

高效液相色谱法测定角鲨烯软胶囊中的角鲨烯

张喜金*, 苏昭仑, 黄康惠

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定角鲨烯软胶囊中角鲨烯的含量。**方法** 样品经甲醇提取, 以甲醇/乙腈 ($V:V=60:40$) 为流动相, 流速为 1.2 mL/min, 经高效液相色谱在色谱柱 Waters Spherisorb C_{18} 分离, 柱温为 40 °C; 然后在检测波长为 203 nm 的条件下测定角鲨烯的含量。**结果** 角鲨烯的浓度在 0.1023~0.5118 mg/mL 的范围内与峰面积线性关系良好, 相关系数 $r>0.999$, 方法的检出限为 0.0025%, 在不同添加水平下, 方法的平均回收率为 100.5%, 相对标准偏差为 0.6% ($n=9$)。与我国《国家药品标准》中 WS-1001-(HD-080-18)-2002 角鲨烯气相色谱法测定比较, 两种结果无显著差异。**结论** 高效液相色谱法更快捷简单, 节省检测成本, 可应用于保健食品中角鲨烯的含量测定。

关键词: 角鲨烯; 高效液相色谱法; 保健食品

Determination of squalene in squalene soft capsule by high performance liquid chromatography

ZHANG Xi-Jin*, SU Zhao-Lun, HUANG Kang-Hui

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of squalene in squalene soft capsules by high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were extracted with methanol, and being separated by waters spherisorb C_{18} column with the mobile phase of methanol/acetonitrile ($V:V=60:40$), and the flow rate was 1.2 mL/min, the column temperature was 40 °C, the content of squalene were determined by HPLC under the detection wavelength at 203 nm. **Results** The method showed a good linearity in the range of 0.1023~0.5118 mg/mL for squalene with the coefficient $r>0.999$, the detection limit was 0.0025%, the average recovery of different adding levels was 100.5%, and the relative standard deviation was 0.6% ($n=9$). Compared with the WS-1001-(HD-080-18)-2002 squalene gas chromatography method of National Drug Standards, there was no statistical difference between the two results. **Conclusion** HPLC method is more quick and easy, saving testing cost, and applicable to measure the content of squalene in health foods.

KEY WORDS: squalene; high performance liquid chromatography; health food

1 引言

角鲨烯是一种脂质不皂化物, 最初发现于鲨鱼的肝油中, 1914 年被命名为 squalene, 其化学名称为 2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-三十碳六烯,

属开链三萜, 又称鱼肝油萜, 具有提高体内超氧化物歧化酶(SOD)活性、增强机体免疫能力、改善性功能、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤等多种生理功能, 是一种无毒性的具有防病治病作用的海洋生物活性物质^[1-5]。因此被广泛应用于医药、保健食品及化妆品等相关领

*通讯作者: 张喜金, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 215865748@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Xi-Jin, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 215865748@qq.com

域。本文以高效液相色谱法检测角鲨烯含量, 用现代分析技术建立了角鲨烯质量控制方法。

目前, 文献报告的角鲨烯软胶囊角鲨烯的含量测定, 主要采用的是气相色谱法和正相色谱法。气相色谱法虽然处理简单, 但对于一些成分比较复杂的样品, 会受基质的不同而影响, 很难得到较好的分离效果^[6-8]。而正相色谱法虽然适应性比较强, 对样品的分离效果显著, 但人长期接触正相试剂, 会对人体产生伤害。本文采用的高效液相色谱法测定角鲨烯软胶囊中角鲨烯的含量, 属于反相色谱法, 该方法不仅能够对样品中角鲨烯的含量起到质量的控制, 而且检测周期短, 适应性更强。

2 材料与方法

2.1 实验仪器

岛津 15C 液相色谱仪(具紫外检测器), C₁₈(5 μm, 4.6 mm×150 mm)色谱柱, XP-205 电子天平(德国赛多利斯公司)。

2.2 标准与试剂

角鲨烯标准品(SUPELCO, 纯度均为 99.0%), 角鲨烯软胶囊(市售, 见下表 2)。

2.3 色谱条件

2.3.1 液相色谱条件

色谱柱: Waters Sphrisorb® C₁₈(5 μm, 4.6 mm×150 mm);

柱温: 40 °C;

检测波长: 203 nm;

流速: 1.2 mL/min;

