

## 检测分析

## 芝麻素标准样品的研制

王岱杰, 闫慧娇, 崔 莉, 林云良, 耿岩玲, 王 晓

(齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心, 山东省中药质量控制技术重点实验室, 济南 250014)

**摘要:**依据 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则》, 研制芝麻素标准样品。以芝麻为原料, 采用高速逆流色谱法分离制备芝麻素单体, 通过 UV、IR、MS 和 NMR 等手段进行结构表征, 同时进行薄层色谱鉴别和热重分析。芝麻素样品进行了均匀性检验、稳定性检验和 8 家实验室联合定值。结果表明: 该样品均匀性良好, 在 0~4℃ 条件下储存 36 个月稳定性良好, 定值结果确定其标准值为 99.73%, 置信度 95% 的不确定度为 0.20。成功研制出了芝麻素国家标准样品, 达到了 GB/T 15000.3—2008 规定的技术要求, 样品具有溯源性, 可用于芝麻素及相关产品的质量控制和检测方法评定。

**关键词:**芝麻素; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

中图分类号: TS229; TQ646 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)09-0144-05

## Preparation of certified reference material of sesamin

WANG Daijie, YAN Huijiao, CUI Li, LIN Yunliang,  
GENG Yanling, WANG Xiao

(Key Laboratory of TCM Quality Control, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China)

**Abstract:** A certified reference material (CRM) of sesamin was developed according to the technical requirements of *CRM General and Statistical Principle for Certification* (GB/T 15000.3—2008). Sesamin monomer was prepared from sesame by means of high-speed counter-current chromatography, and its structure was confirmed by UV, IR, MS and NMR. Sesamin sample was analyzed by thin layer chromatography and thermo-gravimetric analysis. Also it was tested for homogeneity test, stability test, and cooperative certification by eight laboratories. The results indicated that the homogeneity of sesamin was excellent, with good stability within 36 months at 0–4℃. The certified value of the reference material of sesamin was 99.73% with the expanded uncertainty of 0.20 in confidence coefficient of 95%. The certified reference material of sesamin was successfully developed. It was conformed to the technical requirement of GB/T 15000.3—2008 and could be traceable. The CRM could be used in the content determination and testing method validation of sesamin related products.

**Key words:** sesamin; certified reference material; homogeneity; stability; certification; uncertainty

芝麻是我国重要的农作物之一, 在我国种植面

积约为 70 万  $\text{hm}^2$ , 居世界第四位, 年产量 60 万~65 万 t, 约占世界芝麻总产量的七分之一<sup>[1]</sup>。芝麻用途广泛, 既是消费者喜爱的食品, 同时作为传统药食同源的滋补品, 具有润五脏、补肝肾、增气力、消炎、止痛和生发等多种保健功效。芝麻素是芝麻中含量最高的一种木脂素类化合物, 含量为 0.1%~0.5%<sup>[2]</sup>, 具有抗炎<sup>[3]</sup>、保肝<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、降血压<sup>[6]</sup>、降低胆固醇<sup>[7-8]</sup>、促进血管生成<sup>[9-10]</sup>、保护神经元<sup>[11-12]</sup>、抗癌<sup>[13]</sup>、治疗白血病<sup>[14]</sup>等多种药理功效, 同时芝麻素在芸香科植物两面针、巴山花椒、刺五加和玄参科

收稿日期: 2017-11-21; 修回日期: 2018-04-24

基金项目: 山东省重大科技创新工程 (2017CXGC1209, 2017CXGC1308); 山东省重点研发计划 (2017GSF216002); 山东省泰山学者岗位专家支持项目; 山东省科学院先导项目

作者简介: 王岱杰 (1981), 男, 副研究员, 硕士生导师, 博士, 研究方向为天然产物化学及标准样品研究 (E-mail) wangdaijie@126.com。

