

HPLC-ELSD 测定油菜花粉抗前列腺增生活性部位中 4 种脂肪酸类化合物

杨必成¹, 刘 海², 杨义芳^{1*}, 肖成成³, 黄春跃¹, 刘征宇^{4*}

1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200040

2. 赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000

3. 信阳市中心医院 药剂科, 河南 信阳 464000

4. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330000

摘要: 目的 建立油菜花粉抗前列腺增生活性部位中亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸、棕榈酸 4 种脂肪酸类化合物的 HPLC-ELSD 分析测定方法。方法 采用 YMC J'sphere ODS-H80 (250 mm×4.6 mm, 4 μm) 色谱柱, 乙腈-水梯度洗脱, 体积流量为 1.00 mL/min, ELSD 漂移管温度 85 °C, 气体为空气, 气体体积流量为 3.0 L/min, 柱温为 35 °C。结果 亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸、棕榈酸的线性范围分别为 57.88~347.28、33.04~198.24、159.40~956.40、83.68~502.08 μg/mL, 平均回收率分别为 100.4%、101.9%、101.1%、100.4%, RSD 分别为 3.68%、2.45%、1.56%、3.71%。结论 该方法同时测定油菜花粉抗前列腺增生活性部位中亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸、棕榈酸 4 种脂肪酸类化合物, 具有结果准确、重现性好、操作简便等优点。

关键词: HPLC-ELSD; 油菜花粉; 前列腺增生; 活性部位; 脂肪酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1967-04

Determination of four fatty acids in active fraction with anti-prostate hyperplasia of rape bee pollen by HPLC-ELSD

YANG Bi-cheng¹, LIU Hai², YANG Yi-fang¹, XIAO Cheng-cheng³, HUANG Chun-yue¹, LIU Zheng-yu⁴

1. State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

2. College of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

3. Department of Pharmacy, Xinyang Central Hospital, Xinyang 464000, China

4. Medical College, Nanchang University, Nanchang 330000, China

Key words: HPLC-ELSD; rape bee pollen; benign prostatic hyperplasia (BPH); active fraction; fatty acids

本课题组的前期研究工作确定了油菜花粉脂肪酸部位为其抗前列腺增生(BPH)活性部位,其中的脂肪酸类化合物为其抗BPH活性成分^[1-4]。目前,脂肪酸类化合物常用的分析检测方法有气相色谱(GC)法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法等,这些方法都需先将脂肪酸衍生为易挥发的酯化物,缺点是酯化过程中存在各种副反应,且很难保证酯化完全;酯化过程延长分析时间并使分析方法复杂化;

由于游离脂肪酸和脂肪酸衍生物均被衍生化为酯化物,因此这些方法不能用于直接测定非衍生脂肪酸类化合物的量^[5-8]。也有报道采用HPLC配合紫外检测器、示差检测器和电化学检测器等直接检测脂肪酸及其衍生物,但由于脂肪酸类化合物不具有合适的发色基团,且这些方法不能采用梯度洗脱,因此,从灵敏度、选择性和分离效果等方面来说,这些方法都是不可取的。采用高效液相色谱-蒸发光散射检

收稿日期: 2011-12-01

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划资助项目(2009ZX09301-007); 上海市自然科学基金资助项目(06ZR14078); 上海市中药现代化专项资助项目(08DZ1971801, 09DZ1975200)

作者简介: 杨必成(1985—),男,江西兴国人,博士研究生,专业方向为分析化学。Tel: 15210842585 E-mail: ybc258429312@126.com

*通讯作者 杨义芳 Tel: (021)62473018 E-mail: yangyf4912@163.com

刘征宇 Tel: 13177821421 E-mail: yunyucnc@dina.com

网络出版时间: 2012-09-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120907.1020.005.html>

测器(HPLC-ELSD)分析检测脂肪酸类化合物及其衍生物,与上述传统分析方法比较具有以下优点:

① ELSD 的响应与样品的光学特性无关;② 可不用酯化直接检测脂肪酸及其衍生物;③ 适合于多溶剂梯度洗脱;④ 分析时间短、方法简单;⑤ 灵敏度和选择性较好。本实验欲建立油菜花粉超临界萃取抗 BPH 部位中的亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸、棕榈酸 4 种脂肪酸类化合物的 HPLC-ELSD 分析方法,以期对油菜花粉中脂肪酸类化合物的定量测定提供一种简单、快速、准确的方法,也为其他脂肪酸类化合物的定量测定提供一种可借鉴的方法,为后续研究奠定基础。

