

HPLC 同时测定林蛙油中 α -亚麻酸、亚油酸和油酸含量

于桂芳^{1,2}, 秦建平^{1,2}, 李家春^{1,2}, 王婧^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001;

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

[摘要] 目的: 建立同时测定林蛙油中 α -亚麻酸、亚油酸和油酸含量的 HPLC 方法。方法: Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.1% 磷酸(80:20)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 203 nm。结果: α -亚麻酸在 4.76 ~ 152.16 mg·L⁻¹ ($r=1$), 亚油酸在 15.36 ~ 491.59 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$), 油酸在 47.28 ~ 1512.80 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) 呈良好的线性关系; 平均回收率 α -亚麻酸为 95.8%, RSD 1.79% ($n=6$); 亚油酸为 98.6%, RSD 1.32% ($n=6$); 油酸为 99.3%, RSD 1.59% ($n=6$)。结论: 该法操作简便, 结果准确, 专属性强, 重复性好, 可作为林蛙油质量控制的参考。

[关键词] 林蛙油; α -亚麻酸; 亚油酸; 油酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)15-0082-04

[doi] 10.11653/syjf2013150082

Determination of α -Linolenic Acid, Linoleic Acid and Oleic Acid in Oviductus Ranae by HPLC

YU Gui-fang^{1,2}, QIN Jian-ping^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, WANG Jing^{1,2},

BI Yu-an^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of α -linolenic acid, linoleic acid and oleic acid in Oviductus Ranae. **Method:** Alltima C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) column was used with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (80:20); the flow rate was 1 mL·min⁻¹; the column temperature was kept at 30 $^{\circ}$ C; the detection wavelength was set at 203 nm. **Result:** The linear ranges of α -linolenic acid, linoleic acid and oleic acid were 4.755-152.16 mg·L⁻¹ ($r=1$), 15.362-491.59 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$) and 47.275-1512.8 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) respectively. The average recoveries were 95.8% with RSD 1.79% for α -linolenic acid, 98.6% with RSD 1.32% for linoleic acid, 99.3% with RSD 1.59% for oleic acid. **Conclusion:** The method is simple, accurate, convenient, specific and repeatable, which can be used to control the quality of α -linolenic acid, linoleic acid and oleic acid in Oviductus Ranae.

[Key words] Oviductus Ranae; α -linolenic; linoleic acid; oleic acid; HPLC

林蛙油又名田鸡油、蛤蟆油、哈士蟆油,系蛙科

动物中国林蛙雌蛙的输卵管干燥后形成的脂肪状物质,经临床实践证明^[1],林蛙油生用或与其他中药配伍,具有健脾养胃、滋阴补肾、辛卜虚退热、润肺生津和利水消肿的功能。现代研究表明^[2-3],林蛙油中含有蛋白质、氨基酸、磷脂、核酸、脂肪酸等多种营养元素,具有增强机体免疫力、抗疲劳抗衰老、镇咳祛痰、调血脂等作用,因此对林蛙油的研究具有重要的意义。

[收稿日期] 20121011(016)

[基金项目] 国家科技部 973 计划项目(2010CB735604)

[第一作者] 于桂芳, 硕士, 助理研究员, 从事中药质量标准研究, Tel: 15189010279, E-mail: gfyu100@126.com

[通讯作者] * 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士, 从事中药新剂型的研究与开发研究, Tel: 13812332334, E-mail: wzzh-nj@tom.com

林蛙油中含有多种不饱和脂肪酸^[4],不饱和脂肪酸是合成前列腺素所必须的前体,可以软化血管、防治高血压和冠心病,其中 α -亚麻酸、亚油酸是人体必需脂肪酸,油酸对人体亦有特殊功能。由于林蛙油尚缺少不饱和脂肪酸的质量控制标准,造成了该产品的不稳定,因此有必要建立简便、准确的质量控制方法。文献多采用GC和GC-MS分析不饱和脂肪酸^[5-10],该法可以同时多种不饱和脂肪酸进行定性和定量,但是均需要甲酯化,影响因素多,容易反应不完全,且柱温较高,易使双键断裂或异构化。也有文献采用HPLC分析不饱和脂肪酸^[11-13],但是分析林蛙油中不饱和脂肪酸的文献很少。本文建立了林蛙油中不饱和脂肪酸 α -亚麻酸、亚油酸和油酸的HPLC含量测定方法,为林蛙油的质量控制提供参考。

