

# 高效液相色谱法测定鸦胆子油乳注射液中脂肪酸含量

李宏<sup>1</sup>, 岳昌林<sup>1</sup>, 项琪<sup>2</sup>, 姚崇舜<sup>3</sup>, 周莉玲<sup>2</sup> (1. 浙江九旭药业有限公司, 浙江 金华 321016; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510405; 3. 广东暨南大学医药生物技术研究开发中心, 广州 510632)

**摘要:**目的 建立脂肪酸含量测定的高效液相色谱法, 并以此测定鸦胆子油乳注射液中的游离脂肪酸和结合脂肪酸含量。方法 用  $\omega$ -溴代苯乙酮为衍生化试剂, 三乙醇胺为催化剂对脂肪酸进行酯化使其产生紫外吸收, 利用 HPLC 法进行分离定量。色谱条件为: 采用 Shim-pack VP-ODS( $C_{18}$ , 150L  $\times$  4.6mm, 5 $\mu$ m) 色谱柱, 检测波长 242nm, 流动相为甲醇:乙腈:  $H_2O$  = 65: 27: 8, 柱温: 25 $^{\circ}C$ , 流速 1.0mL/min。十七烷酸为内标。结果 在上述色谱条件下, 各脂肪酸衍生物均达到基线分离。鸦胆子油乳注射液中游离脂肪酸含量较低, 主要为结合脂肪酸。结论 本方法为评价和控制鸦胆子油乳质量提供了依据。

**关键词:** 鸦胆子油乳注射液, 脂肪酸, 含量测定

中图分类号: R917.798.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)04-0329-03

## Determination of fatty acids in *Brucea javanica* oil injection by high-performance liquid chromatography

LI Hong<sup>1</sup>, YUE Chang-lin<sup>1</sup>, XIANG Qi<sup>2</sup>, YAO Chon-shun<sup>3</sup>, ZHOU Li-ling<sup>2</sup> (1. Zhejiang Jiuxu Pharmaceutical Co., Ltd, Jinhua 321016, China; 2. College of China Traditional Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine Guang Dong, Guangzhou 510405, China; 3. Biopharmaceutical Research & Development Center of Jinan University Guang Dong, Guangzhou, 510632, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the contents of fatty acids in *Brucea javanica* oil injection by high-performance liquid chromatography. **METHODS** The fatty acids in *Brucea javanica* oil injection were saponified and esterified to esters with  $\omega$ -bromophenacyl bromide. Phenacyl bromide esters of fatty acids in *Brucea javanica* oil injection were best resolved using an octadecylsilyl column with endcapped silanol groups. An isocratic elution method using methanol-acetonitrile water (65: 28: 7) at 1 mL/min with UV detection at 242 nm and a column temperature of 25 $^{\circ}C$  was found to optimally resolve the four major fatty acids present in *Brucea javanica* oil (palmitic acid [16: 0], stearic [18: 0], oleic [18: 1] and linoleic [18: 2]), with a run time of less than 45 min. The entire process including pre-column derivatization, and HPLC quantitation can be completed in 120 min. **RESULTS** Established techniques for fatty acid derivatization and HPLC separation. **CONCLUSION** The method is rapid, sensitive and highly reproducible. It is suitable for the determination of fatty acids in *Brucea javanica* oil injection.

**KEY WORDS:** *Brucea javanica* oil; fatty acid; quantification determination

鸦胆子油乳注射液是以鸦胆子仁石油醚提取物为原料, 以精制大豆磷脂为乳化剂制成的水包油型乳剂。在临床上主要应用于肺癌、肺癌脑转移和消化道恶性肿瘤的治疗。鸦胆子种仁含油 56.23%, 油中不皂化物占 1.36%; 皂化物 92.47%<sup>[1]</sup>。早在 1921 年就有学者发现一些二元羧酸有溶解肿瘤细胞的作用, 之后国内外对脂肪酸抗肿瘤作用进行了较多的研究。从研究结果来看, 碳链越长, 解离度越低, 呈现分子状态所需的 pH 越接近生理 pH<sup>[2-3]</sup>, 则其抗肿瘤活性越明显。而不饱和脂肪酸较饱和脂肪酸的抗肿瘤活性更为明显, 两者间存在显著性差异。同时脂肪酸经甲酯化后其抑瘤性也大大降低, 因此游离羟基和双键是脂肪酸分子中二个重要活性基因。鸦胆子油乳注射液中的主要活性成分为不饱和脂肪酸 油酸和亚油酸, 两者的抑瘤活性均已被证实, 但至今未有鸦胆子油乳注射液含量测定的报道。笔者采用柱前

