

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果Table 2 Design and result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	人参皂苷 C-K /(mg · mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	0.405 5
2	1	2	2	2	0.649 8
3	1	3	3	3	0.864 3
4	2	1	2	3	0.332 8
5	2	2	3	1	0.619 0
6	2	3	1	2	0.750 0
7	3	1	3	2	0.376 3
8	3	2	1	3	0.324 8
9	3	3	2	1	0.654 8
k_1	0.639 9	0.371 5	0.493 4	0.559 8	
k_2	0.567 3	0.531 2	0.545 8	0.592 0	
k_3	0.451 9	0.756 4	0.619 9	0.507 3	
R	0.188 0	0.384 9	0.126 5	0.084 7	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	方差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.054	2	0.027	4.91	
B	0.224	2	0.112	20.44	$P < 0.05$
C	0.024	2	0.012	2.21	
D(误差)	0.011	2	0.005		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

适的酶制剂可以实现将含量较高的天然皂苷转化为具有特殊活性的、价值更大的次级皂苷,并使其含量提高数百倍,为新药(原料)的开发奠定了基础。

3.2 工业酶制剂代替生物转化既可以减少许多繁琐的制备工艺,又可以消除多种副产物的生成,便于转化产物的分离与纯化,这是由酶的专一性所决定的。本实验利用工业酶制剂 β -葡聚糖苷酶转化三七叶皂苷可制备 0.883 mg/mL 的抗肿瘤活性产物人参皂苷 C-K,为进一步研究其药理活性创造了条件。

References

- [1] Huang G K, Hu X L, Q in Q, *et al.* Microscale experiment of

isolation and purification of total saponins from the stalk and leaves of *Panax ginseng* [J]. *J Guangxi Normal Univ* (广西师范大学学报), 2000, 18(2): 106-107.

- [2] Chen Y G, Zhan E Y, Chen H F, *et al.* Saponins with low sugar chain from the leaves of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25(3): 176-178.
- [3] Dou D Q, Jin L, Chen Y J. Advances and prospects of the study on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax ginseng* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16(2): 151-156.
- [4] Liu K. Preparation and antitumor activities of rare ginsenoside [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 43 (Suppl): 57-59.
- [5] Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb₁ by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration — measurement of compound K by enzyme immunoassay [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(3): 245-249.
- [6] Kim D S, Cue Y S, Yu H S, *et al.* Ginsenoside Rh₂ prepared from enzyme reaction [J]. *J Dalian Inst Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2001, 20(2): 99-104.
- [7] Chen Y G, Lü Y P, Gui S H, *et al.* Preparation of protopanaxadiol and its epimer 20(R)-protopanaxadiol from leaf saponins of *Panax notoginseng* [J]. *Fine Chem* (精细化工), 2003, 20(7): 425-426.
- [8] Wang L P. *In vitro* metabolism of ginseng saponins [J]. *J Strait Pharm* (海峡药学), 2000, 12(4): 4-6.
- [9] Ma J S, Zhou Q L, Fei X F, *et al.* Metabolism of ginsenoside Rb₁ and panaxadiol saponins by fungi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(8): 603-605.
- [10] Koizumi H, Sanada S, Ida Y, *et al.* Studies on the ginseng. 1) On the structure and enzymatic hydrolysis of ginsenoside-Ra₁ [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(7): 2393-2398.
- [11] Hasegawa H, Sung J H, Matsumiya S, *et al.* Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria [J]. *Plant Med*, 1996, 62: 453-457.
- [12] Wu S J, Yang Z J, Zhu L H, *et al.* Study on biotransformation of glycyrrhizin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 516-518.

