

注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分甲酯化方法的研究

逢小倩¹, 叶正良^{2*}, 李德坤², 周大铮²

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193;

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410)

[摘要] **目的:**研究注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分的最佳甲酯化方法。**方法:**分别采用 1% 硫酸-甲醇加热回流酯化法, 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法, 25% 硫酸-甲醇加热回流酯化法和 2% 氢氧化钾-甲醇加热回流酯化法对该部分物质进行甲酯化, 并用合适的溶剂进行萃取, 之后将所得萃取物进行 GC-MS 分析。**结果:**当采用 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法对该部分物质进行甲酯化并选用氯仿做萃取剂时, 酯化效率最高。**结论:**10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法是注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分的最佳甲酯化方法, 为该部分主要成分的研究提供依据。

[关键词] 注射用益气复脉(冻干); 甲酯化; GC-MS 分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0096-04

[doi] 10.11653/syfy2013220096

Study of Methyl Esterification Method in Alkali Alcohol Eluent of Yiqi Fumai Lyophilized Injection

PANG Xiao-qian¹, YE Zheng-liang^{2*}, LI De-kun², ZHOU Da-zheng²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300410, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimal methyl esterification method in alkali alcohol eluent from Yiqi Fumai lyophilized injection. **Method:** Some esterification methods were adopted as follows: 1% sulfuric acid-methanol refluxed esterification method, 10% sulfuric acid-methanol refluxed esterification method, 25% sulfuric acid-methanol refluxed esterification method and 2% potassium hydroxide-methanol refluxed esterification

[收稿日期] 20120910(004)

[基金项目] 科技重大专项“重大新药创制”项目(2010ZX09502-004)

[第一作者] 逢小倩, 在读硕士, 从事药物分析和中药质量控制的研究, Tel:13370336803, E-mail:Joicepang0524@163.com

[通讯作者] *叶正良, 研究员, Tel:022-86342066, E-mail:yezyl@tasly.com

[8] Collantes Díaz I E, Goncalves E G, Yoshida M. Chemical constituents from tubers of *Dracontium spruceanum* (Schott) G. Zhu ex *Dracontium lorentense* Krause (Araceae) [J]. Rev Soc Quím Perú, 2011, 77 (2):117.

[9] Saha M, Uttam K, Malli K. A chromenoflavanone and two caffeic esters from *Pongamia glabra* [J]. Phytochemistry, 1991, 30 (11):3834.

[10] 王安伟, 陈光英, 尹文清, 等. 大叶鱼骨木茎的化学成分研究 [J]. 化学研究与应用, 2009, 21 (7):1024.

[11] Ono M, Masuoka C, Odake Y, et al. Antioxidative constituents from *Tessaria integrifolia* [J]. Food Sci Technol Res, 2000, 6 (2):106.

[12] Chakravarty A K, Mukhopadhyay S, Moitra S K, et al. Syringareinol, a hepatoprotective agent and other constituents from *Sweria chirayita* [J]. Indian J Chem B, 1994, 33 (8):405.

[13] 陈曼, 张救, 孙视, 等. 赤芝子实体的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22 (6):1018.

[责任编辑 邹晓翠]

method. The solution of methyl ester extraction was extracted by opportune solvent, then, analysis them with GC-MS. **Result:** 10% sulfuric acid-methanol refluxed esterification with extracted by chloroform is the optical method, which shows the best esterification efficiency. **Conclusion:** 10% sulfuric acid-methanol refluxed esterification is the best esterification method of alkali alcohol eluent from Yiqi Fumai lyophilized injection, which provides the basis for the research on the main ingredients of this extract.

[**Key words**] Yiqi Fumai lyophilized injection; methyl esterification; GC-MS analysis

