

## 柱前皂化 HPLC 法测定不同产地桃仁中亚油酸和油酸的量

刘 威<sup>1,2</sup>, 张 帅<sup>1</sup>, 付小环<sup>1</sup>, 李红娟<sup>1</sup>, 萧 伟<sup>1\*</sup>

1. 江苏康缘药业股份有限公司博士后工作站, 江苏 连云港 222001

2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

**摘要:** **目的** 建立柱前皂化 HPLC 测定不同产地桃仁脂肪酸中亚油酸、油酸的测定方法, 为有效控制和科学评价桃仁药材质量提供依据。**方法** 桃仁以 0.5 mol/mL 氢氧化钾乙醇溶液皂化提取亚油酸、油酸, 利用 HPLC 测定桃仁中亚油酸、油酸的量。色谱柱: Waters-Symmetry-RP-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (92:8), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 205 nm, 柱温 30 °C。**结果** 亚油酸进样量在 8.193 2~163.864 μg/mL 具有良好的线性关系 ( $r=0.9997$ ), 平均回收率为 97.3%, RSD 为 2.7%; 油酸进样量 26.4~528.0 μg/mL 具有良好的线性关系 ( $r=0.9995$ ), 平均回收率为 98.0%, RSD 为 2.3%。**结论** 本方法准确, 重复性好, 简便易行, 适用于桃仁脂肪酸中亚油酸、油酸的同时测定。

**关键词:** 桃仁; 亚油酸; 油酸; 柱前皂化; HPLC

中图分类号: R286.022

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)14-2000-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.025

## Determination of linolic acid and oleic acid in *Persicae Semen* from different habitats by precolumn saponification HPLC method

LIU Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Shuai<sup>1</sup>, FU Xiao-huan<sup>1</sup>, LI Hong-juan<sup>1</sup>, XIAO Wei<sup>1</sup>

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

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

**Abstract: Objective** To develop a precolumn saponification HPLC method for determining linolic acid and oleic acid in *Persicae Semen* from different habitats and to provide the basis for controlling the herb quality quickly and accurately. **Methods** The linolic acid and oleic acid in *Persicae Semen* were saponified with 0.5 mol/mL KOH/EtOH as saponifier. HPLC method was used to determine the contents of linolic acid and oleic acid. The column was Waters-Symmetry-RP-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% aqueous phosphoric acid (92:8); The flow rate was 1.0 mL/min; The absorbance was monitored at 205 nm; The column temperature was 30 °C. **Results** The calibration curves of linolic acid and oleic acid were in a good linearity over the ranges of 8.193 2—163.864 μg/mL ( $r = 0.9997$ ) and 26.4—528.0 μg/mL ( $r = 0.9995$ ), and the average recoveries of linolic acid and oleic acid were 97.3% and 98.0% with RSD values of 2.7% and 2.3%, respectively ( $n = 6$ ). **Conclusion** This method is simple, sensitive, and accurate, which is suitable for the simultaneous determination of linolic acid and oleic acid in *Persicae Semen*.

**Key words:** *Persicae Semen*; linolic acid; oleic acid; precolumn saponification; HPLC

桃仁来源于蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch. 或山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子。为常用活血化瘀药, 具有活血化瘀、润肠通便、止咳平喘的功效<sup>[1-2]</sup>, 《中国药典》2010 年版以苦杏仁苷的量为桃仁的质量评价指标<sup>[3]</sup>, 但专属性较低, 桃仁的化学成分复杂<sup>[4]</sup>, 其主要成分为脂质体、甾萜、

氨基酸和蛋白质、挥发油、甾体和黄酮及其糖苷类化合物, 桃仁生品中脂溶性成分量占 46.2%~65.49%, 其中又以亚油酸、油酸最为突出, 文献中对桃仁中脂肪酸的测定多采用 GC 和 GC-MS 法, 但在分析中由于柱温过高容易引起油酸、亚油酸双键断裂或发生异构化现象。现采用 HPLC 对桃仁中亚油酸、油酸进

收稿日期: 2013-01-27

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09504-004)

作者简介: 刘 威 (1973—), 女, 博士, 从事药物分析研究。E-mail: liuwei01@126.com

\*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士。E-mail: wzhhz-nj@tom.com

行测定<sup>[3]</sup>, 为桃仁的质量控制、化学成分研究、开发利用等提供新的方法。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, G1322A 四元梯度泵, G1367B 自动进样系统, G1365D MWD 检测器及 G1316A 柱温箱; Satorius BP 211D 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司 0.01 mg); Mettler Toledo AB 204-S 电子分析天平 (Mettler Toledo 仪器有限公司 0.1 mg); Millipore (美国 Millipore 公司) USA 纯净水发生器, 超声振荡器 (昆山市超声仪器有限公司)。

