

核磁共振波谱法测定臭氧化橄榄油中的活性成分含量

马筱娴¹, 严贝贝², 杨雅雯², 罗紫藤², WAQAS Ahsan², 李侃社², 陈福欣²

(1. 西安科技大学高新学院, 西安 710109; 2. 西安科技大学 化学与化工学院, 西安 710054)

摘要:以橄榄油为原料, 经臭氧化制备臭氧化橄榄油。利用核磁共振(NMR)采集碳谱数据, 积分碳谱特征峰, 计算橄榄油被氧化成分的相对含量。结果表明:臭氧化橄榄油与橄榄油碳谱有明显的区别, 臭氧化橄榄油在 δ 103.1 处出现新峰, 对应 δ 130.1 处的峰高减弱, 这是由于橄榄油中的不饱和双键被氧化。采用该方法测得 5 个臭氧化油中活性成分含量分别为 21.46%、21.03%、21.31%、18.71% 和 24.42%。采用核磁共振波谱法测定臭氧化橄榄油的活性成分含量具有操作简单, 不需要预处理, 结果可靠的优点。

关键词:橄榄油; 臭氧化橄榄油; 臭氧化反应; 核磁共振波谱

中图分类号:TS225;TS227 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)03-0128-03

Determination of active components content in ozonized olive oil by NMR

MA Xiaoxian¹, YAN Beibei², YANG Yawen², LUO Ziteng²,
WAQAS Ahsan², LI Kanshe², CHEN Fuxin²

(1. Xi'an Kedagaoxin University, Xi'an 710109, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, China)

Abstract: The ozonized products were prepared from olive oil by ozonation reaction. The data of carbon spectrum was collected by NMR, and the characteristic peaks of ¹³C NMR were integrated to calculate the relative content of oxidized components in olive oil. The results showed that the carbon spectrum of olive oil had significant differences from the ozonized olive oil. The new peak appeared at δ 103.1, corresponding to the weakening of the peak height at δ 130.1, which was due to the oxidation of unsaturated double bonds in olive oil. The active component contents in five ozonized oils determined by the method were 21.46%, 21.03%, 21.31%, 18.71% and 24.42%, respectively. The method of determining the active component content in ozonized olive oil by NMR had the advantages of simple operation, no pretreatment and reliable results.

Key words: olive oil; ozonized olive oil; ozonation reaction; NMR

橄榄油富含大量的不饱和和脂肪酸, 不仅营养丰

富, 而且作为医药用原料用途广泛^[1], 其中橄榄油经臭氧化的产物(臭氧化油)具有良好的抗菌活性, 保质期长, 使用方便^[2]。液态臭氧化油作为臭氧的一种储存形态可以缓慢释放臭氧及其他活性物质, 这些物质对微生物具有显著的广谱抗菌作用^[3], 可用于治疗猕猴桃溃疡病、苹果树腐烂病、草莓叶片白粉病等^[4-6]。然而, 臭氧化油作为一种成分复杂的混合物, 长期以来其活性成分的鉴定是难题, 目前市场上缺少一种快捷可靠的臭氧化油品质检测方法。

长期以来, 核磁共振技术(NMR)主要作为化合物结构测定的工具, 但随着 NMR 的发展和成熟,

收稿日期:2019-11-25;修回日期:2020-11-05

基金项目:国家自然科学基金(31760016);陕西省重大科技创新项目(2019GY-138, 2020GY-236);农药与化学生物学教育部重点实验室开放基金(2016A02);农业部农产品加工重点实验室开放基金(201705)

作者简介:马筱娴(1991),女,助理讲师,研究方向为有机化学(E-mail)palpitation2013@sina.cn;严贝贝(1995),女,在读硕士,研究方向为有机化学(E-mail)809826514@qq.com。马筱娴和严贝贝共同为第一作者。

通信作者:陈福欣,副教授,博士(E-mail)chenfuxin1981@163.com。

准确度、灵敏度不断提高,其在产品鉴定、含量测定方面快速发展。肖新生等^[7]采用核磁共振氢谱法分析食用油氧化产物,为鉴别不同氧化程度的食用油提供了新思路。杨扬等^[8]利用不同类型油类核磁共振谱图峰形与特征峰的差别快速判断地沟油。De Andrade等^[9]发现臭氧化的三油酸甘油酯核磁共振谱、氢谱图发生了变化,并对结构变化提出了猜想。核磁共振技术凭借操作简单方便、分析时间短等特点及其无需被测物质标准品的优势,成为分析没有标准品的复杂混合物的有效方法。

本实验以橄榄油作为参考标准对臭氧化油活性成分进行了测定,利用高场核磁共振仪采集样品的碳谱数据,分析样品特征峰,通过积分计算臭氧化油活性成分的含量。考察了实验条件对结果的影响,对所建立的方法进行了验证,为臭氧化油活性成分含量测定提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