通信作者: 王 晓, 研究员, 博士 (E-mail) wxjn1998@126.com。

毛泡桐等植物中含量也十分丰富,具有进一步深入开发的價值。

标准样品是具有一种或多种足够均匀的和很好确定了特性值的材料或物质,可以用来校准仪器、评价测量方法和给材料赋值<sup>[15]</sup>。随着天然产物资源国际化的发展,研制与 ISO 对接的标准样品的需求进一步迫切。目前,我国研发的天然产物标准样品种类和数量严重不足,影响相关产品的检测,也制约了相关行业的发展,为改善这一现状,我国天然产物标准样品的研究正在广泛开展<sup>[16]</sup>。目前市场上芝麻素样品主要以对照品为主,纯度参差不齐,未按照国家标准进行均匀性、稳定性和定值试验,最终结果没有不确定度评价,样品也不具有溯源性。因此,为了满足芝麻素及相关产品的检测需求,保证检测结果的准确性、可比性和溯源性,本文参照 ISO Guide 35 和 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则》,成功研制了芝麻素国家标准样品。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

GF254 薄层硅胶板(青岛海洋化工厂),甲醇(色谱纯,美国天地公司),重蒸水,其他试剂为分析纯,芝麻购于济南本地农贸市场。

R-3 型旋转蒸发器,瑞士 BUCHI 公司;SCI-ENTZ-10N 型冷冻干燥仪;E2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;KQ-500VDV 型超声波清洗器;TBE-300A 型制备型逆流色谱仪;3057 型记录仪;TBP-5002 型恒流泵;DC-0506 型恒温冷却循环浴;8823A 型紫外检测器;WRS-1B 型数字熔点仪;UV-2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;INOVA 600 MHz 核磁共振波谱仪,美国瓦里安公司;6520 Q-TOF 型液质联用仪,美国安捷伦公司;STA 449FC 型同步热分析仪,德国耐驰公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 样品制备

##### 1.2.1.1 芝麻素粗提物的提取

将 1.1 kg 芝麻粉碎,用 10 L 正己烷回流提取 3 次,每次 2 h,抽滤,滤液真空旋转蒸发成油状总提取物。上述总提取物加 500 mL 无水乙醇超声提取 3 次,每次 2 h,取上清液真空旋转蒸发,得芝麻素粗提物 10.3 g,所得样品经高速逆流色谱进行分离。

##### 1.2.1.2 高速逆流色谱分离

将石油醚、乙酸乙酯、甲醇和水体系以 1:0.4:1:0.5 的比例配制于 2 L 分液漏斗中,充分摇匀后静置分层,将上相和下相分开,超声波脱气,取上相为固定相,下相为流动相,备用。取芝麻粗提物溶解于

10 mL 上相和 10 mL 下相的混合液,摇匀,充分溶解。溶剂系统的固定相用恒流泵以 20.0 mL/min 的流速泵入高速逆流色谱仪,开启速度控制器 800 r/min,使逆流色谱仪分离柱按顺时针方向旋转,将流动相以 2.0 mL/min 的流速泵入,同时开启紫外检测器。待达到逆流色谱流体动力学平衡后开始进样,根据检测器的紫外吸收图接管收集样品,相似组分合并,减压浓缩,冷冻干燥,得芝麻素单体,芝麻素单体制备图见图 1。

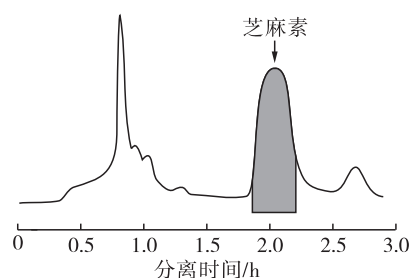


图 1 芝麻素单体的高速逆流色谱制备图

#### 1.2.2 HPLC 分析

Shim-pack C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(体积比 80:20);柱温 30℃;运行时间 25 min;流速 1.0 mL/min;检测波长 286 nm;样品质量浓度 0.2 mg/mL,甲醇溶解。