亚油酸 (批号 111622-200602), 油酸 (批号 111621-201004) 对照品均购自中国药品生物制品检定所, 乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 磷酸为色谱纯 (天津科密欧化学试剂有限公司), 纯净水为自制, 其余试剂均为国产分析纯。

桃仁购自安徽亳州、河北安国等各大药材市场, 样品经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为桃 *Prunus persica* (L.) Batsch. 和山桃 *Prunus daridiana* (Carr.) Franch 的干燥成熟种子, 见表 1。其同号样品保存于江苏康缘药业股份有限公司标本室。

表 1 样品来源  
Table 1 Sources of samples

编号	品种	产地
1	山桃 <i>Prunus daridiana</i>	内蒙
2	山桃	山东
3	山桃	河北
4	山桃	河北
5	山桃	北京
6	山桃	北京
7	山桃	北京
8	山桃	甘肃
9	山桃	甘肃
10	山桃	陕西
11	山桃	陕西
12	山桃	陕西
13	山桃	山西
14	山桃	山西
15	山桃	山西
16	山桃	山西
17	桃 <i>P. persica</i>	甘肃
18	桃	湖北
19	桃	山东
20	桃	山东
21	桃	山东
22	桃	山东
23	桃	新疆
24	桃	新疆
25	桃	新疆
26	桃	新疆

## 2 方法与结果

### 2.1 混合对照品溶液的制备

取对照品亚油酸、油酸适量, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成亚油酸 4.096 6 mg/mL, 油酸 13.200 0 mg/mL 对照品储备液, 再分别精密吸取适量, 配制成含亚油酸 163.864 0 μg/mL, 油酸 528.000 0 μg/mL 混合对照品储备液。再用甲醇逐级稀释成一系列浓度的混合对照品溶液 (质量浓度分别为亚油酸: 8.193 2、16.386 4、49.159 2、81.932 0、131.091 2、163.864 0 μg/mL; 油酸: 26.400 0、52.800 0、158.400 0、264.000 0、422.400 0、528.000 0 μg/mL)。

### 2.2 供试品溶液的制备

首先对皂化条件进行优选: 根据影响皂化反应的因素, 参考相关文献报道的反应条件<sup>[3-4]</sup>, 分别单因素考察不同体积的 0.5 mol/L 氢氧化钾乙醇溶液、皂化反应温度和皂化反应时间对油酸、亚油酸测定结果的影响, 以筛选各因素的最佳范围。通过筛选测定结果, 确定供试品溶液的制备方法: 桃仁碾碎成粗粉, 取粉末约 0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加 0.5 mol/mL 的氢氧化钾乙醇溶液 20 mL, 无水乙醇 40 mL 在 90 °C 下回流皂化 2 h, 放冷, 加入酚酞试液 3 滴, 加 6 mol/mL 的盐酸溶液至红色刚好褪去, 溶液转移至 100 mL 量瓶中, 用无水乙醇洗涤圆底烧瓶, 洗涤液并入量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 4 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液即得。

### 2.3 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Waters-Symmetry-RP-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水 (92:8); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 205 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 亚油酸、油酸色谱峰能够与其他色谱峰达到基线分离, 混合对照品、桃仁样品色谱图见图 1。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系** 分别精密吸取“2.1”项下各浓度的混合对照品溶液 10 μL, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 记录峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 对应的对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行回归分析, 得亚油酸回归方程  $Y=15.515X+12.706$ , 线性范围为 8.193 2~196.64 μg/mL,  $r=0.999 7$ ; 油酸回归方程  $Y=2.613 6 X+11.864$ , 线性范围为 26.4~633.6 μg/mL,  $r=0.999 5$ 。

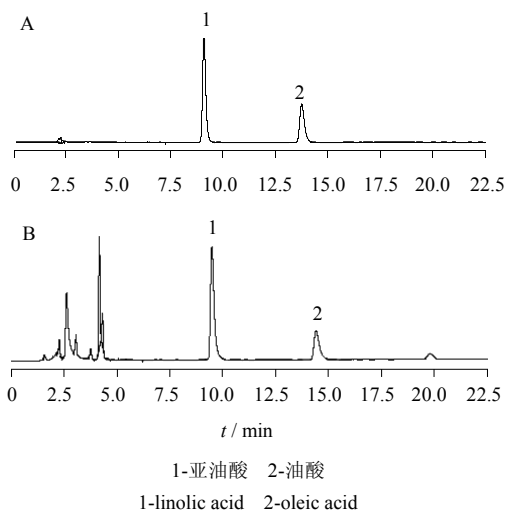


图 1 混合对照品 (A)、桃仁样品 (B) 高效液相色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Persicae Semen* sample (B)