橄榄油(购于本地超市);1号臭氧化油(西安金品正德生物科技有限公司);2号臭氧化油(陕西康乐);3号臭氧化油(中素生物科技有限公司);4号臭氧化油(陕西海林正德生物医药有限责任公司);5号臭氧化油(西安浩然药业有限公司);氘代氯仿(CDCl_3)、三氯乙烯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

Bruker BioSpin 400 MHz NMR spectrometer(德国 Bruker 公司),采用 BBO 探头及 Topspin 3.5 操作软件(德国 Bruker 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 臭氧化橄榄油的制备

将 50 mL 橄榄油放入 100 mL 圆底烧瓶中,打开臭氧发生器通入臭氧(流量 3 g/h)并加入磁子搅拌,室温反应 1.5 h 后,取样 0.5 mL 备用。

1.2.2 核磁共振测定臭氧化油活性成分含量

1.2.2.1 样品溶液的配制

精密称取 42.6 mg 三氯乙烯及 89.15 mg 橄榄油或臭氧化油,加入 400 μL CDCl_3 ,溶解、混匀,移取 0.5 mL 样品溶液至 5 mm 核磁管中。

1.2.2.2 NMR 条件

采用 ^{13}C 的共振频率, zpgp30° 脉冲角度,定义弛豫时间为 5 s,扫描次数为 1 024 次,探头温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,谱峰宽度小于等于 219。分别对配制好的样品溶液进行核磁碳谱测定。设置参数后测 ^{13}C NMR 谱图。吸收峰准确定标,调整峰相位,使峰形左右对称,并调整基线。

1.2.2.3 活性成分含量计算

按下式计算臭氧化油活性成分含量。

$$m_c = \frac{A_c}{A_c + A_r} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_c 为臭氧化油活性成分含量; A_c 为臭氧化油活性成分定量峰的积分面积; A_r 为橄榄油定量峰的积分面积。

2 结果与讨论

2.1 内标和臭氧化油活性成分定量峰的选择

橄榄油、添加内标三氯乙烯的橄榄油和添加内标三氯乙烯的臭氧化橄榄油的 ^{13}C NMR 谱图分别见图 1~图 3。

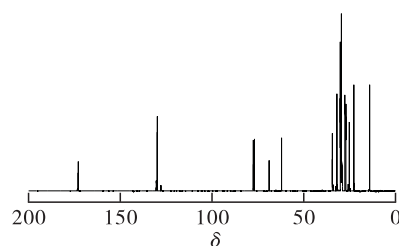


图1 橄榄油的 ^{13}C NMR 谱图

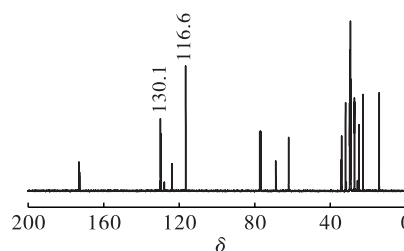


图2 添加内标三氯乙烯的橄榄油的 ^{13}C NMR 谱图

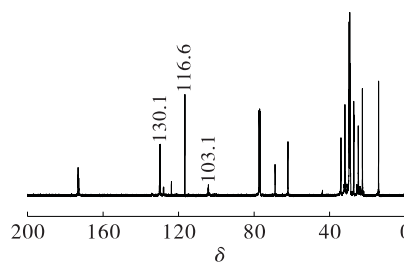


图3 添加内标三氯乙烯的臭氧化橄榄油的 ^{13}C NMR 谱图

内标物质应该具有较高的纯度,不与样品和溶剂发生化学反应,能较好地溶于氘代溶剂,此外其信号峰与橄榄油及臭氧化油的信号峰可完全分离、互不干扰,且基线平整,专属性较高,以便对定量信号和内标信号准确积分^[10]。本实验选择三氯乙烯作为内标物质。三氯乙烯在 CDCl_3 中溶解良好,选其在 δ 116.6 的响应信号作为内标(见图 2)。在橄榄油转化为臭氧化油的过程中,橄榄油内含不饱和双键的化合物被氧化形成过氧化合物。随着臭氧的通入, δ 130.1 的响应信号逐渐减弱,这是由于该信号所对应的位置为橄榄油中不饱和双键上的碳,而其

发生了转化,所以选择橄榄油样品在 δ 130.1 的响应信号作为橄榄油的定量峰。与此同时, δ 103.1 处出现新峰,对应为过氧化物碳氧环上的峰,故选择臭氧化橄榄油样品在 δ 103.1 的响应信号作为臭氧化油活性成分定量峰。

