

- [J]. Clin Pharmacokine, 2002, 41 ( 1 ) : 7-17.
- [4] 杜先华, 牛欣, 冯前进, 等. 染料木素自微乳在家兔体内的相对生物利用度研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19 ( 4 ) : 278-280.
- [5] 徐戎, 斯陆勤, 顾世芬, 等. 国产和进口坎地沙坦酯片人体生物等效性评价 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43 ( 6 ) : 455-457.
- [6] 杨红, 董海松, 罗思婧, 等. 异黄酮苷元滴丸和片剂在大鼠体内的相对生物利用度研究 [J]. 广东药学院学报, 2009, 25 ( 6 ) : 560-563.
- [7] 陈日来, 李玉珍, 李衡梅, 等. HPLC 法测定阿司达莫缓释胶囊在人体内的血药浓度及生物等效性研究 [J]. 中国药房, 2008, 19 ( 17 ) : 1311-1313.
- [8] 郑筱萸. 化学药品和治疗用生物样品研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002 : 63-69.
- ( 收稿日期: 2012-08-11 ; 修回日期: 2012-9-10 )

## 反相高效液相色谱法测定巴豆油中游离型和结合型亚油酸的含量

唐君苹<sup>1</sup>, 曾宝<sup>1,2</sup>, 黄孟秋<sup>1</sup>, 肖祖平<sup>1</sup>, 袁捷<sup>1,2\*</sup>, 赖小平<sup>1,2</sup> (1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

**摘要:** 目的 建立巴豆油中游离型和结合型亚油酸的含量测定方法, 为巴豆油的质量评价提供理论依据。方法 采用 RP-HPLC 法, 色谱条件: Kromasil 100-5C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈 - 0.1% 甲酸 (80 : 20), 等度洗脱; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 ; 检测波长: 210 nm。结果 巴豆油中亚油酸在 0.04 ~ 0.68 mg · mL<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好的线性关系 ( $Y = 6.000 \times 10^6 X + 6.916 \times 10^4$ ,  $r = 0.9997$ ,  $n = 7$ ), 平均回收率为 98.0% (游离型) 和 98.5% (结合型) ( $n = 6$ )。结论 该方法简单、准确、重复性好, 可为巴豆药材的质量控制提供参考。

**关键词:** 巴豆油; 反相高效液相色谱法; 亚油酸

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2012)11-0811-04

doi:10.3969/j.issn.1672.2981.2012.11.004

## Determination of free and bound type linoleic acid in crotonis oil by RP-HPLC

TANG Jun-ping<sup>1</sup>, ZENG Bao<sup>1,2</sup>, HUANG Meng-qiu<sup>1</sup>, XIAO Zu-ping<sup>1</sup>, YUAN Jie<sup>1,2\*</sup>, LAI Xiao-ping<sup>1,2</sup> (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. Research Institute of Mathematical Engineering of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan Guangdong 523808)

**Abstract: Objective** To establish an RP-HPLC method for the determination of linoleic acid in crotonis oil, and to offer evidence for quality evaluation of fructus crotonis. **Methods** RP-HPLC method was used. The separation condition was as follows: Kromasil 100-5C<sub>18</sub> chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), elution was used with the mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid (80 : 20), the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, the column temperature was 25 , and detection wavelength was 210 nm. **Results** The linear range of linoleic acid in crotonis oil was 0.04 - 0.68 mg · mL<sup>-1</sup>. The correlation coefficient of calibration curves was 0.9997. The average recovery was 98.0% (free type) and 98.5% (bound) ( $n = 6$ ). **Conclusion** The established method is simple, accurate, and repeatable, which will supply evidence for the quality evaluation of fructus crotonis.