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液 (26 号) 在“2.3”项色谱条件下连续进样 6 次, 测定各亚油酸、油酸峰面积的 RSD 分别为 0.5%、1.5%。确认仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 按“2.2”项下方法制备 6 份桃仁 (26 号) 的供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$  进行测定。结果桃仁样品中亚油酸、油酸量的平均值分别为 10.3%、23.2%; RSD 分别为 2.7%、2.9% ( $n=6$ )。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一供试品 (26 号) 溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24、48 h, 在“2.3”项色谱条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$  进行测定。所得亚油酸、油酸峰面积的 RSD 分别为 0.5%、1.9%。确认供试品溶液在室温下 48 h 内稳定性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 取 6 份已测定的桃仁粗粉 (亚油酸 96.73 mg/g, 油酸 231.46 mg/g), 每份约 0.25 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 分别精密加入与样品含量相当的亚油酸、油酸的对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$  进行测定, 计算加样回收率。亚油酸的回收率为 97.3%, RSD 为 2.7%; 油酸的回收率为 98.0%, RSD 为 2.3%。

## 2.5 样品测定

精密称取 26 批桃仁样品粉末 (每份 0.5 g), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在“2.3”项色谱条件下测定分析物的峰面积, 以外标法计算, 结果见表 2。

表 2 26 批样品中亚油酸和油酸的测定结果 ( $n=3$ )

Table 2 Determination of linolic acid and oleic acid content in 26 batches of *Persicae Semen* samples ( $n=3$ )

编号	油酸 / ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	亚油酸 / ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	总量 / ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	346.6	119.2	465.8
2	286.1	111.1	397.2
3	256.7	97.6	354.3
4	286.7	72.4	359.1
5	293.6	114.3	407.9
6	310.9	94.6	405.5
7	296.9	103.3	400.2
8	306.2	113.5	419.7
9	306.1	105.8	411.9
10	305.8	92.3	398.1
11	284.8	108.1	392.9
12	251.7	97.6	349.3
13	281.9	95.8	377.7
14	286.1	111.0	397.1
15	294.9	114.3	409.2
16	287.3	106.6	393.9
17	303.9	87.1	391.0
18	223.1	80.2	303.3
19	285.6	64.3	349.9
20	192.5	70.7	273.2
21	251.2	68.0	319.2
22	270.2	54.7	324.9
23	202.1	68.6	370.7
24	209.9	68.9	377.7
25	257.5	65.1	322.6
26	231.4	96.7	328.1

从实验结果可以看出, 桃仁中油酸量高于亚油酸的量, 油酸几乎是亚油酸的 3 倍, 部分地区达到 4 倍以上, 山桃仁两种脂肪酸最低量是 354.3 mg/g, 最高量 465.8 mg/g; 桃仁最低量 273.2 mg/g, 最高量 391.0 mg/g, 不同地区桃仁两脂肪酸的量不同, 但同一地区脂肪酸量基本接近。

## 3 讨论

对种子中油脂的测定, 通常是先用石油醚将脂肪酸提出, 然后取一定量油脂皂化或衍生化进行测定<sup>[5-6]</sup>, 本实验直接将样品皂化提取亚油酸、油酸, 两种方法提取率相当, 故样品直接皂化处理省去转移过程, 减少了操作误差。

文献报道<sup>[7-8]</sup>及本次实验结果, 得出桃仁中不饱

和脂肪酸占药材的40%以上,而脂肪酸中主要含有亚油酸、油酸,26批桃仁样品中的不饱和脂肪酸油酸、亚油酸的平均总量高达30%以上,不同产地和批次桃仁中油酸、亚油酸的量相对稳定,山桃仁中不饱和脂肪酸的量相对于家桃仁高些。

现代研究表明不饱和脂肪酸有明显降低低密度脂蛋白血清胆固醇的作用,进而减少高血压、心脏病及中风等疾病的发病率,同时不饱和脂肪酸在维护生物膜的结构和功能方面有重要作用<sup>[3]</sup>。因此,可以采用不饱和脂肪酸油酸、亚油酸的总量作为控制桃仁质量的指标之一。本实验首次对桃仁中亚油酸、油酸采用柱前皂化HPLC测定其量,相对以往以苦杏仁苷单一化学成分作为质控指标更加全面。为桃仁药材质量的分析与控制提供了更可靠的方法和依据。

#### 参考文献

[1] 王仁芳,范令刚,高文远,等.桃仁化学成分与药理活

性研究进展[J].现代药物与临床,2010,25(6):426-429.

[2] 中国药典[S].一部.2010.

[3] 裴瑾,颜永刚,万德光.桃仁中脂肪酸的含量分析研究[J].中药材,2009,32(6):908-910.

