

## HPLC 测定中药鸦胆子油中油酸和亚油酸

张悦, 张溪桐, 张彤, 闫玉娇, 王冰\*  
(上海中医药大学, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:建立高效液相测定中药鸦胆子油中油酸和亚油酸 2 个不饱和脂肪酸成分含量的方法。方法:采用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(88:12), 检测波长 203 nm, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C。结果:油酸和亚油酸分别在 19.219 ~ 615.00, 3.375 ~ 108.0 mg·L<sup>-1</sup> 与色谱峰面积呈良好线性关系, 加样回收率在 81.29% ~ 108.44%, RSD 在 1.3% ~ 2.9%; 鸦胆子油中的油酸和亚油酸质量分数分别为 68.10% 和 12.49%。结论:本法无需柱前衍生化处理, 具有简单准确, 快速高效的特点, 为中药鸦胆子油及其制剂的质量控制提供了参考。

**[关键词]** 鸦胆子油; 高效液相色谱法; 油酸; 亚油酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0051-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070051

**Determination of Oleic Acid and Linoleic Acid in Bruceae Fructus Oil by HPLC-UV** ZHANG Yue, ZHANG Xi-tong, ZHANG Tong, YAN Yu-jiao, WANG Bing\* (Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** A high-performance liquid chromatography-UV method was developed to determine the contents of oleic acid and linoleic acid in Bruceae Fructus oil. **Method:** A chromatographic process was set up by using column Ultimate XB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). A mobile phase of 88% acetonitrile-12% phosphoric acid solution (0.1%) was used with flow rate at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature at 30 °C, and determine wavelength at 203 nm. **Result:** The calibration curve of oleic acid was linear between 19.219-615.00 mg·L<sup>-1</sup>, and linoleic acid was linear between 3.375-108.0 mg·L<sup>-1</sup>, with the average recovery 81.29% - 108.44% and RSD of 1.3% - 2.9%. The contents of oleic acid and linoleic acid in Bruceae Fructus oil were 68.10% and 12.49%. **Conclusion:** This new analytical method do not need the operation of pre-column derivatization, and with the advantage of simple, accurate and repeatable, which could be a critical reference for quality control of Bruceae Fructus oil pharmaceutical manufacture.

**[Key words]** Bruceae Fructus oil; HPLC; oleic acid; linoleic acid

鸦胆子清热解毒、截疟、止痢、外用腐蚀赘疣,用于痢疾、疟疾、外治赘疣、鸡眼。性味苦寒,有小毒<sup>[1]</sup>;始载于《本草纲目拾遗》<sup>[2]</sup>。鸦胆子油为鸦胆子果实中提取到的脂肪油,具有治疗多种中晚期恶性肿瘤、胃溃疡、尖锐湿疣、恶性胸腔积液及降低颅内压等作用。实验证明鸦胆子油为细胞周期非特异性抗癌药,对肿瘤细胞 G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M 期有杀伤和抑制作用,能明显抑制肿瘤细胞 DNA, RNA 及蛋白质的合成,干扰肽键的形成。脂肪油中脂肪酸组成为油酸 81.87%, 亚油酸 3.37%, 硬脂酸 2.65%, 棕

榈酸 6.62%, 还有熔点为 152 °C 的绢丝状结晶体 4.59%, 有软脂酸、共轭亚油酸、十七烷酸及花生酸<sup>[3]</sup>、豆蔻酸、二十碳烯酸、山嵛酸<sup>[4]</sup>。2010 年版《中国药典》采用气相色谱法,样品经甲酯化后仅测定了油酸含量,操作较为复杂,检测费时较长,影响因素多,容易反应不完全,且在分析过程中柱温很高(180 °C),易使油酸、亚油酸的双键断裂或产生双键的异构化现象,方法中也未控制抗肿瘤活性较好的亚油酸含量。目前,国内外对鸦胆子油含量测定的报道多集中在 GC 法<sup>[5-6]</sup>,也有柱前衍生化 HPLC 测

**[收稿日期]** 20140401(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81303233);上海市卫生局项目(20124074);上海市卫生局青年科研项目(20124Y002)

**[第一作者]** 张悦,在读博士,从事药物新剂型与新技术研究, Tel:021-51322685, E-mail:zy0217@163.com

**[通讯作者]** \*王冰,博士,副教授,从事中药纳米新型给药系统研究, Tel:021-51323068, E-mail:annabel\_cn@163.com

定的报道<sup>[7-8]</sup>,但上述几种方法都需要繁复的前处理。也有文献采用 HPLC-UV 分析不饱和脂肪酸<sup>[9-11]</sup>,但分析鸦胆子油中的不饱和脂肪酸的文献很少。本文建立同时测定鸦胆子油中油酸和亚油酸含量,且无需甲酯化或柱前衍生化的 HPLC 方法,为鸦胆子油或制剂的质量控制提供了参考依据。

### 1 仪器和试剂

1100 系列高效液相色谱仪 (Agilent 公司), XS105DU 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司)。

