

文章编号: 1006-2858(2011)11-0882-04

GC 法同时测定鸦胆子油中 4 种脂肪酸的含量

刘 丹¹, 韩 飞², 李 伟¹, 毕开顺¹, 陈晓辉¹

(1. 沈阳药科大学 药学院 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 药业有限公司 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立同时测定鸦胆子油中棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸 4 种成分含量的方法。方法 采用毛细管气相色谱法, 甲酯化后测定鸦胆子油中棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的含量。色谱柱: DB-17 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 检测器: 氢火焰离子化检测器(FID), 柱温恒温: 200 ℃(保持 11 min), 进样口温度: 250 ℃, 检测器温度: 250 ℃, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 分流比: 20:1, 内标物: 苯甲酸苯酯。结果 棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的线性分别为 74 ~ 738 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 6$), 51 ~ 509 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 1$), 741 ~ 7 410 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 1$) 和 265 ~ 2 650 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 1$); 各成分的平均回收率($n=9$) 分别为 94.6%、94.2%、94.2% 和 95.3%。结论 此方法可为鸦胆子油的质量评价提供依据。

关键词: 鸦胆子油; 气相色谱法; 脂肪酸; 含量测定

中图分类号: R 917 文献标志码: A

鸦胆子(*Brucea javanica*(L.) Merr.) 为苦木科植物鸦胆子的干燥成熟果实, 又名老鸦胆或苦参子, 始载于《本草纲目拾遗》, 是一种常用中药, 主要分布在福建、云南、台湾、广东等地。其味苦, 性寒; 有小毒。归大肠、肝经。具有清热燥湿、解毒杀虫、腐蚀赘疣, 还具有截疟和抗肿瘤作用等功效^[1]。鸦胆子油为鸦胆子干燥成熟果实经石油醚提取后所得到的脂肪油, 临床上其制剂主要用于消化道肿瘤及宫颈癌, 也可用于肺癌的治疗^[2]。其中含有丰富的不饱和脂肪酸, 尤其是油酸, 具有很强的抗癌活性^[3], 其他的不饱和多烯脂肪酸对人体也起着重要的调节作用。目前文献报道的脂肪酸含量测定的方法有滴定法^[5]、气相色谱法^[4]、薄层扫描法^[5]和 HPLC 法^[5], 并仅限于其中油酸和亚油酸的含量测定, 多组分的同时定量分析未见相关报道。本文作者采用气相色谱法测定鸦胆子油中 4 种脂肪酸类成分的含量, 为鸦胆子油的多指标成分质量控制提供方法。

1 仪器与试剂

Agilent 7890A 气相色谱仪(Agilent 科技有限公司), DB-17 色谱柱(Agilent 科技有限公司), BP210S 电子天平(德国 Sartorius 公司), HH-2 数

显恒温水浴锅(常州国华仪器有限公司), SGK-5LB 型氢气发生器(上海荆和分析仪器有限公司), HGC-36A 型氮吹仪(上海楚定分析仪器有限公司)。

对照品: 油酸和亚油酸对照品(美国 SigmaAldrich 贸易有限公司, 质量分数≥99%), 棕榈酸(190029-201001) 和硬脂酸(190032-201001) (中国药品与生物制品检定所), 内标物: 苯甲酸苯酯(上海西域机电系统有限公司, 质量分数≥98%), 鸦胆子油各批次均由药大药业有限公司提供。

试剂: 正己烷、甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司), 三氟化硼乙醚(成都市科龙化工试剂厂), 氯化钠、氢氧化钠、无水硫酸钠等(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: DB-17 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 柱温恒温: 200 ℃(保持 11 min), 进样口温度: 250 ℃, FID 检测器温度: 250 ℃, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 分流比: 20:1, 载气: 高纯氮, 进样量: 1 μL。在上述色谱条件下, 取对

