

高效液相色谱法测定马齿苋中不饱和脂肪酸的含量

辛海量^①, 侯银环^②, 盛佳钰^①, 岳小强^①, 李敏^③, 路金才^②, 凌昌全^①

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定马齿苋中 α -亚麻酸、亚油酸的含量。方法 色谱柱: Shin-pack C18-ODS (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-乙腈-0.5% 磷酸水溶液 (66:22:12); 柱温: 26 $^{\circ}$ C; 检测波长: 210 nm; 流速: 1.1 ml/min。结果 α -亚麻酸的回归方程为 $A = 2.394 \times 10^7 C - 2.623 \times 10^3$ ($r = 0.9999$), 线性范围: 1.60~64.00 μ g/ml; 亚油酸的回归方程为 $A = 1.066 \times 10^6 C - 2.927 \times 10^3$ ($r = 0.9998$), 线性范围: 1.68~67.20 μ g/ml。结论 不同产地、批次的马齿苋中 α -亚麻酸、亚油酸的含量差异较大。现行版中国药典尚无马齿苋药材的含量测定项目, 有必要将亚麻酸、亚油酸含量指标纳入马齿苋药材的质量评价体系。

[关键词] 马齿苋; α -亚麻酸; 亚油酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2011)01-052-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.01.016

Determination of Unsaturated Fatty Acid in *Portulaca Oleracea* L. with High Performance Liquid Chromatography Methods

XIN Hai-liang^①, HOU Yin-huan^②, SHENG Jiayu^①, YUE Xiao-qiang^①, LIM in^③, LU Jin-cai^②, LING Chang-quan^①

^①Department of Traditional Chinese Medicine Changhai Hospital of Second Military Medical University Shanghai 200433

China ^②School of Traditional Chinese Material Medicine Shenyang Pharmaceutical University Shenyang 110016 China

^③Department of Military Health, Naval Faculty, Second Military Medical University Shanghai 200433 China

[Abstract] **Objective** To develop an high performance liquid chromatography method for the determination of α -linolenic acid and linoleic acid in *Portulaca oleracea* L. **Methods** The method was developed under the following conditions: Shin-pack C18-ODS column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) was used with the mobile phase of methanol-acetonitrile-0.5% phosphonic acid (66:22:12) at a flow rate of 1.1 ml/min. Column temperature was at 26 $^{\circ}$ C and the detection wavelength was set at 210 nm. **Results** The standard curves of α -linolenic acid and linoleic acid were linear in the range of 1.60-64.00 μ g/ml and 1.68-67.20 μ g/ml respectively. The standard curves of α -linolenic acid and linoleic acid were $A = 2.394 \times 10^7 C - 2.623 \times 10^3$ ($r = 0.9999$) and $A = 1.066 \times 10^6 C - 2.927 \times 10^3$ ($r = 0.9998$), respectively. **Conclusion** The content of α -linolenic acid and linoleic acid in *Portulaca oleracea* L. growing in different districts and of different batches. For no quantitative analysis item of *Portulaca oleracea* L. included in China pharmacopoeia (2005 year edition), it is necessary to include α -linolenic acid and linoleic acid in quality evaluation system of *Portulaca oleracea* L.

[Key words] *Portulaca oleracea* L.; α -linolenic acid; linoleic acid; high performance liquid chromatography

马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.) 为马齿苋科一年生肉质草本植物, 具有清热解毒, 散血消肿之功效, 是常见的药食两用植物。现代研究表明马齿

苋不仅具有抗菌、降血脂、松弛肌肉、抗炎、镇痛以及促进伤口愈合等作用, 而且还具有较强的抗氧化、抗衰老作用^[1-3]。我们前期研究结果表明马齿苋具有较强的抗缺氧、抗疲劳、抗应激作用, 其所富含的 α -亚麻酸、亚油酸等不饱和脂肪酸可能是其抗缺氧活性成分^[4]。现有文献报道多采用柱前衍生化-气相色谱 (Gas Chromatography GC) 法^[5] 进行 α -亚麻酸、亚油酸含量分析, 直接 GC 法^[6] 和柱前衍生化高效液相色谱法^[7-8] 亦有报道, 但这些方法都存在前处理繁琐、影响因素多、反应不完全的缺点, 难于适应 α -亚麻酸、亚油酸精确定量的要求。国外有报道采

