

高效液相色谱-荧光检测法测定脂溶性药物中 α -生育酚

李 婕, 袁 松, 黄海伟, 何 兰*

中国食品药品检定研究院, 北京 102269

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-荧光检测法测定 α -生育酚的方法。**方法** 建立高效液相色谱-荧光检测法, 采用 Merck LiChrosorb Si60 (4×250 mm, 5 μ m) 硅胶柱、荧光检测器, 以 0.75% 异丙醇的正己烷溶液为流动相, 考察方法专属性、线性关系、检测限与定量限、精密度、加样回收率、稳定性, 并与高效液相色谱-紫外检测法进行灵敏度比较; 检测 ω -3 羧酸胶囊、维生素 A 棕榈酸酯和维生素 E 中 α -生育酚含量, 与高效液相色谱-紫外检测法检测结果进行比较。**结果** 建立的高效液相色谱-荧光检测法中 α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚分离良好, 在 3~30 μ g/mL 呈良好的线性关系 ($r=0.9998$); 信噪比约为 1:10, 定量限为 0.15 μ g/mL; 信噪比约为 1:3, 检测限为 0.05 μ g/mL; 添加 ω -3 羧酸、维生素 A 棕榈酸酯、维生素 E, 加样回收率分别为 (98.7±1.4) %、(97.6±0.8) %、(99.5±2.3) % ($n=9$); 精密度、稳定性均符合要求; 荧光检测器较紫外检测器灵敏度高 3~5 倍, 且受其它主药成分干扰小; 应用两种方法检测的 3 种产品中 α -生育酚含量相近。**结论** 该方法灵敏、准确、简便, 专属性好, 可用于测定多种脂溶性药物中 α -生育酚的含量。

关键词: 高效液相色谱-荧光检测法; 高效液相色谱-紫外检测法; α -生育酚; 含量; ω -3 羧酸胶囊; 维生素 A 棕榈酸酯; 维生素 E
中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0096-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.017

Determination of content of α -tocopherol in fat-soluble drugs by HPLC with fluorescence detection

LI Jie, YUAN Song, HUANG Haiwei, HE Lan

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102269, China

Abstract: Objective To establish a method to determine the content of α -tocopherol in fat-soluble drugs by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. **Method** Merck LiChrosorb Si60 silica gel column (4 mm × 250 mm, 5 μ m) and fluorescence detector were adopted to establish HPLC-fluorescence detection. The mobile phase was 0.75% isopropyl alcohol in n-hexane. The specific properties, linear relations, detection limits and quantitative limits, precision, rate of recovery, and stability of the established methods were investigated, and its sensitivity was compared with that of HPLC-UV detection. The contents of α -tocopherol in Omega-3 carboxylic acid capsules, vitamin A palmitate and vitamin E were detected and compared with those of HPLC with UV detection. **Results** From the method established in this study, good separation of α , β , γ , and δ -tocopherol could be achieved, and the standard curve has a good linear relation in the range of 3–30 μ g/mL ($r = 0.9998$). The signal-to-noise ratio was 1:10, and the limit of quantification was 0.15 μ g/mL; Signal-to-noise ratio was 1:3, and the detection limit was 0.05 μ g/mL. After adding Omega-3 carboxylic acid, vitamin A palmitate and vitamin E, the recoveries were (98.7 + 1.4)%, (97.6 + 0.8)% and (99.5 + 2.3)%, respectively ($n = 9$). Precision and stability are in line with the requirements of a UV detector. The sensitivity of fluorescence detector is 3~5 times higher than that of UV detector, and is less disturbed by other main components. The contents of α -tocopherol in three products detected by two methods were similar. **Conclusion** This method is sensitive, accurate, simple, and good specificity, and will be used for the determination of the content of α -tocopherol in various fat-soluble drugs.

Key words: HPLC-fluorescence detection; HPLC - UV detection; α -tocopherol; content; Omega-3 carboxylic acid capsules; vitamin A palmitate; vitamin E

收稿日期: 2017-09-01

第一作者: 李 婕, 女, 硕士, 主要从事化学药物质量控制和研究。Tel: (010)53851577 E-mail: lijie@nifdc.org.cn

*通信作者: 何 兰, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事化学药物质量控制、天然产物合成及纳米技术研究。Tel: (010)53851600

E-mail: helan1961@aliyun.com

天然生育酚包含4种光学异构体,根据其苯环上所含甲基位置和数目的不同,将它们分别命名为 α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚,其中以 α -生育酚的生物活性最高,是一种有效的抗氧化剂,不仅常作为食品添加剂,还广泛作为脂溶性药物的抗氧化剂,以保证药物的稳定性。