#### 1.2.3 薄层鉴别

精密称取样品 5 mg,加甲醇配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 对照品溶液。展开剂分别为石油醚-丙酮(体积比 4:1)和石油醚-乙酸乙酯(体积比 3:1),定量毛细点样管吸取 20、40、60、80、100 μg,梯度将样品点于 GF254 硅胶板。两种展开剂分别展开,取出,晾干,分别用荧光检测(254、365 nm)和显色剂检测(喷硫酸无水乙醇显色剂,105℃下加热 3 min)。

#### 1.2.4 LC-MS 纯度分析

LC 条件:Shim-pack C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(体积比 80:20);柱温 30℃;运行时间 25 min;流速 1.0 mL/min。

MS 条件:ESI 电喷雾离子源,扫描范围(*m/z*) 100~1 000,毛细管电压 4.0 kV,载气流速 10 L/min,普氮为载气,载气温度 300℃。

#### 1.2.5 热重分析

精密称取样品 5 mg,置于热重用坩埚中。热重条件:初温 30℃,终温 600℃,升温速率 10℃/min,气体 N<sub>2</sub>,流量 100 mL/min。

#### 1.2.6 结构表征

芝麻素单体的结构表征采用紫外光谱(UV)、

红外光谱(IR)、质谱(MS)和核磁共振(NMR)等技术。UV法的测试溶剂为甲醇,扫描范围为200~400 nm;IR法采用KBr压片,扫描波数为400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ;MS为电喷雾离子源,扫描范围( $m/z$ )为100~1 000,载气流速为10 L/min,普氮为载气,载气温度为300  $^{\circ}\text{C}$ ,毛细管电压为4.0 kV;NMR法氘代试剂为 $\text{CDCl}_3$ 。

### 1.2.7 均匀性检验

依据GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则》(均匀性研究)要求,采用顺序重复随机测量,随机抽取分装好的芝麻素样品10瓶( $>1.5\sqrt[3]{N}$ ),3种抽样程序(第一种1-3-5-7-9-2-4-6-8-10;第二种10-9-8-7-6-5-4-3-2-1;第三种2-4-6-8-10-1-3-5-7-9),样品按1.2.2方法进行分析,样品纯度读取采用峰面积归一化法,采用方差分析法进行数据分析。

### 1.2.8 稳定性检验

芝麻素样品储存温度为0~4  $^{\circ}\text{C}$ ,考察样品的3年稳定期,分5个时间段考察监测,按1.2.2方法进行分析,样品纯度读取采用峰面积归一化法,每份样品测定5次,统计分析采用 $t$ 检验法<sup>[17]</sup>。

### 1.2.9 定值

根据工作导则,标准样品的定值采用8家实验室协作进行的方法。随机抽取样品24瓶,每家定值实验室寄出样品3瓶,每瓶测定2次,每家协作实验室出6个检测结果,按1.2.2方法进行分析,样品纯度以峰面积归一化法读取。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纯度分析

采用HPLC的DAD检测器对色谱峰进行3D总吸收图扫描(见图2),检测结果扣除溶剂峰,HPLC纯度分析结果表明,未见明显杂质峰存在。荧光检测和硫酸无水乙醇显色剂显色结果表明,样品呈现黑色和深棕色斑点, $R_f$ 值分别为0.65和0.63,未见明显杂质斑点存在。

