

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.14.010

反相高效液相色谱法同时测定中成药保健食品中4种生育酚含量

张 竞,王雪芹,王 倩,徐金玲,王海波

(河南省食品药品检验所,河南 郑州 450003)

摘要:目的 建立同时测定中成药保健食品中4种生育酚含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为 YMC Carotenoid - C₃₀ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(梯度洗脱),流速为 0.8 mL/min,检测波长为 294 nm,柱温为 20 °C,进样量为 10 μL。结果 α, β, γ, δ-生育酚质量浓度线性范围分别为 5.28~63.36, 5.42~65.09, 5.23~62.77, 5.10~61.15 μg/mL($r > 0.999$),精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%;平均加样回收率分别为 95.77%, 95.23%, 97.43%, 94.83%, RSD 值分别为 1.13%, 1.86%, 1.34%, 1.73% ($n = 6$)。结论 该方法操作简便,准确,精密性、稳定性、重复性、耐用性均较好,可用于同时测定中成药保健食品中4种生育酚含量。

关键词:反相高效液相色谱法;中成药保健食品;天然维生素 E; α-生育酚; β-生育酚; γ-生育酚; δ-生育酚;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)14-0029-03

Simultaneous Determination of Four Tocopherols in Chinese Patent Medicine and Functional Food by RP-HPLC

ZHANG Jing, WANG Xueqin, WANG Qian, XU Jinling, WANG Haibo

(Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou, Henan, China 450003)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for content determination of four tocopherols in Chinese patent medicine and functional food. **Methods** The chromatographic column was YMC Carotenoid - C₃₀ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - water (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 294 nm, the column temperature was 20 °C and the sample size was 10 μL. **Results** The α, β, γ, δ-tocopherol showed good linear relationship in the ranges of 5.28 - 63.36, 5.42 - 65.09, 5.23 - 62.77, 5.10 - 61.15 μg/mL ($r > 0.999$). RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%. The average recoveries were 95.77%, 95.23%, 97.43%, 94.83%, RSDs were 1.13%, 1.86%, 1.34%, 1.73% ($n = 6$).

Conclusion The method is simple and accurate, it has good precision, stability, repeatability and durability, which can be used for the simultaneous determination of four tocopherols in Chinese patent medicine and functional food.

Key words: RP-HPLC; Chinese patent medicine and functional food; natural vitamin E; α-tocopherol, β-tocopherol; γ-tocopherol; δ-tocopherol; content determination

维生素 E 又称生育酚,为脂溶性维生素,具有抗氧化、抗衰老、促生育功能、提高免疫、保护肝脏、提高记忆、防治白内障、减轻肾损害等众多生理功能^[1]。按其来源可分为人工合成和天然维生素 E,来自动植物的天然维生素 E 是苯并二氢吡喃的衍生物,共有 8 种类似物,包括 α, β, γ, δ-生育酚和 α, β, γ, δ-生育三烯酚,生理活性均不同,其中以 α-生育酚生理活性最强,其次为 β-生育酚^[2]。测定维生素 E 的传统方法主要有比色法、分光光度法、红外光谱法、荧光分析法、电化学法、气相色谱法等^[3],上述方法灵敏度和精密度均较低,准确性较差。高效液相色谱(HPLC)法的灵敏度、重复性、分辨率、分离效果均较好,本研究中参考文献[4-11],采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对 4 种生育酚进行定量分析。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪,包括 2998 型光电二极管

管阵列检测器(美国 Waters 公司);XPE205 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);XMTD-204 型数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.2 试剂

安睡美胶囊(洛阳新春都生物制药有限公司,规格为每粒 380 mg,样品 I);玉妍丸(汉南汉方药业有限责任公司,规格为每粒 0.14 g,样品 II);α-生育酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 190168-201601,含量为 100.0%)、β-生育酚对照品(上海甄准生物科技有限公司,批号为 ZZS17121601,含量为 96.0%)、γ-生育酚对照品(批号为 AC171010-12,含量为 99.3%)、δ-生育酚对照品(批号为 SM171007-28,含量为 94.87%),均购自美国 Stanford Analysis Chemicals 公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC Carotenoid - C₃₀ 柱(250 mm × 4.6 mm,

第一作者:张竞,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品与保健食品检验及质量标准,(电话)0371-65566283(电子信箱) zjing780624@163.com。