亚油酸 (批号 BCBH9833V), 油酸 (批号 BCBJ2002V) 对照品购自 Sigma 公司; 鸦胆子油 (批号 120919004, 购自江西吉水大兴天然香料油厂); 乙腈为色谱纯, 购自 Merck 公司, 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

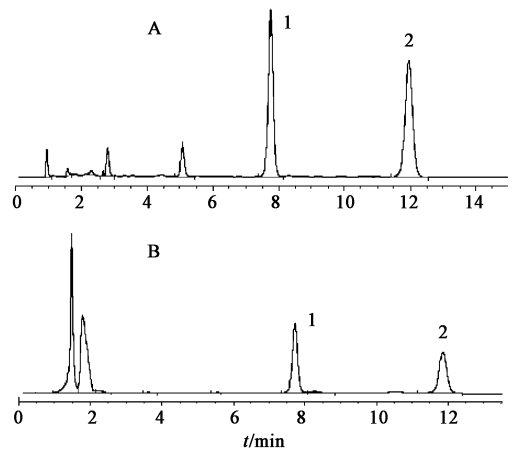
### 2 方法和结果

**2.1 对照品溶液的制备** 称取油酸、亚油酸对照品适量, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入 0.1% 磷酸乙腈溶液溶解并定容, 摇匀, 制成含有油酸、亚油酸 1.230, 0.216 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 12.5 mL, 以 0.1% 磷酸乙腈溶液稀释并定容于 25 mL 量瓶中, 即得含油酸和亚油酸 0.615, 0.108 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备溶液, 备用。

**2.2 供试品溶液的制备** 称取鸦胆子油约 100 mg, 精密称定, 置于 250 mL 圆底烧瓶内, 加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钾乙醇溶液 20 mL, 称重, 加热回流提取 30 min, 放至室温后再次称重, 补足失重, 加入酚酞试液 50 μL, 用 1 mol·L<sup>-1</sup> 的盐酸溶液滴定至红色刚好褪去, 溶液转移至 100 mL 量瓶中, 用乙醇洗涤圆底烧瓶, 洗涤液并入量瓶中, 加乙醇定容, 精密量取 1 mL 置 5 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样测定。

**2.3 色谱条件** 采用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (88:12), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 进样量 20 μL。对照品及样品色谱见图 1。

**2.4 线性关系的考察** 精密吸取混合对照品储备液, 加入 0.1% 磷酸乙腈溶液稀释为含油酸 307.50, 153.7, 76.875, 38.438, 19.219 mg·L<sup>-1</sup>, 含亚油酸 54.00, 27.00, 13.50, 6.750, 3.375 mg·L<sup>-1</sup> 混合对照品溶液。将上述系列混合对照品溶液, 分别注入高效液相色谱仪, 测定。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 得回归方程  $Y_{\text{油酸}} = 6.876 3X + 59.629$  ( $r = 0.999 8$ ),  $Y_{\text{亚油酸}} = 44.265 X + 35.036$  ( $r = 0.999 9$ ), 结果表明, 油酸和亚油酸分别在



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 油酸; 2. 亚油酸

图 1 鸦胆子油 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Bruceae Fructus oil

19.219 ~ 615.00, 3.375 ~ 108.0 mg·L<sup>-1</sup> 与色谱峰面积呈良好线性关系。

**2.5 精密度试验** 取低、中、高 3 个质量浓度的油酸 (615.00, 153.75, 19.219 mg·L<sup>-1</sup>) 和亚油酸 (108.0, 27.00, 3.375 mg·L<sup>-1</sup>) 混合对照品溶液, 测定日内精密度和日间精密度。日内精密度结果, 油酸和亚油酸峰面积的 RSD 分别为 0.03%, 0.1%, 1.3% 及 0.08%, 0.1%, 1.0%; 日间精密度结果, 油酸和亚油酸峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.2%, 1.8% 及 1.1%, 1.1%, 1.5%。表明仪器的精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取 6 份鸦胆子油样品, 每份约 100 mg, 精密称定, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 在前述色谱条件下进样测定, 油酸和亚油酸含量的 RSD 分别为 0.7%, 0.5%。表明方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 在室温下放置, 于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定油酸和亚油酸的峰面积, 峰面积 RSD 分别为 0.5%, 0.2%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.8 加样回收率试验** 称取已知含量 (含油酸和亚油酸分别为 62.55% 和 11.47%) 的鸦胆子油样品 9 份, 每份约 50 mg, 精密称定。分别准确加入油酸和亚油酸对照品, 测定低中高 3 个浓度的加样回收率。按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 在前述色谱条件下进样, 测定油酸和亚油酸的含量, 计算回收率, 结果见表 1, 2。

**2.9 样品含量测定** 取 3 批鸦胆子油样品约 100 mg, 精密称定, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 在前述色谱条件下进样, 测定。结果油酸的质量分数分别为 62.55%, 61.49%, 61.28%; 亚油酸的质