α -生育酚的定量方法主要有气相色谱法^[1-2]、高效液相色谱-紫外检测法^[3-5],也有少数文献报道高效液相色谱-荧光检测法^[6]。其中气相色谱法需要加入内标,且色谱峰保留时间较长;反相高效液相色谱法存在不能将生育酚的4种异构体分开的缺点;正相高效液相色谱-荧光检测法能够实现生育酚异构体的分离,并且灵敏度较紫外检测器高、分析速度快,是一种较好的方法,但必须通过优化流动相的组成以及荧光检测器参数来消除不同脂溶性药物的干扰。

本研究建立了一种通用的高效液相色谱-荧光检测法来测定 α -生育酚的含量,并与紫外法进行了结果比较。该方法灵敏度高、专属性强、准确可靠,可用于 ω -3 羧酸胶囊、维生素A棕榈酸酯和维生素E中 α -生育酚的测定,同时还可为其其它脂溶性药物中 α -生育酚的测定提供新思路。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪和 Open Lab 软件(美国安捷伦);XP205 电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KH-500 型超声波(昆山禾创)。

1.2 药物及主要试剂

α -生育酚对照品, USP, 质量分数为 98.5%, 批号 O0K291; 生育酚混合对照品, SIGMA-ALDRICH, 批号 MKBX0861V; ω -3 羧酸胶囊, 企业 A, 规格 1 g/粒, 3 批; 维生素 A 棕榈酸酯, 企业 B, 1 批; 维生素 E, 企业 C, 1 批。正己烷, Fisher, 批号 143348, 质量分数 \geq 99.9%; 异丙醇, Fisher, 批号 135261, 质量分数 \geq 99.9%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Merck LiChrosorb Si60 (4 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相为 0.75% 异丙醇的正己烷溶液; 体积流量 1.2 mL/min; 荧光检测器: 激发波长为 290 nm, 发射波长为 330 nm; 紫外检测器: 检测波长为 290 nm; 进样体积 10 μ L; 柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取 α -生育酚对照品适

量, 加流动相溶解制成约含 α -生育酚 15 μ g/mL 的溶液, 作为 α -生育酚对照品溶液。

2.2.2 专属性溶液 称取生育酚混合对照品适量, 加流动相溶解制成约含生育酚 45 μ g/mL 的溶液, 作为专属性溶液。

2.2.3 线性溶液 精密称取 α -生育酚对照品适量, 加流动相溶解制成含 α -生育酚 750 μ g/mL 的溶液, 作为 α -生育酚对照品储备溶液。再分别精密量取 α -生育酚对照品储备溶液 (750 μ g/mL) 适量, 加流动相稀释制成含 α -生育酚分别为 3.0、7.5、10.5、15.0、22.5、30.0 μ g/mL 的溶液, 作为 α -生育酚线性对照品溶液。

2.2.4 回收率溶液 精密称取 ω -3 羧酸胶囊内容物适量, 加流动相溶解并定量稀释, 制成约含 α -生育酚 15 μ g/mL 的溶液, 作为 ω -3 羧酸储备液。精密量取 α -生育酚线性对照品溶液 (30 μ g/mL) 2.0、2.5、3.0 mL 各 3 份, 分别置 5 mL 量瓶中, 再分别用 ω -3 羧酸储备液稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率溶液(1)。

精密称取维生素 A 棕榈酸酯(批号 PY20110302) 适量, 加流动相溶解并定量稀释, 制成约含 α -生育酚 15 μ g/mL 的溶液, 作为维生素 A 棕榈酸酯储备液。精密量取 α -生育酚线性对照品溶液 (30 μ g/mL) 2.0、2.5、3.0 mL 各 3 份, 分别置 5 mL 量瓶中, 再分别用维生素 A 棕榈酸酯储备液稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率溶液(2)。

精密称取维生素 E (批号 100062-201110) 适量, 加流动相溶解并定量稀释, 制成约含 α -生育酚 15 μ g/mL 的溶液, 作为维生素 E 储备液。精密量取 α -生育酚线性对照品溶液 (30 μ g/mL) 2.0、2.5、3.0 mL 各 3 份, 分别置 5 mL 量瓶中, 再分别用维生素 E 储备液稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率溶液(3)。

2.2.5 供试品溶液 分别精密称取 ω -3 羧酸胶囊内容物、维生素 A 棕榈酸酯、维生素 E 适量, 加流动相溶解并稀释制成含 α -生育酚约 15 μ g/mL 的溶液, 作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取空白溶剂, 专属性溶液, ω -3 羧酸胶囊、维生素 A 棕榈酸酯、维生素 E 供试品溶液, 按照“2.1”项下的荧光色谱条件进样测定, 考察生育酚异构体的分离情况。结果表明, α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚分离良好(图 1)。