基金项目: 国家自然科学基金项目, No. 30772855; 总后“十一五”专项项目, No. 06Z024 “十一五”军队中医药研发推广专项课题, No. 2006172002

作者简介: 辛海量, 博士。研究方向: 中药资源、活性、品质评价

作者单位: ① 200433 上海, 第二军医大学长海医院中医系; ② 110016 辽宁沈阳, 沈阳药科大学中药学院; ③ 200433 上海, 第二军医大学海军事军队卫生教研室

通讯作者: 凌昌全, Tel (021) 81871551; E-mail lingchangquan@hotmail.com

用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法对人体液样品中游离不饱和脂肪酸和脂肪酸含量进行分析^[9], 但测定条件苛刻, 并且对于植物性样品的适应性也未考察。本文采用建立的 HPLC 方法对不同产地、批次的马齿苋药材进行品质评价^[10]。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪, 四元低压梯度洗脱系统, DAD 检测器; AUW 220D 型分析天平 (均为日本岛津制作所), DL-720 型超声波自动清洗器 (上海之信仪器有限公司); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 水为高纯水, 正己烷、三氯甲烷均为分析纯; α -亚麻酸 (纯度: 99.1%, Sigma 公司, 批号: 096K1537); 亚油酸 (纯度: 99.4%, Sigma 公司, 批号: 115K1141)。马齿苋药材来源见表 2 (经本校药学院郑汉臣教授鉴定, 符合《中国药典》规定)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Shim-pack CLC-ODS 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 保护柱: DKMA Easy-Guard C₁₈ (4.6 mm $\times$ 10 mm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.5% 磷酸水溶液 (66: 22: 12); 柱温: 26°C; 检测波长: 210 nm; 流速: 1.1 mL/min。

2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液 分别精密称定 α -亚麻酸、亚油酸 4.00、4.20 mg 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 即得 α -亚麻酸、亚油酸贮备液。分别精密吸取 α -亚麻酸、亚油酸贮备液各 2.00 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得含 α -亚麻酸、亚油酸 0.080、0.084 mg/mL 的混合对照品液。(2) 供试品溶液 药材干燥, 粉碎, 过 3 号筛, 精密称定 50 mg 置 5 mL 具塞量瓶中, 精密加入 4.00 mL 甲醇, 密封, 超声 (25°C, 功率 600 W, 频率 60 kHz) 30 min 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适应性试验 分别取样品溶液, 对照品溶液, 25 μ L 进样, 照 2.1 项下色谱条件分别测定, α -亚麻酸、亚油酸与相邻色谱峰分离度均大于 1.5, 理论塔板数按 α -亚麻酸、亚油酸峰计算均不低于 5000, 拖尾因子均在 0.95~1.05 内。见图 1。

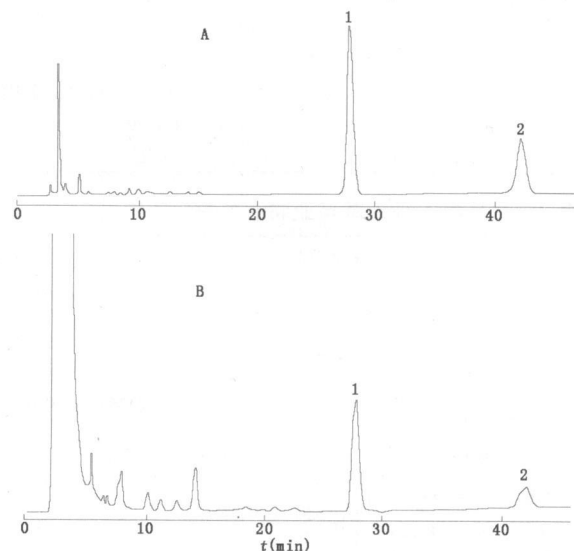
2.4 线性关系考察 分别取混合对照品溶液适量, 以甲醇依次稀释为 α -亚麻酸: 1.60、8.00、16.00、32.00、48.00、64.00 μ g/mL 亚油酸: 1.68、8.40、16.80、33.60、50.40、67.20 μ g/mL 摇匀。将各混合