1 材料

Agilent 1200型高效液相色谱仪, α -亚麻酸对照品(批号463-40-1, sigma公司),亚油酸(批号101075991, sigma公司),油酸(批号101064923, sigma公司)甲醇、乙腈(色谱纯,上海星可生化试剂有限公司),水(超纯水),其余试剂均为分析纯,南京化学试剂有限公司。

林蛙油分别购自吉林长白山、吉林桦甸、黑龙江宁安,经康缘药业质量标准研究中心鉴定为中国林蛙的干燥输卵管。

2 方法与结果

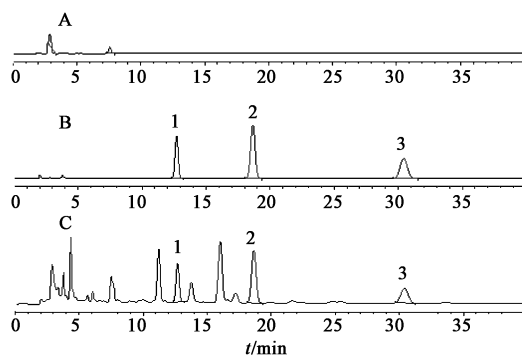
2.1 色谱条件 Alltima C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液(80:20),流速1 mL·min⁻¹,柱温30 $^{\circ}$ C,检测波长203 nm,进样量10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备 取 α -亚麻酸、亚油酸和油酸对照品适量,精密称定,加0.1%磷酸乙腈制成每1 mL分别含25, 80, 250 μ g的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品,40 $^{\circ}$ C干燥2 h,研细,取约0.2 g,精密称定,置圆底烧瓶内,加0.5 mol·L⁻¹的氢氧化钾乙醇溶液10 mL,回流提取30 min,放冷,以0.5 mol·L⁻¹盐酸溶液调节至弱酸性(pH约为5),用石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)振摇提取3次,每次20 mL,合并石油醚液,室温挥干,残渣加无水乙醇2 mL使溶解,即得。

2.4 系统适应性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液各10 μ L,进样,照2.1项下色谱条件分别测定, α -亚麻酸、亚油酸和油酸与相邻色谱峰分离度

均>1.5,理论板数按 α -亚麻酸、亚油酸和油酸峰计算均不低于8 000,拖尾因子均在0.95~1.05(图1)。



A. 溶剂; B. 混合对照品; C. 供试品;
1. α -亚麻酸; 2. 亚油酸; 3. 油酸

图1 林蛙油HPLC

2.5 线性关系考察 精密称取 α -亚麻酸7.61 mg,亚油酸24.58 mg和油酸75.64 mg,置50 mL量瓶中,加0.1%磷酸乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,即得 α -亚麻酸、亚油酸和油酸分别为152.16, 491.59, 1 512.80 mg·L⁻¹的混合对照品储备液,再以0.1%磷酸乙腈稀释,摇匀,即得系列对照品溶液。吸取各浓度的对照品溶液10 μ L,进样,以峰面积为纵坐标(Y),以对照品浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,结果见表1。

表1 线性范围、回归方程和相关系数

成分	回归方程	线性范围/mg·L ⁻¹	r
α -亚麻酸	$Y = 34.234X + 2.1346$	4.76 ~ 152.16	1
亚油酸	$Y = 18.996X - 16.885$	15.36 ~ 491.59	0.999 8
油酸	$Y = 3.3702X + 30.206$	47.28 ~ 1 512.80	0.999 9

2.6 定量限 按2.1色谱条件用对照品溶液稀释进行试验,结果 α -亚麻酸、亚油酸和油酸的定量限分别为0.8, 1.9, 20 ng。

2.7 精密度试验 取一定浓度的混合对照品溶液,按2.1色谱条件连续进样6次, α -亚麻酸、亚油酸和油酸峰面积的RSD分别为1.42%, 1.14%, 1.22%,结果表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取林蛙油样品一份,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别于配制后0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 h进样测定,测得峰面积,计算 α -亚麻酸、亚油酸和油酸峰面积的RSD分别为0.52%, 0.50%, 0.77%,结果表明供试品溶液在16 h内稳定。