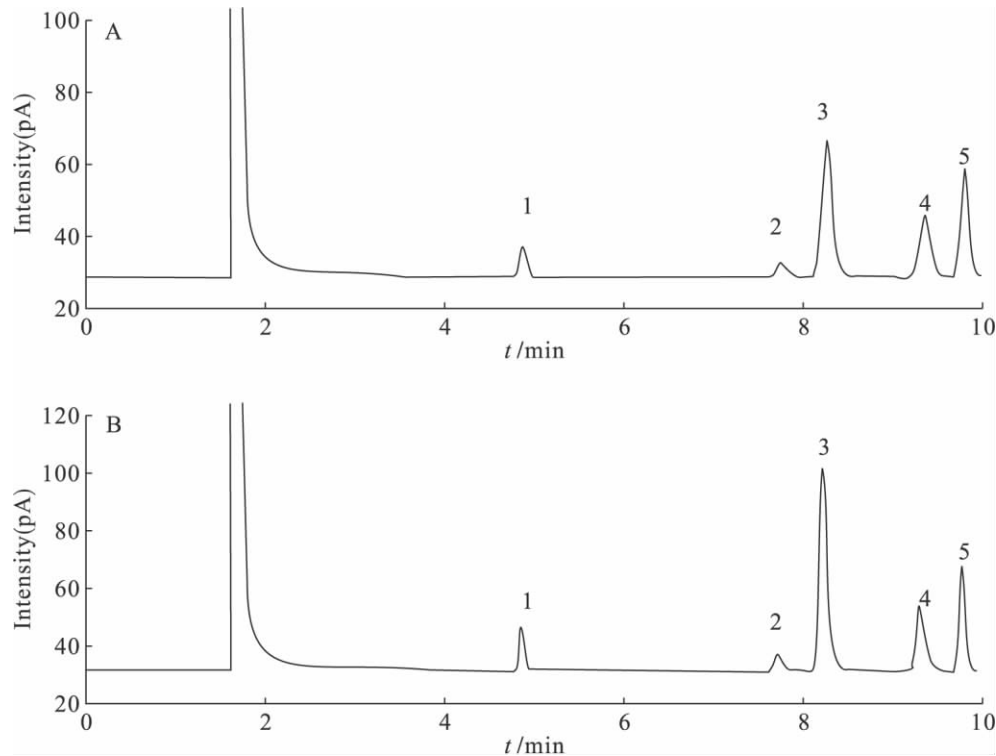
收稿日期: 2011-04-01

基金项目: 辽宁省教育厅科技专项课题(LT201001)

作者简介: 刘丹(1986-), 女(汉族), 吉林公主岭人, 硕士研究生, E-mail qtwld1986@163.com; 陈晓辉(1954-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 主要从事药物质量控制分析方法的研究, Tel. 024-23986259, E-mail cxh_syphu@yahoo.com.cn。

照品溶液进样分析。理论塔板数按油酸甲酯计算不低于 3.0×10^4 。棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯色谱峰分离度良好,与相邻色谱峰

的分离度均大于 1.5(对照品及样品色谱图见图 1)。



1—Methyl hexadecanoate; 2—Methyl octadecanoate; 3—Methyl cis-9-octadecenoate; 4—Methyl linoleate; 5—Phenyl benzoate

Fig. 1 GC chromatograms of reference solution(A) ,sample solution(B)

2.2 溶液制备

内标溶液: 取苯甲酸苯酯约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加正己烷稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 $512 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液。对照品溶液: 取对照品棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸适量,精密称定,置于同一 50 mL 量瓶中,加正己烷稀释至刻度,摇匀,配制成棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸质量浓度分别为 295、204、2 960 和 1 060 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

供试品溶液: 取鸭胆子油约 5 mg,精密称定,加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾甲醇溶液 2 mL,置 60°C 水浴皂化 15 ~ 25 min 至油珠全部消失,放冷,加体积分数为 15% 的三氟化硼乙醚甲醇溶液 2 mL,置 60°C 水浴酯化 2 min,放冷,精密加入正