1 仪器与材料

Waters 515 HPLC pump、Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器、HS 色谱数据工作站 V4.0+ (Waters 公司);十万分之一电子分析天平为 Sartorius 公司产品;HA221—40—11 超临界 CO₂ 萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司);亚麻酸酰胺对照品由本实验室分离制备,通过波谱方法(ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR)和文献报道确定为亚麻酸酰胺(质量分数为 99%);亚麻酸甘油酯对照品(批号 UG-024N)为 Accustandard 公司产品(质量分数大于 99%);亚麻酸对照品(批号 068K1564)和棕榈酸对照品(批号 027K2112)为 Sigma 公司产品(质量分数大于 99%);油菜花粉(批号 RBP0907、RBP0902、RBP1002)购于安徽百康蜂业有限公司,经同济大学王开发教授鉴定为油菜花粉;水为水森活纯净水,色谱纯乙腈和甲醇为迪马公司产品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 YMC J'sphere ODS-H80 (250 mm×4.6 mm, 4 μm),流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱:0~10 min, 40%~60% A; 10~20 min, 60%~80% A; 20~30 min, 80%~100% A; 30~35 min, 100% A; 体积流量 1.00 mL/min, ELSD 漂移管温度 85 °C, 气体为空气, 体积流量 3.0 L/min, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。对照品及油菜花粉抗 BPH 活性部位样品色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取亚麻酸酰胺对照品 14.47 mg、亚麻酸甘油酯对照品 8.26 mg、亚麻酸对照品 39.85 mg、棕榈酸对照品 20.92 mg 置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得 4 种脂肪酸类化合物的混合对照品溶

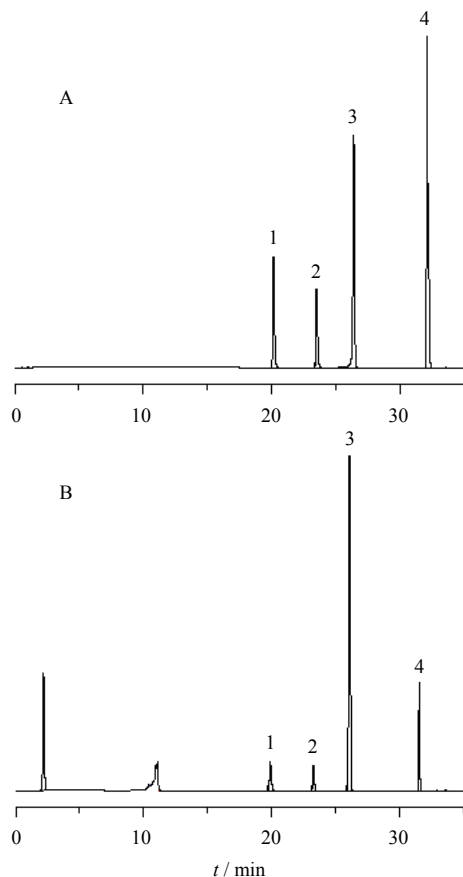


图1 混合对照品(A)和样品(B)的HPLC图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

液(质量浓度分别为亚麻酸酰胺 578.8 μg/mL、亚麻酸甘油酯 330.4 μg/mL、亚麻酸 1.594 mg/mL、棕榈酸 836.8 μg/mL)。

2.3 有效部位溶液的制备

参考文献报道^[9]的工艺条件制备油菜花粉超临界 CO₂ 萃取物,将油菜花粉超临界萃取物上 DA-201 大孔吸附树脂用 60%乙醇洗脱即得,洗脱物用甲醇溶解,即得。

2.4 线性关系考察

准确量取“2.2”项下混合对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,用丙酮定容,配成梯度混合对照品溶液,分别精密吸取 6 种梯度混合对照品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以峰面积积分值的对数值(Y)对质量浓度(μg/mL)的对数值(X)进行线性回归,得回归

方程。以各对照品信噪比 10:1 确定定量限(LOQ), 明各脂肪酸类化合物在试验质量浓度范围内线性关系良好。信噪比 3:1 确定检测限 (LOD), 结果见表 1, 表

表 1 4 种脂肪酸类化合物的线性回归方程、定量限和检测限
Table 1 Linear regression equations, LODs, and LOQs of four fatty acids

成 分	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	检测限 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
亚麻酸酰胺	57.88~347.28	$Y=1.986\ 8\ X+1\ 404\ 9$	0.999 7	0.67	1.12
亚麻酸甘油酯	33.04~198.24	$Y=1.962\ 7\ X+1\ 808\ 5$	0.999 7	0.44	1.89
亚麻酸	159.40~956.40	$Y=3.227\ 2\ X-2\ 481\ 6$	0.999 5	2.18	8.34
棕榈酸	83.68~502.08	$Y=9.718\ 5\ X-23\ 618\ 0$	0.999 5	4.68	12.92

2.5 精密度试验

取同一混合对照品溶液 (亚麻酸酰胺 115.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚麻酸甘油酯 66.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚麻酸 318.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、棕榈酸 167.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 重复进样 6 次, 结果亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸和棕榈酸峰面积的 RSD 分别为 1.34%、1.65%、0.72%、1.93%。

