

致谢:得到了实验中心王德宝、贾天军、罗强等
的热情帮助!

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House. 1977.
[2] Hou X H, Yu Z G, Du H L, et al. Determination of the rutaecarpine in the rat plasma by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm U-*

niv (沈阳药科大学学报), 2001, 18(5): 335.

[3] Li Q Y, Hong X K, Wang Z H, et al. Determination of evodiamine in *Fructus Evodia* by high performance capillary electrophoresis [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(6): 370.
[4] Hou X H, Yu Z G, Xu Z M, et al. Determination of the contents of evodiamine and rutaecarpine in 34 species of *Evodia Rutaecarpa* by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(5): 334.

月见草油中 γ -亚麻酸柱色谱分离纯化的正交试验优选

薛 刚^{1,2}, 刘凤霞^{1,2}, 黄开勋¹, 高伟霞², 张立华^{3*}

(1. 华中科技大学, 湖北 武汉 430074; 2. 南阳理工学院 生物与化学工程系, 河南 南阳 473004;
3. 南阳普康药业有限公司, 河南 南阳 473004)

富集月见草油中 γ -亚麻酸的方法主要有有机溶剂萃取法、银离子树脂色谱法、真空精馏法、冷冻结晶法、尿素包合法和超临界 CO₂ 萃取法等^[1]。国内主要采用尿素包合法^[2], 或从月见草油中分离高浓度 γ -亚麻酸甲酯^[3]。低温结晶法得到 γ -亚麻酸只有 30% ~ 50%, 真空分馏法得到的 γ -亚麻酸纯度为 80%。只有纯度大于 90% 的 γ -亚麻酸才可以合成二高 γ -亚麻酸。采用银离子树脂色谱法可以达到要求, 但在分离过程中有银离子, 对制药不利。因此本实验尝试采用硅胶柱色谱法对月见草油中的 γ -亚麻酸进行富集, 为二高 γ -亚麻酸的合成提供原料。

1 仪器和材料

GC-14B 气相色谱仪(日本岛津), 硅胶(青岛海洋化工厂), 月见草油(江西), γ -亚麻酸(尿素包合物, 自制), 尿素(山西天脊化工股份有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 γ -亚麻酸的测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: 300 m 长的毛细管柱, PEG-20 m 极性柱, 温度: 230 , 进样口温度: 250 , 检测器 280 , 压力: N₂ 140 kPa, H₂ 70 kPa, 空气 50 kPa。

2.1.2 测定: 取 γ -亚麻酸 0.1 g 置 10 mL 具塞试管中, 加入 0.5 mol/L KOH 甲醇溶液 2 mL 于 63 水浴上皂化 20 min, 加入 BF₃-乙醚溶液(1 : 1) 0.2 mL, 63 水浴上甲酯化 5 min, 取出冷水冷却, 加 2 mL 石油醚, 振摇, 吸取上层 2 μ L 进样, 按面积归一

法计算。其中 γ -亚麻酸保留时间在 16.6 min 左右。

2.2 柱色谱分离法: 称取硅胶 100 g, 120 活化 1.5 h, 加入等体积的氯仿, 摇匀。取两支色谱柱(40 cm \times 2 cm), 各先加 20 mL 氯仿, 然后加入硅胶, 轻轻敲打装完后垫上一层滤纸, 加适量无水硫酸钠, 打开旋塞, 用氯仿洗柱 1 h, 将尿素包合后得到的 γ -亚麻酸用等体积的氯仿溶解后加入, 收集 30 min 以后的产物, 回收氯仿和甲醇, 得产物。

2.3 正交试验设计及分析: 由于实验的目的是通过柱色谱纯化不同含量 γ -亚麻酸, 因此对 γ -亚麻酸质量分数(A)考虑了 4 个水平, 同时考虑了硅胶的粒度(B)、流动相氯仿-甲醇的配比(C)和色谱分离次数(D), 见表 1, 选用 L₈(4 \times 2⁴) 正交表(表 2), 并进行方差分析(表 3)。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	A	B/目	C	D
1	60	100 ~ 200	90 10	1
2	65	200 ~ 300	100 0	2
3	70			
4	75			

从表 2 可知, 最优组合为 A₄B₁C₁D₂ 即 γ -亚麻酸质量分数为 75%, 硅胶粒度为 100 ~ 200 目, 流动相相比为 90 : 10, 色谱分离次数为两次。

通过方差分析, 说明 A、B 因素达到了显著水平, 应控制在最优水平, 即 A₄B₁, C 和 D 因素不显著, 可以在任意水平, 为方便操作, C 应在 C₂ 水平, 即用氯仿作为流动相, 为节省成本和省时, D 因素应