己烷 2 mL,振摇,加饱和氯化钠溶液 2 mL,振摇,静置。取上层溶液,加 0.4 g 无水硫酸钠,除去微量水。精密量取上层溶液 1 mL,并精密加入 1 mL 内标溶液,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性

分别精密量取混合对照品溶液 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 置于具塞玻璃试管中,照“2.2”条制备方法,制成系列混合对照品溶液。在上述色谱条件取 $1 \mu\text{L}$ 进样分析。以对照品溶液质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标(X),对照品与内标峰面积的比值为纵坐标(Y),绘制标准曲线。线性回归方程如表 1。

Table 1 The results of regression equation($n=6$)

Component	Regression equation	r
Palmitic acid	$Y=0.810 X + 0.010 0$	0.999 6
Octadecanoic acid	$Y=0.787 9X + 0.009 9$	0.999 1
Oleic acid	$Y=0.558 6 X + 0.070 3$	0.999 1
Linoleic acid	$Y=0.744 4 X + 0.030 1$	0.999 1

结果表明棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸分别在 74 ~ 738、51 ~ 509、741 ~ 7410 和 265 ~ 2 650 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与峰面积比成良好线性关系。

2.3.2 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 1 mL, 按“2.2”条的方法操作。在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测得棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯的峰面积与内标峰面积比值的 RSD 分别为 1.6%、2.2%、2.0%、1.9%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验

取鸦胆子油 6 份, 每份约 5 mg, 精密称定, 按“2.2”条方法操作。在上述色谱条件下进样分析, 计算棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯含量的 RSD 分别为 1.0%、1.9%、

1.2%、2.2%, 结果表明重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按“2.2”条方法操作, 在室温下放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 在上述色谱条件下进样分析, 计算棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯与内标峰面积比值的 RSD 分别为 1.4%、2.1%、1.2%、1.3%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 回收率试验

取鸦胆子油 9 份, 每份约 2.5 mg, 精密称定, 分别精密加入低、中、高 3 种浓度的对照品溶液, 按“2.2”条方法操作, 在上述色谱条件下进样分析, 计算平均回收率。各成分回收率测定结果见表 2。

Table 2 The results of recovery test ($n=3$)

Components	$m_{\text{original}}/\text{mg}$	$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery/%	$\bar{x}/\%$	RSD/%
Palmitic acid	0.333 0	0.073 8	0.235 3	93.2	94.6	1.5
	0.333 0	0.147 5	0.308 2	96.1		
	0.333 0	0.221 3	0.375 6	94.5		
Octadecanoic acid	0.184 2	0.050 9	0.139 3	92.7	94.2	1.4
	0.184 2	0.101 8	0.188 6	94.8		
	0.184 2	0.152 7	0.237 4	95.2		
Oleic acid	3.498 0	0.741 0	2.460 0	96.0	94.2	1.5
	3.498 0	1.482 0	3.130 0	93.2		
	3.498 0	2.223 0	3.824 0	93.3		
Linoleic acid	0.848 0	0.265 0	0.677 0	95.5	95.3	2.2
	0.848 0	0.530 0	0.940 0	97.4		
	0.848 0	0.795 0	1.164 0	93.1		

2.4 样品测定

取鸦胆子油 5 份, 按“2.2”条方法制备供试

品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算含量, 结果见表 3。

Table 3 The results of sample determination ($w/\%$ $n=3$)

Batch number	Palmitic acid	Octadecanoic acid	Oleic acid	Linoleic acid
1008271	6.059	3.267	63.866	15.309
1012081	5.525	2.904	59.667	14.051
1008131	5.967	3.102	62.952	14.837
1007241	5.645	3.136	61.208	15.035
1012171	5.707	3.031	60.547	14.749