柱前衍生 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸含量

丁 怡, 唐 星*

(沈阳药科大学 药剂教研室, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 目的 建立 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸的方法。方法 以 2,4'-二溴苯乙酮为衍生化试剂, 18-冠-6 醚为相转移催化剂, 采用 Kromasil C₈(250 mm × 4 mm, 5 μm) 反相柱, 波长 254 nm, 以乙腈-水(80:20)为流动相等度洗脱, 柱温室温, 体积流量为 1.3 mL/min, 正十七烷酸为内标, 一次基线分离 5 种脂肪酸。结果 亚油酸的线性

* 收稿日期: 2003-11-22

基金项目: 辽宁省重大课题项目(2002226005)

作者简介: 丁 怡(1978—), 女, 河北人, 沈阳药科大学 2001 级在读研究生, 主要从事静脉注射用微乳剂和缓控释制剂的研究。

Tel: (024) 23843711-3923 E-mail: dingyisue@21cn.com

范围为 0.022~0.330 μg , 软脂酸的线性范围为 0.014~0.213 μg , 油酸线性范围为 0.028~0.416 μg , 硬脂酸的线性范围为 0.012~0.177 μg 。平均回收率分别为 99.2%、97.2%、101.8%、97.8%, RSD 分别为 1.2%、1.5%、0.4%、2.3%。结论 该方法重现性好, 定量准确, 可作为鸦胆子油中脂肪酸的定量方法。

关键词: 鸦胆子油; 脂肪酸; 柱前衍生化; 高效液相色谱

中图分类号: R 286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)09-0988-04

Determination of fatty acids in *Fructus Bruceae* oil by precolumn derivation HPLC

DING Yi, TANG Xing

(Department of Pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Object** A method was developed for the determination of fatty acid in *Fructus Bruceae* oil by precolumn derivation HPLC. **Methods** Fatty acids were derivatized with *p*-bromophenacylbromide as derivative and 18-crown-6 as catalyst. The method used C_{18} Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4 mm, 5 μm) column and isocratic acetonitrile-water eluent and the internal standard was heptadecanoic acid. The detection wavelength was 254 nm. Column temperature was fixed at room temperature, and the flow rate was 1.3 mL/min. **Results** The standard curves of linoleic, palmitic, oleic, and stearic acid are linear within the range of 0.022—0.330, 0.014—0.213, 0.028—0.416, and 0.012—0.177 μg , respectively. The four fatty acid recoveries are 99.2%, 97.2%, 101.8%, 97.8%, and the RSD are 1.2%, 1.5%, 0.4%, 2.3%, individually. **Conclusion** Five fatty acids are separated within 30 minutes during a single run. The present method is reliable and relatively simple for the determination of fatty acid in *Fructus Bruceae* oil.

Key words: *Fructus Bruceae* oil; fatty acid; precolumn derivation; HPLC

鸦胆子为苦木科植物鸦胆子的干燥种仁, 具有清热、解毒、杀虫、截疟作用, 主治热毒血痢、冷痢、疟疾、痔疮、痈肿、阴痒、鸡眼^[1]。鸦胆子种仁中含有 7.2% 脂肪油, 其中三酰甘油中油酸的量达 58.2%, 亚油酸为 20.2%, 软脂酸为 8.0%, 硬脂酸为 5.1%^[2]。近年来国内外研究发现鸦胆子油中油酸具有抗肿瘤活性, 而且药理实验证明其中的油酸、亚油酸具有抗肿瘤活性^[3]。国内已上市的鸦胆子油乳注射液临床试验证实具有良好的抗癌疗效。植物油中的脂肪酸的含量测定一般采用气相色谱法^[4,5], 但在分析过程中柱温很高(180 $^{\circ}\text{C}$), 易使油酸、亚油酸的双键断裂或产生双键的异构化现象。HPLC 法对人體中游离脂肪酸及植物油中脂肪酸的测定国外已有不少报道^[6-9], 多采用 C_{18} 分析, 时间长(60 min)或需要梯度洗脱。本实验采用柱前衍生化 C_{18} 反相柱等度洗脱进行分析, 4 种脂肪酸和内标达到基线分离, 分析时间短, 重现性好。

