

文章编号:1002-1124(2011)03-0017-03

HPLC 法测定火麻仁中 α - 亚麻酸的含量*

夏林波, 邓仕任, 郭莹

(辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 本文采用 HPLC 法对中药火麻仁中 α - 亚麻酸进行了含量测定。确定色谱条件为: 色谱柱 Agilent Eclipse XDB- C_{18} (150mm \times 4.6mm, 5 μ m); 流动相乙腈 - 水(体积比为 80:20); 流速 1.0mL \cdot min $^{-1}$; 检测波长 210nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C。在此条件下, α - 亚麻酸甲酯与其它组分得到良好的分离, 线性范围为 10.5~168 μ g ($r=0.9998$), 平均加样回收率为 97.26% (RSD=0.84%)。

关键词: 火麻仁; α - 亚麻酸; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.7 TS225.1

文献标识码: A

Determination of α -linolenic acid in hemp seed by HPLC*

XIA Lin-bo, DENG Shi-ren, GUO Ying

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: The method of determination α -linolenic acid in hemp seed by HPLC was established in this thesis. The chromatography was carried out on an Agilent Eclipse XDB- C_{18} column (150mm \times 4.6mm, 5 μ m) with acetonitrile-water ($V:V=80:20$) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL \cdot min $^{-1}$. The detection wavelength was set at 210nm. α -linolenic acid separated thoroughly from other components on this condition, the calibration curve was linear within the range of 10.5~168 μ g ($r=0.9998$) and the average recoveries were 97.26% (RSD=0.84%).

Key words: hemp seed; α -linolenic acid; high performance liquid chromatography

火麻仁别名麻子、麻子仁、大麻子,为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟种仁,是一味药亦食的润下药,其性味归经甘、平,主治肠燥便,血虚津亏等症^[1]。现代研究表明,火麻仁中油脂含量非常丰富(约占 30%),火麻仁油脂对便秘和腹泻有良好的双向治疗作用^[2],因此,建立火麻仁中油脂成分的分析方法对火麻仁的系统研究具有重要意义。文献中关于火麻仁油脂中脂肪酸的化学成分研究多采用 GC-MS 法^[3],然而该方法对仪器要求较高,考虑到 HPLC 的通用性和普及性,本文采用柱前衍生化,结合 HPLC 技术,建立了火麻仁药材中的特征成分 α - 亚麻酸的含量测定方法。

1 实验部分

收稿日期:2010-12-22

基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究项目(No. 2008450);辽宁中医药大学优秀青年药学人才基金(yxrc0912)

作者简介:夏林波(1977-),女,讲师,博士,主要研究方向:中药分析。

导师简介:邓仕任(1979-),男,副教授,博士,主要研究方向:中药质量标准规范化,中药炮制。

1.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10Avp 高效液相色谱仪;AR2140 电子分析天平(力能);RE52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ2200 型超声波清洗器(舒美),HH-4 数显恒温水浴锅(国华)。

α - 亚麻酸甲酯对照品(中国药品生物制品检定所);火麻仁购于河北安国,经辽宁中医药大学鉴定教研室翟延君教授鉴定为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实;色谱纯甲醇(天津科密欧);二次重蒸水,其它试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB- C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈 - 水(80:20);检测波长:210 nm;流速:1.0 mL \cdot min $^{-1}$,柱温:30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取 α - 亚麻酸甲酯对照品 105.0 mg,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀即得。(α - 亚麻酸甲酯 10.5 mg \cdot mL $^{-1}$)。

1.4 火麻仁油脂的提取

准确称取火麻仁药材粉末(过 40 目筛)5.00 g,

置具塞锥形瓶中,加入75mL石油醚,冷浸30min后,超声振荡30min,过滤后取滤液。重复上述提取过程3次,滤液合并后减压蒸干溶剂,得火麻仁油脂,收率31.2%。

1.5 火麻仁样品的甲酯化

准确称取火麻仁油脂0.20g,置25mL烧瓶中,加入5%NaOH-CH₃OH溶液4mL,60℃水浴回流30min(油滴完全消失),冷却后加入14%BF₃-CH₃OH甲醇溶液5mL,继续回流2min,继而加入4mL正庚烷回流5min,冷却,加入5mL饱和NaCl溶液振荡后分层,精密吸取上清液1mL,挥干溶剂,残留物用甲醇定容至1mL,微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 线性关系考察

精密吸取对照品溶液1、4、8、12、16 μ L,注入高效液相色谱仪中,按1.2项下色谱条件测定色谱峰面积,以绝对进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,并计算线性回归方程为 $Y=3.96 \times 10^5 X + 1.65 \times 10^7$, $r=0.9998$ 。结果表明 α -亚麻酸甲酯在10.5~168 μ g范围内,其峰面积与进样量有良好的线性关系。

2.2 精密度试验

取同一供试品溶液,按1.2项下色谱条件,连续进样5次,测得 α -亚麻酸甲酯峰面积值的相对标准偏差为0.70%,表明仪器精密度良好。

2.3 稳定性试验

取同一新鲜制备的供试品溶液,在0、2、4、6、8、10h各进样10 μ L,测得 α -亚麻酸甲酯峰面积的相对标准偏差0.90%,表明 α -亚麻酸甲酯在10h内稳定。

2.4 重复性试验

取同一供试品5份,按1.4项下方法制备5份供试液,分别测定 α -亚麻酸甲酯含量,相对标准偏差分别为0.80%,表明方法重复性较好。

2.5 加样回收率试验

取已知含量(α -亚麻酸含量为83.9mg·g⁻¹)的火麻仁粉末5份,各约0.64g,分别加入 α -亚麻酸甲酯对照品溶液(10.5mg·mL⁻¹)5 μ L,按1.4、1.5项制备供试液,求得 α -亚麻酸甲酯平均加样回收率为97.26%,相对标准偏差为0.84%。

