

HPLC 法测定槲皮素固体脂质纳米粒的含量

常明泉, 杨光义, 李发鹏¹, 王 刚 (湖北医药学院附属太和医院药学部, 十堰 442000;
¹湖北医药学院药检学院)

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定槲皮素固体脂质纳米粒含量的方法。方法 色谱柱: Diamonsil C18 柱, 流动相: 甲醇-4.3% 乙酸溶液 (55: 45), 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 254 nm, 进样量: 20 μL, 柱温: 30 °C。结果 槲皮素在 20.0~200.0 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 平均回收率为 98.6%, RSD = 1.18%, 结论 本方法快捷、简便、准确、专属性强, 可用于槲皮素固体脂质纳米粒的质量控制。

关键词: 槲皮素; 固体脂质纳米粒; HPLC; 含量测定

中图分类号: R284; R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2011) 08-0779-03

Determination of Quercetin Solid Lipid Nanoparticles by HPLC

Chang Mingquan, Yang Guangyi, Li Fapeng¹ and Wang Gang (Taihe Hospital of Hubei Medical College, Shiyan 442000; ¹School of Drug Tests, Hubei Medical College)

ABSTRACT: **Objective** To establish the determination method of quercetin solid lipid nanoparticles (QUE-SLNs). **Methods** HPLC column was Diamonsil C18. Mobile phase: methanol-4.3% acetic acid (55: 45), flow rate: 1.0 mL · min⁻¹, column temperature: 30 °C, injection volume: 20 μL, detection wavelength: 254 nm. **Results** The linear range of quercetin was 20.0~200.0 μg · mL⁻¹. The average recovery was 98.6%, with RSD 1.18%. **Conclusion** This method is simple, accurate, and feasible. It can be used for quality control of QUE-SLNs.

KEY WORDS: quercetin; solid lipid nanoparticles; HPLC; determination

槲皮素是一种天然黄酮类化合物^[1], 以苷的形式在一些植物药中存在; 固体脂质纳米粒具有细胞亲和性、靶向性、缓释性、低毒性和稳定性的特点, 药物制成脂质体可大大提高生物利用度^[2]。槲皮素固体脂质纳米粒是一种抗癌新制剂, 为了更好地发挥槲皮素的药理作用、控制制剂质量, 笔者试验用高速离心-高效液相色谱法对其主药槲皮素含量进行测定。

1 仪器与试剂

戴安 3000 型高效液相色谱仪; TGL-16G 离心机 (上海安亭科学仪器厂); UPS-200H 型超声波振荡仪 (500W, 50KHZ, 南京熊猫电子仪器有限公司); LG-冰箱 (LTR-B2071GTBC)。槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100081-

200406); 槲皮素固体脂质纳米粒 (十堰市武当中医药研究所, 批号: 20100410、20100415、20100422); 无水乙醇、甲醇、乙酸均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-5]

色谱柱: Diamonsil C18 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-4.3% 乙酸溶液 (55: 45); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL, 柱温: 30 °C。

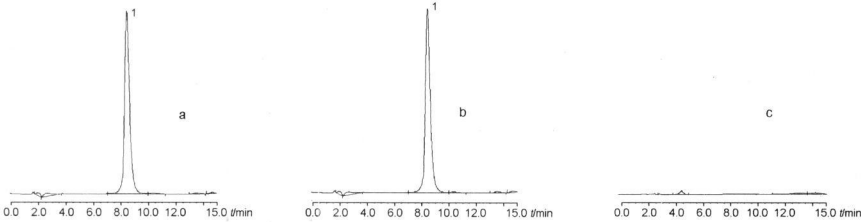
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取在 105 °C 减压干燥至恒重的槲皮素对照品 20.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇超声溶解, 定容, 即得 200 μg · mL⁻¹ 对照品溶液。

基金项目: 湖北省教育厅优秀中青年基金资助项目 (编号 ku201002110)

作者简介: 常明泉, 学士, 主管药师; 研究方向: 药物制剂; E-mail: cmqman@yahoo.com.cn

2.2.2 供试品溶液的制备 取槲皮素固体脂质纳米粒 1g, 精密称定, 置 50mL 平底烧杯中, 加无水乙醇约 15mL 超声破乳分散, 溶液转入 50mL 量瓶中, 用无水乙醇分次洗涤烧杯 3 次 (10、10、10mL), 洗液并入量瓶中, 定容, 摇匀, 取混合溶液适量, 于高速离心机中离心 15min (转速: 1.6×10^4), 取上清液用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。



a 对照品; b 供试品; c 阴性对照; 1 槲皮素。

图 1 槲皮素固体脂质纳米粒 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察

分别吸取槲皮素对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得 20.0、40.0、80.0、120.0、160.0、200.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品溶液, 精密吸取 20 μ L, 在“2.1”色谱条件下进样测定, 重复操作 3 次, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程:

$A = 1.3435C - 1.4904 \quad r = 0.9996$

结果表明, 槲皮素在 20.0~200.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取浓度为 80 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品溶液, 在“2.1”色谱条件下分别进样 6 次, 测定槲皮素的峰面积, 结果峰面积平均值为 60.6103, RSD 为 1.12% (n=6)。

2.6 稳定性试验

取已知含量的供试品溶液 (5~10 $^{\circ}$ C 保存), 在 0、4、12、24、36、48h 分别取样, 在“2.1”色谱条件下进样测定, 结果峰面积平均值为 74.5418, RSD 为 1.62%。表明溶液在 48h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

平行称取 6 份样品, 各 1g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下进样, 测得槲皮素平均含量为 10.48 μ g $\cdot$ mL⁻¹, RSD = 1.80% (n=6), 表明方法重复性良好。