**Key words:** crotonis oil; RP-HPLC; linoleic acid

基金项目: 国家科技部重大新药创制专项 (编号: 2009ZX09103-388) ; 广东省科技计划项目 (编号: 2009A030100014)。

作者简介: 唐君苹, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新药研究与开发工作, Tel: 15920408231, E-mail: 124653604@qq.com \* 通讯作者:

袁捷, 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药新药研究与开发工作, Tel: 13622888589, E-mail: yuanjie16881688@vip.tom.com

巴豆油来源于中药材巴豆(大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实)。巴豆中含有巴豆油酸、巴豆酸、亚油酸、肉豆蔻酸、花生酸、棕榈酸等有机酸及其组成的甘油酯<sup>[1]</sup>。有文献报道,巴豆具有抗肿瘤、降血压、降血脂、降血糖等药理作用<sup>[2]</sup>,巴豆油注射液在试管内有杀癌细胞作用。也有文献报道<sup>[3-4]</sup>,亚油酸为人体不能自身合成的必需脂肪酸,在与其他脂溶性维生素共同作用下,有明显的抗癌作用,能显著抑制淋巴瘤、腹水癌、乳腺癌细胞的生长<sup>[5-6]</sup>,而且还具有降血压、降血脂、降血糖的药理作用。亚油酸占巴豆脂肪油的 50% 以上,脂肪酸是巴豆油中药理活性的物质基础之一,因此有必要建立巴豆油中的亚油酸含量的分析方法。

亚油酸一般是以甘油酯的形式存在于动植物油脂中,要测定植物种子油中亚油酸的总含量就必须经过水解,将结合型的转化为游离型的,这样才能更加准确的测定种子油中亚油酸的含量。目前巴豆中脂肪酸的含量测定有气相色谱-质谱联用法<sup>[3-4]</sup>,但此方法分析过程中柱温过高。随着 HPLC 法在药物分析中的广泛应用,其测定人体游离脂肪酸和植物油中脂肪酸含量的方法也有相关报道,但尚未见有文献报道有关 HPLC 法测定巴豆油中亚油酸的含量。为了更好地控制巴豆药材质量,并为测定其制剂的含量做准备,同时也为了给巴豆的药理活性提供一个药效物质基础,因此,本实验选择亚油酸作为指标成分,采用 RP-HPLC 法测定巴豆油中游离型和结合型亚油酸的含量。

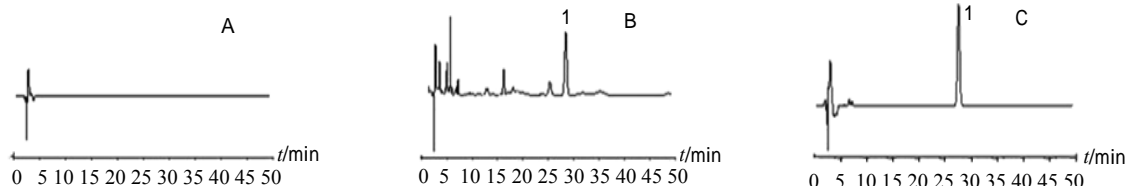


图 1 亚油酸高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of linoleic acid

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 游离型样品 (free type sample); C. 亚油酸对照品 (linoleic acid); 1. 亚油酸 (linoleic acid)

## 2.2 巴豆油的制备

取购于不同的产地共 10 批干燥的巴豆种子,去壳后将种仁粉碎,取约 50 g,精密称定,用滤纸包裹,置索氏提取器中,加适量乙醚,40℃ 水浴加热,提取 8 h,蒸干乙醚提取液,放冷,得巴豆油(浅黄色油状,相对浓度为 0.90 g·mL<sup>-1</sup>),备用。

## 2.3 对照品溶液的制备

精密称取亚油酸对照品适量,置 10 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成 1.02 mg·mL<sup>-1</sup> 的亚油酸对照品溶液。

## 2.4 供试品溶液的制备

**2.4.1 游离型供试品溶液的制备** 精密量取 0.1 mL 巴豆油置于 25 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解完全并稀释至刻度,取适量溶液,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.4.2 结合型供试品溶液的制备** 精密量取 0.1 mL 巴豆油置于具塞的锥形瓶中,加入 10 mL 10% KOH,80℃ 水浴 1 h,冷却,加 2 mL 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中和,加入乙醚萃取 2 次,每次 10 mL,合并乙醚层,蒸干,加无水乙醇溶解完全,置 25 mL 容量瓶中加无水乙醇稀释至刻度,取适量溶液,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

