

检测分析

高效液相色谱法测定蒜头果油分离出的神经酸含量

赖福兵,李伟光,赖芳,刘雄民,马丽,王一凡

(广西大学 化学化工学院, 南宁 530004)

摘要:建立了高效液相色谱法测定从蒜头果油中分离出的神经酸含量的方法。采用的色谱柱为 Hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 甲醇 - 0.4% 乙酸水溶液 - 四氢呋喃 (体积比 80:12:5:3), 柱温 26 °C, 检测波长 205 nm, 流速 1.0 mL/min, 进样量 5 μL。结果表明:神经酸在 1.0 ~ 20.0 mg/mL 范围内呈良好线性关系, 精密度和稳定性的相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.52%、1.61%; 回收率为 97.41% ~ 104.89%, RSD 为 0.72% ~ 3.22%; 测得样品的 RSD 为 0.90% ~ 2.36%。实验方法简便、快速、准确、重复性好, 可作为蒜头果油分离脂肪酸过程中神经酸含量的分析方法。

关键词:高效液相色谱法; 神经酸; 蒜头果油

中图分类号: TS225; TQ646

文献标识码: A

文章编号: 1003 - 7969(2018)06 - 0144 - 04

Determination of content of nervonic acid separated from *Malania oleifera* oil by HPLC

LAI Fubing, LI Weiguang, LAI Fang, LIU Xiongmin, MA li, WANG Yifan

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: A method for determination of content of nervonic acid separated from *Malania oleifera* oil was established. The method was developed under the following conditions: Hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile - methanol - 0.4% acetic acid solution - tetrahydrofuran (volume ratio 80:12:5:3), flow rate 1.0 mL/min, injection volume 5 μL, column temperature 26 °C and detection wave length 205 nm. The results showed that the standard curve of nervonic acid had good linear in the range of 1.0 - 20.0 mg/mL. The relative standard deviation (RSD) of precision and stability were 1.52% and 1.61%, respectively. The recovery rate of nervonic acid was 97.41% - 104.89%, and RSD was 0.72% - 3.22%. The RSD of the tested sample was 0.90% - 2.36%. The method was simple, rapid, accurate and reproducible, and it could be used to determine the content of nervonic acid during the separation of fatty acids from *Malania oleifera* oil.

Key words: high performance liquid chromatography; nervonic acid; *Malania oleifera* oil

蒜头果是广西及云南部分山区的特色植物资源, 其种仁油中富含 30% ~ 60% 神经酸^[1-3]。神经

酸具有增强免疫功能^[4]、提高神经的活跃、防止脑神经衰弱的作用^[5], 对阿尔茨海默病^[6]、齐薇格综合征^[7]、肾上腺脑白质营养不良^[8]、肿瘤^[9]等心血管及人体自身免疫缺乏性疾病也具有相当好的预防和治疗功效^[10]。蒜头果油一般不直接在食品及药品上使用, 需要经过水解并把神经酸分离提纯到一定纯度再进行利用。溶剂重结晶法是利用溶解度的差异而达到分离提纯效果的分离方法^[11], 是目前常用来分离提纯神经酸的方法, 在分离提纯神经酸的

收稿日期: 2017 - 11 - 10; 修回日期: 2018 - 03 - 18

基金项目: 国家自然科学基金(21502027); 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139041)

作者简介: 赖福兵(1992), 男, 在读硕士, 研究方向为天然产物的提取 (E-mail) 1326912257@qq.com。

通信作者: 李伟光, 副教授 (E-mail) lwgxqz@163.com。

过程中需要建立分析方法对神经酸含量进行跟踪检测。

目前文献报道多采用衍生化气相色谱法^[12-15]对神经酸进行定量分析。由于衍生化气相色谱法通常将神经酸进行酯化后测定酯化物的含量,预处理过程烦琐,存在未完全反应的神经酸,会对检测结果有一定影响。本文建立了高效液相色谱法直接测定蒜头果油分离的神经酸含量,不需要进行衍生化,分析条件温和,操作简单便捷,定量结果准确。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

蒜头果油,由广西巴马县燕峒乡交乐村良丰屯的蒜头果通过压榨的方式制得;神经酸标准品(含量 $\geq 95\%$,东京化成工业株式会社);甲醇(含量99.9%,德国默克股份两合公司)、乙腈(含量99.9%,德国默克股份两合公司),均为色谱纯;水为超纯水;四氢呋喃(含量99.0%,上海试四赫维化有限公司)、醋酸(含量99.5%,广东光华科技股份有限公司),均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-20AUV 检测器(日本岛津公司),GC-2010Plus 气相色谱仪(日本岛津公司),FID 检测器(日本岛津公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 神经酸标准储备液的配制