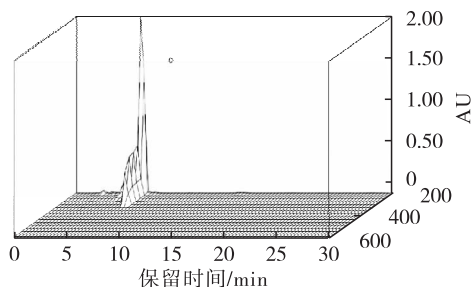


图2 芝麻素 HPLC 3D 扫描图

LC-MS结果表明(见图3),提取MS的总离

子流图,未见明显的杂质峰存在。热重结果表明,在24.7~184.0  $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内,TG曲线是一条水平线,表明测试样品中吸附水和结晶水含量很低,热稳定性好。当温度超过184.0  $^{\circ}\text{C}$ 时,样品开始分解,DTA曲线显示温度升高到295.2  $^{\circ}\text{C}$ ,样品迅速分解。

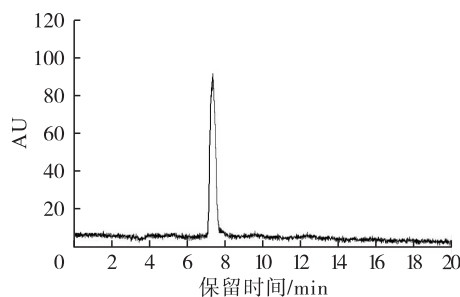


图3 芝麻素样品的 LC-MS 总离子流图

### 2.2 结构表征

熔点: 122 ~ 123  $^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ : 235、286 nm;  $\text{IR}\nu_{\text{max}}^{\text{cm}^{-1}}$ : 2 969, 2 850( $\nu_{\text{CH}}$ ), 1 500( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ), 1 443, 1 365( $\nu_{\text{CH}}$ ), 1 249, 1 035( $\nu_{\text{CO}}$ ); ESI-MS( $m/z$ ) 377.0 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^{+}$ , 709.0 [ $2\text{M} + \text{H}$ ] $^{+}$ , 731.0 [ $2\text{M} + \text{Na}$ ] $^{+}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.81 (6H, overlapped, H-2, 5, 6, 2', 5', 6'), 5.92 (4H, s, O-CH<sub>2</sub>-O), 4.70 (2H, br s, H-7, 7'), 4.21 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.85 (2H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-9b, 9'b), 3.03 (2H, m, H-8, 8').  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148.0 (C-4, 4'), 147.1 (C-3, 3'), 135.1 (C-1, 1'), 119.4 (C-6, 6'), 108.2 (C-5, 5'), 106.5 (C-2, 2'), 101.1 (O-CH<sub>2</sub>-O  $\times 2$ ), 85.8 (C-7, 7'), 71.7 (C-9, 9'), 54.4 (C-8, 8'). 以上数据与文献[18]比较基本一致,确定为芝麻素。

### 2.3 均匀性检验

将结果进行 $F$ 检验,进行数据统计,确定芝麻素样品的均匀性,结果分别见表1和表2。

表1 均匀性检验 %

瓶号	第1组	第2组	第3组	平均值	总平均值
1	99.77	99.79	99.78	99.78	99.76
2	99.71	99.72	99.72	99.72	
3	99.77	99.77	99.78	99.77	
4	99.76	99.78	99.79	99.78	
5	99.77	99.78	99.73	99.76	
6	99.71	99.73	99.78	99.74	
7	99.78	99.76	99.78	99.77	
8	99.79	99.78	99.73	99.77	
9	99.78	99.72	99.78	99.76	
10	99.78	99.71	99.78	99.75	

表2 方差分析

变差源	方差	自由度	均方差(MS)
组间	0.010 200	9	0.001 133
组内	0.012 400	20	0.000 620
总和	0.022 600	29	

组间方差的计算公式:

$$s_A^2 = \frac{MS_{\text{组间}} - MS_{\text{组内}}}{n_0} = 1.71 \times 10^{-4}$$

则组间标准偏差为:

$$s_{\text{bb}} = \sqrt{s_A^2} = 0.02$$

$$u_{\text{均}} = s_{\text{bb}} = 0.02$$

F值的计算公式:

$$F = MS_{\text{组间}} / MS_{\text{组内}} = 1.83$$

以组间自由度  $v_1 = 9$  及组内自由度  $v_2 = 20$  为变量查询 F 界值表,可知临界值  $F_{0.05}(9, 20) = 2.94$ ,由于  $F < F_{0.05}(9, 20)$ ,因此所研制的芝麻素标准样品具有良好的均匀性。

