

复方亚麻酸软胶囊中大豆卵磷脂和 γ -亚麻酸含量测定的方法学研究

隋国奇*,蔡广知,李连坤,贡济宇*(长春中医药大学药学院,长春 130117)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0412-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.44

摘要 目的:建立测定复方亚麻酸软胶囊中大豆卵磷脂和 γ -亚麻酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法测定制剂中大豆卵磷脂的含量;色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为甲醇-水(84:16, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为219 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μ l;采用气相色谱法测定制剂中 γ -亚麻酸的含量;色谱柱为DB WAX柱,进样口温度为210 ℃,程序升温,载气为氦气,流速为1 ml/min,分流比为1:30,进样量为0.02 μ l。结果:*L*- α -卵磷脂和 γ -亚麻酸甲酯检测质量浓度线性范围分别为4.64~16.24 μ g/ml、0.093 44~0.327 04 μ g/ml($r=0.999\ 9, 0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为96.79%~99.36%(RSD=0.93%, $n=6$)、96.63%~99.07%(RSD=1.01%, $n=6$)。结论:该两种方法操作简便、稳定、重复性好,可用于复方亚麻酸软胶囊中大豆卵磷脂和 γ -亚麻酸含量的测定。

关键词 复方亚麻酸软胶囊;气相色谱法;高效液相色谱法;大豆卵磷脂; γ -亚麻酸

Study on Contents Determination of Phospholipid and γ -linolenic Acid in Compound Linolenic Acid Soft Capsule

SUI Guoqi, CAI Guangzhi, LI Liankun, GONG Jiyu (School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of phospholipid and γ -linolenic acid in Compound linolenic acid soft capsule. METHODS: HPLC was conducted to determine the content of soybean lecithin; the column was Agilent TC-C₁₈ with mobile phase of methanol-water (84:16, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 219 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μ l. Gas chromatography was conducted to determine the content of γ -linolenic acid in the preparation; the column was DB WAX, injector temperature was 210 ℃ by temperature programmed, carrier gas was helium at a flow rate of 1 ml/min by split injection (split ratio of 1:30), and the injection volume was 0.02 μ l. RESULTS: The linear range was 4.64-16.24 μ g/ml for phospholipid ($r=0.999\ 6$) and 0.093 44-0.327 04 μ g/ml for γ -linolenic acid methy ester ($r=0.999\ 6$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recoveries were 97.44%-99.36% (RSD=0.93%, $n=6$) and 97.22%-99.07% (RSD=1.01%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, stable with good separation, and can be use for the contents determination of phospholipid and γ -linolenic acid in Compound linolenic acid soft capsule.

KEYWORDS Compound linolenic acid soft capsule; Gas chromatography; HPLC; Phospholipid; γ -linolenic acid

复方亚麻酸软胶囊具有活血化痰、利湿化痰等功效,临床常用于肝肾阴虚、脉络瘀阻所致高血脂、动脉粥样硬化、心悸、胸痹、心痛、肥胖等症的治疗^[1-6]。复方亚麻酸软胶囊有效成分含量低、服用量大、药物稳定性较差,给患者使用带来不便,限制了其进一步应用和开拓市场。当前,随着人们生活水平的提高和现代中药研究技术的发展,亟需对复方亚麻酸软胶囊质量进行进一步优化,故笔者分别采用高效液相色谱(HPLC)法和气相色谱法测定了复方亚麻酸软胶囊中大豆卵磷脂和 γ -亚麻酸的含量,以为该制剂质量标准的完善和提高提供参考^[7]。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC系统(包括VWD紫外检测器)、7820型气相色谱仪(美国Agilent公司);AE240型万分之一电子天平、AE201型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);

* 硕士研究生。研究方向:中药分析。E-mail:suiguogqi@sina.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析。电话:0431-86172207。E-mail:gyj0431@126.com

JB-2A 磁力搅拌旋转蒸发仪(上海申科仪器有限公司);RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KQ-3000E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方亚麻酸软胶囊(长春中医药大学药学院自制,批号:121201、121202、121203,规格:0.3 g/粒);*L*- α -卵磷脂对照品(美国Sigma公司,批号:113K5214,纯度:99.0%); γ -亚麻酸甲酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111624-201305,纯度:98%);试验所用试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 大豆卵磷脂含量的测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水(84:16, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:219 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μ l。理论板数以*L*- α -卵磷脂计不低于3000,分离度>1.5。色谱见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精确称取*L*- α -卵磷脂对照品11.6

