

分光光度法测定巴豆油聚乳酸羟基乙酸微球中总油的含量

李云霄^{1*}, 黄宝群², 孙洪胜^{3#}(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东电力中心医院, 济南 250001; 3. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1028-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.25

摘要 目的: 建立测定巴豆油聚乳酸羟基乙酸微球(简称巴豆油微球)中总油含量的方法。方法: 巴豆油微球经碱液-超声破解后, 应用异构化反应将其主成分亚油酸转变为共轭亚油酸, 采用紫外分光光度法测定其吸光度, 通过换算系数(单位质量浓度共轭亚油酸与巴豆油的吸光度比值)代入回归方程求得巴豆油微球中总油的含量。结果: 共轭亚油酸的质量浓度在 1.571~9.427 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系($r=0.999\ 9$); 平均加样回收率为 100.45%, $\text{RSD}=0.60\%$ ($n=6$); 换算系数 $K=2.201 \pm 0.043$ 。结论: 本方法准确、简便, 可以作为巴豆油微球中总油的含量测定方法。

关键词 巴豆油; 微球; 分光光度法; 异构化; 共轭亚油酸; 含量测定

Determination of Total Oil Content in Croton Oil PLGA Microspheres by Spectrophotometry

LI Yun-xiao¹, HUANG Bao-qun², SUN Hong-sheng³(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Central Hospital of Shandong Electric Power, Jinan 250001, China; 3. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study a method for the determination of total oil content in Croton oil (poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA) microspheres. METHODS: Croton oil microspheres broken by lye-ultrasonic, and main ingredient linoleic acid turned into conjugated linoleic acid through isomerization reaction. UV spectrophotometry was used to determine the absorbance, and total oil content of Croton oil microspheres was calculated by substituting conversion factor (ratio of unit concentration of conjugated linoleic acid to absorbance of croton oil) into standard curve equation. RESULTS: The linear range of conjugated linoleic acid was 1.571-9.427 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.999\ 9$) with average recovery of 100.45% ($\text{RSD}=0.60\%$, $n=6$); conversion factor K was equal to 2.201 ± 0.043 . CONCLUSION: The method is accurate and simple, and it can be used for the determination of total oil content in Croton oil PLGA microspheres.

KEY WORDS Croton oil; Microspheres; Spectrophotometry; Isomerization; Conjugated linoleic acid; Content determination

表 4 不同批次连翘叶中 4 种成分的含量测定结果 ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Tab 4 Results of content determination of 4 ingredients in different batches of the leaves of *F. suspensa* ($\mu\text{g}/\text{g}$)

批号	异瓣皮苷	金丝桃苷	绿原酸	鞣皮素
100601	118	43.5	195	34.8
100602	106	39.7	225	33.4
100603	95	35.8	206	30.7
110601	143	50.2	188	38.4
110701	128	45.8	193	41.3
110702	130	46.2	228	37.2

合物峰形较好, 且响应值稳定。最终确定以乙腈-水(含 1 mmol/L 乙酸铵和 0.15% 甲酸)为流动相, 进行梯度洗脱。

参考文献

- [1] 丁冈, 刘延泽. 中药连翘及其同属植物的研究近况[J]. 中药材, 1994, 17(10): 42.
- [2] 段飞, 张双民, 杨建雄, 等. 连翘叶提取物抑菌作用的研究[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(2): 66.

* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂新剂型、新技术。E-mail: yiliner2100@163.com

通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 药物新剂型、新技术与新药研发。电话: 0531-82929059。E-mail: shs7777@163.com

- [3] 杨建雄, 朱淑云, 李发荣. 连翘叶茶的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 120.
- [4] 柴渭莉, 刘静, 杨建雄, 等. 连翘叶提取物对油脂抗氧化作用的研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 32(9): 187.
- [5] 杨建雄, 刘静, 李发荣, 等. 连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J]. 营养学报, 2004, 26(1): 65.
- [6] 黄亚亚, 杨建雄, 赵咏梅. 连翘叶黄酮对力竭游泳恢复小鼠的抗疲劳作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1 019.
- [7] 柴渭莉, 杨建雄, 周俊芳, 等. 连翘叶苷类成分对力竭游泳小鼠心肌和骨骼肌超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及超微结构的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(5): 609.
- [8] 张杲, 李发荣, 段飞, 等. 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和金丝桃苷的含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 790.
- [9] 张淑蓉, 裴香萍, 闫艳, 等. 不同采收期青翘和连翘叶中活性成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2 940.
- [10] 朱凤云, 陈志红, 王春雷, 等. 连翘叶采收期探讨[J]. 中药材, 2002, 25(8): 547.