#### 2.4 稳定性检验

采用 t 检验法对稳定性检测结果统计分析,采用直线模型,观察直线斜率值变化趋势,同时进行预测,结果见表3。

表3 稳定性检验

时间 (月)	纯度/%						标准偏 差/%
	1	2	3	4	5	平均值	
0	99.78	99.84	99.82	99.80	99.79	99.81	0.03
6	99.78	99.72	99.74	99.77	99.73	99.75	0.03
12	99.77	99.78	99.79	99.78	99.80	99.77	0.02
18	99.79	99.75	99.73	99.74	99.75	99.75	0.03
24	99.78	99.72	99.75	99.73	99.71	99.74	0.03
36	99.72	99.75	99.73	99.72	99.70	99.72	0.02

斜率计算公式如下:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{-0.96}{840} = -0.001 1$$

式中:  $\bar{Y} = 99.76$ ;  $\bar{X} = 16$

截距计算公式如下:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} = 99.76 + (0.001 1 \times 16) = 99.78$$

直线模型的标准偏差:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} = \frac{0.002}{4} = 0.000 5$$

则  $s = 0.03$

斜率相关不确定度计算公式如下:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = \frac{0.03}{\sqrt{840}} = 0.002$$

查表得自由度为  $n - 2$  和 95% 置信水平 ( $p = 0.95$ ) 分布的 t 因子为 3.182。

由于斜率变化的绝对值  $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1) = 3.182 \times 0.002 = 0.006 4$

即:  $|b_1| < 0.006 4$

因此,斜率变化不显著,即芝麻素标准样品在3年内稳定性良好。

稳定性的不确定度为:

$$u_{\text{稳}} = S(b_1) \times t = 0.002 \times 36 = 0.08$$

#### 2.5 定值

根据各个协作实验室的反馈结果,进行数据的统计分析,并最终确定芝麻素标准样品的标准值和不确定度,统计结果如表4所示。

表4 协作定值

实验室序号	测得平均值	标准偏差	总平均值
1	99.78	0.01	99.73
2	99.83	0.05	
3	99.67	0.04	
4	99.77	0.03	
5	99.59	0.06	
6	99.75	0.03	
7	99.72	0.03	
8	99.75	0.03	

测定结果总平均值的计算公式如下:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}}{N} = 99.73\%$$

实验室平均值的标准偏差为:

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} = 0.08$$

总平均值标准偏差为:

$$S_{\bar{X}} = \frac{S_{\bar{X}}}{\sqrt{n}} = 0.04$$

多家定值引入的不确定度

$$u_{\text{定}} = S_{\bar{X}} = 0.04$$

芝麻素标准样品的不确定度由如下3部分组成:①均匀性检验不确定度;②稳定性检验不确定度;③定值不确定度。这3部分不确定度分量互不相关,需将3种不确定度合成,即合成不确定度 ( $U_{\text{合成}}$ ) 为:

$$U_{\text{合成}}^2 = u_{\text{均}}^2 + u_{\text{稳}}^2 + u_{\text{定}}^2$$

代入数据计算得  $U_{\text{合成}} = 0.10$

置信区间 95% 时,  $k = 2$

则芝麻素标准样品的扩展不确定度:

$$U_{\text{扩展}} = 2U_{\text{合成}} = 0.10 \times 2 = 0.20$$

### 3 结论

本研究针对芝麻素及相关产品缺乏国家标准样品的现状,严格按照国标规定的标准样品研制规则,成功地研制出芝麻素标准样品,并顺利通过了专家验收。研制过程中对标准样品的均匀性进行考察,并进行方差分析;稳定性检验采用直线模型,并进行了  $t$  检验法考察;定值采用多家实验室协作,对定值结果进行统计分析。根据 3 个方面引入的不确定度,进行了不确定度的合成和扩展,获得了标准值为 99.73%,置信度 95% 的不确定度为 0.20 的芝麻素国家标准样品,具有样品溯源性,可用于相关产品的检测方法评定和含量测定,填补了芝麻素标准样品的国内外空白。