* 收稿日期: 2004-02-18

作者简介: 薛 刚(1961—), 副教授, 硕士, 从事生化工程的教学和生物制药的研究工作。

表 2 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交试验设计Table 2 Design of $L_8(4 \times 2^4)$ orthogonal tests

序号	A	B	C	D	γ -亚麻酸/ %
1	1	1	1	1	85.66
2	1	2	2	2	82.98
3	2	1	1	2	93.27
4	2	2	2	1	87.67
5	3	1	2	2	92.68
6	3	2	1	1	90.13
7	4	1	2	1	94.88
8	4	2	1	2	92.44
\bar{K}_1	84.32	91.62	90.38	89.61	89.59
\bar{K}_2	90.47	88.31	89.55	90.32	90.34
\bar{K}_3	91.41				
\bar{K}_4	93.06				
R	9.34	3.31	0.83	0.71	0.75

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	自由度	均方	平方和	F 值
A	3	95.70	31.9	29.81
B	1	22.01	22.01	20.57
C	1	1.35	1.35	
D	1	0.99	0.99	
误差 e	1	1.15	1.15	
误差 (D+e)	2	2.14	1.07	
总变异	7	121.20		

$$F_{0.05}(3, 1) = 19.16 \quad F_{0.01}(3, 1) = 99.17$$

在 D_1 水平, 所以最佳组合为 $A_4B_1C_2D_1$ 。

2.4 验证试验: 对最佳组合 $A_4B_1C_2D_1$ 进行了 5 次

重复试验, 结果 γ -亚麻酸质量分数分别为 95.33%、94.49%、91.44%、93.21%、93.44%, RSD 为 1.56%。

3 讨论

3.1 采用柱色谱可以把 γ -亚麻酸的质量分数提高到 90% 以上, 作为二高 γ -亚麻酸的前提物质, 经正交试验说明最佳的硅胶粒度为 100~200 目, 在实验中 200~300 目的硅胶自然色谱分离非常慢, 经加压后才把 γ -亚麻酸分离出, 因此加多大压收集哪一段是今后的研究方向。流动相最佳是 100:0, 即甲醇的比例越大则分离得越快。

3.2 在进行正交试验设计时, 已经进行了不同含量的 γ -亚麻酸柱色谱分离两因素试验, 说明了柱色谱可以使质量分数高于 65% 的 γ -亚麻酸提到 90% 以上, 由于色谱次数效果一样, 因此低于 65% 的 γ -亚麻酸在色谱前最好再经尿素包合提高其质量分数。

References:

- [1] Wen Z, Yu D S, Lü Q. Research on the enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea inclusion [J]. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2001, 13(4): 414-416.
- [2] Zhao R J, Zheng Y X. Study of γ -linolenic acid in evening primrose acid [J]. *Chin Cereals Oils Association* (中国粮油学报), 1995, 10(2): 44-47.
- [3] Guo Y, Wei Y C, Wang Y J. Study of the isolation of high concentration γ -linolenic acid from evening primrose [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 21(9): 9-10.

气相色谱法测定薄荷油中薄荷脑的含量

王成港, 王春龙, 刘 衡, 阎 卉, 李桂龙*

(天津药物研究院, 天津 300193)

薄荷油为《中华人民共和国药典》2000 年版一部收载品种, 主要成分为薄荷脑(薄荷醇), 用于血管舒张、减轻鼻黏膜充血、镇咳、解痉、治疗头痛、利胆、抗菌等。药典中薄荷油测定了总醇量, 不能反映薄荷脑的实际含量。为了控制薄荷油质量, 提高检测标准, 本实验采用毛细管气相色谱法测定薄荷油中薄荷脑的含量。

1 仪器与试剂

HP6890 气相色谱仪(安捷伦公司), HP3395 积分仪(安捷伦公司)。薄荷脑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0728-200005, 供含量测定用), 薄荷

油(上海万香日化有限公司、中南药业有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: HP-FFAP (25 m \times 0.32 μ m); 检测器: FID 检测器; 气化室温度: 220 ; 检测器温度: 220 ; 程序升温: 65~115 , 1 /min; 载气: N_2 ; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 1 μ L。在上述色谱条件下, 薄荷脑与其他成分完全分离, 薄荷脑保留时间约 32 min(图 1)。

2.2 对照品溶液制备: 取薄荷脑对照品适量, 精密称定, 加正己烷溶解制 1.50 mg/mL 的溶液, 即得。

* 收稿日期: 2004-04-08
基金项目: 天津市科委 2003 年基金资助项目(033187411)