## 2.5 线性关系考察

精密吸取“2.3”项下对照品溶液 0.08、0.14、0.28、0.54、0.82、1.08、1.36 mL,分别置于 2 mL 容量瓶中,加无水

## 1 材料

### 1.1 仪器

Shimadzu 高效液相色谱仪(日本岛津公司,LC-20AT 泵;SIL-20A 自动进样器;SPD-20A 检测器),Kromasil 100-5C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,CP225D 十万分之一电子天平(德国 sartorius 公司),BP110S 万分之一天平(德国 sartorius 公司),HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),KQ3200DE 医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

10 批巴豆药材分别来源于四川、广西、云南 3 个主产区,经广州中医药大学赖小平研究员鉴定为大戟科植物巴豆(*Croton tiglium* L.)的干燥成熟果实;亚油酸(linoleic acid)(中国药品生物制品检定所,批号为 116222-200301,纯度>98%,供含量测定用);甲醇、乙腈(德国 Merck 公司,色谱纯);其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Kromasil 100-5C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈-0.1% 甲酸(80:20),检测波长为 210 nm,记录时间 50 min,柱温为 25℃,进样量为 10 μL。在上述色谱条件下,亚油酸的拖尾因子为 1.026,理论塔板数为 17 116 (见图 1)。

乙醇稀释至刻度,摇匀,使亚油酸浓度分别为 0.04、0.07、0.14、0.27、0.41、0.54、0.68 mg·mL<sup>-1</sup>。以质量浓度(*C*, mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,峰面积积分值(*A*)为纵坐标,进行线性回归分析,得亚油酸的回归方程为( $Y = 6.000 \times 10^6 X + 6.916 \times 10^4$ ,  $r = 0.9997$ ,  $n = 7$ )。结果表明巴豆油中亚油酸在进样质量浓度为 0.04 ~ 0.68 mg·mL<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系。

### 2.6 精密度试验

取对照品 1 份,按“2.3”项下方法制备后,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,亚油酸峰面积 *RSD* 分别为 0.30% (游离型) 和 2.9% (结合型),表明精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取供试品 1 份,按“2.4”项下方法制备样品溶液后,按“2.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样,亚油酸峰面积 *RSD* 分别为 1.2% (游离型) 和 1.9% (结合型),表明 24 h 内供试品溶液的成分稳定。

### 2.8 重复性试验

取供试品 6 份,按照“2.4”项下方法制备样品溶液后,平行制备 6 份。按“2.1”项下色谱条件进样,亚油酸峰面积 *RSD* 分别为 1.9% (游离型) 和 4.6% (结合型),表明实验重复性良好。

### 2.9 加样回收试验

精密量取批号为 20100418 的四川宜宾巴豆油 0.1 mL 置于具塞的锥形瓶中，分别精密加入一定量的亚油酸对照品，加入 10 mL 10% KOH，80℃ 水浴 1 h，冷却，加 2 mL 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中和，加入乙醚萃取 2 次，每次 10 mL，合并乙醚层，蒸干，加无水乙醇溶解完全，置 25 mL 容量瓶中加入无水乙醇稀释至刻度，取适量溶液，以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得（见表 1）。

表 1 亚油酸加样回收率试验结果 (n = 6)

Tab 1 Recovery of linoleic acid in crotonis oil (n = 6)

成分 (component)	取样量 ( sample amount ) /mL	样品中含量 ( sample content ) /μg	对照品加入量 ( added amount ) /μg	测得量 ( detected amount ) /μg	回收率 ( recovery ) /%	平均回收率 ( average recovery ) /%	RSD/%
游离型	0.1	0.88	0.85	1.70	96.5	98.0	1.3
亚油酸	0.1	0.84	0.85	1.69	100.0		
	0.1	0.80	0.85	1.65	100.0		
	0.1	0.83	0.85	1.65	100.5		
	0.1	0.87	0.85	1.70	96.5		
	0.1	0.84	0.85	1.67	97.6		
结合型	0.1	13.90	15.50	29.20	98.7	98.5	1.2
亚油酸	0.1	14.10	15.50	29.40	98.7		
	0.1	14.30	15.50	29.22	96.3		
	0.1	16.00	15.50	31.25	98.4		
	0.1	14.90	15.50	30.33	99.5		
	0.1	13.80	15.50	29.18	99.2		