(收稿日期: 2012-04-06 修回日期: 2012-07-09)

巴豆为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实,味辛,性热,有大毒,归胃、大肠经^[1],具有峻下积滞、逐水消肿之功^[2],临床用于治疗乳肺癌、肝癌、卵巢癌、白血病等肿瘤中属癌毒内壅痰瘀互结者^[3]。本品所含巴豆油既是有毒成分又是有效成分^[4]。研究表明,巴豆油乳剂作大鼠移植性皮肤癌内注射,能引起癌体退化,并延缓皮肤癌的发展,因而认为巴豆油中含有抗癌活性物质^[5];巴豆具有抗人类免疫缺陷病毒(HIV-1)活性^[6]、抗结核分枝杆菌活性^[7]。亚油酸为巴豆油中的主要成分,占52%~56%^[8-9],对其常用的检测方法有气相色谱(GC)法和高效液相色谱(HPLC)法^[10]等,但都需要柱前衍生化,操作烦琐。笔者采用乳化-溶剂挥发法制备出巴豆油聚乳酸羟基乙酸(PLGA)微球(下文简称“巴豆油微球”),使巴豆油以高度分散的状态存在,具备了性质稳定、外表美观等特点;在此基础上,建立了采用分光光度法测定巴豆油微球中总油含量的方法,为含巴豆油制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

U2800型紫外分光光度计(日本日立公司);KDM型可控温电热套(山东鄞城华鲁电热有限公司);CP225D型电子天平[奥豪斯国际贸易(上海)有限公司];SK5200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

巴豆油微球(批号:120520、120522、120525)及不含巴豆油的空白微球均由笔者自制;巴豆油(江西省吉水县中南天然香料厂);共轭亚油酸对照品(德国Sigma公司,批号:1001173420,纯度≥99%);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 巴豆油的紫外光谱分析

2.1.1 巴豆油的紫外扫描 精密称取巴豆油32.18 mg,置50 ml量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取1.0 ml,以无水乙醇定容至25 ml,摇匀,得巴豆油稀释液(25.74 μg/ml)。以无水乙醇为空白溶剂,进行200~400 nm全波长紫外扫描。紫外吸收光谱图见图1。结果表明,巴豆油无水乙醇溶液的最大紫外吸收波长为208 nm。

2.1.2 KOH乙二醇溶液的制备 准确称取KOH 0.75 g,置于

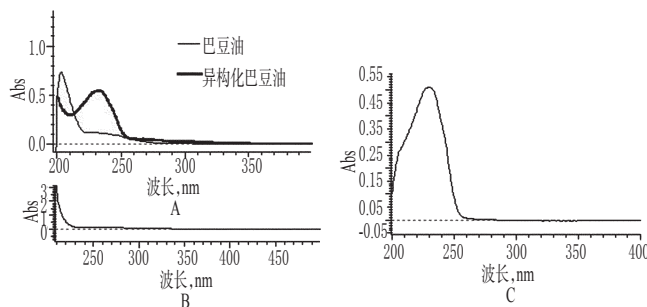


图1 紫外吸收光谱图

A. 巴豆油; B. 空白碱液; C. 共轭亚油酸对照品

Fig 1 UV absorption spectrum

A. Croton oil; B. blank alkali lye; C. conjugated linoleic acid control
10 ml量瓶中,加乙二醇溶解并稀释至刻度,即得7.5% (m/V)的KOH乙二醇溶液。

2.1.3 异构化巴豆油的制备及紫外扫描 精密称取巴豆油58.25 mg,置于圆底烧瓶中,加入7.5% KOH乙二醇溶液5.8

ml,180℃加热2 h,速冷后转入50 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,精密吸取0.2 ml,置10 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,即得异构化巴豆油乙醇溶液(23.30 μg/ml)。以无水乙醇为空白溶剂,进行200~400 nm全波长紫外扫描。紫外吸收光谱图见图1A。结果表明,异构化反应后巴豆油的主成分结构发生转变,最大紫外吸收波长红移至231.5 nm。