2.9 重复性试验 按照2.3项下方法制备供试品

溶液,平行制备 6 份,按 2.1 色谱条件进行测定,计算含量。结果 α -亚麻酸平均质量分数为 0.02%, RSD 0.91%; 亚油酸的平均质量分数为 0.08%, RSD 1.89%, 油酸的平均质量分数为 0.20%, RSD 0.98%, 表明方法重复性良好。

2.10 回收率试验 取林蛙油样品约 100 mg,精密称定,加入 1 mL 混合对照品溶液,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,按 2.1 色谱条件进行测定,计算各成分的含量,并计算回收率。结果平均回收率为 α -亚麻酸 95.8% (RSD 1.79%), 亚油酸 98.6% (RSD 1.32%), 油酸 99.3% (RSD 1.59%), 见表 2~4。

表 2 α -亚麻酸加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.108 1	0.024 9	0.048 6	93.6	95.8	1.79
2	0.102 4	0.023 6	0.048 1	96.8		
3	0.110 8	0.025 5	0.049 5	94.7		
4	0.099 8	0.023 0	0.047 7	97.6		
5	0.102 1	0.023 5	0.048 2	97.5		
6	0.101 5	0.023 3	0.047 3	94.5		

注:加入量均为 0.025 4 mg。

表 3 亚油酸加样回收率试验 (n=6)

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.108 1	0.086 5	0.166 7	97.9	98.6	1.32
2	0.102 4	0.081 9	0.162 9	98.8		
3	0.110 8	0.088 6	0.168 1	97.0		
4	0.099 8	0.079 8	0.161 3	99.4		
5	0.102 1	0.081 7	0.161 8	97.8		
6	0.101 5	0.081 2	0.163 6	100.6		

注:加入量均为 0.081 9 mg。

表 4 油酸加样回收率试验 (n=6)

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.108 1	0.219 4	0.478 4	98.1	99.3	1.59
2	0.102 4	0.207 9	0.469 3	99.0		
3	0.110 8	0.224 9	0.491 2	100.9		
4	0.099 8	0.202 6	0.465 4	99.5		
5	0.102 1	0.207 3	0.463 5	97.1		
6	0.101 5	0.206 0	0.473 0	101.1		

2.11 样品含量的测定 取 3 份不同来源的林蛙油样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行制备 2 份,按 2.1 色谱条件进行测定,计算,结果见表 5。

表 5 样品中 3 种脂肪酸含量测定

产地	α -亚麻酸	亚油酸	油酸
黑龙江宁安	0.035	0.120	0.253
吉林长白山	0.028	0.125	0.271
吉林桦甸	0.036	0.197	0.209

3 讨论

由于 α -亚麻酸、亚油酸和油酸分子结构中仅含有非共轭双键,因此选择 203 nm 为检测波长。

考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸流动相系统,结果乙腈-0.1% 磷酸系统分离效果最佳;考察流动相比比例波动 $\pm 2%$, 流速波动 $\pm 20%$, 柱温波动 $\pm 5^\circ\text{C}$ 对 α -亚麻酸、亚油酸和油酸的分离效果无显著影响;还考察了 Waters C_{18} , Luna C_{18} , Kromasil C_{18} , Alltima C_{18} 4 个品牌的色谱柱,结果后 2 种色谱柱分离效果较佳。首先考察样品先提取后皂化与直接皂化 2 种方式对 α -亚麻酸、亚油酸和油酸含量的影响,结果后者含量明显高于前者,而且操作简单,节省时间;皂化时间考察了 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h, 结果 0.5 h 已经反应完全,随着皂化时间的延长,含量反而稍有降低,可能与不饱和脂肪酸容易被氧化有关;考察了溶剂体积 10, 20, 30 mL, 结果含量无显著性变化;萃取溶剂种类考察了石油醚、乙醚、二氯甲烷及乙酸乙酯,结果石油醚萃取时含量最高;萃取次数的考察结果表明使用石油醚萃取 3 次基本萃取完全;另外挥干温度考察了室温、40 $^\circ\text{C}$ 、60 $^\circ\text{C}$, 结果表明室温下挥干溶剂,含量最高,随着温度的升高,含量降低,可能与不饱和脂肪酸容易被氧化有关。林蛙油样品不稳定,常温放置一个月含量明显下降,需低温保存。