精密称取 1.000 0 g 神经酸标准品,将其用甲醇在 50 mL 的容量瓶中定容,充分摇匀,即得 20.0 mg/mL 神经酸标准储备液。

1.2.2 神经酸样品的制备

称量由蒜头果油皂化酸化制得的混合脂肪酸 100.0 g,按 1:1 加入无水乙醇,加热使其充分溶解,冷却至常温后,将其置于 5℃ 冰箱中静置 5 h,取出抽滤,即得一次结晶的神经酸产品。用一次结晶产品重复上述步骤,即得二次结晶的神经酸产品。精密称取混合脂肪酸、一次结晶产品和二次结晶产品各 0.100 0 g,置于 25 mL 容量瓶中,并用甲醇定容,摇匀,用 0.45 μm 滤膜过滤,即得质量浓度为 4 mg/mL 的样品溶液。

1.2.3 高效液相色谱条件

Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.4% 乙酸水溶液-四氢呋喃(体积比为 80:12:5:3),柱温 26℃,检测波长 205 nm,流速 1.0 mL/min,进样量 5 μL 。

2 结果与讨论

2.1 神经酸标准曲线的绘制

准确量取 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 的神经酸标准储备液,分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得不同质量浓度的神经酸标准溶液,并进行高效液相色谱分析,以神经酸色谱峰面积(A)和相对应的神经酸质量浓度(c)进行线性回归分析。由最小二乘法计算得回归方程为 $A = 1.9840 \times 10^5 c - 3.6577 \times 10^4$,相关系数为 0.999 8,说明在 1.0 ~ 20.0 mg/mL 质量浓度范围内,神经酸的标准曲线线性良好。

2.2 精密度实验

取 6.0 mL 神经酸标准储备液,用甲醇定容至 10 mL,得到质量浓度为 12 mg/mL 的样品溶液,并采用高效液相色谱法进行 6 次平行测试,结果该样品中神经酸的质量浓度的测定值分别为 12.02、12.31、11.94、12.31、11.89、12.29 mg/mL,测得方法的相对标准偏差(RSD)为 1.52%,说明本方法精密度良好,符合分析要求。

2.3 稳定性实验

取 2.5 mL 神经酸标准储备液,用甲醇定容至 10 mL,得到质量浓度为 5 mg/mL 的样品溶液,并置于室温下,每隔一定时间采用高效液相色谱法进样测定,结果在 1、2、4、6、8 h 测定样品中神经酸的质量浓度为 5.18、5.14、5.07、4.96、5.10 mg/mL,测得方法的 RSD 为 1.61%,表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.4 加标回收实验

将样品平均分为 9 份,再平均分为 3 组,分别加入 1.0、2.0、3.0 mL 神经酸的标准储备液,用甲醇定容至 10 mL。按上述方法进行测定,分别测定加标样品和未加标样品中神经酸含量,根据其含量、加入量和测定量计算回收率,测定结果如表 1 所示。

表 1 样品中添加神经酸标准储备液的回收率及相对标准偏差($n=3$)

样品中神经酸含量/mg	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	RSD /%
30.07	20.00	50.74	103.33	3.22
	20.00	49.55	97.41	
	20.00	51.05	104.89	
30.07	40.00	70.90	102.07	0.72
	40.00	71.46	103.49	
	40.00	70.82	101.87	
30.07	60.00	89.27	98.66	0.72
	60.00	89.69	99.37	
	60.00	90.32	100.42	

由表 1 可知,添加神经酸标准储备液后所得样品的回收率在 97.41% ~ 104.89% 之间, *RSD* 在 0.72% ~ 3.22% 之间,说明该方法比较准确,可用于神经酸的定量分析。

