黄色斑点,取出后计算 R_f 值。 R_f 值为斑点中心距原点的距离与溶剂展开前沿距原点距离的比值。

1.2.2.2 角鲨烯预处理优化 角鲨烯标准溶液的配制:称取 0.1 g 的角鲨烯标准品于 10 mL 的容量瓶中,用正己烷定容至刻度并摇匀,配制浓度为 10 mg/mL 的角鲨烯标准品溶液。

角鲨烯样品预处理条件的优化分 3 种不同的处理方法。处理 1(A):皂化处理。称取 1 g 油茶籽油于 250 mL 的磨口锥形瓶中,加入 2 mol/L 的 KOH-乙醇溶液 50 mL,连接好回流装置,在 85 ℃的恒温水浴锅中回流 1 h,移出后冷却至室温。将皂化液转入 250 mL 的分液漏斗中,加入饱和氯化钠溶液 50 mL,然后加入 50 mL 石油醚,充分振摇萃取,静置分层后将上层溶液转入 250 mL 的分液漏斗中,下层溶液再用 50 mL 石油醚萃取 2 次,合并 3 次的上层有机相溶液,用去离子水洗至中性,然后过无水硫酸钠脱水,在 35 ℃水浴中旋转蒸发至近干,用正己烷定容至 2 mL,混匀后,过 0.45 μm 微孔滤膜于进样瓶中,作为待测液。处理 2(B):硅胶柱提纯处理。采用湿法装柱法,将硅胶柱固定于铁架台上,倒入约 100 mL 的石油醚,称取 10 g 经 500 ℃烘干的硅胶,慢慢倒入硅胶柱中,静置片刻,再加入 0.5 cm 无水硫酸钠(约 2 g),打开塞子,使石油醚缓慢淋洗下来,确保柱中硅胶填料均匀,不出现

气泡和断层现象。称取 1 g 左右的油茶籽油样品放置于小烧杯中,用少量石油醚分数次润洗小烧杯,洗涤液一并倒入小柱中,加入 50 mL 石油醚于硅胶柱中,打开旋塞,收集滤液,当石油醚液面与上端无水硫酸钠层相切时,再分 2 次加入 50 mL 石油醚,收集全部的洗脱液至锥形瓶中,用旋转蒸发仪浓缩滤液,然后用氮吹仪氮吹至干,随后用正己烷定容至 2 mL,充分振摇,过 0.45 μm 微孔滤膜,作为待测液转移到进样瓶中。处理 3(C):皂化处理硅胶柱提纯处理。按处理 1 皂化萃取后,再按处理 2 硅胶柱提取。

1.2.2.3 角鲨烯高效液相色谱测定的条件优化 流动相选择:在流速为 1 mL/min 和柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 的相同条件下,改变流动相,考察甲醇、乙腈、甲醇/乙腈(V/V,50/50)体系对分离效果的影响。

流动相比例的选择:在流速为 1 mL/min 和柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 的相同条件下,选择较优的流动相比例,考察流动相比例对分离效果的影响。

柱温的选择:在乙腈/甲醇(V/V,40/60)作为流动相和流速为 1 mL/min 的相同条件下,改变柱温(35、40、45 $^{\circ}\text{C}$),考察柱温对分离效果的影响。

流速的选择:在流速为 1 mL/min 和柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 的相同条件下,改变流速(0.8、1.0、1.2 mL/min),考察流速对分离效果的影响。