衍生化的 HPLC, 分别测定了鸦胆子油乳注射液中游离脂肪酸和结合脂肪酸的含量。为鸦胆子油乳注射液的质量控制提供思路。

### 1 仪器与试剂

Shimadzu LC-2010C 高效液相色谱仪; SPD-M10Avp 检测器 (日本岛津公司); TGL-16G 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); Sartorius BS 110S 分析天平 (德国赛多利斯); JY92-II 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。鸦胆子油乳注射液 (浙江九旭药业有限公司, 批号: 20050501, 20050502, 20050503), 鸦胆子油 (浙江九旭药业有限公司)。油酸、亚油酸、十七烷酸对照品 (Sigma 公司)。甲醇、乙腈色谱纯, 丙酮 AR, 冰乙酸 AR, 和三乙醇胺分析纯。 $\omega$ -溴代苯乙酮 ( $\omega$ -Bromacetophenone, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: T 20041103, 化学纯)。

广东省中医药局 2004 年度科研课题, 课题编号: 1040073

作者简介: 李宏, 中药制剂硕士, 高级工程师。主要研究方向为中药新剂型和新技术。Tel: (0579) - 2261500, E-mail: lh999jd@vip163.com

## 2 实验方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS 150L × 4.6 (SHIMADZU), 保护柱: Shim-pack GVP-ODS 10L × 4.6 (SHIMADZU)。流动相: 甲醇: 乙腈: H<sub>2</sub>O = 65: 27: 8, 柱温: 25℃, 检测波长 λ = 242 nm, 流速 1.0 mL/min。在上述色谱条件下, 各脂肪酸衍生物均达到基线分离。理论板数按油酸计为 10 000, 油酸衍生物与软脂酸衍生物峰的分离度为 2.6。

### 2.2 衍生化方法

衍生化试液的配制 取 ω-溴代苯乙酮约 200 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用丙酮溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (此液在 4℃ 保存, 可使用 1 个月)。

取三乙醇胺约 250 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用丙酮溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (此液在 4℃ 保存, 可使用 1 个月)。

取冰乙酸约 100 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用丙酮溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

衍生化反应 取一定量脂肪酸溶液, N<sub>2</sub> 吹干, 精密加入 ω-溴代苯乙酮 (20 mg/mL) 和三乙醇胺 (25 mg/mL) 各 50 μL, 乙腈 300 μL, 试管加塞密封, 混合摇匀, 于 100℃ 加热 15 min, 冷却至室温后, 精密加入乙酸溶液 75 μL, 于 100℃ 加热 5 min, N<sub>2</sub> 吹干备用。

### 2.3 标准曲线的制备

取油酸对照品约 20 mg, 亚油酸对照品约 10 mg, 软脂酸对照品约 5 mg, 硬脂酸对照品约 10 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为对照品贮备溶液 (油酸液在 -20℃ 保存, 可使用 1 个月; 其余的溶液在 4℃ 保存, 可使用 1 个月)。

内标溶液的配制 取十七烷酸 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为内标贮备溶液 (此液在 4℃ 保存, 可使用 1 个月)。

标准曲线 I: 精密量取对照品贮备溶液 I 和 II 各 5, 50, 100, 150, 300 μL 于 5 mL 具塞离心试管中, 分别精密加入内标溶液 50 μL, N<sub>2</sub> 吹干, 精密加入 ω-溴代苯乙酮 (20 mg/mL) 和三乙醇胺 (25 mg/mL) 各 50 μL, 乙腈 300 μL, 混合摇匀, 于 100℃ 加热 15 min, 冷却至室温后, 精密加入乙酸溶液 75 μL, 于 100℃ 继续加热 5 min, N<sub>2</sub> 吹干, 精密加甲醇 500 μL, 振摇 1 min, 离心 (10 000 r/min) 10 min, 取上清液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度 C (μg) 和对应的峰面积比 (Y) 计算回归方程 (Y = aC + b)。数据由 SPSS 软件处理。