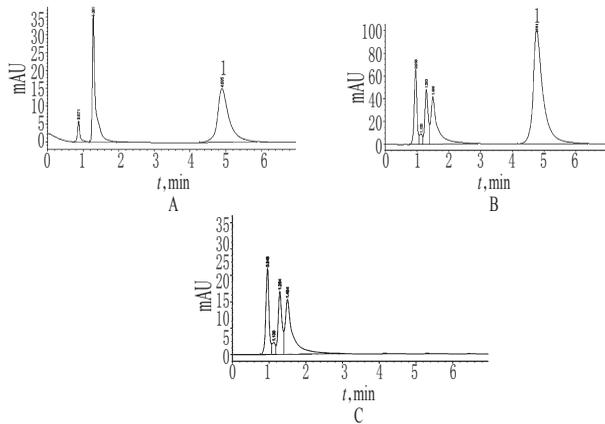


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.L- α -卵磷脂

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test samples;C.negative control;1.L- α -phospholipid

mg,置于10 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取装量差异项下的样品内容物,研细,精密称定0.3 g,置于100 ml烧杯中,加甲醇适量,超声(功率:300 W,频率:50 kHz,下同)处理20 min,放冷,移至100 ml量瓶中,用甲醇定容,摇匀,滤过,精密量取续滤液2 ml,转移至10 ml离心管中,用甲醇定容,摇匀,以半径为12.5 cm、12 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按复方亚麻酸磷脂软胶囊处方和制备工艺制备缺大豆卵磷脂的阴性样品,并按“2.1.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.1.5 线性关系考察 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,稀释制成质量浓度分别为4.64、6.96、9.28、11.6、13.92、16.24 $\mu\text{g/ml}$ 的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各10 μl ,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以L- α -卵磷脂质量浓度(x, $\mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=81.827x+22.259$ ($r=0.9999$)。结果表明,L- α -卵磷脂检测质量浓度线性范围为4.64~16.24 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.1.6 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,大豆卵磷脂(以L- α -卵磷脂计)峰面积的RSD=2.0% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(批号:121201)适量,分别于放置0、2、4、6、8、10 h时进样测定,记录峰面积。结果,大豆卵磷脂(以L- α -卵磷脂计)峰面积的RSD=2.6% ($n=6$),表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.1.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:121201)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,大豆卵磷脂(以L- α -卵磷脂计)峰面积的RSD=1.5% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:121201)适量,共6份,分别加入一定质量的L- α -卵磷脂对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,计算大豆卵磷脂(以L- α -卵磷脂计)含量并计算加样回收

率,结果见表1。

表1 大豆卵磷脂的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test for phospholipid ($n=6$)

取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.34	0.137	0.156	0.290	98.08		
0.37	0.148	0.156	0.300	97.44		
0.38	0.152	0.156	0.303	96.79	98.08	0.93
0.36	0.145	0.156	0.298	98.08		
0.35	0.141	0.156	0.296	99.36		
0.35	0.140	0.156	0.294	98.72		

2.1.10 样品中大豆卵磷脂的含量测定^[6] 取3批样品各适量,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定并计算大豆卵磷脂(以L- α -卵磷脂计)含量,结果见表2。

表2 样品中大豆卵磷脂的含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of phospholipid content determination in samples ($n=3$)

批号	L- α -卵磷脂, mg/g(纯化后)
121201	53.30
121202	58.38
121203	52.42

2.2 γ -亚麻酸含量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:DB-WAX(30 mm \times 0.25 mm \times 0.25 μm);进样口温度:210 $^{\circ}\text{C}$;分流比:1:30;柱温:程序升温(升温程序见表3);载气:氦气;流速:1 ml/min;进样量:0.02 μl 。在上述色谱条件下,理论板数以 γ -亚麻酸甲酯峰计不少于6 000,分离度 >2 ,各成分基线分离良好。色谱见图2。

表3 升温程序($n=3$)

Tab 3 Temperature programmed ($n=3$)

温度, $^{\circ}\text{C}$	升温速度, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	停留时间, min
120	0	1
120 \rightarrow 190	3	2
190 \rightarrow 196	2	3
196 \rightarrow 200	1	2

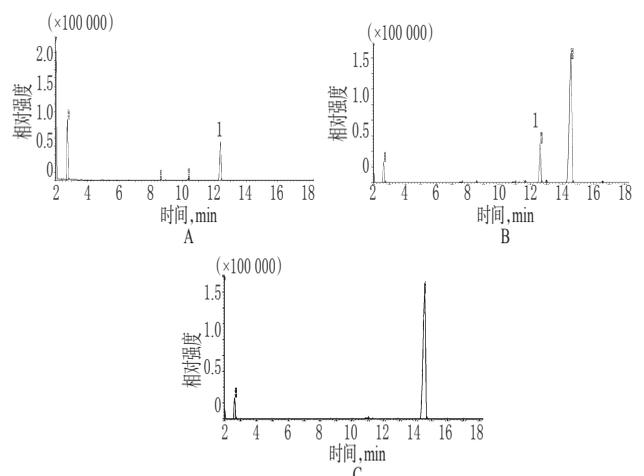


图2 气相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1. γ -亚麻酸甲酯

Fig 2 High performance weather chromatogram

A.reference substance; B.test samples; C.negative control; 1. γ -linolenic acid methyl ester