2 结果与分析

2.1 薄层层析法(TLC)定性检测油茶籽油中的角鲨烯

由图 1 可知,在 $R_f = 0.662$ 处有一个黄色斑点,斑点非常清晰,未产生拖尾,与角鲨烯标准品完全一致。说明油茶籽油中含有角鲨烯。

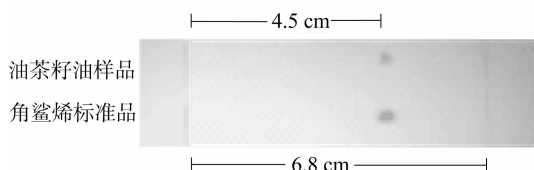


图1 角鲨烯的薄层层析法检测

2.2 预处理条件的测定结果

采用 3 种不同的预处理方法对油茶籽油样品进行处理,处理后的色谱图如图 2 至图 4 所示。

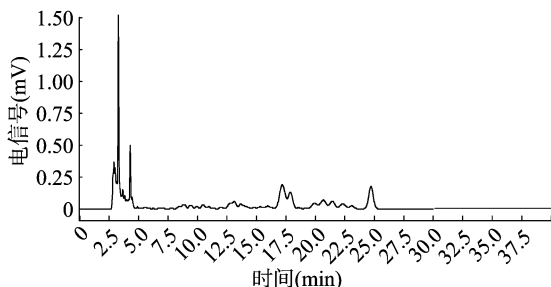


图2 油茶籽油经皂化处理后的角鲨烯 HPLC 图谱

由图 2 至图 4 可知,油茶籽油经不同的预处理方法得到的角鲨烯 HPLC 图谱差异很大。经皂化处理后的 HPLC 图谱杂质峰较多,目标峰(角鲨烯)附近有干扰,损害色谱柱,且皂

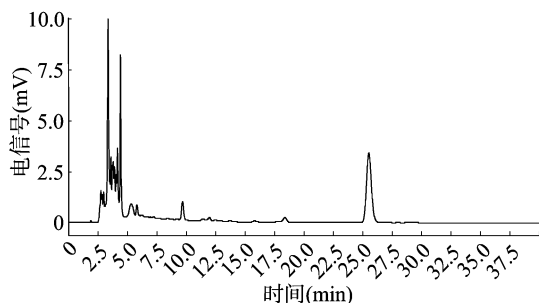


图3 油茶籽油经硅胶柱提取处理后的角鲨烯 HPLC 图谱

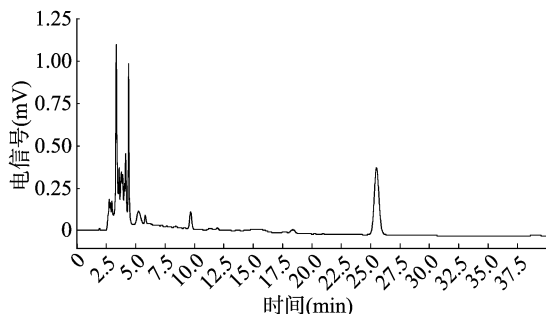


图4 油茶籽油经皂化、硅胶柱提取处理后的角鲨烯 HPLC 图谱

化时间过长。经硅胶柱提纯处理后的 HPLC 图谱峰形较好,附近没有杂质峰的干扰,方法简单且角鲨烯峰型对称、峰面积较大。经皂化处理和硅胶柱提纯处理后的 HPLC 图谱与硅胶柱提取后的 HPLC 图谱处理的效果差别不大,但角鲨烯峰面积偏低,且操作过程较为繁琐,因此硅胶柱提取法是一种较优的预处理方法,最终能使角鲨烯得到良好的分离效果。

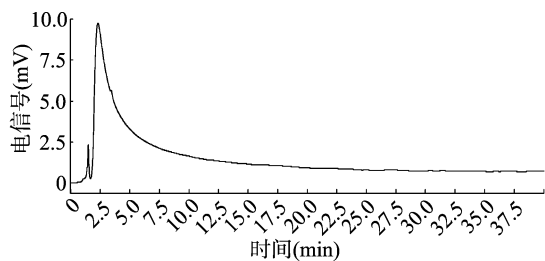
2.3 角鲨烯检测高效液相色谱法条件的研究

2.3.1 流动相的选择 由图 5 可知,采用乙腈作为流动相,由于乙腈具有较强的洗脱能力,图谱中仅有 1 个大峰,溶剂峰与目标峰没有分开。采用甲醇和甲醇/乙腈(V/V,50/50)分离效果均较好,因乙腈较甲醇使柱内承受的压力低,考虑到色谱柱的使用寿命,选用甲醇/乙腈作为流动相。

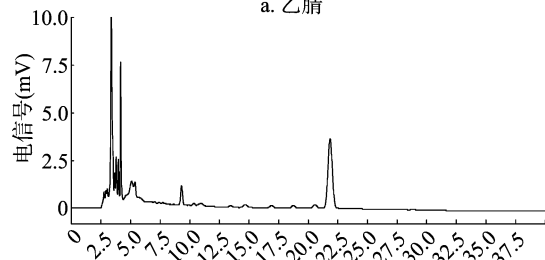
2.3.2 流动相比例的选择 由图 6 可知,样品在不同比例的流动相条件下都能与杂质峰分开,但是随着乙腈比例的增加,样品的保留时间增加,当乙腈增加到 60% 时,样品主峰的保留时间为 29 min。一般情况下,因乙腈的洗脱能力较甲醇强,增加乙腈的比例,样品的保留时间缩短,但在本试验中,随着乙腈的比例增加,样品的保留时间反而延长,这可能与角鲨烯的特有性质有关。为缩短样品的保留时间,选择乙腈/甲醇(V/V,40/60)作为流动相。