对照品液分别进样 25 μ L 注入液相色谱仪, 测定。以峰面积积分值 (A) 对对照品浓度 (C) 进行线性回归, 得 α -亚麻酸、亚油酸回归方程分别为:

$$A = 2.394 \times 10^7 C - 2.623 \times 10^3, r = 0.9999$$

$$A = 1.066 \times 10^6 C - 2.927 \times 10^3, r = 0.9998$$

α -亚麻酸、亚油酸线性范围分别为: 1.60~64.00 μ g/mL, 1.68~67.20 μ g/mL。



A: 对照品; B: 供试品; 1: α -亚麻酸; 2: 亚油酸

图 1 HPLC 色谱图

2.5 精密度试验 精密吸取 α -亚麻酸、亚油酸混合对照品溶液 25 μ L 按上述色谱条件连续进样 6 次, α -亚麻酸、亚油酸的峰面积的 RSD 分别为 0.73% 和 2.10%, 表明方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 照 2.1 项下色谱条件, 精密吸取 4 号样品的供试品液 25 μ L 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定 α -亚麻酸、亚油酸峰面积得 RSD 分别为 2.33% 和 3.91%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取 4 号样品, 共 6 份, 精密称定, 置 5 mL 具塞量瓶中, 照 2.2(2) 项下方法制备。分别测定 α -亚麻酸、亚油酸的含量, α -亚麻酸、亚油酸的含量分别为 0.19% 和 0.08%, RSD 分别为 1.92% 和 2.33%, 表明方法重复性好。

2.8 加样回收率试验 精密称定 4 号样品 6 份, 置 5 mL 量瓶中, 分别准确加入 α -亚麻酸、亚油酸浓度分别为 0.40、0.42 mg/mL 的混合对照品 100 μ L 按 2.2(2) 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.9 样品测定 取不同来源的样品按 2.2(2) 项下制备供试品溶液, 进样 25 μ L 测定, 结果见表 2。

表 1 回收率试验结果 (n = 6)

成分	取样量 (mg)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
α -亚麻酸	25.1	0.0477	0.0400	0.0879	100.52		
	25.0	0.0475	0.0400	0.0875	100.00		
	24.9	0.0473	0.0400	0.0891	104.60		
	25.1	0.0477	0.0400	0.0914	109.27	104.68	3.62
	24.8	0.0471	0.0400	0.0895	105.82		
	25.0	0.0475	0.0400	0.0906	107.87		
亚油酸	25.1	0.0208	0.0420	0.0620	98.14		
	25.0	0.0207	0.0420	0.0609	95.59		
	24.9	0.0207	0.0420	0.0610	96.03		
	25.1	0.0208	0.0420	0.0639	102.54	98.72	2.76
	24.8	0.0206	0.0420	0.0630	100.99		
	25.0	0.0207	0.0420	0.0623	99.05		

表 2 样品中 α -亚麻酸与亚油酸含量测定结果 (n = 3)