5 μm);流动相:甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~13 min 时 96% A, 13~20 min 时 96% A \rightarrow 100% A, 20~24 min 时 100% A, 24~24.5 min 时 100% A \rightarrow 96% A, 24.5~30 min 时 96% A);流速:0.8 mL/min;检测波长:294 nm;柱温:20 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别称取 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚对照品各适量,精密称定,分别置 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,作为单一对照品贮备液;分别精密量取 5 mL,置同一 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取样品内容物适量,精密称定,置 150 mL 锥形瓶中,加 20 mL 温水,混匀,再加 1.0 g 维生素 C 和 0.1 g 丁羟甲苯,混匀,加 30 mL 无水乙醇,15 mL 氢氧化钾溶液(50 g \rightarrow 100 g),摇匀后于 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡皂化 30 min,立即冷却至室温;将皂化液用 30 mL 水转入 250 mL 分液漏斗中,加 50 mL 石油醚(30 \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$)-乙醚(1:1, V/V)混合液,振荡萃取 5 min,将下层溶液转移至另一 250 mL 分液漏斗中,加入 50 mL 混合醚液再次萃取,合并醚层;用水洗涤至中性(约需 3 次,每次约 30 mL);将洗涤后的醚层经无水硫酸钠滤入旋转蒸发瓶中,用 15 mL 石油醚洗涤分液漏斗及无水硫酸钠洗涤 2 次,洗液并入蒸发瓶内,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下,水浴充氮气蒸至近干;残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,定容,即得。

阴性对照品溶液:按样品处方和工艺制备缺天然维生素 E 的阴性样品,依法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL ,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。结果理论板数按各待测成分峰计均大于 9 000,分离度均大于 1.5,基线分离良好。

线性关系考察:精密量取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得质量浓度分别为 5, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列溶液。精密量取 10 μL ,按拟订色谱条件进样,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、

峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

表 1 回归方程与线性范围($n=5$)

待测成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)
α -生育酚	$Y=4\ 852.09X-1\ 538.42$	0.999 2	5.28~63.36
β -生育酚	$Y=4\ 237.12X-4\ 200.65$	0.999 3	5.42~65.09
γ -生育酚	$Y=4\ 991.52X-2\ 875.57$	0.999 7	5.23~62.77
δ -生育酚	$Y=5\ 461.00X-2\ 675.11$	0.999 5	5.10~61.15

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚峰面积的 RSD 分别为 1.12%, 0.93%, 0.60%, 1.21% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(样品 I)适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚峰面积的 RSD 分别为 1.80%, 0.93%, 1.31%, 1.74% ($n=6$),表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:称取同一批样品(样品 I)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定 6 次,记录峰面积,并计算含量。结果 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚平均含量分别为 2.59, 0.82, 20.36, 8.70 mg/g, RSD 分别为 1.33%, 1.81%, 1.90%, 1.64% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(样品 I)适量,共 6 份,分别加入低、中、高质量浓度的对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 2。

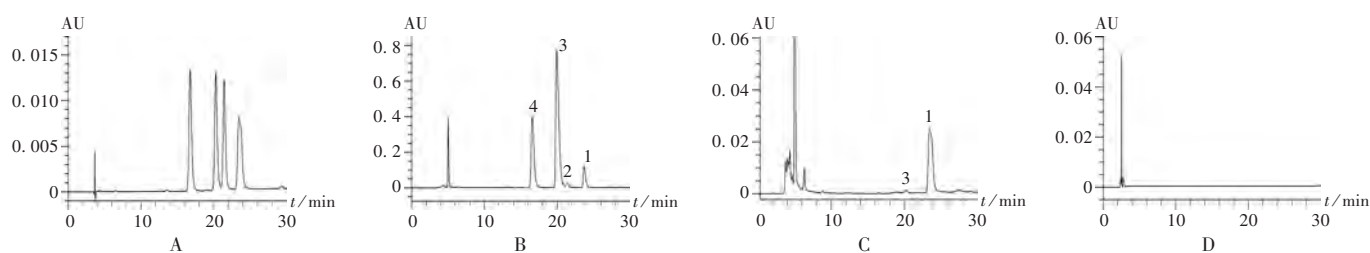
2.4 样品含量测定

取各样品适量,精密称定,分别依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,平行测定 3 次,记录峰面积并计算含量。结果见表 3。

3 讨论

3.1 分析方法和色谱柱选择

对于 4 种生育酚,尤其是 β -生育酚和 γ -生育酚,采用传统的 C_{18} 柱很难达到基线分离,多数采用正



1. α -生育酚 2. β -生育酚 3. γ -生育酚 4. δ -生育酚
A. 混合对照品溶液 B. 样品 I 供试品溶液 C. 样品 II 供试品溶液 D. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

表2 加样回收试验结果(n=6)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
α-生育酚	0.5003	1.296	1.056	2.297	94.79	95.77	1.13
	0.5051	1.308	1.056	2.338	97.54		
	0.5032	1.303	1.056	2.314	95.74		
	0.5022	1.301	1.056	2.317	96.21		
	0.5018	1.300	1.056	2.298	94.51		
	0.5039	1.305	1.056	2.317	95.83		
β-生育酚	0.5003	0.410	0.542	0.921	94.28	95.23	1.86
	0.5051	0.414	0.542	0.922	93.73		
	0.5032	0.413	0.542	0.935	96.31		
	0.5022	0.412	0.542	0.929	95.39		
	0.5018	0.411	0.542	0.918	93.54		
	0.5039	0.413	0.542	0.945	98.15		
γ-生育酚	0.5003	10.186	10.462	20.596	99.50	97.43	1.34
	0.5051	10.284	10.462	20.533	97.96		
	0.5032	10.245	10.462	20.305	96.16		
	0.5022	10.225	10.462	20.456	97.79		
	0.5018	10.217	10.462	20.388	97.22		
	0.5039	10.259	10.462	20.297	95.95		
δ-生育酚	0.5003	4.353	4.077	8.202	94.41	94.83	1.73
	0.5051	4.394	4.077	8.192	93.16		
	0.5032	4.378	4.077	8.323	96.76		
	0.5022	4.369	4.077	8.199	93.94		
	0.5018	4.366	4.077	8.187	93.72		
	0.5039	4.384	4.077	8.339	97.01		