本文建立了简单易行的方法检测林蛙油中 α -亚麻酸、亚油酸和油酸的含量,并且对该方法进行了系统了方法学验证和耐受性考察,对保证林蛙油的质量具有重要的意义。

[参考文献]

[1] 刘仁甫. 哈士蟆油初步介绍[J]. 药学通报, 1955 (11): 517.
[2] 高丹, 郑明珠, 蔡丹, 等. 长白山林蛙油产品的研究现状与开发[J]. 农产品加工(学刊), 2010, (6): 73.
[3] 白雪松, 宋春梅, 杜鹃, 等. 林蛙油研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2009, 30(4): 227.

白头翁配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

江洁怡^{1*}, 胥爱丽¹, 毕晓黎^{1,2}, 李养学¹, 李素梅¹

(1. 广东省中医研究所, 广州 510095; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立白头翁配方颗粒的高效液相指纹图谱, 为白头翁配方颗粒的鉴别、质量评价与控制提供实验依据。
方法: 采用高效液相色谱 (HPLC) 法, Waters XbridgeTM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱; 乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 柱温 40 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹。
结果: 建立了白头翁配方颗粒的高效液相指纹图谱, 以白头翁皂苷 B₄ 为参照, 确定了 12 个共有峰为特征峰, 对照指纹图谱色谱峰丰富, 分离度高, 相似性好。
结论: 该方法可用于白头翁配方颗粒的鉴别、质量评价与控制。

[关键词] 白头翁配方颗粒; 高效液相色谱; 指纹图谱; 白头翁皂苷 B₄

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0085-04

[doi] 10.11653/syfyj2013150085

Study on HPLC Fingerprint Analysis of Radix Pulsatillae Formula Granules

JIANG Jie-yi^{1*}, XU Ai-li¹, BI Xiao-li^{1,2}, LI Yang-xue¹, LI Su-mei¹

(1. Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint of Radix Pulsatillae Formula Granules for identifying and evaluating its quality by HPLC. **Method:** The HPLC analysis was carried out in Waters XbridgeTM C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric by gradient elution. The detection wavelength was set at 210 nm; the column temperature was kept at 40 °C and the flow rate was 0.8 mL ·

[收稿日期] 20130228(015)

[基金项目] 广东省教育部科技部产学研结合项目(2011A091000005)

[通讯作者] * 江洁怡, 硕士, 中药师, 从事中药质量标准研究, Tel:020-83501292, E-mail: blpz.jiang@yahoo.com.cn

- [4] 韩铁锁, 王亚军, 王新, 等. 东北林蛙油化学成分和药理作用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, (4): 17.
- [5] 季怡萍. 哈士蟆油中脂肪酸的 GC、GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 1999, 18(3): 80.
- [6] 卢立明, 宋少江, 徐绥绪, 等. 哈士蟆卵油化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(4): 224.
- [7] 李成义, 金子, 王琳. GC/MS 分析吉林产哈士蟆卵油的脂肪酸[J]. 中国药学杂志, 1994, 29(1): 18.
- [8] 韩娜, 赵建邦, 宋平顺. 气相色谱法测定火麻仁中亚油酸及 α-亚麻酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 83.
- [9] 卢淑君, 杨燕云, 许亮, 等. 气相色谱法测定牛蒡子脂肪油中 3 种脂肪酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 56.
- [10] 张辰露, 吴三桥, 秦文娟, 等. GC-MS 法分析中药索骨丹中脂肪酸成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 56.
- [11] 傅渝滨, 景淑华. 亚麻籽油中 α-亚麻酸等不饱和脂肪酸的 HPLC 测定[J]. 重庆医科大学学报, 1996, 21(3): 223.
- [12] 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.
- [13] 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.

[责任编辑 顾雪竹]