2.10 样品测定 按“2.1”项下色谱条件进样测定，根据回归方程计算亚油酸的含量（见表 2）。  
取不同批号的巴豆油按“2.4”项下操作得供试品后，

表 2 样品中亚油酸含量 (n = 10)

Tab 2 Determination of linoleic acid in crotonis oil (n = 10)

序号 (No.)	批号 (batch No.)	产地 (place of origin)	购买公司 (company)	游离型亚油酸含量 (content of free type of crotonis oil) / mg · mL <sup>-1</sup>	结合型亚油酸含量 (content of bound type of crotonis oil) / mg · mL <sup>-1</sup>
1	20100418	四川宜宾	四川成都市五块石药市	21.22	135.62
2	20100419	四川万县	四川成都市五块石药市	45.17	120.44
3	20100420	四川宜宾	四川宜宾县观音镇	29.75	114.47
4	20101118	四川	云南向辉生物科技有限公司	66.81	86.19
5	20101130	四川	安徽亳州药市	38.12	93.17
6	20101205	四川	安徽亳州中药材总公司	61.82	104.06
7	20101201	云南	广西玉林国际中药港	14.03	103.52
8	20101206	云南	安徽亳州中药材总公司	61.36	164.88
9	20101122	广西	河北安国同利中药材公司	15.51	78.66
10	20101204	广西	安徽亳州中药材总公司	59.91	164.7

3 讨论

巴豆油中含有多种不饱和脂肪酸，GC-MS 测定结果表明<sup>[3-4]</sup>，亚油酸在巴豆油脂肪酸中的相对含量 > 50%，可见巴豆油中的亚油酸等脂肪酸是其药理活性的物质基础之一。测定脂肪油中游离脂肪酸的含量，对保障脂肪油的质量具有重要的作用，游离脂肪酸含量高易致脂肪油酸败，含量低脂肪油不易酸败，而脂肪油中脂肪酸多以结合型的甘油酯形式存在，因此测定巴豆中游离型和结合型亚油酸的含量对保证巴豆药材的质量具有很好的参考价值。

目前国内已报道的巴豆中脂肪酸的含量测定方法仅有 GC-MS 法，其测定的是巴豆油中多种脂肪酸的相对含量，本文首次采用 HPLC 法直接测定巴豆油中亚油酸的

含量，试验通过对巴豆油中游离型和结合型亚油酸含量的比较，可见结合型亚油酸的含量明显比游离型含量高，则皂化使巴豆油中结合型亚油酸转化为游离型亚油酸，从而可以准确测定巴豆油中亚油酸的含量。本实验的皂化条件是通过正交试验 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 得出的结果，该正交试验 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 中以 KOH 浓度 (5%、10%、15%)，水浴温度 (70、80、90℃)，H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的浓度 (10%、30%、50%) 以及水浴时间 (0.5、1、1.5 h) 为考察因素，最后测得在 10 mL 10% KOH，80℃ 水浴 1 h，冷却后，加 2 mL 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中和的条件下亚油酸的峰面积最大，即为结合型亚油酸水解完全。因此确定其皂化条件中溶剂量 10 mL 10% KOH 最佳，温度 80℃ 即可，水浴 1 h 适宜，

加 2 mL 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中和最佳。

本试验还对不同的流动相、流动相的比例、检测波长进行了考察,结果显示乙腈-0.1% 甲酸溶液以 80:20 的比例等度洗脱为最佳,峰形对称且分离度好,保留值适宜,柱后处理简便省时;检测波长在 210 nm 处测定峰形最好且灵敏度高。该方法测定巴豆油中亚油酸含量,样品制备简单,测定结果准确,回收率、线性、精密度均符合中药分析要求,且方法简单、快速准确且灵敏,可作为巴豆药材的质量控制。

#### 参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草编委会》,中华本草(第 4 册)[M].

上海:上海科学技术出版社,2000:769-774.