2.1.4 KOH乙二醇溶液的紫外扫描 量取7.5% KOH乙二醇溶液5 ml,按“2.1.3”项下方法自“180℃加热2 h”开始制备,再进行200~400 nm全波长紫外扫描。紫外吸收光谱图见图1B。结果表明,空白碱液在同样制备条件下未生成干扰物质。

2.2 巴豆油微球的紫外光谱分析

2.2.1 方法专属性考察 分别精密称取空白微球、巴豆油微球各30 mg,置于圆底烧瓶中,各加7.5% KOH乙二醇溶液5 ml,超声(功率:200 W,频率:53 kHz)60 min,待微球破解后于180℃加热2 h,速冷后转入50 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,精密吸取1.0 ml,置25 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,即得。以无水乙醇为空白溶剂,进行200~400 nm全波长紫外扫描。巴豆油微球的紫外吸收光谱图见图2。结果表明,巴豆油微球所用辅料无干扰。

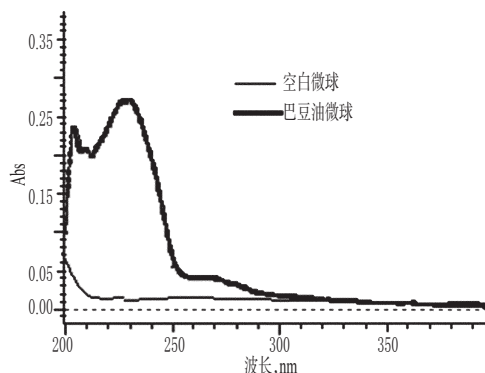


图2 巴豆油微球的紫外吸收光谱图

Fig 2 UV absorption spectrum of Croton oil microspheres

2.2.2 换算系数(K)的测定^[11] 取共轭亚油酸乙醇溶液、异构化巴豆油乙醇溶液各适量,分别测定吸光度(A)值并计算K值(即单位质量浓度共轭亚油酸与异构化巴豆油的吸光度比值)。K=A共轭亚油酸×c异构化巴豆油/(A异构化巴豆油×c共轭亚油酸),重复6次取平均值,得K=2.201±0.043(RSD=1.05%,n=6)。再以K和A异构化巴豆油值代入共轭亚油酸标准曲线方程,即可计算巴豆油微球中巴豆油的质量浓度。

2.3 标准曲线的制备

2.3.1 共轭亚油酸乙醇溶液的制备 精密称取共轭亚油酸对照品39.28 mg,置于10 ml量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得共轭亚油酸母液(3.928 mg/ml);精密吸取0.1 ml,以无水乙醇定容至10 ml,即得共轭亚油酸乙醇溶液(39.28 μg/ml)。

2.3.2 标准曲线的建立 分别吸取39.28 μg/ml的共轭亚油酸乙醇溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml,置于5 ml量瓶中,加无水乙醇至刻度。以无水乙醇为空白溶剂,200~400 nm全波长紫外扫描后,于最大吸收波长231.5 nm处进行分光光度法测定,记录A值。以对照品质量浓度(c)为横坐标,A为纵坐标,绘制标准曲线,得共轭亚油酸的回归方程为A=0.070 9 c+0.032 7(r=0.999 9,n=6)。结果表明,共轭亚油酸的质量浓度在1.571~9.427 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