注射用益气复脉(冻干)是在生脉注射液基础上开发研制而成,其处方组成为红参、麦冬和五味子,具有益气生津、敛阴止汗的功效^[1]。该方剂在临床上对于冠心病、心绞痛、心梗、心源性休克等症都有良好的治疗效果^[2-4],其起效物质基础主要为皂苷、多糖、木脂素以及氨基酸等类物质^[5]。高级不饱和脂肪酸具有增强人体免疫力、降血脂、抗动脉粥样硬化和抗血栓形成等功效。注射用益气复脉(冻干)中有机酸成分的种类及含量已经有较为深入的研究,该类成分的研究分析则大多采用 GC-MS^[6]。由于脂肪酸的沸点较高,不宜直接采用 GC 法进行分析,一般都是将其进行衍生化降低沸点后,再通过 GC 分析测定。本文对注射用益气复脉大孔吸附树脂碱醇洗脱部分中亚油酸等脂肪酸物质的甲酯化方法进行比较研究。常用的甲酯化方法分为酸催化、碱催化两大类。每种方法各有其优缺点,且使用范围各不相同。而许多文献和参考资料中使用的酸碱浓度、萃取溶剂等也有较大差异。因此,选择方便、快捷的甲酯化方法对脂肪酸的分析至关重要。本文对 1% 硫酸-甲醇加热回流酯化法,10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法,25% 硫酸-甲醇加热回流酯化法和 2% 氢氧化钾-甲醇加热回流酯化法的甲酯化效果进行比较^[7],确定了最适用于注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分的甲酯化方法。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 7890A-5975C 型气相色谱-质谱联用仪(配 7693A 自动进样器),AE240 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 METTLER 公司),KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水处理系统,DK-S28 型电热恒温水浴锅。

1.2 试剂 正己烷、氯仿、乙酸乙酯、氢氧化钾、氯化钠、无水甲醇、浓硫酸均为分析纯(天津化学试剂有限公司),三氟化硼乙醚(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。

1.3 样品的制备 取注射用益气复脉(冻干)上已处理好的 AB-8 大孔树脂柱,将其所含成分按极性

大小进行分离。上样后,用酸水洗至无色,并用纯化水冲洗柱子调 pH 到中性;之后用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 25% 乙醇溶液冲洗树脂柱,收集该部分洗脱液,加入 pH 1 的盐酸水液,调节 pH 至中性后,浓缩,冻干,除盐后所得的组份命名为注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分。

2 方法与结果

2.1 甲酯化方法 以下 4 法用于测定不同浓度酸法及碱法甲酯化效果的影响,每种方法制备 3 个平行样。

2.1.1 1% 硫酸-甲醇加热回流酯化法 取注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分样品 20 mg,置于反应烧瓶内,加 1% 硫酸-甲醇溶液 4 mL 使之溶解,在 70 °C 恒温水浴中加热回流 30 min,取下冷却移入分液漏斗,加入 15 mL 水混匀,用 10 mL 氯仿萃取放入小瓶中,放入适量无水硫酸钠过夜除水,定容至 10 mL,备用。

2.1.2 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法 取注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分样品 20 mg,置于反应烧瓶内,加入 4.5 mL 无水甲醇使之溶解,再慢慢加入 0.5 mL 浓硫酸,在 70 °C 下水浴中加热回流 30 min。加入 15 mL 水混匀,再加入 10 mL 氯仿振荡,进行萃取。用无水硫酸钠除水,定容至 10 mL 量瓶中,备用。

2.1.3 25% 硫酸-甲醇加热回流酯化法 取注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分样品 20 mg,置于反应烧瓶内,加入 3.0 mL 无水甲醇使之溶解,再慢慢加入 1.0 mL 浓硫酸摇匀,在 70 °C 水浴中加热回流 30 min,加入 15 mL 水混匀,用 10 mL 氯仿萃取,放入小瓶中,放入适量无水硫酸钠过夜除水,定容至 10 mL,待测。

2.1.4 2% 氢氧化钾-甲醇加热回流酯化法 取注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分样品 20 mg,置于反应烧瓶内,加入 2% 的氢氧化钠-甲醇溶液 5 mL 溶解,于电热套上加热回流 30 min,再加入 3 mL 三氟化硼乙醚溶液反应 5 min。精密加入 10 mL 氯仿,再保持 5 min。反应液冷却至室温后,加入饱和氯化

钠溶液适量,振摇 15 min,静置分层,分取氯仿层定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,备用。

以下 2 种方法结合 2.1.2 所描述的方法用于测定酸法甲酯化时不同萃取溶剂对该部分物质甲酯化效果的影响,每种方法平行制备 3 次。

2.1.5 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(萃取溶剂为正己烷) 取注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分样品 20 mg,置于反应烧瓶内,加入 4.5 mL 无水甲醇使之溶解,再慢慢加入 0.5 mL 浓硫酸,在 70 °C 下水浴中加热回流 30 min。取下冷却移入分液漏斗,加入 15 mL 水混匀,再加入 10 mL 正己烷振摇,进行萃取。静置,待液面分层后弃去水相。用无水硫酸钠除水,定容至 10 mL 量瓶中,备用。