- [2] 赵云飞. 巴豆属植物的化学成分、药理作用及临床应用概述[J]. 贵州畜牧兽医, 2008, 32(4): 18-24.
- [3] 胡静, 高文远, 凌宁生, 等. 巴豆和巴豆霜挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 464-465.
- [4] 梁英, 潘英明. 巴豆种子油的 GC-MS 分析[J]. 光谱实验室, 2002, 19(6): 748-750.
- [5] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 83.
- [6] 郑子新, 张荣欣. 构成脂肪的脂肪酸和必需脂肪酸(营养与健康卷)[M]. 成都: 四川人民出版社, 1999: 50-51.

(收稿日期: 2012-06-13; 修回日期: 2012-07-23)

## 添加前体物质对水培益母草中盐酸水苏碱含量的影响

宋婷, 彭菲\*, 谭朝阳 (湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

**摘要:** 目的 探究盐酸水苏碱前体物质对益母草水培过程中产生盐酸水苏碱的影响。方法 在益母草水培营养液中按不同浓度和时间分别添加盐酸水苏碱可能的前体物质 L-脯氨酸和 L-鸟氨酸, 并采用 HPLC-ELSD 法测定各组盐酸水苏碱的含量。结果 L-脯氨酸添加的最佳浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 最佳转化时间为 96 h, 盐酸水苏碱由对照的 1.037% 上升至 1.585%; L-鸟氨酸添加的最佳浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 转化时间为 72 h 时, 盐酸水苏碱含量达到 1.135%。结论 添加前体物质 L-脯氨酸和 L-鸟氨酸, 对益母草中盐酸水苏碱积累有效, 且 L-脯氨酸的效果优于 L-鸟氨酸。

**关键词:** 前体物质; 益母草; 水培; 盐酸水苏碱; L-脯氨酸; L-鸟氨酸

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2012)11-0814-04

doi:10.3969/j.issn.1672.2981.2012.11.005

## Effect of precursors on the content of stachydrine hydrochloride in the hydroponic herba *Leonuri*

SONG Ting, PENG Fei\*, TAN Zhao-yang (Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208)

**Abstract: Objective** To explore how the precursors of stachydrine hydrochloride affect the content of stachydrine hydrochloride during the hydroponic process of herba *Leonuri*. **Methods** Precursors of stachydrine hydrochloride (namely L-proline and L-ornithine) were added at different concentrations and the time to the nutrient solution of the herba *Leonuri*. HPLC-ELSD was used to measure the contents of stachydrine hydrochloride. **Results** The best concentration of L-proline was 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> and gathering for 96 h. The content of stachydrine hydrochloride rose from 1.037% to 1.585%. The best concentration of L-ornithine was 1 mmol·L<sup>-1</sup> and gathering for 72 h. The content of stachydrine hydrochloride rose to 1.135%. **Conclusion** Adding the precursors is effective for the accumulation of stachydrine hydrochloride and L-proline is better than L-ornithine.

**Key words:** precursor; herba *Leonuri*; hydroculture; stachydrine hydrochloride; L-proline; L-ornithine

益母草 (*Leonurus japonicus* Houtt.) 为唇形科一年生或二年生直立草本植物, 以新鲜或干燥地上部分入药, 气微,

味微苦, 具活血调经, 利尿消肿作用, 用于月经不调, 痛经, 经闭, 恶露不尽, 水肿尿少以及急性肾炎水肿<sup>[1]</sup>。益母草中

基金项目: 长沙市科技局项目 (No.K1001034-31)。

作者简介: 宋婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药资源与质量研究, E-mail: 120363525@qq.com \* 通讯作者: 彭菲, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药资源与质量研究, E-mail: pengfei63@163.com