标准曲线 II: 精密量取对照品贮备溶液 I 和 II 各 2, 5, 10, 15, 30 μL 于 5 mL 具塞离心试管中, 分别精密加入内标溶液 25 μL, N<sub>2</sub> 吹干, 余下同“标准曲线 I”操作。

### 2.4 精密度实验

精密量取各对照品贮备溶液 100 μL 按照“标准曲线 II”方法项下重复操作 5 次, 记录峰面积, 由回归曲线计算油酸、亚油酸的浓度, 计算 RSD 值分别为 2.16%, 2.83%, 3.29% 和 3.02%。

表 1 各脂肪酸标准曲线回归方程 (Y = aC + b)

成分	a	b	R <sup>2</sup>	线性范围 (μg)
油酸	2.352 × 10 <sup>-2</sup>	0.3193	0.9739	10.62 ~ 530.0
	0.0653	-0.0974	0.9908	5.670 ~ 121.5
亚油酸	2.416 × 10 <sup>-2</sup>	-6.176 × 10 <sup>-2</sup>	0.9931	3.400 ~ 68.00
	0.0252	-0.0106	0.9974	1.136 ~ 22.72
软脂酸	7.847 × 10 <sup>-3</sup>	3.578 × 10 <sup>-2</sup>	0.9941	14.20 ~ 284.0
	0.0654	0.0216	0.9973	2.800 ~ 42.00
硬脂酸	1.851 × 10 <sup>-2</sup>	0.1270	0.9861	10.40 ~ 130.0
	0.0379	0.012	0.9993	2.080 ~ 52.00

### 2.5 加样回收率测定

精密量取各对照品溶液 10 μL 于 5 mL 具塞离心试管中, 分别加入鸦胆子油乳注射液破乳并提取后的正庚烷溶液 25 μL, 照“标准曲线 II”项下操作, 平行测定 3 份样品, 由回归曲线计算油酸、亚油酸的浓度, 并计算出加样回收率。回收率分别为: (101.4 ± 2.67)%, (102.7 ± 1.26)%, (100.7 ± 2.30)% 和 (101.6 ± 0.65)%。

### 2.6 样品含量测定

2.6.1 脂肪酸的分离提取 称取 0.4 g 无水硫酸钠于 10 mL 具塞离心试管中, 用内容移液管精密量取鸦胆子油乳注射液 0.8 mL, 加入等体积的蒸馏水, 涡旋 1 min, 间断超声 10 min (超声 5 min, 间隔 5 min, 强度 600 W), 80℃ 水浴加热 30 min<sup>[6]</sup>。待剂乳完全破乳后取出放冷, 精密加入异丙醇-正庚烷-冰乙酸 (40:10:1) 的混合溶液 2.5 mL, 涡旋振摇 1 min, 间断超声 2 min, 放置 10 min。精密加入正庚烷 1 mL, 蒸馏水 1.5 mL, 涡旋振摇 1 min, 间断超声 2 min, 离心 10 min (2 500 r/min)。精密吸取最上层淡黄色液体, 置 5 mL 量瓶中, 加正庚烷稀释至刻度, 摇匀。

2.6.2 游离脂肪酸的含量测定 从上述 5 mL 量瓶中精密吸取 500 μL, 加入内标溶液 25 μL, 摇匀后 N<sub>2</sub> 吹干, 再精密加入 ω-溴代苯乙酮 (20 mg/mL) 和三乙醇胺 (25 mg/mL) 各 50 μL, 乙腈 300 μL, 按“标准曲线 II”项下操作。上清液即为供试品溶液 II。

2.6.3 结合脂肪酸的含量测定 另从上述 5 mL 量瓶中精密吸取 500 μL, 加氢氧化钾-甲醛溶液 (0.5 mol/L) 0.4 mL, 旋涡振摇 1 min, 于 60℃ 水浴加热 30 min, 冷却至室温后加异丙醇-正庚烷-冰乙酸 (40:10:1) 的混合溶液 2.5 mL, 涡旋 1 min, 间断超声 2 min, 室温下放置 10 min。再精密加入正庚烷 1 mL, 双蒸水 1.5 mL, 涡旋 1 min, 间断超声 2 min (间隔 30 s, 强度 500 W), 离心 (2 500 r/min × 10 min) 后精密吸取上清液 1 mL, 加入内标溶液 50 μL, 混匀后 N<sub>2</sub> 吹干, 照“标准曲线 I”项下操作。N<sub>2</sub> 吹干后精密加甲醇 500 μL, 振摇 1 min, 离心 (10 000 r/min) 10 min, 上清液即为供试品溶液 I。