2.3.3 柱温的选择 柱温是最重要的色谱操作条件,它直接影响色谱柱的选择性、色谱峰区域展宽和分析速度^[6]。由图 7 可知,在柱温为 35、40、45 $^{\circ}\text{C}$ 时,峰形有一定的变化,但在试验中观察到峰面积变化很小;样品主峰跟其他杂质峰均分离良好,样品的保留时间随着柱温的升高都前移了。因柱温太高容易损伤色谱柱,综合考虑样品的保留时间和柱子的使用寿命,柱温选择 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

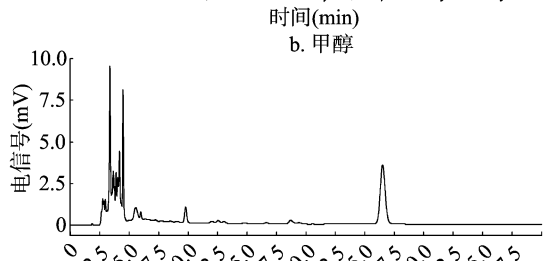
2.3.4 流速的选择 由图 8 可知,在流速选择 0.8、1.0、1.2 mL/min 时,样品主峰跟其他杂质峰均分离良好,流速增大时,峰宽变小,但峰面积变化不大。样品的保留时间随着流速的增大而缩短。同时,随着流速的增大,柱压会上升。综合



a. 乙腈

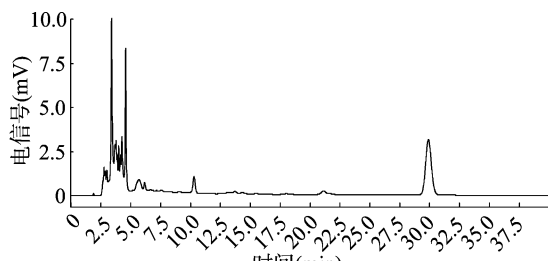


b. 甲醇

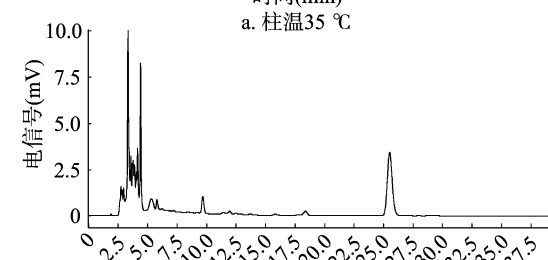


c. 甲醇/乙腈(V/V, 50/50)