流动相: 甲醇-乙腈(V:V=60:40)。

2.3.2 气相色谱条件

仪器: Agilent 7890A 气相色谱仪, 带 FID(火焰离子化检测器);

进样口: 280 °C, 分流比 10:1, 进样量 1 μL;

色谱柱: Agilent, HP-5, 30 m, 320 μm, 0.25 μm, 流速 2 mL/min;

柱温箱: 250 °C, 保持 14 min;

检测器: 280 °C, 氢气 30 mL/min, 空气 400 mL/min, 尾吹 30 mL/min。

2.4 对照品溶液的制备

精确称取角鲨烯对照品 10.34 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。精密吸取

1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 配成浓度为 0.10237、0.20473、0.30710、0.40946、0.51183 mg/mL 的标准溶液。

2.5 样品溶液的制备

称取混合均匀的油类制品 10.00 mg(精确到 0.01 mg)至 50 mL 容量瓶, 加入甲醇超声, 溶解定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取滤液作为样品溶液。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件选择

3.1.1 波长的选择

角鲨烯标准品的紫外波长图谱(图 1)显示角鲨烯最大吸收波长为 203 nm, 用甲醇稀释的角鲨烯软胶囊内容物的紫外波长图谱与标准品相符, 最大吸收波长亦为 203 nm。因此, 在该色谱条件下角鲨烯的最大吸收波长即为 203 nm。

3.1.2 流动相和柱温选择

角鲨烯为不饱和烃类化合物, 可选用反相色谱对其进行分离, 角鲨烯为不饱和的烃类化合物, 采用反相色谱检测提取液中角鲨烯含量, 调整甲醇/乙腈的比例进行测试, 得出在甲醇:乙腈=60:40(V:V) 时有较好的分离效果, 色谱图如图 2 所示。选用检测波长 203 nm, 先后按照流速 1.0、1.2 mL/min 与柱温 30 °C、40 °C 进样, 分析发现角鲨烯软胶囊样品中各组分在液相条件为甲醇:乙腈=60:40(V:V)、检测波长 203 nm、流速 1.2 mL/min、柱温 40 °C 时有较好的分离效果, 其结果如图 3 所示。在上述色谱条件下标准溶液和样品待测液中角鲨烯得到充分分离角鲨烯保留时间为 4.0 min 左右, 且样品与标准液中角鲨烯保留时间一致。

3.2 方法性能指标

3.2.1 工作曲线和线性范围

在实验条件下, 对标准系列测定 5 次, 结果表明, 角鲨烯的在 0.10 mg/mL 至 0.50 mg/mL 之间呈现良好的线性关系^[9,10]。回归方程为 $Y=8 \times 10^{-8} X - 0.021$, $r^2=0.9999$, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求, GB/T 27404-2008 要求相关系数 $r^2 > 0.99$ ^[11]。如表 1 和图 4 所示。