编号	样品来源	α -亚麻酸 含量 (%)	亚油酸 含量 (%)	α -亚麻酸 + 亚油酸 (%)	α -亚麻酸 / 亚油酸
1	上海德华国药制品 有限公司 (2005020401)	0.1069	0.0823	0.1892	1.2989
2	上海雷允上中药饮片厂 (2005120085)	0.1316	0.0643	0.1959	2.0467
3	(2005040010)	0.1250	0.0612	0.1862	2.0425
4	上海虹桥药业有限公司 中药饮片厂 (040224)	0.1620	0.0943	0.2563	1.7179
5	上海蔡同德中药饮片厂 (03051208)	0.1877	0.0827	0.2704	2.2696
6	亳州市永刚饮片厂 有限公司 (060901)	0.0821	0.0556	0.1377	1.4766
7	吉林长春 (20070308)	0.1938	0.0979	0.2917	1.9796
8	四川重庆 (20070522)	0.1078	0.1089	0.2167	0.9899
9	黑龙江通河 (20070615)	0.0703	0.0544	0.1247	1.2923
10	安徽 (20070615)	0.0647	0.1155	0.1802	0.5602

3 讨论

测定结果表明, α -亚麻酸最高者 (7号) 高于含量最低者 (10号) 3倍以上, 亚油酸含量最高者 (10号) 高

于含量最低者 (9号) 2倍以上, α -亚麻酸、亚油酸两者总和最高者 (7号) 高于含量最低者 (9号) 2倍以上。除 8、10号样品外, 其他样品 α -亚麻酸 / 亚油酸含量比值 > 1 说明不同产地的马齿苋中 α -亚麻酸、亚油酸含量差异较大。现行版中国药典尚无马齿苋药材的含量测定项目, 不利于保证马齿苋药材的品质。我们认为有必要将亚麻酸、亚油酸含量指标纳入马齿苋药材的质量标准中, 对保证药材的品质具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] 孙希云, 刘 宁, 陈 波, 等. 马齿苋总黄酮抗氧化性质的研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(1): 108-110
- [2] 张温典, 姚钢乾, 张利平. 鲜马齿苋抗衰老效应的研究 [J]. 河北师范大学学报 (自然科学版), 2003, 27(2): 195-197
- [3] 董立巍, 王万银, 岳义田, 等. 马齿苋总黄酮抗小鼠缺氧作用及其机制研究 [J]. 中西医结合学报, 2005, 3(6): 450-454
- [4] 凌 晨. 马齿苋对 D-半乳糖衰老模型小鼠应激能力的影响 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(5): 361-363
- [5] 曹华娟, 曾 栋, 方学新, 等. 衍生气相色谱法同时检测分析亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸 AA、EPA、DHA [J]. 实用预防医学, 2006, 13(2): 295-297
- [6] 宋 萍, 王巧娥, 宋怀江, 等. 非衍生毛细管气相色谱法直接测定紫苏子油中的 α -亚麻酸 [J]. 分析试验室, 2005, 24(10): 88-90
- [7] 丁 怡, 唐 星. 柱前衍生 HPLC 法测定鸭胆子油中的脂肪酸含量 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 988-991
- [8] 项 琪, 周莉玲. HPLC 法测定鸭胆子油中的脂肪酸 [J]. 中草药, 2007, 37(3): 383-385
- [9] Michael P, Harald K, Elke von O, *et al.* Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range [J]. Clin Chem, 1993, 39(5): 825-832
- [10] 辛海量, 候银环, 李 敏, 等. 高效液相色谱法测定马齿苋提取物中 α -亚麻酸和亚油酸的含量 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6(11): 1174-1177

(收稿日期: 2009-11-03; 修回日期: 2010-03-11)

(本文编辑 魏 萍)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊参考文献的著录格式要求 (I)

专著 著录格式: 主要责任者. 书名 (版次) [文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年. 引文起页-讫页

[1] 付小兵, 王德文. 现代创伤修复学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 11: 162-207

标准 著录格式: 主要责任人. 文献题名 (版次) [文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年. 引文起页-讫页

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 162-207

期刊 著录格式: 主要责任人. 文献题名 [文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年, 卷号 (期号): 引文起页-讫页

[1] 王天然, 周 纬, 曾祥元, 等. 槲皮素干预实验性慢性肾衰的初步研究 [J]. 解放军药学报, 2007, 23(3): 182-184

(本刊编辑部)