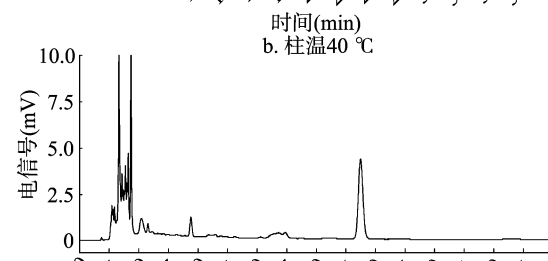
图5 不同流动相条件下的色谱



a. 柱温35 °C

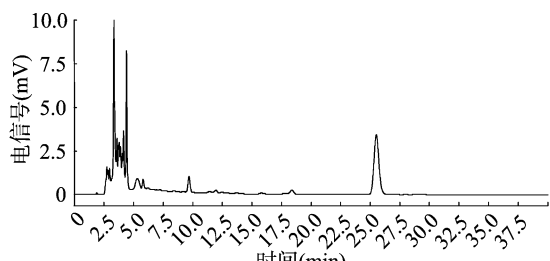


b. 柱温40 °C

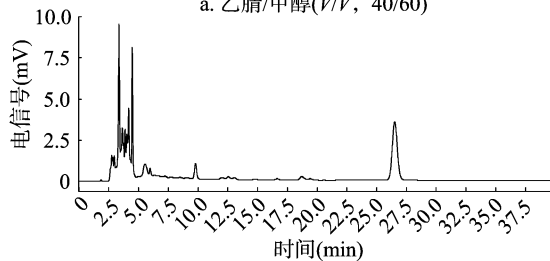


c. 柱温45 °C

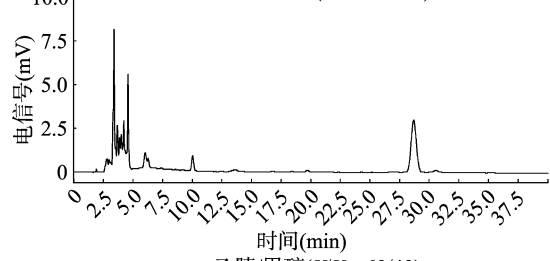
图7 不同柱温条件下的色谱



a. 乙腈/甲醇(V/V, 40/60)



b. 乙腈/甲醇(V/V, 50/50)



c. 乙腈/甲醇(V/V, 60/40)

图6 不同比例流动相条件下的色谱

考虑分析时间及柱子使用寿命,流速选择1.0 mL/min。

2.4 高效液相色谱法检测角鲨烯的效果评价

2.4.1 标准角鲨烯浓度与峰面积的线性关系 量取一定量10 mg/mL的标准溶液,用正己烷稀释,配制成浓度分别为0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.40 mg/mL的标样,按选定的色谱条件,取10 μ L进样,记录色谱图,测定其峰面积,以峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归,建立标准曲线图(图9)及线性回归方程。

线性回归方程 $y = 4 \times 10^7 x + 198\,720$, $r^2 = 0.999\,6$,线性范围0.01 ~ 0.4 mg/mL。

2.4.2 稳定性试验 精确称取油茶籽油样品1 g,经硅胶柱提取处理后用正己烷定容至2 mL,每隔8 h进样10 μ L,按照优化的色谱条件进行定量分析。稳定性试验结果见表1。根据表1,计算出RSD为1.26%,说明用本试验方法制成的供试样品溶液中的角鲨烯在24 h内稳定。

2.4.3 回收率试验 加标回收率是表示准确度的一个指标。称取已知角鲨烯含量(80.02 μ g/g)的油茶籽油样品,再添加5 μ L角鲨烯标准品溶液。经硅胶柱提取处理后用正己烷定容至2 mL,进样10 μ L,按照优化的色谱条件进行定量分析,重复3次,回收率试验结果见表2。