2.3.2 线性范围 取 α -生育酚线性对照品溶液, 按

照“2.1”项下的荧光色谱条件进样测定。以浓度对峰面积作线性回归,得回归方程: $A=10.594C-2.2824$, $r=0.9998$ 。结果表明, α -生育酚在质量浓度 3~30 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 检测限与定量限 取 α -生育酚线性对照品溶液,逐步稀释,制成含 α -生育酚 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,

信噪比约为 1:10,达定量限;含 α -生育酚 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,信噪比约为 1:3,达检测限。

2.3.4 精密度试验 取 α -生育酚线性对照品溶液 (15 $\mu\text{g/mL}$),按照“2.1”项下的色谱条件重复进样 6 次,计算 α -生育酚峰面积的 RSD 为 0.6%,符合检测要求。

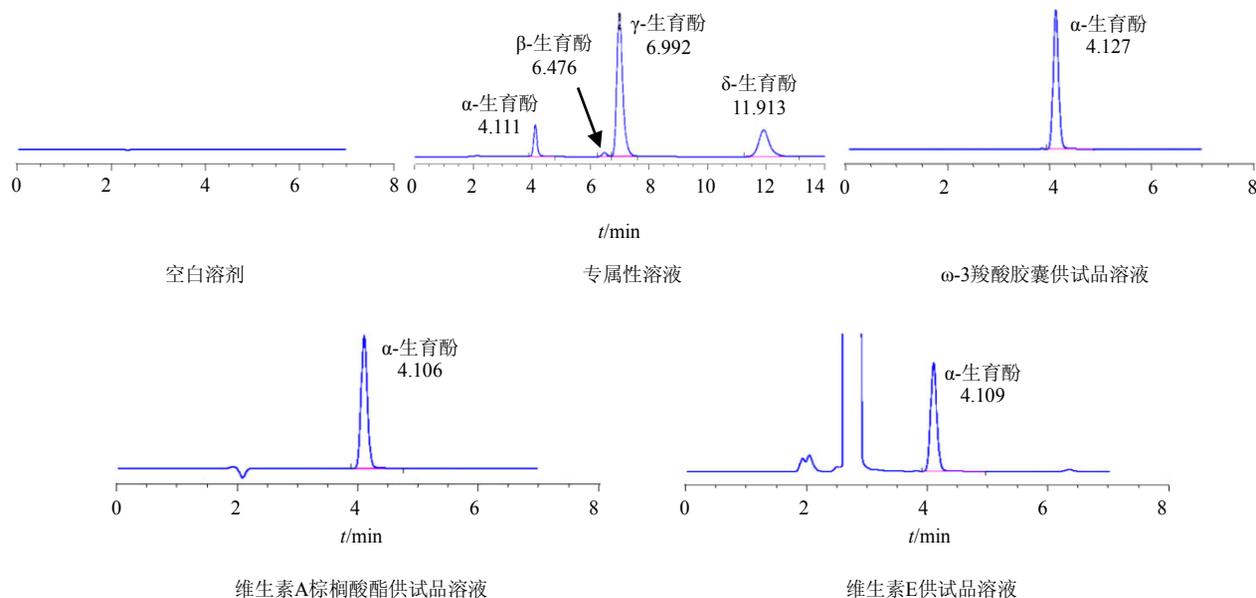


图 1 几种药物中 α -生育酚高效液相色谱-荧光检测色谱图

Fig. 1 HPLC-Fluorescence chromatograms for α -tocopherol in several drugs

2.3.5 回收率试验 取回收率溶液 (1)、(2)、(3),按照“2.1”项下的荧光色谱条件进样测定,采用对照品外标法,计算回收率分别为 $(98.7 \pm 1.4)\%$ 、 $(97.6 \pm 0.8)\%$ 、 $(99.5 \pm 2.3)\%$ ($n=9$),符合检测要求。

2.3.6 稳定性试验 取 α -生育酚线性对照品溶液 (15 $\mu\text{g/mL}$),分别于 0、2、4、6、8 h,按照“2.1”项下的荧光色谱条件进行测定,计算 α -生育酚峰面积的 RSD 为 2.2%,符合检测要求。

2.3.7 样品测定 取供试品溶液,照“2.1”项下的荧光色谱条件进行测定,采用对照品外标法,计算 α -生育酚的含量,结果见表 1,两种检测方法 α -生育酚的含量相近。