2.6 稳定性试验

分别称取批号为 RBP0907 的油菜花粉, 按“2.3”项下方法制备有效部位供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、12、20 h 测定, 亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸和棕榈酸峰面积的 RSD 分别为 2.00%、0.57%、1.11%、3.16%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.7 重复性试验

分别称取批号为 RBP0907 的油菜花粉 6 份, 按“2.3”项下方法制备 6 份有效部位供试品溶液, 分别进样 20 μL , 测定亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸和棕榈酸, 计算得其质量分数的 RSD 分别为

2.31%、2.61%、2.67%、2.78%。

2.8 加样回收率试验

精密称取批号 RBP0907 的有效部位供试样品, 平行 6 份, 每份约 12 mg, 精密称定, 分别精密加入一定量的亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸和棕榈酸混合对照品溶液, 按“2.3”项方法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算加样回收率。结果亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸、棕榈酸的平均回收率分别为 100.4%、101.9%、101.1%、100.4%, RSD 分别为 3.68%、2.45%、1.56%、3.71%。

2.9 样品测定

分别称取批号为 RBP0907、RBP0902、RBP1002 的 3 批油菜花粉, 按“2.3”项下方法制备 3 份有效部位样品溶液, 按定量测定方法进行测定, 分别得亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸和棕榈酸的质量分数, 结果见表 2。

表 2 油菜花粉有效部位样品中 4 种脂肪酸类化合物测定结果
Table 2 Determination of four fatty acids in active fraction of rape bee pollen

批 次	亚麻酸酰胺 / %	亚麻酸甘油酯 / %	亚麻酸 / %	棕榈酸 / %	总和 / %
RBP0907	2.36	2.86	29.32	19.73	54.27
RBP1001	2.02	2.54	28.31	21.91	54.78
RBP0902	2.41	2.39	30.07	22.62	57.49

3 讨论

3.1 漂移管温度的优化

在气体体积流量为 3.5 mL/min 条件下, 开启流动相, 以漂移管温度为 115 $^{\circ}\text{C}$ 为基准, 以 5 $^{\circ}\text{C}$ 为单位, 增加和降低漂移管温度, 观察信噪比的变化, 继续改变温度直到信噪比最大, 漂移管的最优温度为信噪比最大时的最低温度。通过实验确定漂移管最优温度为 85 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2 气体体积流量的优化

在漂移管温度为 85 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 启动流动相, 让系统充分平衡; 进样样品溶液并获得每个组分的峰面积; 选择样品质量浓度允许在同一刻度上观察峰面积和基线噪音的变化; 气体体积流量以 3.5 mL/min 为基准, 以 0.2 mL/min 为单位增加和降低气体体积流量, 观察每次改变后峰面积的变化; 继续降低气体体积流量并测定峰面积直到基线噪音不

可接受;在可接受的低噪音基线条件下产生最大峰面积时的最低气体体积流量为最优气体体积流量。通过试验确定最优气体体积流量为 3.0 mL/min。

3.3 流动相的选择

在流动相系统选择方面,曾采用甲醇-水、丙酮-水、乙腈-水等恒定比例及梯度洗脱,考察样品中各成分的分离情况及检测灵敏度,经过反复试验,结果表明采用乙腈-水梯度洗脱时,所测成分亚麻酸酰胺、亚麻酸甘油酯、亚麻酸和棕榈酸的色谱峰峰形、柱效和分离度均良好。

4 结论

本方法简单、准确、重复性好,可用于油菜花粉抗 BPH 活性部位脂肪酸类成分的定量测定;此部位的有效成分达到 50%以上,符合中药、天然药物注册分类及申报资料要求中中药五类新药要求。

参考文献

[1] 李 坤. 油菜花粉抗良性前列腺增生有效成分群及其作用机理研究 [D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2008.

- [2] 杨必成, 刘 海, 杨义芳, 等. 油菜花粉中黄酮类化合物的提取与分析 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2451-2455.
- [3] 杨必成, 刘 海, 杨义芳, 等. 聚酰胺树脂纯化油菜花粉黄酮部位工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2240-2243.
- [4] 李 坤, 杨义芳, 李永辉. 油菜花粉抗前列腺增生与炎症的活性部位研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 798-802.
- [5] 张 彬, 王 晔, 鲁 静, 等. 紫菀中有效成分的分离鉴定及紫菀酮的 HPLC-ELSD 测定 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(4): 296-298.
- [6] 潘建国, 段 怡, 吴惠勤, 等. 油菜蜂花粉中脂肪酸的 GC-MS 分析 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(1): 74-75.
- [7] 李 伶, 魏锡文, 杨刚毅, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中的游离脂肪酸 [J]. 分析仪器, 1996(3): 37-39.
- [8] 程志青, 吴惠勤, 张桂英. GC/MS 法快速测定食用植物油中脂肪酸含量 [J]. 分析测试通报, 1989, 8(6): 11-14.
- [9] 杨必成. 油菜花粉抗良性前列腺增生有效部位制备工艺和质量控制方法研究 [D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2010.