2.1.6 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(萃取溶剂为乙酸乙酯) 取注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分样品 20 mg,置于反应烧瓶内,加入 4.5 mL 无水甲醇使之溶解,再慢慢加入 0.5 mL 浓硫酸,在 70 °C 下水浴中加热回流 30 min。取下冷却移入分液漏斗,加入 15 mL 水混匀,再加入 10 mL 乙酸乙酯振摇,进行萃取。静置,待液面分层后弃去水相。用无水硫酸钠除水,加乙酸乙酯定容至 10 mL 量瓶中,备用。

2.2 气相色谱-质谱分析条件

2.2.1 气相色谱 Abel Bonded AB-5 MS 玻璃毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm);柱温 60 °C,保持 2 min,以 10 °C · min⁻¹的速度升温至 300 °C,保持 5 min;辅助器温度 280 °C,进样口温度 250 °C,进样量 1 μL(分流进样,分流比为 5:1),氦气流速 1 mL · min⁻¹(模式:恒流)。

2.2.2 质谱条件 离子源温度 230 °C,MS 四极杆

温度 150 °C,EM 电压 1 000 V,质量扫描范围 *m/z* 50 ~ 550,溶剂延迟 5 min。

2.2.3 检测方法 将样品中主要成分甲酯化后,利用 GC-MS 进行定性分析,得到样品的总离子流图。通过数据库软件给出的 MS 标准谱图检索对照结果,并结合质谱碎片峰的人工分析,确定每一个成分的化学结构,采用峰面积归一化法确定各组成在样品中的百分含量。

2.3 结果 注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分甲酯化样品的总离子流图见图 1,经 NIST 2008 标准谱库检索,共识别了 11 个化合物,分别为 10 个脂肪族类化合物、1 个芳香族类化合物。其中亚油酸含量最高(占 20.32%),其次为棕榈酸(占 9.72%),检索结果见表 1。

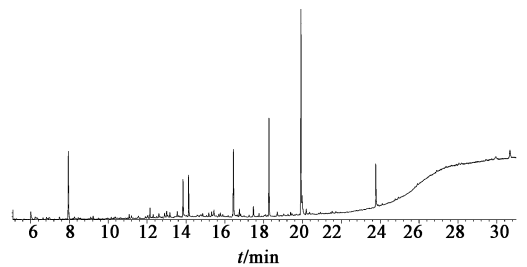


图 1 注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分甲酯化产物的 GC-MS

如表 2 所示,采用氯仿作为萃取溶剂的 3 种酸法甲酯化方法所得产物中,25% 硫酸-甲醇加热回流酯化法得到的亚油酸甲酯等主要成分的平均峰面积较小,含量较低;1% 硫酸-甲醇加热回流酯化法次之;10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法所得主要成分含量最高,较为理想。而与 2% 氢氧化钾-甲醇加热回

表 1 注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分甲酯化产物的 GC-MS 检索

No.	<i>t_R</i> /min	名称	相似度 / %	相对含量 / %
1	7.948	benzoic acid, methyl ester 苯甲酸甲酯	91	7.76
2	11.082	methyl cinnamate 肉桂酸甲酯	96	1.56
3	13.847	benzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-, methyl ester 香草酸甲酯	96	3.90
4	14.138	nonanedioic acid, dimethyl ester 壬二酸二甲酯	91	4.10
5	16.441	2-propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-, methyl ester 对羟基肉桂酸甲酯	96	7.18
6	16.750	benzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-, hydrazide 3,5-二甲氧基-4-羟基苯酰肼	98	0.45
7	17.468	2-propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-, methyl ester 阿魏酸甲酯	98	1.41
8	18.269	hexadecanoic acid, methyl ester 十六烷酸甲酯;棕榈酸甲酯	98	9.72
9	19.919	9,12-octadecadienoic acid(<i>Z,Z</i>)-, methyl ester (<i>Z,Z</i>)-9,12-十八烷二烯酸甲酯;亚油酸甲酯	99	20.32
10	19.979	(<i>Z,Z,Z</i>)-9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester 9,12,15-十八烷三烯酸甲酯;亚麻酸甲酯	99	3.32
11	20.186	octadecanoic acid, methyl ester 硬脂酸甲酯;十八碳酸甲酯	96	0.77