[4] 秦建平,陆艳芹,罗雪磊,等.HPLC同时测定火麻仁中 $\alpha$ -亚麻酸、亚油酸和油酸含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):71-73.

[5] 侯冬岩,回瑞华,李铁纯,等.莱菔子中脂肪酸及主成分 $\gamma$ -亚麻酸的分析[J].质谱学报,2011,32(2):108-111.

[6] 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.

[7] 王远,郭萍,李晖,等.RP-HPLC法同时测定紫苏子中 $\alpha$ -亚麻酸和亚油酸的含量[J].药物分析杂志,2012,32(2):252-254.

[8] 袁丹,胡爽,毕开顺,等.桃仁药材质量评价法的研究[J].中国药学杂志,2003,38(1):53-56.

## 内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成

谭燕<sup>1</sup>, 贾茹<sup>1</sup>, 陶金华<sup>2</sup>, 杨念云<sup>1</sup>, 段金殿<sup>1</sup>, 钱大玮<sup>1</sup>, 江曙<sup>1\*</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 南通大学, 江苏 南通 226019

**摘要:** 内生真菌是药用植物内环境重要的组成部分, 与药用植物长期共进化过程中形成了一种稳定的互利共生关系。内生真菌诱导子能够快速、高度专一和选择性地诱导药用植物特定基因的表达, 进而活化特定次生代谢途径, 调控药用植物次生代谢物的生物合成, 显著促进药用植物活性成分的积累。从诱导子信号的识别、信号转导、基因表达和关键酶的激活等方面对内生真菌诱导子的作用机制进行综述, 以期通过利用内生真菌诱导子促进药用植物细胞高效合成和积累活性成分, 为研究药用植物次生代谢的调控提供新的研究思路和方法。

**关键词:** 内生真菌; 诱导子; 活性成分; 生物合成; 药用植物

**中图分类号:** R282.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2013)14-2004-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.026

## Regulation on biosynthesis of active constituents in medicinal plants by endophytic fungal elicitor

TAN Yan<sup>1</sup>, JIA Ru<sup>1</sup>, TAO Jin-hua<sup>2</sup>, YANG Nian-yun<sup>1</sup>, DUAN Jin-ao<sup>1</sup>, QIAN Da-wei<sup>1</sup>, JIANG Shu<sup>1</sup>

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Nantong University, Nantong 226019, China

**Key words:** endophytic fungi; elicitor; active constituents; biosynthesis; medicinal plants

植物内生真菌是指在植物体内完成其生活史的部分或全部, 生长于植物组织细胞间, 分布于根、茎、叶和种子中, 但又不引起任何病症的微生物<sup>[1-2]</sup>。内生真菌是植物内环境重要的组成部分, 与植物长期共进化过程中形成了一种稳定的互利共生关系, 具有促进植物生长、增强植物对病虫害的抗性以及其他生物活性, 使植物具备了优良的抗逆性和生长特性; 尤其是内生真菌能够促进植物次生代谢物的生物合成, 在药用植物中的作用显著<sup>[3-6]</sup>。药用植物内生真菌具有丰富的生物多样性, 在药用植物不同生长期, 由于其生理状态及气候条件的变化, 影响内生真菌的种群和分布, 而这种种群结构的动态变化显著影响药用植物的生长与代谢<sup>[7-9]</sup>。

### 1 内生真菌诱导子的种类与功能

诱导子是一种能诱发烟草、拟南芥、大豆、水

稻等植物细胞中防御基因表达及过敏反应的化学物质, 是植物抗病生理过程中诱发植物产生抗毒素和引起超敏反应的因子。目前主要根据两种方法对诱导子进行分类: 一种是根据其来源分为生物诱导子和非生物诱导子; 另一种是根据其在细胞内或细胞外的形成而将其分为内源性诱导子和外源性诱导子。生物诱导子是指植物在防御过程中为对抗微生物感染而产生的物质, 包括分生孢子、降解细胞壁的酶类、细胞壁碎片、有机体产生的代谢物等。非生物诱导子是指所有非植物细胞中的天然成分, 但又能触发植物细胞形成抗毒素信号的物质。内源性诱导子主要是来自植物细胞的分子, 多为植物细胞壁在微生物作用下的降解产物及沉积在细胞壁上的木质素等。近年来, 研究发现内生真菌能够产生一类可诱导药用植物细胞生物合成次生代谢产物的物

收稿日期: 2012-12-29

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAI09B05-1); 国家自然科学基金资助项目 (81072996, 81102743)

\*通信作者 江曙, 男, 博士, 副教授。主要从事微生物与中药品质的研究。E-mail: jiangshu2000@163.com