表 1 鸦胆子油样品中油酸的加样回收率试验

Table 1 Recovery of oleic acid in samples

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
51.49	32.21	27.28	61.02	105.60	102.39	3.0
52.47	32.82	27.13	60.48	101.95		
53.35	33.37	27.18	60.45	99.64		
52.47	32.82	34.08	70.33	110.07	108.44	2.6
54.10	33.84	35.20	70.86	105.15		
52.81	33.03	34.73	71.27	110.11		
53.01	33.16	40.75	73.32	98.55	100.98	2.1
56.18	35.14	40.88	77.13	102.70		
55.20	34.53	40.79	76.00	101.70		

表 2 鸦胆子油中亚油酸加样回收率试验

Table 2 Recovery of linoleic acid in samples

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
51.49	5.91	4.97	9.89	80.16	81.31	2.3
52.47	6.02	5.08	10.26	83.50		
53.35	6.12	5.01	10.14	80.25		
52.47	6.02	6.16	11.12	82.82	81.58	1.4
54.10	6.21	6.01	11.05	80.61		
52.81	6.06	6.03	10.96	81.31		
53.01	6.08	7.33	12.12	82.40	81.70	1.6
56.18	6.44	7.45	12.42	80.22		
55.20	6.33	7.37	12.41	82.48		

量分数分别为 11.47% ,12.34% ,12.46% 。

### 3 讨论

本文在预试验及文献[9]的基础上确定了流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(88:12)。在此条件下亚油酸和油酸的保留时间分别约为 8 min 和 12 min,分离时间较短,峰形对称无干扰峰。亚油酸和油酸分子结构中仅有非共轭双键,只有末端吸收,因此选择检测波长 203 nm,但在 203 nm 波长下,为避免甲醇等溶剂在该检测波长下产生末端吸收,故采用乙腈体系作为流动相。

本试验供试品溶液的制备需要经过高温加热回流提取,碱化,酸化等过程,由于处理步骤较多,操作过程中难免产生误差,如操作者在对滴定终点指示剂变色的判断等恒定误差,这些误差均可能影响回收率的测定结果,故本文中油酸的加样回收率只有 81%。但是,由于本实验的目的为建立一套快速、简便的测定方法,以简化、方便后续课题研究中大量制剂处方的筛选,所以该实验方法的建立能够基本上满足鸦胆子油类制剂处方研究的需要。

提取鸦胆子油中的油酸和亚油酸时,曾考察

了处理供试品的溶剂用量,分别以 10,20,30 mL 的 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钾乙醇溶液热回流,后续处理方法一致,结果表明以 20 mL 的 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钾乙醇处理后,油酸和亚油酸提取率均最高。另外,本文参考了 2010 年版《中国药典》对于鸦胆子油的含量测定方法以油酸总量为检测指标,故油酸的加样回收率的权重在亚油酸加样回收率之上。

曾摸索过 HPLC 柱前衍生法进行鸦胆子油的测定,即以 ω-溴代苯乙酮在三乙醇胺的催化下进行酯化反应,但需多次加入试剂反应,过程复杂,处理时间较长且容易造成待测成分的损失。相比之下,本法无需柱前衍生化处理,具有简单准确,快速高效的特点,为中药鸦胆子油及其制剂的质量控制提供了参考。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 马杰津. 抗癌药物鸦胆子的研究进展[J]. 医学文选,2001,20(3):378-379.

[3] 李福星. 鸦胆子脂溶性活性成分的研究[D]. 南昌:南昌大学,2006.

[4] 丘明明,王受武,韦荣芳,等. 鸦胆子治疗尖锐湿疣活性成分的提取分离[J]. 广西中医学院学报,1999,16(4):82-88.

[5] 孙苓苓,王淑丽. 气相色谱法测定鸦胆子油乳剂中油酸的含量[J]. 药物分析杂志,1996,16(2):98-100.

[6] 黄俊忠,陈新国,高美华. GC 法测定鸦胆子油口服乳液中油酸的含量[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(2):197-199.

[7] 丁怡,唐星. 柱前衍生 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸含量[J]. 中草药,2004,35(9):33-36.

[8] 罗淑文,邓远辉,朱艳红. 柱前衍生化 HPLC 法测定鸦胆子油中油酸和亚油酸的含量[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(3):328-330.

[9] 秦建平,陆艳芹,罗雪磊,等. HPLC 同时测定火麻仁中 α-亚麻酸、亚油酸和油酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):71-74.

[10] 辛海量,侯银环,盛佳钰,等. 高效液相色谱法测定马齿苋中不饱和脂肪酸的含量[J]. 解放军药学报,2011,27(1):52-54.

[11] 郝荣荣,杨倩,曹蔚,等. 椒目及椒目仁油中 α-亚麻酸的含量测定研究[J]. 现代生物医学进展,2014,14(20):3840-3843.

[责任编辑 顾雪竹]