表2 酸法和碱法生成的脂肪酸甲酯的峰面积比较

甲酯化方法(萃取溶剂)	平均峰面积		
	棕榈酸甲酯	亚油酸甲酯	亚麻酸甲酯
1% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(氯仿)	3 485 491	7 001 533	881 049
10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(氯仿)	3 692 651	7 637 492	1 300 009
25% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(氯仿)	3 314 620	4 992 907	1 044 491
2% 氢氧化钾-甲醇加热回流酯化法(氯仿)	3 524 810	7 164 349	1 106 679
10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(乙酸乙酯)	2 943 578	5 883 396	1 008 867
10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法(正己烷)	1 044 931	2 456 130	478 380

流酯化法相比,10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法产物中亚油酸等主要成分的平均峰面积较大,含量亦较高。因此推断 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法对注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分的甲酯化效率最高。

通过比较 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法分别用正己烷、氯仿、乙酸乙酯萃取时的总离子图,并结合表 2 不同萃取溶剂对甲酯化产物峰面积的影响进行考察。萃取溶剂为正己烷时得到的成分种类极少,且含量较低;乙酸乙酯次之;氯仿萃取物检测到的成分最多,且亚油酸、棕榈酸等脂肪酸含量较高。

3 讨论

注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分物质成分复杂,大多数组分极性相近、沸点较高;而且含脂肪酸类成分较多。由于脂肪酸极性较强,是一种热敏性物质,在高温下容易发生聚合、脱羧、裂解等副反应,直接进行气相色谱分析,柱温很高固定相难以选择,色谱峰易拖尾,保留时间不易重复,有时还有假峰出现^[8-11],所以不宜直接采用 GC 法进行分析,一般都是将其进行衍生化降低沸点后,再通过 GC 分析测定。

注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分物质相对极性较大,甲酯化后的产物极性也较大,因此极性较弱的正己烷不能将其完全萃出。本实验还对萃取溶剂氯仿和乙酸乙酯进行了考察,结果得出氯仿的萃取转移率要优于乙酸乙酯。

通过对酸、碱催化的两类常用的甲酯化方法进行研究,发现 10% 硫酸-甲醇加热回流酯化法对注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分的脂肪酸甲酯化效率较高,适用面广,而且得出在不同浓度硫酸催化的几种方法中并不是硫酸浓度越高越好。碱法反应时间短,水解、甲酯化一步完成,快捷、简便,但相对酸法,对注射用益气复脉(冻干)碱醇洗脱部分脂肪酸的酯化率较低,因此该法对此物质不适用。

[参考文献]

- [1] 周丹丹,王蕴华,李凡,等.注射用益气复脉(冻干)的 HPLC 指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2009,29(11):1900.
- [2] Zhang Y C, Lu B J, Zhao M H, et al. Effect of Shengmai injection on vascular endothelial and heart functions in patients with coronary heart disease complicated with diabetes mellitus [J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(4):281.
- [3] Zhang Y C, Chen R M, Lu B J, et al. Effect of Shengmai injection on cardiac function and inflammatory reaction in patients with acute coronary syndrome [J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(2):107.
- [4] 丁晓飞,陈光,刘玉兰.注射用生脉对心源性休克的影响[J].中国中药杂志,2007,32(21):2298.
- [5] 韩晓萍,李德坤,周大铮,等.近红外光谱法快速测定注射用益气复脉(冻干)中人参总皂苷的含量[J].光谱实验室,2011,28(4):1888.
- [6] 周永红.银杏叶中脂肪酸的 GC-MS 分析研究[J].分析科学学报,2005,21(4):471.
- [7] 寇秀颖,于国萍.脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究[J].食品研究与开发,2005,26(4):46.
- [8] 张金廷.脂肪酸及其深加工手册[M].北京:化学工业出版社,2002:362.
- [9] 吕芳,叶正良,李德坤,等.加热时间对注射用益气复脉(冻干)药液中不同成分的影响研究[J].陕西中医,2012,33(10):1414.
- [10] 吴衍风,李德坤,周大铮,等.色差计法测定注射用益气复脉(冻干)溶液的颜色[J].中华中医药学刊,2012,30(1):52.
- [11] 王志伟,高钧,胡靖,等.动态浊度法测定益气复脉(冻干)中细菌内毒素的含量[J].沈阳药科大学学报,2010,27(5):409.

[责任编辑 邹晓翠]