### 参考文献:

- [1] 王瑞元. 我国芝麻产业的发展[J]. 中国油脂, 2016, 41(2): 1-2.
- [2] 梅鸿献, 魏安池, 刘艳阳, 等. 芝麻种质资源芝麻素、蛋白质、脂肪含量变异及其相关分析[J]. 中国油脂, 2013, 38(4): 87-90.
- [3] BOURNIVAL J, PLOUFFE M, RENAUD J, et al. Quercetin and sesamin protect dopaminergic cells from MPP<sup>+</sup> - induced neuroinflammation in a microglial (N9) - neuronal (PC12) coculture system [J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 92: 1941-1952.
- [4] CHANG C, CHEN Y, YANG S, et al. Effect of schisan-drin B and sesamin mixture on CCl<sub>4</sub> - induced hepatic oxidative stress in rats [J]. Phytother Res, 2009, 23: 251-256.
- [5] SUJA K P, JAYALEKSHMY A, ARUMUGHAN C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH system [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(4): 912-915.
- [6] WU X, KONG X, ZHOU Y, et al. Sesamin exerts reno-protective effects by enhancing NO bioactivity in renovascular hypertensive rats fed with high - fat - sucrose diet [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 683: 231-237.
- [7] ROGI T, TOMIMORI N, ONO Y, et al. The mechanism underlying the synergetic hypocholesterolemic effect of sesamin and  $\alpha$  - tocopherol in rats fed a high - cholesterol diet [J]. J Pharmacol Sci, 2011, 115(3): 408-416.
- [8] VISAVADIYA N P, NARASIMHACHARYA A V R L. Sesame as a hypocholesterolemic and antioxidant dietary component [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(6): 1889-1895.
- [9] CHUNG B, LEE J J, KIM J, et al. Angiogenic activity of sesamin through the activation of multiple signal pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 254-260.
- [10] BALUCHNEJADMOJARAD T, ROGHANI M, NADOUSHAN M J, et al. The sesame lignan sesamin attenuates vascular dysfunction in streptozotocin diabetic rats: involvement of nitric oxide and oxidative stress [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 698(1/3/5): 316-321.
- [11] LIU C, ZHENG G, MING Q, et al. Sesamin protects mouse liver against nickel - induced oxidative DNA damage and apoptosis by the PI3K - Akt pathway [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 1146-1154.
- [12] HSIEH P F, HOU C, YAO P, et al. Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid - induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX - 2 activation [J]. J Neuroinflamm, 2011, 8: 57-66.
- [13] LEE C, LIU K, WU Y, et al. Sesamin inhibits macrophage - induced vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase - 9 expression and proangiogenic activity in breast cancer cells [J]. Inflammation, 2011, 34(3): 209-221.
- [14] MIYAHARA Y, KOMIYA T, KATSUZAKI H, et al. Sesamin and episesamin induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells [J]. Int J Mol Med, 2000, 6: 43-49.
- [15] 中国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 标准样品工作导则(2) 标准样品常用术语及定义: GB/T 15000.2-1994 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
- [16] 杜宁, 周晓晶, 张婉, 等. 我国天然产物标准样品研制工作组组织管理[J]. 现代科学仪器, 2010, 6(3): 140-142.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 数值修约与极限数值的表示和判定: GB/T 8170-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [18] 葛利, 蓝柳凤, 暴惠宾, 等. 山蓝化学成分初步研究[J]. 广西植物, 2014, 34(2): 155-159.