吸取共轭亚油酸乙醇溶液(6.285 μg/ml)适量,于231.5 nm波长处进行分光光度法测定,重复6次,记录A值。结果,RSD=0.061%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一异构化巴豆油(批号:120520)乙醇溶液适量,于0、15、30、45、60、90、120 min在231.5 nm波长处进行分光光度法测定,记录A值。结果,RSD=1.22%(n=7),表明供试品溶液在120 min内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:120522)适量,共6份,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,于231.5 nm波长处进行分光光度法测定,记录A值,代入共轭亚油酸回归方程计算巴豆油微球中巴豆油的质量浓度。结果,巴豆油微球中巴豆油的质量浓度以质量分数计为32.73%,RSD=1.89%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的巴豆油微球(批号:120525)适量,共6份,分别加入一定量的共轭亚油酸对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,于231.5 nm波长处进行分光光度法测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

取样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
15.90	5.204	5.203	10.430	100.44		
15.90	5.204	5.203	10.450	100.83		
15.91	5.207	5.203	10.470	101.15	100.45	0.60
15.91	5.207	5.203	10.450	100.77		
15.90	5.204	5.203	10.410	100.05		
15.90	5.204	5.203	10.380	99.48		

2.8 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,于231.5 nm波长处测定A值,以K和A值代入共轭亚油酸回归方程计算巴豆油微球中巴豆油的质量浓度,折合成质量分数,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=5)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=5)

批号	质量分数,%	RSD,%
120520	31.50	1.07
120522	32.73	1.86
120525	32.64	0.84

3 讨论

3.1 巴豆油异构化的意义

本试验表明,巴豆油中亚油酸等有机酸类的最大吸收峰在200~210 nm波长处,受溶剂末端吸收影响较大。经异构化反应后最大吸收峰红移,其异构化产物共轭亚油酸在230~233 nm波长处有最大吸收峰。本试验结合异构化巴豆油紫外全波长扫描结果选择231.5 nm为检测波长,排除了溶剂末端

吸收的影响。

3.2 测定方法的选择

巴豆油的主要成分为亚油酸,对其常用的测定方法有GC法和HPLC法等。GC法需经衍生化预处理,否则体系温度较高易使亚油酸双键断裂或异构化;HPLC法多需衍生化处理或使用C₈反相色谱柱等,往往操作烦琐,且对温度有一定的要求。本试验结合经典的碱催化异构化反应将亚油酸转变为共轭亚油酸,碱催化异构化反应相比柱前衍生化操作简单、易控,且应用简便、易行的紫外分光光度法进行检测,在保证测定准确度的前提下提高了测定的效率。

3.3 K值的引入

巴豆油中主成分亚油酸的质量分数达到了50%以上,但无法排除巴豆油中其余成分在测定中的干扰。为保证巴豆油总量测定结果的真实性,本试验引入了K值。经过验证试验证明,该方法准确、可靠。但不同厂商巴豆油产品的K需重新测定。

3.4 方法的应用

大多数植物油中含有亚油酸,均可以参考在此条件下异构化为共轭亚油酸从而进行紫外检测,以测定未知物中某植物油的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:74.
- [2] 黄仁礼.巴豆临证运用心得[J].新中医,2004,36(10):68.
- [3] 林铭培.《神农本草经》对研发抗肿瘤中药的贡献[D].广州:广州中医药大学,2011.
- [4] 刘春美,吴晓峰,潘扬,等.巴豆发酵品与生巴豆、巴豆霜中毒性成分的含量比较[J].中国药房,2011,22(43):4071.
- [5] 杜贵友,方文贤.有毒中药现代研究与合理应用[M].北京:人民卫生出版社,2003:359-367.
- [6] Sahar EM, Meselhy RM, Norio N, et al. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*[J]. *Phytochemistry*,2000,53(4):457.
- [7] 赵中夫,赵正保.巴豆油各分离组份体外抗结核分枝杆菌实验研究[J].长治医学院学报,2006,20(1):1.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 李盈,沈琦,段成才,等.RP-HPLC法测定鸦胆子油中油酸和亚油酸的含量[J].中国药房,2009,20(36):2836.
- [11] 游剑,于英伟,李青坡,等.莪术油微球的含量测定[J].中成药,2005,27(1):25.

(收稿日期:2012-07-26 修回日期:2012-10-29)