2.5 样品神经酸含量的测定

按照 1.2.2 的制备方法,配制出不同质量浓度的样品溶液,按建立的 HPLC 法测定溶液中神经酸的含量,结果如图 1 和表 2 所示。

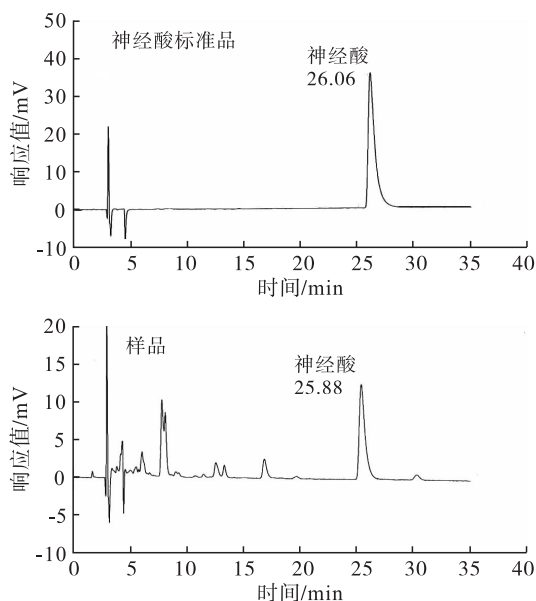


图 1 神经酸标准品和样品 HPLC 色谱图

由图 1 可以看出,样品神经酸组分与其他脂肪酸组分分离度良好,与神经酸标样的出峰时间基本一致。

表 2 神经酸产品中神经酸含量的测定结果 ($n=3$)

实验号	神经酸质量浓度/ (mg/mL)	神经酸含量/%	神经酸含量 平均值/%	<i>RSD</i> /%
1	1.65	41.35	40.30	2.36
	1.62	40.50		
	1.56	39.04		
2	2.74	68.45	70.07	1.42
	2.82	70.45		
	2.85	71.32		
3	3.26	81.60	81.50	0.90
	3.22	80.56		
	3.29	82.35		

由表 2 可知,3 份神经酸样品测得其 *RSD* 分别为 2.36%、1.42%、0.90%,其 *RSD* 在 0.90% ~ 2.36% 之间,说明该方法可用于蒜头果油分离神经酸过程所得神经酸产品含量的测定。

2.6 本方法与国标方法的比较

按照 GB 5009.168—2016 中的方法对神经酸标准品进行甲酯化后配成一系列标准溶液,然后进行气相色谱分析,结果在 1.00 ~ 10.00 mg/mL 范围

内,测得神经酸甲酯峰面积(A)与神经酸甲酯质量浓度(C)所得的回归方程为: $A=6.9159 \times 10^5 C + 5.7211 \times 10^4$,相关系数为 0.9993,精密度和稳定性的 *RSD* 分别为 0.75% 和 0.52%,加标回收率在 97.51% ~ 103.10% 之间,其 *RSD* 在 0.28% ~ 1.73% 之间。

随机取 3 份按 1.2.2 方法制备的神经酸产品,将其配成溶液,将每份神经酸样品溶液分别按本文所用的高效液相色谱法和气相色谱法(国标方法)进行分析,结果如表 3 所示。

表 3 高效液相色谱法与气相色谱法(国标方法)测定样品中神经酸含量的比较

实验号	样品中神经酸含量/%	
	高效液相色谱法	气相色谱法(国标方法)
1	50.15	48.12
2	62.09	60.54
3	76.05	75.69

注:表 3 中数据是 3 次测定的平均结果。

由表 3 可知,从蒜头果油分离得到不同纯度的神经酸利用高效液相色谱法测得的结果比气相色谱法(国标方法)的结果略高,用 t 检验对比两种方法的结果无显著性差异($P>0.05$)。

3 结论

建立了高效液相色谱法测定蒜头果油中的神经酸含量的方法。该方法操作简单快速,减少了检测样品前处理过程,而且稳定性和重复性良好,精密度高,回收率在可允许范围内,可用于测定蒜头果油神经酸和蒜头果油分离神经酸过程中各阶段神经酸产品的含量,监控神经酸产品的质量。

参考文献:

- [1] 王性炎,樊金栓,王姝清. 中国含神经酸植物开发利用研究[J]. 中国油脂, 2006, 31(3): 69-71.
- [2] 张茜,谭瑜,李雁群,等. GC-MS 测定蒜头果油中的脂肪酸含量[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(5): 15-17.
- [3] 曹建华,丁俊峰,林建超,等. 蒜头果油微波辅助提取及脂肪酸成分分析[J]. 中国油脂, 2008, 33(10): 17-20.
- [4] 王熙才,左曙光,邱宗海,等. 艾舍尔软胶囊增强小鼠免疫力的实验研究[J]. 昆明医学院学报, 2008(6): 71-75.
- [5] 候镜德,陈至善. 神经酸与脑健康[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006.
- [6] 王建民,胡晓凯,王建林,等. 生物活性物质神经酸钙的分离提取纯化生产工艺及其在治疗老年痴呆症中的应用:CN200910101699[P]. 2011-03-30.