测定法 精密吸取供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 由回归方程计算供试品含量。

表 2 鸦胆子油乳注射液含量测定 (mg·mL<sup>-1</sup>, Mean ±S, n=3)

Tab 2 The determination results of Brucea jananica oil injection

	批号	亚油酸	软脂酸	油酸	硬脂酸
游离脂肪酸	20050503	1.612 ±0.0635	0.2908 ±0.0056	0.7344 ±0.0361	0.1893 ±0.0046
	20050502	1.487 ±54.0	0.2996 ±0.0037	0.6334 ±0.0505	0.1809 ±0.0023
	20050501	1.274 ±0.0941	0.2256 ±0.045	0.6381 ±0.0037	0.1436 ±0.0186
结合脂肪酸	20050503	1.843 ±0.3488	3.0559 ±0.7101	16.11 ±3.171	3.815 ±0.9424
	20050502	1.5476 ±0.8120	2.594 ±0.1073	15.49 ±0.837	2.843 ±0.1163
	20050501	1.6805 ±0.7132	2.7717 ±0.1842	15.46 ±0.697	3.447 ±0.2782

### 3 讨论

本实验是在相关文献的基础上加以改进<sup>[5-7]</sup>而来。Adosh Mehta等详细讨论了 2,4-二溴苯乙酮在 18-冠-6 醚催化下和 α-溴苯乙酮在三乙胺催化下,脂肪酸的衍生化反应及相关的色谱行为。本实验对上述方法均进行了考察,结果发现 ω-溴苯乙酮在三乙胺催化下的酯化反应操作简便快捷,而且在相同色谱条件下,所得脂肪酸酯的保留时间只相当于 2,4-二溴苯乙酮衍生物的一半。在本实验色谱条件下,45min 内可分析完一个样品,而 2,4-二溴苯乙酮衍生物需要 75min。

中国药典从 1985 年版开始采用 HPLC 法进行含量测定,但仅有 7 例,到 2000 年版已增加到 697 例,内容涉及鉴别、检查和含量测定项目。美国药典中 85% 以上的品种采用高效液相 (HPLC) 法进行定量分析。鉴于 HPLC 在药品分析中的应用越来越多,因此有必要建立 HPLC 法测定鸦胆子油乳注射液中活性成分油酸和亚油酸的含量,从而控制和提高产品质量。

鸦胆子油乳注射液中脂肪酸存在游离和结合两种形式,现执行标准为 WS3-B-2739-97(部颁中药成方制剂(第十九册)),采用滴定法测定总酸含量。本实验对鸦胆子油乳注射

液的抗肿瘤活性成分油酸和亚油酸进行分离,并分别测定了游离型和结合型的含量,对阐明鸦胆子油乳注射液的物质基础和药效作用的相互关系具有积极意义。

### 参考文献

- [1] 陈德昌. 现代实用本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [2] 朱友平. 脂肪酸的抗肿瘤作用 [J]. 国外医学·肿瘤分册, 1990, 3: 133.
- [3] 晏四平, 苏德森. 不饱和脂肪酸抗肿瘤作用研究进展 [J]. 辽宁药物与临床, 2000, 3(1): 36-39.
- [4] 吴松昌. 鸦胆子抗癌——从分子生物学水平探讨鸦胆子抗癌机理 <http://www.orientum.or.com/xinliaofa/newliaofa-7.htm>.
- [5] 丁怡, 唐星. 柱前衍生 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸含量 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 988-991.
- [6] 丁怡, 唐星. 柱前衍生 HPLC 法测定百多宁注射液中的脂肪酸含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(1): 29-32.
- [7] Adosh M, Oeser AM. Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 1998, (719): 9-23.

收稿日期: 2005-08-10