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线回归方程、检出限和定量限

移取用内标溶液配制的质量浓度分别为 20、40、60、80、120、160 mg/mL 的臭氧化橄榄油系列溶液 0.5 mL 至核磁管中,按 1.2.2.2 条件测定获取 ^{13}C NMR 谱图。各质量浓度的 ^{13}C NMR 谱图经相位校正后,以内标峰峰面积与臭氧化橄榄油定量峰峰面积之比(x)为横坐标,两者摩尔比(y)为纵坐标进行线性回归,得到标准曲线回归方程为 $y = 7.5776x - 0.0971$, $R^2 = 0.9926$ 。说明在 20 ~ 160 mg/mL 范围内,臭氧化橄榄油质量浓度与其定量峰峰面积呈线性关系。

取臭氧化橄榄油溶液,逐步进行稀释。以信噪比为 10 时对应的质量浓度作为定量限,以信噪比为 3 时对应的质量浓度作为检出限。结果表明,采用 ^{13}C NMR 测定臭氧化橄榄油活性成分含量时,定量限为 7.17 mg/mL,检出限为 2.13 mg/mL。

2.2.2 精密度

取臭氧化油(1号)样品 1 份,按照 1.2.2 方法连续测定 5 次,自动积分,对峰进行分析,其化学位移(δ)和相对峰面积的相对标准偏差分别在 0% ~ 0.08% 和 0.25% ~ 0.98% 之间,说明该方法精密度良好。

2.2.3 重现性

取臭氧化油(1号)样品 5 份,按照 1.2.2 方法测定,自动积分,对峰进行分析,其化学位移和相对峰面积的相对标准偏差分别在 0% ~ 0.13% 和 0.22% ~ 1.22% 之间,说明该方法重现性良好。

2.2.4 稳定性

取臭氧化油(1号)样品 1 份,分别在室温放置 0、2、8、16、24、48 h,按 1.2.2 方法测定,自动积分,对峰进行分析,其化学位移和相对峰面积的相对标准偏差均小于 1.5%,说明该方法在 48 h 内测定是稳定的。

2.3 样品测定

分别精密称取市购臭氧化油(1号~5号),配制样品溶液,在 1.2.2.2 条件下分别进样测定。结果表明,5 个臭氧化油样品活性成分含量分别为 21.46% (1号)、21.03% (2号)、21.31% (3号)、18.71% (4号)和 24.42% (5号)。

3 结论

本文以橄榄油制备的臭氧化油为研究对象,利用核磁共振技术,以 δ 103.1 处的峰作为臭氧化油活性成分的特征信号峰,以 δ 130.1 处的峰作为橄榄油信号峰,计算臭氧化油活性成分含量。该方法在臭氧化橄榄油质量浓度为 20 ~ 160 mg/mL 范围内线性关系良好,相关系数为 0.9926,精密度、重现性和稳定性均良好,符合方法学的验证。

参考文献:

- [1] 吴学君,汤婷. 世界橄榄油的生产及贸易动向分析[J]. 中国油脂,2015,40(12):1-6.
- [2] 艾买提江·萨伍提,吾满江·艾力,司马义·努尔拉. 臭氧化蓖麻油制备甘油三酸酯多元酸的研究[J]. 中国油脂,2009,34(7):42-46.
- [3] ALMEIDA N R, BEATRIZ A, MICHELETTI A C, et al. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review [J]. *Electr J Chem*, 2013, 4(4): 313-326.
- [4] 马瑜,柯杨,李勃,等. 利用臭氧化油防治猕猴桃溃疡病新技术[J]. 果农之友,2013(8):22.
- [5] 柯杨,李勃,马瑜,等. 臭氧化植物油防治苹果腐烂病的研究简报[J]. 陕西农业科学,2012,58(3):68-69.
- [6] 李宝庆,李士超,鹿秀云. 有机草莓白粉病防治技术研究[J]. 现代农业科技,2017(17):115,123.
- [7] 肖新生,杨交如,唐满生,等. 核磁共振技术在食用油脂分析中的应用研究进展[J]. 中国油脂,2018,43(12):134-139.
- [8] 杨扬,殷乐,尹芳华,等. 几种食用油的核磁共振光谱特征与地沟油的快速检测[J]. 中国油脂,2015,40(7):45-50.
- [9] DE ANDRADE B, GAVÍN J, JOSÉ A N, et al. Structural characterization by nuclear magnetic resonance of ozonized triolein[J]. *Grasas Aceites*, 2008, 59(3): 274-281.
- [10] GOTTSTEIN V, MÜLLER M, GÜNTHER J, et al. Direct ^1H NMR quantitation of valuable furan fatty acids in fish oils and fish oil fractions[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(42): 11788-11795.