1 仪器与材料

日本日立—7100 型高相液相色谱仪, TC-100 柱温箱。

油酸、亚油酸、软脂酸、硬脂酸、十七烷酸(内标)对照品, 2, 4'-二溴苯乙酮和 18-冠-6 醚均购于 Sigma 公司, 鸦胆子油为本实验室制备, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4 mm, 5 μm); 检测波长: 254 nm; 流动相: 乙腈-水(80:20); 柱温: 室温; 体积流量: 1.3 mL/min。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制: 准确称取油酸、亚油酸、软脂酸、硬脂酸、十七烷酸(内标)对照品过量, 分别加甲醇制成 0.93, 0.77, 0.332, 0.276, 0.25 mg/mL 的溶液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.2 衍生化试剂溶液的配制: 称取一定量的 2, 4'-二溴苯乙酮和 18-冠-6 醚, 分别加乙腈配制成 10, 2.64 mg/mL 溶液。4~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

2.2.3 空白溶液的制备: 加入 2, 4'-二溴苯乙酮 60 μL , 18-冠-6 醚溶液 60 μL 和乙腈 500 μL , 顶部充氮气, 旋紧螺塞(用聚四氟乙烯隔片), 超声混合, 即得。

2.3 脂肪酸对照品的衍生化处理: 分别取油酸、亚油酸对照品溶液 20 μL , 软脂酸、硬脂酸、十七烷酸对照品溶液 30 μL , 置于具塞螺口反应瓶中, 以酚酞为指示剂, 用 0.05 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液将混合液中和至终点, 氮气吹干。加入 2, 4'-二溴苯乙酮 50 μL 、18-冠-6 醚溶液 50 μL 、乙腈 600 μL , 顶部充氮气, 旋紧螺塞(用聚四氟乙烯隔片), 涡旋 2 min; 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min, 取出放冷, 离心, 取上清液 10 μL 注入高效液相色谱仪。

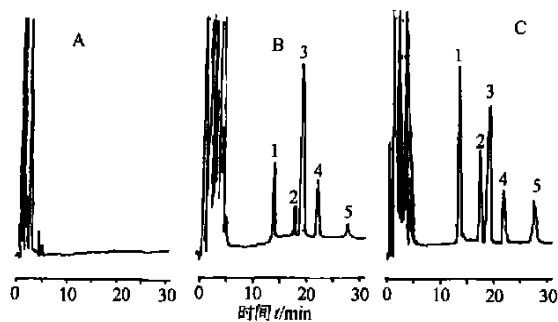
2.4 鸦胆子油的衍生化处理: 精密称取鸦胆子油 80 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加丙酮溶解稀释至刻度,

精密吸取 100 μL 置刻度试管, 加 300 μL 内标, 氮气吹干。加 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 0.4 mL, 60

恒温水浴皂化 30 min, 待油珠完全溶解, 氮气吹干^[4,5]。加水 1 mL 溶解, 滴加 6 mol/L 盐酸至酚酞褪色, 用 6 mL 乙醚分 3 次萃取, 每次涡旋 2 min。乙醚全部转移至 10 mL 量瓶中, 加乙醚至刻度。精密吸取上述乙醚液 0.5 mL 置 1.5 mL 反应瓶中, 按 2.3 项下衍生化处理。

2.5 标准曲线的绘制: 分别吸取对照品溶液油酸、亚油酸各 1 mL, 软脂酸、硬脂酸各 1.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度。分别吸取该溶液 10、30、80、100、130、150 μL 置 6 个 1.5 mL 反应瓶中, 再分别加入 30 μL 内标溶液, 衍生化处理。以各脂肪酸的峰面积与内标峰面积之比 Y 对相应的进样量 X 进行线性回归, 得回归方程。亚油酸: $Y = 0.1235X - 0.0455$, $r = 0.9996$, 线性范围: 0.022~0.330 μg ; 软脂酸: $Y = 0.0887X + 0.0009$, $r = 0.9997$, 线性范围: 0.014~0.213 μg ; 油酸: $Y = 0.0907X - 0.0090$, $r = 0.9995$, 线性范围: 0.027~0.416 μg ; 硬脂酸: $Y = 0.2987X - 0.0010$, $r = 0.9999$, 线性范围: 0.011~0.160 μg 。

2.6 专一性考察: 取鸦胆子油、脂肪酸对照品的衍生化产物及空白溶液, 进样, 记录色谱图, 见图 1。可见在空白中亚油酸、软脂酸、油酸、硬脂酸、十七烷酸处均无干扰, 并且在鸦胆子油色谱中内标无干扰。