3 讨论

a. 为使待测组分具有良好的分离度和合适的保留时间, 考察了 DB-1、DB-17 和 HP-5 三种不同极性的毛细管柱。结果表明 DB-17 毛细管柱

能够对样品各待测组分实现良好的分离。

b. 实验曾采用 80 ~ 230 $^{\circ}\text{C}$ 程序升温的方式, 结果发现待测组分在 200 $^{\circ}\text{C}$ 左右时出峰。考察了柱温分别为 190、200、210 $^{\circ}\text{C}$ 等, 最后确定 200 $^{\circ}\text{C}$ 恒温测定时色谱峰达到基线分离, 出峰时间合适

且拖尾因子符合要求。

c. 鸦胆子油在甲酯化后,生成的甲酯化产物遇水不稳定,在 4 h 左右含量即下降。故采用无水硫酸钠对其甲酯化产物脱水,从而使甲酯化产物在 24 h 内符合稳定性要求。

d. 气相色谱法测定油脂脂肪酸组分是现在最常用的方法,也是一些相关标准(如: GB/T17377)规定应用的检测方法。甲酯化是分析动植物油脂脂肪酸成分的常用的前处理方法,也是常用的标准方法(GB/T17376)。HPLC 法分析脂肪酸需要用到 P-溴苯乙酮为衍生剂,18-冠醚-6 作催化剂,这两种有机试剂不是实验室的常用试剂且对皮肤及黏膜毒害大,HPLC 法分析时间长。而 GC 灵敏度高,柱效高,分析时间短,大大减少了有机溶剂的使用。

e. 本实验中,作者采用气相色谱法对鸦胆子油中的 4 种脂肪酸类成分进行了同时定量分析,弥补了以往对单一成分含量测定不能全面反应中药质量的不足。含量测定结果表明 4 种脂肪酸

类成分占鸦胆子油中总脂肪酸含量的 90% 左右,油酸含量在 60% 以上,为其抗癌活性的主要成分。该方法灵敏、准确、重复性好,建立了鸦胆子油的多指标成分含量测定方法,为鸦胆子油的质量评价提供依据。

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: 238.
- [2] 周春玲, 陈晓辉, 毕开顺. GC 法测定鸦胆子油酸与亚油酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 996-998.
- [3] 俞进友, 朱良志, 夏曙详. 浅谈鸦胆子在原发性肝癌介入治疗中的作用[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1995, 2: 49-50.
- [4] 孙苓苓, 王淑丽. 气相色谱法测定鸦胆子油乳剂中油酸的含量[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(2): 98-100.
- [5] 项琪, 周莉玲, 姚崇舜, 等. HPLC 法测定鸦胆子油中脂肪酸[J]. 中草药, 2006, 37(3): 383-385.

GC determination of four fatty acids in *Brucea javanica*(L.) Merr. oil simultaneously

LIU Dan¹, HAN Fei², LI Wei¹, BI Kai-shun¹, CHEN Xiao-hui¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Pharmaceutical Major Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the determination of palmitic acid, octadecanoic acid, oleic acid and linoleic acid in *Brucea javanica*(L.) Merr. oil simultaneously. **Methods** The sample was determined with capillary column DB-17(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) by GC coupled with flame ionization detector. Temperature was maintained at 200 °C for 11 min. The injector temperature was 250 °C. The detector temperature was 250 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Split injection was conducted with split ratio of 20:1. Nitrogen was used as carrier gas. **Results** The calibration curve was linear within the range of 74-738 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 6), 51-509 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 1), 741-7 410 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 1) and 265-2 650 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 1) for palmitic acid, octadecanoic acid, oleic acid and linoleic acid, respectively. The average recoveries (*n* = 3) were 94.6%, 94.2%, 94.2% and 95.3% for palmitic acid, octadecanoic acid, oleic acid and linoleic acid, respectively. **Conclusions** This method is convenient, accurate and reproducible for the determination of palmitic acid, octadecanoic acid, oleic acid and linoleic acid in *Brucea javanica*(L.) Merr. oil.

Key words: *Brucea javanica*(L.) Merr. oil; GC; fatty acid; assay