根据表2,得到该试验方法的平均回收率为100.28%,RSD为1.9%,说明该方法的回收率良好,即测定方法有良好的准确度,是可靠的。

2.4.4 精密度的测定 精密度是衡量可靠性的另一个指标,表现所测数据重复性的好坏。精确进样角鲨烯标样10 μ L,

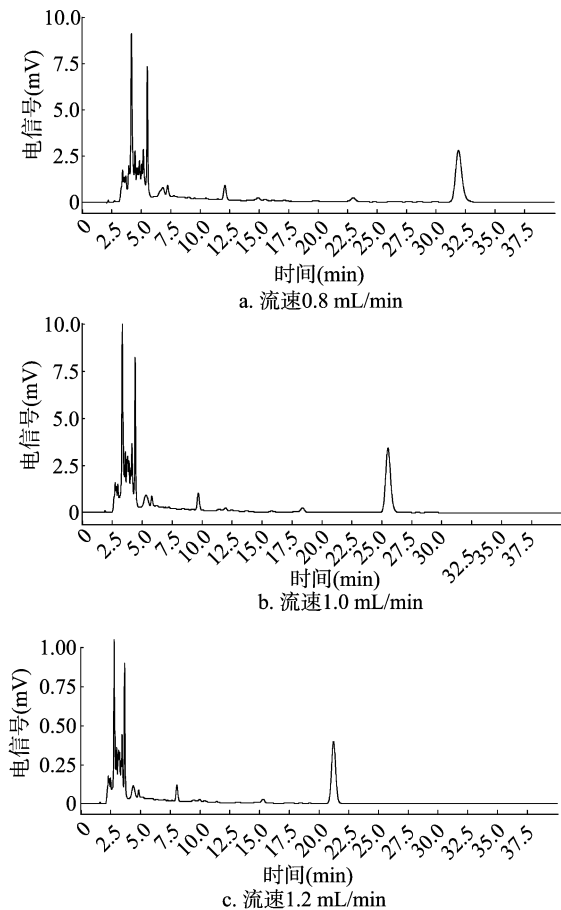


图8 不同流速条件下的色谱

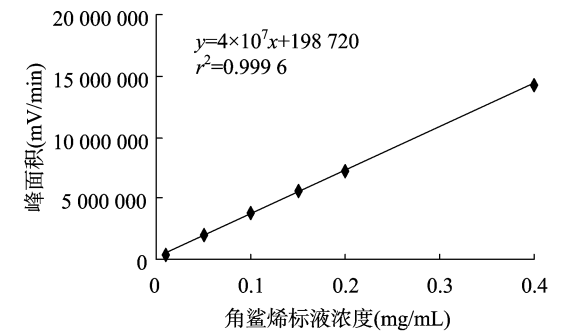


图9 角鲨烯的标准曲线

表1 稳定性试验结果

相隔时间 (h)	峰面积 (mV·min)	平均峰面积 (mV·min)	RSD (%)
0	1 031 443	1 030 225	1.26
8	1 011 598		
16	1 040 225		
24	1 037 632		

连续进样6次。精密度的试验结果见表3。

根据表3,计算出相对标准偏差RSD为1.24%,表明在该方法和色谱条件下,精密度良好,即测定方法比较稳定,可以使测定数据较好的重现。

3 小结与讨论

本试验建立了油茶籽油中角鲨烯的HPLC测定方法。样

表2 回收率试验结果

试验次数	加入标样测 量值(μg/g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	130.31	100.58	100.28	1.9
2	129.14	98.24		
3	130.01	102.02		

表3 精密度试验结果

序号	角鲨烯峰面积(mV·min)
1	655 028
2	649 692
3	659 706
4	669 562
5	658 873
6	670 553

品采用硅胶柱提纯处理优于皂化处理、皂化处理后硅胶柱提纯处理,得到的色谱峰杂峰少、角鲨烯峰型对称、峰面积较大。最佳色谱条件为C₁₈柱,流动相V_{乙腈}:V_{甲醇}为40:60,检测波长210 nm,流速为1 mL/min,柱温为40℃。该方法下角鲨烯在0.01~0.40 mg/mL范围内浓度和面积呈现良好的线性关系,相关系数为0.999 6,平均回收率100.28%(RSD=1.9%),精密度RSD(n=6)为1.24%。该方法可用于实验室检测油茶籽油中角鲨烯的含量。

液相色谱法^[7-8]已应用于甘草^[9-10]、罗汉果^[11]中角鲨烯含量的测定,但应用于油茶籽油的检测中尚未有报道。本研究建立了油茶籽油中角鲨烯的HPLC测定方法,对建立油茶籽油中角鲨烯含量测定的标准方法具有参考价值。

参考文献:

[1]钟冬莲,汤富彬,沈丹玉,等.油茶籽油中角鲨烯含量的气相色谱法测定[J].分析试验室,2011,30(1):104-106.
[2]王海洪,黄晓春.用深海鲨鱼制备角鲨烯、角鲨烷[J].东海海洋,1999,17(2):43-46.
[3]陈思伟,陈上云.角鲨烯对部分T淋巴细胞亚群的影响[J].广东药学院学报,1997,13(2):131-132.
[4]陈伟珠,方华,张怡评,等.超高效液相色谱法检测角鲨烯[J].食品与发酵科技,2014,50(6):74-76,86.
[5]梁新华,郑彩霞,张凤侠,等.甘草角鲨烯的提取及高效液相色谱分析[J].北京林业大学学报,2010,32(2):123-126.
[6]赵铁男.高效液相色谱技术(HPLC)影响因素的选择[J].分析实验室,2007,26:340-341.
[7]李青,谭红,袁鑫,等.高效液相色谱法测定核桃青皮中胡桃醌的含量[J].江苏农业科学,2014,42(1):259-261.
[8]李智宁,李渭川,胡德禹,等.高效液相色谱法测定烟草上的噻森铜[J].江苏农业科学,2015,43(1):284-286.
[9]汪运明,陈华勇,杨继国,等.气相色谱质谱联用测定茶油中角鲨烯含量[J].食品工业科技,2011(6):404-406.
[10]梁新华,郑彩霞,张凤侠,等.甘草角鲨烯的提取及高效液相色谱分析[J].东北林业大学学报,2010,32(2):123-126.
[11]陈全斌,程忠泉,杨建香,等.罗汉果种仁油中角鲨烯的高效液相色谱分析[J].广西科学,2006,13(2):118-120.