3 讨论

3.1 检测器的选择及参数优化

文献^[3-5]多采用紫外检测器对 α -生育酚进行测定,也有文献采用荧光检测器^[6],但鲜有文献报道两种检测器的差异。本实验方法开发时采用紫外检测器和荧光检测器串联。结果表明,荧光检测器较紫外检测器灵敏度高 3~5 倍,且受其它主药成分干

扰小,结果更加可靠故最终选择荧光检测器来测定 α -生育酚的含量 (图 2)。

本实验通过对 α -生育酚对照品溶液及供试品溶液的紫外全波长扫描确定了荧光检测器的激发波长为 290 nm,固定激发波长,扫描发射波长,确定发射波长为 330 nm。

3.2 色谱柱的选择

本实验尝试不同品牌的硅胶柱: Phenomenex luna Silica、Thermo Synchronis Silica 和 Merck Li

表 1 α -生育酚的测定结果

Table 1 Content of α -tocopherol

品种	企业	实测质量分数%	
		荧光法	紫外法
ω -3 羧酸胶囊	A	0.29	0.28
		0.29	0.28
		0.30	0.29
维生素 A 棕榈酸酯	B	1.22	1.33
维生素 E	C	0.48	0.49

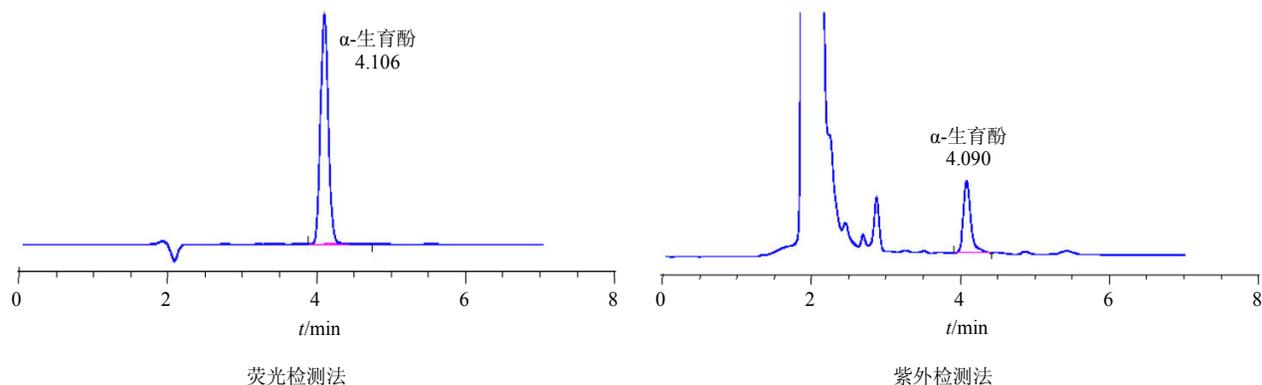


图2 荧光检测法与紫外检测法测定维生素A棕榈酸酯中的 α -生育酚色谱图对比

Fig. 2 HPLC-Fluorescence and HPLC-UV chromatograms for α -tocopherol in Vitamin A Palmitate

Chrosorb Si60 等。方法学研究结果表明:采用 Merck LiChrosorb Si60 硅胶柱, α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚分离良好, 并且分析时间较快, 与其他硅胶柱相比, 有明显优势。

3.3 流动相的优化

本实验方法开发时, 采用正相色谱分离系统中应用较多的溶剂正己烷和异丙醇作为流动相。通过流动相优化, 最终确定了流动相组成为 0.75%异丙醇的正己烷溶液, 同时将该流动相比例进行上下微调, 分别采用 0.5%和 1.0%异丙醇的正己烷溶液进行试验。结果表明, 4 种生育酚异构体仍能够达到基线分离, 且脂溶性药物成分不干扰测定, 方法耐用性较好。

参考文献

[1] 王倩, 范宏茜, 哈国坚. 气相色谱法测定维生素 E 微

乳中维生素 E 的含量 [J]. 广东药学院学报, 1997, 13(1): 14-17.

[2] 朱克旭, 程璐. 气相色谱法测定 VitE 乳膏中维生素 E 含量 [J]. 安徽医药, 2006, 10(9): 674.

[3] 杨红娟, 袁文杰, 许艳稚. 维生素 E 软胶囊中 α -生育酚的含量测定 [J]. 中国药事, 2009, 23(10): 995-996.

[4] 徐响, 刘光敏, 高彦祥. 基于正相高效液相色谱法的维生素 E 异构体含量测定 [J]. 食品科学, 2008, 24(4): 135-138.

[5] 李柰, 樊琛, 李小波, 等. 食用植物油中生育酚含量测定方法优化及分析 [J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(3): 59-63.

[6] 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.