3.2.2 检出限实验

以角鲨烯标准溶液的色谱响应值计算, 当信噪比(S/N)为 3 时, 检出限为 0.005 μg/mL, 取样 10 mg,

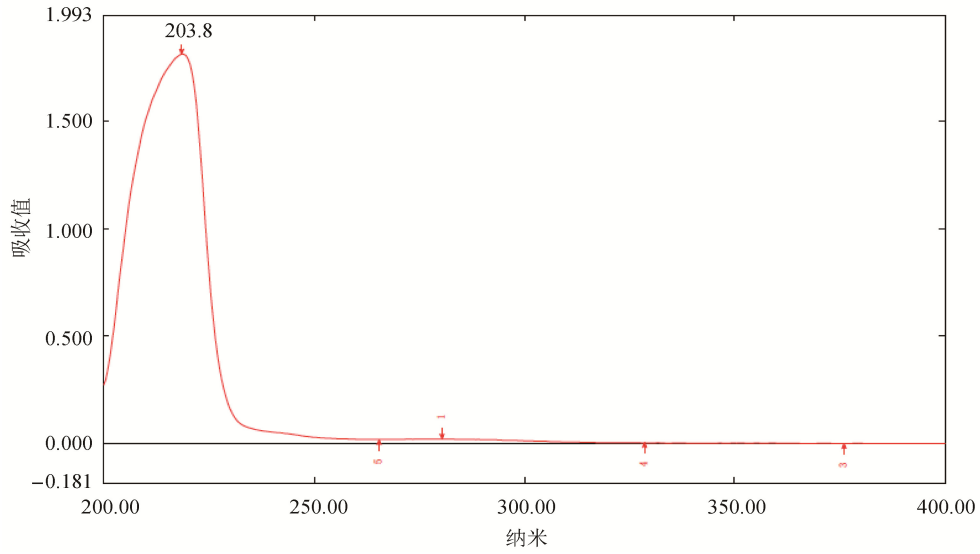


图 1 角鲨烯标准品的紫外吸收曲线

Fig. 1 Ultraviolet absorption curve of squalene standard

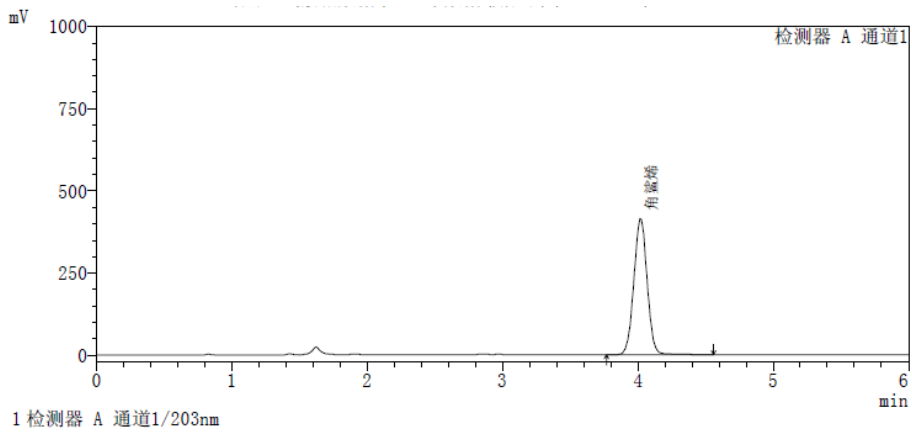


图 2 角鲨烯标准品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of squalene standard

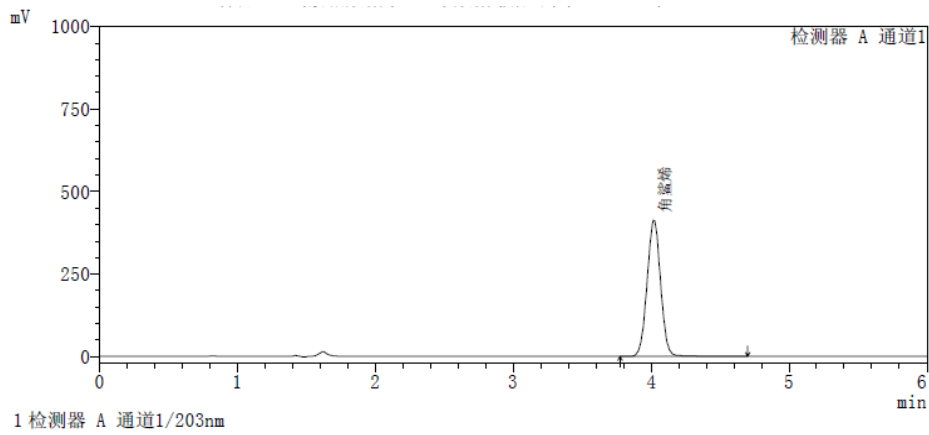


图 3 样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the sample

表 1 对照品浓度与峰面积的关系

Table 1 The relationship between the concentration of the reference and the peak area

序号	浓度/mg·mL ⁻¹	峰面积
STD1	0.102366	1532512
STD2	0.204732	2836243
STD3	0.307098	4056251
STD4	0.409464	5359604
STD5	0.511830	6590887
线性方程	$Y=8 \times 10^{-8}X-0.021$	
相关系数(r^2)	0.9999	