1-亚油酸 2-软脂酸 3-油酸
4-十七烷酸(内标物) 5-硬脂酸
1-linoleic acid 2-palmitic acid 3-oleic acid
4-heptadecanoic acid (internal standard)
5-stearic acid

图 1 空白溶液(A)、脂肪酸对照品衍生物(B)和鸦胆子油衍生物(C)的 GC 图谱

Fig. 1 GC chromatograms of blank solution (A), fatty acid derivatives (B), and *Fruetus Bruceae* oil derivatives (C)

2.7 稳定性试验: 取衍生化处理的鸦胆子油的供试品溶液于 8 h 内不同时间进样, 记录色谱图, 计算得

亚油酸、软脂酸、油酸、十七烷酸、硬脂酸峰面积的 RSD 值分别为 0.9%、1.5%、1.0%、0.8%、1.8% ($n = 4$), 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 精密度试验: 取鸦胆子油衍生化溶液, 连续进样 5 次, 记录峰面积, 以内标对比法计算鸦胆子油中亚油酸、软脂酸、油酸、硬脂酸的质量分数, 计算得 RSD 值分别为 1.9%、1.9%、1.4%、1.2%。

2.9 绝对回收率试验: 分别取油酸、亚油酸对照品溶液 200 μL , 软脂酸、硬脂酸、十七烷酸对照品溶液 300 μL 置于刻度试管中, 衍生化处理, 进样 10 μL , 记录峰面积 A_1 ; 另取鸦胆子油衍生化溶液 10 μL , 记录峰面积 A_2 , 求得绝对回收率 A_2/A_1 。油酸、亚油酸、软脂酸、硬脂酸、十七烷酸的回收率分别为 102.6%、98.2%、98.4%、99.6%、100.0%, RSD 分别为 0.9%、1.3%、0.8%、1.7%、1.5%。

2.10 方法回收率试验: 精密称取已知含量 7 份鸦胆子油各 40 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加丙酮溶解并稀释至刻度。分别精密吸取 100 μL 置 7 个 10 mL 刻度试管中, 分别精密加入 300 μL 十七烷酸对照品溶液及 40 mg 鸦胆子油中相应量的油酸、亚油酸、软脂酸、硬脂酸对照品溶液, N_2 吹干, 衍生化处理, 用内标对照法计算油酸、亚油酸、软脂酸、硬脂酸的量。结果回收率分别为 100.4%、102.2%、99.4%、104.5%, RSD 分别为 1.0%、1.9%、0.7%、2.4% ($n = 7$)。

2.11 鸦胆子油的测定: 采用内标法对比法测定 3 批鸦胆子油样品中亚油酸、软脂酸、油酸、硬脂酸的含量, 结果见表 1。

表 1 鸦胆子油中脂肪酸的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of fatty acids in *Fruetus Bruceae* oil ($n = 3$)

批号	亚油酸/%	软脂酸/%	油酸/%	硬脂酸/%
20021023	19.2	8.1	57.3	5.4
20021024	19.0	8.3	57.5	5.2
20021025	18.7	8.5	57.8	5.5

3 讨论

3.1 在衍生化试剂与反应底物物质的量比为 6 : 1 时(衍生化试剂远远过量), 考察反应时间 25、45、60 min 的各种脂肪酸的峰面积变化。结果显示 25 min 以后的峰面积没有变化, 说明 25 min 即可反应完全, 但是为保证反应完全, 实验操作时控制反应时间为 30 min。

3.2 脂肪酸是长链烃类, 在 200~400 nm 没有最大吸收, 无法直接用紫外检测器进行检测, 所以采用柱前衍生化的方法, 使脂肪酸带上一个强发色团, 在

200~400 nm 有最大吸收。 α -溴苯酮和2,4-二溴苯乙酮为常用衍生化试剂,将脂肪酸衍生化成苯乙酮酯,由于采用18-冠-6醚为相转移催化剂,使酯化反应活能降低,衍生化反应速度快,酯化率高。