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取5.84 mg γ -亚麻酸甲酯对照品,置于25 ml量瓶中,用石油醚溶解并定容,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取装量差异项下的样品内容物,研细,精密称定0.3 g,置于25 ml量瓶,精密加入25 ml石油醚,称定质量^[7],超声处理15 min,放置至室温,再次称定质量,用石油醚补足减失的质量,摇匀,滤过,取5 ml续滤液,置于10 ml量瓶中,用正己烷定容,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按复方亚麻酸磷脂软胶囊处方和制备工艺制备缺 γ -亚麻酸的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察^[8] 分别精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液适量,倍比稀释制成质量浓度为0.093 44~0.327 04 $\mu\text{g/ml}$ 的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液各10 μl ,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以 γ -亚麻酸甲酯质量浓度(x , $\mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=4\ 000\ 000\ 0x+121\ 538$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明, γ -亚麻酸甲酯检测质量浓度线性范围为0.093 44~0.327 04 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果, γ -亚麻酸(以 γ -亚麻酸甲酯计)峰面积的RSD=1.5%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:121201)适量,分别于放置0、2、4、8、10 h时进样测定,记录峰面积。结果, γ -亚麻酸(以 γ -亚麻酸甲酯计)峰面积的RSD=1.2%($n=5$),表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:121201)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, γ -亚麻酸(以 γ -亚麻酸甲酯计)峰面积的RSD=1.3%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:121201)适量,共6份,分别加入一定质量的 γ -亚麻酸甲酯对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算 γ -亚麻酸(以 γ -亚麻酸甲酯计)含量并计算加样回收率,结果见表4。

表4 γ -亚麻酸的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 4 Results of recovery test for γ -linolenic acid($n=6$)

取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
3.57	1.070	1.187	2.224	97.22		
3.58	1.074	1.187	2.234	97.73		
3.64	1.091	1.187	2.258	98.32	97.94	1.01
3.60	1.080	1.187	2.227	96.63		
3.62	1.087	1.187	2.263	99.07		
3.50	1.050	1.187	2.221	98.65		

2.2.10 样品中 γ -亚麻酸的含量测定 取3批样品各适量,分

别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算 γ -亚麻酸(以 γ -亚麻酸甲酯计)含量,结果见表5。

表5 样品中 γ -亚麻酸的含量测定结果($n=3$)

Tab 5 Results of γ -linolenic acid content determination in samples($n=3$)

批号	γ -亚麻酸甲酯, mg/g
121201	336.45
121202	335.80
121203	336.65

3 讨论

本试验采用HPLC法测定复方亚麻酸软胶囊中大豆卵磷脂的含量。试验中,笔者曾考察了不同比例的甲醇-水系统和乙腈-水系统的流动相条件^[8-9],通过对两种条件做了详细的分析及比较后,发现以甲醇-水(84:16, V/V)作为流动相能够缩短保留时间且提高分离度,因此最终选用该流动相。

本试验采用气相色谱法测定复方亚麻酸软胶囊中 γ -亚麻酸含量。试验中,笔者参照2010年版《中国药典》进行考察,最终确定进样口温度为210 $^{\circ}\text{C}$ 。

综上所述,该两种方法操作简便、稳定、重复性好,可用于复方亚麻酸软胶囊中大豆卵磷脂和 γ -亚麻酸含量的测定。

参考文献

- [1] 裴少平,李自强,周丹,等.超临界二氧化碳技术的应用进展[J].山西化工,2012,32(02):31.
- [2] 毕永贤,何聪芬.超临界萃取技术在中草药化妆品原料开发中的应用进展[J].香料香精化妆品,2012,134(5):49.
- [3] 周同永,任飞,邓黎,等. γ -亚麻酸及其生理生化功能研究进展[J].贵州农业科学,2011,39(3):53.
- [4] 李艳萍,张志荣.纳米乳的研究进展及其应用[J].华西药学杂志,2010,25(4):485.
- [5] 马鲁豫.浅谈中药现代化的创新发展[J].中国科技产业,2009(11):88.
- [6] 蒋渝,武小赞,土欣,等.川白芷有机氯类农药残留量的检测[J].中国药房,2012,23(19):1 808.
- [7] 刘春静,陈月坤,刘荣荣,等.月见草油- γ -亚麻酸绝对含量的测定[J].中国油脂,2012,37(1):69.
- [8] Ma Z, Bai L. The anti-inflammatory effect of Z-ligustilide in experimental ovariectomized osteopenic rats[J]. *Inflammation*, 2012, 35(6):1 793.
- [9] Su S, Hua Y, Wang Y, et al. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of individual and combined extracts from Commiphora myrrha, and Boswellia carterii [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2):649.

(收稿日期:2015-03-15 修回日期:2015-09-15)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——中国生物医学期刊引文数据库(CMCI)收录期刊,欢迎投稿、订阅