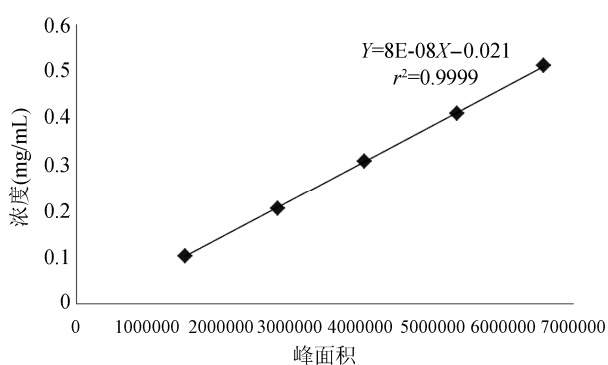


图 4 角鲨烯标准曲线

Fig. 4 Standard curve of squalene

定容至 50 mL, 则样品中角鲨烯的最低检出限是 0.0025%。

3.2.3 重复性实验

取同一批(批号 20140701E)供试品, 精密称定 6 份, 约 10 mg, 按“2.5”项下方法制备, 按“2.3”色谱条件进行测定, 计算角鲨烯软胶囊中角鲨烯的含量。结果角鲨烯软胶囊的平均含量为 98.5%, RSD 为 0.2%。

3.2.4 供试品含量测定

取 3 批角鲨烯软胶囊样品, 按“2.5”项下方法制备, 按“2.3”色谱条件进行分析, 角鲨烯软胶囊含量见表 2。

3.2.5 回收率实验

精密称取 10.00 mg 已知含量的样品(含量为 98.5%)(共 9 份), 置于 50 mL 容量瓶中, 分别精密加入角鲨烯标准使用液(浓度为 2.67795 mg/mL)2.4 mL、3.0 mL、3.6 mL, 加甲醇溶解定容, 摇匀, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 取滤液作为供试品溶液。实验测得本法平均回收率为 100.5%, 相对偏差(RSD)为 0.6%, 符合 GB/T 27404-2008(实验室质量控制规范)的要求^[11-14], 其结果见表 3。

3.2.6 稳定性实验

在室温下, 分别测定样品溶液在不同放置时间 0、4、8、12、24、48 h 时角鲨烯含量变化, 结果表明, RSD 为 0.2% ($n=6$), 说明样品溶液 48 h 内稳定。

表 2 不同样品中角鲨烯含量测定结果

Table 2 Squalene content determination results in different samples

名称	来源	规格/mg ⁻¹ ·粒	批号	含量/%
角鲨烯软胶囊	汤臣倍健股份有限公司	500	20150701E	98.5
角鲨烯软胶囊	上海澳琳达健康食品有限公司	1400	406130203	71.2
角鲨烯胶丸	浙江海力生制药有限公司	250	141101	99.2

表 3 回收率实验

Table 3 The recovery of experiment

已知量/mg	加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
8.5411	6.4271	14.9740	100.09		
8.6198	6.4271	15.1515	100.62		
8.5708	6.4271	15.0295	100.49		
8.0196	8.0338	16.1185	100.81		
8.2164	8.0338	16.2365	99.82	100.5	0.6
8.2853	8.0338	16.3535	100.42		
8.6789	9.6406	18.3405	100.21		
8.9642	9.6406	18.6515	100.48		
8.8462	9.6406	18.5710	100.87		

4 方法验证

为了确认液相色谱法的可靠性,采用《国家药品标准》中 WS-1001-(HD-080-18)-2002 角鲨烯气相色谱法对建立的方法进行了验证。样品处理方法:称取适量样品,以角鲨烷作为内标,加正己烷稀释定容^[15]。称取不同批次样品各 4 份,2 份用本法测定,另外 2 份用《国家药品标准》中 WS-1001-(HD-080-18)-2002 角鲨烯气相色谱法测定,结果取均值,经配对 t 检验,两结果之间差异无统计学意义($t=0.202$, P 双侧 >0.10),其结果见表 4。

表 4 液相色谱法与气相色谱法的对比(%)
Table 4 Comparison of the liquid chromatography and gas chromatography (%)

样品号	液相色谱法	《国家药品标准》法
1	98.31%	98.45%
2	97.78%	98.01%
3	99.12%	99.33%
4	98.58%	98.37%
5	99.67%	99.32%
6	98.51%	98.39%
7	97.82%	97.55%
8	98.46%	98.69%

5 结论

本文通过对样品进行甲醇提取,采用 Waters SpherisorbC₁₈ 作为色谱柱,甲醇/乙腈(60/40=V:V)作为流动相,采用高效液相色谱法,能很快地分离角鲨烯软胶囊中的角鲨烯,并进行定量检测。通过测定其线性范围、检出限、稳定性和回收率实验等,结果令人满意。而且通过与《国家药品标准》中 WS-1001-(HD-080-18)-2002 中角鲨烯气相色谱法对比,所测出的角鲨烯的含量相差较小,2 种方法结果之间差异无统计学意义,证明 2 种测定方法均科学有效,能对角鲨烯软胶囊中角鲨烯的含量起到质量控制的目的。而液相色谱方法的对照品配制方法、样品处理方法更为快捷、简单,分析周期短,能够提高效率。