2.6 样品测定

平行取3份火麻仁药材粉末5g,按1.4、1.5项分别制成供试品溶液。取供试品溶液10 μ L注入高效液相色谱仪测定含量,结果显示该批次火麻仁药材中 α -亚麻酸含量为83.9mg·g⁻¹,色谱图显示该峰峰型对称,与相邻峰达到基线分离。具体测定结果见表1,样品色谱图见图1。

表1 α -亚麻酸含量测定结果

编号	称样量/g	α -亚麻酸含量/mg·g ⁻¹	平均值/mg·g ⁻¹	RSD%
1	5.0023	83.0		
2	5.0005	84.7	83.9	1.04
3	5.0058	84.2		

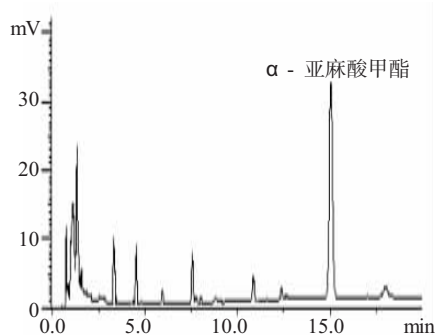


图1 火麻仁供试品溶液高效液相色谱图

Fig.1 HPLC of hemp seed sample

3 结论

现代研究证明,多不饱和脂肪酸有明显降低高密度脂蛋白血清胆固醇作用,进而减少高血压、心脏病及中风等疾病的发病率,在食品、药品等领域具有广泛的用途^[4]。火麻仁中油脂含量丰富(约占30%),且不饱和脂肪酸(如 α -亚麻酸、亚油酸)含量很高,约占油脂总量的85%以上,其油脂被认为是火麻仁润肠通便作用的有效成分,因而建立油脂的成分分析及含量测定方法对火麻仁的质量控制具有重要意义。本文采用HPLC法,建立了火麻仁中亚麻酸含量的测定方法,该法简便、易行、适用范围广,经方法学考察证明准确、可靠、重复性好,可作为火麻仁中 α -亚麻酸的质量控制方法。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社, 2010. 74.
- [2] 张明发, 朱自平. 火麻仁的消化系统药理研究概述[J]. 药学实践杂志, 1997, 15(5): 267.

(下转第20页)

体积比 3/1), 滴定前可加入 10mL 乙醇或丙酮, 滴加 3~5D 1% 酚酞指示剂, 以 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 或 KOH 乙醇标准滴定溶液进行滴定, 滴定至浅粉色出现, 30s 内仍不褪色即为终点。用同样方法同时做一空白试验。

2 结果与讨论

2.1 羟值的定义及表示法

羟值是样品中羟基含量的量度。以中和 1g 样品中羟基酰化时所耗用酸所需的 KOH 的质量(mg) 表示, 单位是 $\text{mgKOH}\cdot\text{g}^{-1}$ 。一般来说, 1mol 羟基对应需耗用 1mol 的 KOH。

2.2 试样中所测羟值的表示法

$$\text{羟值}(\text{mgKOH}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{(V_{\text{空}} - V_{\text{样}}) \times 56.10 \times c}{m}$$

式中: $V_{\text{空}}$: 空白试验时 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 或 KOH 标准滴定溶液用量, mL; $V_{\text{样}}$: 滴定试样时 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 或 KOH 标准滴定溶液用量, mL; C : NaOH 或 KOH 标准滴定溶液的实际浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; m : 试样的质量, g; 56.10: KOH 的摩尔质量, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

测定结果以两次平行测定的算术平均值表示, 精确到小数点后第二位。羟值大于 $80\text{mgKOH}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, 精确到小数点后第一位。

2.3 测定结果允许差

两次平行测定结果之差不得大于 $0.5\text{mgKOH}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.4 水对测试结果的影响

由于水会消耗酰化剂中的酸酐, 故样品中的水分含量应尽可能低, 最好低于 0.2%, 至少低于

0.5%。配制酰化剂的乙酸乙酯中的水分含量应低于 0.1%。

2.5 称样量对测定结果的影响

要按规定进行称样, 才能保证酰化反应完全及结果的准确。即必须使样品所消耗的碱液大于空白试验的四分之三, 否则要重新称样。

2.6 酰化反应温度的控制对测定结果的影响

酰化温度在 30°C 左右, 要保证受热均匀, 且温度不能过高, 酰化剂中的高氯酸加热会引起分解, 失去作用, 使酰化反应不彻底, 使测试结果不准确。

2.7 标准滴定溶液的滴加速度对测定结果的影响

在用标准滴定溶液进行滴定时, 一定不要滴的过快, 要以一定的速度匀速滴加, 滴的过快会导致酸性物质被包裹住, 反应不完全, 标准滴定溶液用量过少, 使测试结果偏高。

3 结论

聚酯多元醇中羟值的测定选择了醋酸酐室温酰化法。这种测定羟值的方法既简便又快速, 只要在操作过程中控制好实验条件就能达到结果的准确性, 是一种较好的测定聚酯多元醇中羟值的方法。

参 考 文 献

- [1] GB/T 7193-2008 不饱和聚酯树脂羟值测定方法[S].
- [2] GB/T 12008.3-2009 塑料 聚醚多元醇(第3部分)羟值的测定[S].
- [3] HG/T 2709-1995 聚酯多元醇中羟值的测定[S].

(上接第 18 页)

[3] 张媛, 王喆之. 大麻仁脂溶性成分的 GC-MS 分析[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 195.

[4] 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.