(下转第 160 页)

由表 1 可看出,所设计的自动调隙榨油机和 D-1688 型榨油机的压榨效果基本相同,在满足使用设计要求的同时,完成压榨任务所需用时节约了 8 h,即两个换笼所用时间,时间节约了 29.68%。而且榨油原料越少,节约时间越明显,这对中小企业和家庭榨油作坊来说尤为重要。

6 结论

适用于多种榨油原料的自动调隙榨油机研制中首先提出了通过开发榨笼和榨螺分离机构和自动调隙机构实现了榨油机出油间隙的自动调整,解决了目前不同榨油原料需要拆装榨笼更换榨条来改变间隙的难题,使榨油机的操作更为简单,大大提高了生产效率,在我国偏远山区和家庭榨油作坊中有着广阔的使用前景。

参考文献:

[1] LI S L, LIU X F. Cold-pressed oil extraction of camellia seeds[C]// ICAE. 2011 International Conference on New Technology of Agricultural Engineering. NJ: IEEE Press, 2011:135-138.

[2] 魏鹏飞,相海,胡淑珍,等. 螺旋榨油机关键设计的探讨[J]. 农机化研究, 2013(11):92-94,98.

[3] 张学阁,伍毅,阮竞兰. 双螺杆榨油机榨螺与榨笼结构的研究进展[J]. 包装与食品机械, 2012, 30(3):47-49.

[4] 刘玉兰. 油脂浸出技术的发展[J]. 中国油脂, 2005, 30(1):23-26.

(上接第 146 页)

[7] TANKAKA K, SHIMIZU T, OHTSUKA Y, et al. Early dietary treatments with Lorenzo's oil and docosahexaenoic acid for neurological development in a case with Zellweger Syndrome[J]. Brain Dev, 2007,29(9): 586-589.

[8] SARGENT J R, COUPLAND K, WILLSON R. Nervonic acid and demyelinating disease[J]. Med Hypoth, 1994, 42(4): 237-242.

[9] 贺浪冲,高雯. 元宝枫油乳液对艾氏腹水癌小鼠的抗肿瘤作用[M]. 西安:陕西科学技术出版社, 1996:77-78.

[10] KASAI N, MIZUSHINA Y, SUGAWARA F, et al. Three-dimensional structural model analysis of the binding site of an inhibitor, nervonic acid, of both DNA polymerase beta and HIV-1 reverse transcriptase[J]. J Biochem, 2002,

[5] 赵国志,刘喜亮,刘智锋. 浸出制油技术开发动向[J]. 粮食与油脂, 2007(4):1-7.

[6] 徐永斌,邓攀博,季祥. 葡萄籽油制取工艺及产品的应用开发[J]. 园艺与种苗,2011(5):96-98.

[7] 程园园,刘大川,刘晔,等. 油菜籽、亚麻籽压榨特性的研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(11):12-15.

[8] DUFAURE C, LEYRIS J, RIGAL L, et al. A twin-screw extruder for oil extraction. I. Direct expression of oleic sunflower seeds[J]. J Am Oil Chem Soc, 1999, 76(9): 1073-1079.

[9] 李智勇. 双螺旋低温核桃仁榨油机研制成功[J]. 农业技术与装备, 2013(9):82.

[10] 刘大川,刘金波,刘晓琴,等. LYZX34 型适温/低温螺旋榨油机的研制[J]. 中国油脂, 2013, 38(4):75-78.

[11] 任小聪,陈戈,郑晓,等. 双螺杆榨油机膛内压力分布测试及研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(4):100-104.

[12] 佚名. SLZ-30 型双螺杆高含油油料榨油机[J]. 农业工程技术·农产品加工业,2015(10):48.

[13] 胡志刚,刘金波,张永林,等. SYZX340 型冷热两用双螺杆榨油机研制[J]. 中国油脂, 2017, 42(1):149-152.

[14] 李诗龙. 全压榨油机榨膛设计探讨[J]. 粮食与油脂, 2010(9):7-9.

[15] 解士聪,黄志辉,李昌珠,等. 1 种螺旋榨油机榨膛内表面温度预估方法[J]. 华南农业大学学报, 2014,35(6):104-107.

132(5): 819-828.

[11] 侯雯雯,刘四川,杨东元,等. 冷冻溶剂结晶法分离纯化混合脂肪酸中的亚油酸[J]. 中国油脂, 2011, 36(11): 54-56.

[12] 张元,侯相林. 元宝枫油中神经酸乙酯的分离提纯[J]. 中国油脂, 2010, 35(1): 28-31.

[13] 周永红,李伟光,易封萍,等. 气相色谱-质谱法测定蒜头果油中的脂肪酸[J]. 色谱, 2001, 19(2): 147-148.

[14] 熊德元,刘雄民,李伟光,等. 结晶法分离蒜头果油中神经酸溶剂选择研究[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2004, 29(1): 85-88.

[15] 周永红,刘雄民,王立升. 不同产地蒜头果中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2002, 27(4): 298-300.