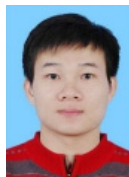
参考文献

- [1] 全国科学技术名词审定委员会[EB/OL]. <http://www.cnctst.cn> (2010-12-7).
National Scientific and Technical Terms of Validation Committee[EB/OL]. <http://www.cnctst.cn> (2010-12-7).
- [2] 周金煦, 李晓玉, 汤宝娣, 等. 角鲨烯的抗肿瘤和免疫调节作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 2: 151-152.
Zhou JX, Li XY, Tang BD, et al. Anti-tumor and immunomodulatory effects of squalene [J]. Chin J Pharm Toxi, 1990, 2: 151-152.
- [3] 潘凤. 角鲨烯提高人类生命质量的奥秘[J]. 上海医药, 2002, 23(1): 30-31.
Pan F. Squalene secret to improving the quality of human life [J]. Shanghai Med, 2002, 23(1): 30-31.
- [4] 赵振东, 孙震. 生物活性物质角鲨烯的资源及其应用研究进展[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(3): 107-112.
Zhao ZD, Sun Z. Research progress and application of resources hound fish bioactive substances [J]. Chem Ind Forest Prod, 2004, 24(3): 107-112.
- [5] 许瑞波, 刘玮炜, 王明艳, 等. 角鲨烯的制备及应用进展[J]. 山东医药, 2005, 35: 69-70.
Xu RB, Liu WW, Wang MY, et al. The progress of preparation and application of squalene [J]. Chin J Shandong Med, 2005, 45(35): 69-70.
- [6] 车欣颖, 卢雯. 气相色谱法测定角鲨烯软胶囊中角鲨烯含量[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(2): 1475 - 1476.
CheXiY, LuW. Determination of squalene in squalene soft capsules by gas chromatography [J]. J Qiqihar Med Coll, 2008, 29(12): 1475-1476.
- [7] 李群, 周淑平. 气相色谱法测定角鲨烯的含量[J]. 首都医药, 2002, 9(6): 68 - 69 .
Li Q,ZhouSP.Determination of squalene by gas chromatography [J]. Capital Med, 2002, 9(6): 68-69.
- [8] 牟志春, 张建武, 张春江. 气相色谱法测定角鲨烯保健品的纯度[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2000, 23(1): 11.
Mou ZC, Zhang JW, Zhang CJ. Determination of squalene health products by gas chromatography, purity [J]. Chin J Health Quarantine, 2000, 23(1): 11.
- [9] 梁新华, 郑彩霞, 张风侠. 甘草中角鲨烯高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 8: 1856-1857.
Liang XH, Zheng CX, Zhang FX. Extraction and HPLC Analysis of the Squalene in Gly-cyrrhiza uralensis Fisch [J]. Chin J Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21: 1856-1857.

- [10] 陈全斌, 程忠泉, 杨建香, 等. 罗汉果种仁油中角鲨烯的高效液相色谱分析[J]. 广西科学, 2006, 2: 118-120.
Chen QB, Cheng ZQ, Yang JX, *et al.* The HPLC analysis of the squalene in *Siraitia grosvenorii* seed oil [J]. Chin J Guangxi Sci, 2006, 13: 118-120.
- [11] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]
GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-chemical testing of food [S].
- [12] 戴宇航. 橄榄油中角鲨烯的分离纯化工艺研究[D]. 天津: 天津大学, 2009.
Dai YH. Research on separation and extraction of squalene from olive oil [D]. Tianjin: Tianjin University, 2009.
- [13] 齐德珍. 大豆油脱臭馏出物中角鲨烯的分离提取研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
Qi DZ. Research on separation and extraction of squalene from SODD [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010.
- [14] 程忠泉. 罗汉果角鲨烯及罗汉果渣油脂成分的分、提纯研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2005.
Cheng ZQ. The Study on separation ,purification of luohanguo squalene and lipidic components of Luohanguo residue [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2005.
- [15] 《国家药品标准》 WS-1001-(HD-080-18)-2002 [C].
WS-1001-(HD-080-18)-2002 by National Drug Standards [C].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



张喜金, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 215865748@qq.com