3.3 国外报道的有关脂肪酸的含量测定的色谱条件多为 C_{18} 柱,或采用梯度洗脱,但是由于脂肪酸的极性过小,在 C_{18} 柱的保留时间很长,分离时间长达80 min。本实验曾尝试过 C_{18} 柱,结果油酸与软脂酸无法达到基线分离。使用 C_8 反相柱,以乙腈-水(80:20)为流动相等度洗脱,油酸与软脂酸可以达到基线分离,而且分析时间在35 min之内。

References

- [1] Lin Q S. *Chemical Constituent of Chinese Traditional Herb Drug* (中草药成分化学) [M]. Beijing: Science Press, 1977.
- [2] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [3] Su X R. Study of *Fructus B rucae* oil on antitumor [J]. *J Shenyang Pharm Coll* (沈阳药学院学报), 1979 (1): 15-18.
- [4] Kong L H, Wang S L, Lu Z, et al. Determination of oleic acid content and its stability in *Yourukeliji of Java B rucea (B rucea javanica)* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26 (2): 72-75.
- [5] Sun L L, Wang S L. Determination of oleic acid in *Fructus B rucae* oil emulsion by GC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(2): 98-100.
- [6] Uchida T, Goto T. High performance liquid chromatographic analysis of serum long-chain fatty acids by direct derivatization method [J]. *J Chromatogr (B)*, 1992, 596: 181-184.
- [7] Hatsumi M, Kinaya S I, Higosawa K. Microanalysis of fatty acids in plasma of experimental animals and humans by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr (B)*, 1986, 380: 247-255.
- [8] Puttmann M, Krug H, Von Ochsenstein E, et al. Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the Picomole Range [J]. *Clin Chem*, 1993, 39(5): 825-832.
- [9] Weinkove C, Reed P. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC [J]. *Clin Chem*, 1994, 40(9): 1707-1712.

银耳多糖中糖醛酸含量的测定

姜瑞芝¹, 陈英红¹, 杨勇杰², 高其品^{3*}

(1. 吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学生命科学院, 吉林 长春 130023; 3. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 建立一种操作简单、快速、准确地测定银耳多糖中糖醛酸的方法。方法 考察中性糖在咔唑法和间羟基联苯法中对糖醛酸测定的干扰,考察加入氨基磺酸对中性糖的抑制作用。并对银耳多糖中糖醛酸进行测定。结果 中性糖在咔唑法和间羟基联苯法中均有不同程度的干扰。对糖醛酸中酸性杂多糖配制质量浓度超出一定范围时,两种方法测得糖醛酸的结果会与实际值有较大误差。结论 测定银耳多糖采用间羟基联苯法,同时待测样品质量浓度配制在0.25~0.50 mg/mL时,所测结果更接近于实际值。

关键词: 银耳多糖; 糖醛酸; 咔唑法; 间羟基联苯法

中图分类号: R 286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-0991-03

Determination of uronic acids in polysaccharide from *Tremella fuciformis*

JIANG Rui-zhi¹, CHEN Ying-hong¹, YANG Yong-jie², GAO Qi-pin³

(1. Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China; 2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China; 3. Jilin Institute for Drug Control, Changchun 130021, China)

Key words: *Tremella* polysaccharide (TP); uronic acids; carbazole method; meta-hydroxydiphenyl method

天然药物提取的多糖以酸性杂多糖的形式存在较多,通常对其中糖醛酸的测定方法有咔唑法^[1]和间羟基联苯法^[2]。但在实际工作中发现,采用以上两种经典方法测定酸性杂多糖中糖醛酸的含量时,中

性糖对测定结果有很大的干扰,使得酸性杂多糖的组份分析结果无法解释。文献报道^[3],氨基磺酸可抑制中性糖的干扰。为建立一种准确、快速测定酸性杂多糖中糖醛酸的方法,本实验选用了糖醛酸含量低

* 收稿日期: 2003-12-10

基金项目: 国家重点科技项目(96-901-06-68)

作者简介: 姜瑞芝(1959—),女,长春人,研究员,主要从事多糖研究及新药开发。Tel: (0431) 6816839

E-mail: zhongyanjrz@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Tel: (0431) 7939919 E-mail: gaoqipin@chinabyte.net