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

待测样品	编号	α-生育酚	β-生育酚	γ-生育酚	δ-生育酚
样品 I	1	2.59	0.82	20.36	8.70
	2	2.42	0.79	20.25	8.61
	3	2.63	0.85	20.39	8.78
样品 II	1	0.84	0.00	0.02	0.00
	2	0.88	0.00	0.03	0.00
	3	0.82	0.00	0.02	0.00

相色谱法彻底分离4种异构体,但该方法在柱稳定性和保留时间重复性方面存在不足。本试验中采用具有长链烷基键合相的C₃₀柱,由于其具有更高含碳量,对脂溶性的生育酚有更好的保留和分离能力,可很好地分离4种生育酚。随着色谱技术的不断发展,有望采用更高性能的色谱柱和检测器,将会进一步缩短检测时间,提高检测灵敏度。

3.2 流动相选择

本试验中考察了纯甲醇和甲醇-水梯度洗脱2种流动相,纯甲醇作流动相时,4种生育酚不能有效分离,β-生育酚和γ-生育酚色谱峰重叠;甲醇-水梯度洗脱时,则既能让4种生育酚达到有效分离,又能防止其他脂溶性大分子杂质在色谱柱中的沉淀,延长了色谱

柱的寿命。考察了1.0,0.8,0.6 mL/min 3种流速,流速越慢,各色谱峰分离效果越好,但样品保留时间则相对延长,检测灵敏度随之降低。对比后选则了0.8 mL/min为流速,在保证足够分离效果的前提下,使4种生育酚的保留时间控制在25 min以内,且峰宽适中。

3.3 不同样品生育酚含量分析

本试验中考察了2个不同厂家2个品种含天然维生素E的样品,2个样品中4种生育酚含量差异较大。维生素E中抗氧化作用最强的是α-生育酚(活性为100%),然后是β-生育酚(活性为12%~40%)、γ-生育酚(活性为3.0%~20%)、δ-生育酚(活性为0.3%~1.0%)。国际市场上,天然维生素E专门指活性最高的α-生育酚,是从植物油加工副产物中提取纯化而来。但市场上的天然维生素E质量参差不齐,尤其是α-生育酚含量差异较大。为有效控制含天然维生素E类中成药和保健食品的质量,建议药品和保健食品生产企业进一步考察处方中所添加天然维生素E的化合物类型及合理的添加剂量。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便,准确,精密性、稳定性、重复性、耐用性均较好,可用于同时测定中成药保健品中4种生育酚含量。

参考文献:

- [1] 范丽萍, 靳雅欣, 赵福永. 生育三烯酚生物合成与生理功能研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2012, 9(4): 41-45.
- [2] 袁明雪, 黄象男, 韩绍印, 等. 天然维生素E的研究进展[J]. 生物学杂志, 2008, 25(3): 13-15.
- [3] 别玮, 刘韦华, 王琳丽, 等. 食用植物油中天然维生素E检测技术研究进展[J]. 现代仪器与医疗, 2015, 21(6): 6-9.
- [4] 蔺娟, 闵祺, 任丽萍, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定多烯酸乙酯软胶囊中4种生育酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(10): 1866-1871.
- [5] 于瑞祥, 张欣, 张秀芹, 等. 反相高效液相色谱法同时测定植物油中四种生育酚[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 764-767.
- [6] 刘艳丽. 高效液相色谱法测定复方三维亚油酸胶丸I中维生素E含量[J]. 中国药业, 2014, 23(12): 78-79.
- [7] 张东, 薛雅琳. 高效液相色谱法测定玉米中生育酚异构体[J]. 粮油食品科技, 2012, 20(1): 36-38.
- [8] 邓鸿铃, 吴钟玲, 王海波, 等. 口香糖中维生素E(α-生育酚)含量的检测方法研究[J]. 食品工业, 2013, 34(8): 211-214.
- [9] 黄百芬, 谭莹, 姚建花, 等. 浙江省居民常用食用植物油中4种生育酚异构体的含量分析[J]. 营养学报, 2013, 35(1): 78-82.
- [10] 张征, 徐春祥, 刘佳娣, 等. 正相超高压液相色谱法测定植物油中的维生素E[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(10): 109-112.
- [11] 张晓雷, 任国谱, 颜景超, 等. 正相高效液相色谱法检测婴幼儿乳粉中的α-生育酚、α-生育酚醋酸酯[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(7): 53-56.

(收稿日期: 2018-11-30)