2.8 回收率试验

取已知含量的槲皮素固体脂质纳米粒样品 (批号: 20100415, 含量 102.4mg $\cdot$ g⁻¹) 6 份, 每份 0.5g, 精密称定, 分别加入含量为 40 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 对

2.2.3 阴性对照溶液的制备 精密称取不含槲皮素的阴性样品 1g, 照“2.2.2”项下方法制备, 即得。

2.3 系统适用性试验

分别吸取对照品、供试品、阴性对照溶液, 在“2.1”色谱条件下进样, 结果对照品、供试品溶液在相同位置有吸收峰出现, 阴性对照溶液无吸收, 说明制剂中的辅料对槲皮素测定不产生干扰。见图 1。

照品溶液 1mL, 按“2.2.2”项下方法制备溶液, 在“2.1”色谱条件下进样, 测定槲皮素的含量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 槲皮素固体脂质纳米粒回收率试验结果 (n=6)

样品含量 (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	加入量 (μ g)	测得量 (μ g $\cdot$ g ⁻¹)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
51.2	40.0	90.5	99.2	98.6	1.18
51.2	40.0	89.2	97.8		
51.2	40.0	91.5	100.3		
51.2	40.0	88.7	97.3		
51.2	40.0	89.9	99.7		
51.2	40.0	88.6	97.1		

2.9 含量测定

取样品 3 批, 各 1g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下进样, 测定槲皮素的含量, 结果见表 2。

表 2 槲皮素固体脂质纳米粒含量测定结果 (n=3)

样品批号	槲皮素含量(μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	RSD(%)
20100410	99.1	1.70
20100415	102.4	1.14
20100422	104.2	1.06

3 讨论

分别取“2.2”项下的各溶液, 在 200~400nm 处做紫外扫描, 结果对照品和供试品溶液在 254nm 处均有最大吸收, 而阴性对照溶液在该波长处无吸收, 因此选择测定波长为 254nm。

槲皮素不溶于水, 本试验采用高速离心-HPLC 法测定槲皮素固体脂质纳米粒中槲皮素的含量, 处理样品过程中加入无水乙醇超声, (下转第 784 页)

CNAS 组织的有关食品、化妆品能力验证计划，与广西食品药品检验所进行了食品、保健食品相关检测项目的比对，同时在实验室内部也开展了新项目的人员比对和方法比对。通过这些质控手段，使我所在检测新领域的项目实施中，强化了人员素质，积累了工作经验，为扩项认证做好积极的准备。

2.5 新项目工作的总结验收

根据扩项实施计划的时间表，在现场评审前技术负责人应择时组织召开相关人员会议，对前期的扩项准备工作进行总结、分析、评价，对存在的问题提出解决方案，对现场评审前尚需完善的工作提出建议，落实整改措施，最后对所有申报的新项目逐一确认验收。评价确认工作要点、面结合。所谓“点”就是对那些技术要求较高、操作较复杂的检测项目，如禁限用物质、有害残留物的检测等，往往需用气-质联用仪或液-质联用仪等大型高端精密仪器，这些技术的应用又是我们较为陌生的，所以应做专门的确认，从标准方法、仪器设备、人员水平、检测过程和结果等方面进行评价，关注其结果的技术指标是否达到标准规范的要求；所谓“面”是指对那些类似或操作简单的检测项目、与过去所做的检测相同或相近的项目，可一并进行确认验收。

2.6 其他

其他准备工作如仪器设备的检定校准和标识化管理、各种质量活动和检验工作材料的整理归档，包括各种质量文件、内审和管理评审、监督检查、能力验证活动、现行有效的标准规范、仪器设备档

案、人员技术业绩档案、检测报告及相关记录、实验室的安全环保管理、化学试剂和标准品的管理、实验室内务整理等，均应按《评审准则》及本实验室管理体系文件的要求进行。

3 工作体会

笔者认为，要真正做好这些跨领域的检测工作，实验室的新建、改扩建、仪器设备的配置固然重要，而实验室人员技术能力的提升和整个实验室管理制度的完善更是当务之急。只有这样才能适应不断增加的新检验检测工作，为相关行政监管提供有力的技术支撑。

参考文献:

[1] 食品安全法 [S]. 中华人民共和国主席令 9 号, 2009

[2] 国家认证认可监督管理委员会. 实验室资质认定评审准则 [Z]. 国认实函 [2006] 141 号, 2006

[3] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范 食品理化检测 [M]. GB/T 27404-2008 北京: 中国标准出版社, 2008

[4] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范 食品微生物检测 [M]. GB/T 27405-2008 北京: 中国标准出版社, 2008

[5] 卫生部. 食品检验机构资质认定条件 [Z]. 卫监督发 [2010] 29 号, 2010

[6] 卫生部. 食品检验工作规范 [Z]. 卫监督发 [2010] 29 号, 2010

[7] 国家认证认可监督管理委员会. 食品检验机构资质认定评审准则 [S]. 2010

[8] 国家认证认可监督管理委员会. 实验室资质认定工作指南 [M]. 二版. 北京: 中国计量出版社, 2007

(上接第 780 页) 是促使样品破乳进而使槲皮素被无水乙醇充分溶解; 利用高速离心使脂质包材与溶剂更好地分离; 以甲醇-4.3% 乙酸溶液 (55:45) 为流动相, 样品分离效果良好。该方法快捷、简便、准确、专属性强, 辅料不对主药含量测定产生干扰, 可用于槲皮素固体脂质纳米粒的质量控制。

参考文献:

[1] 舒毅, 谭陶, 张思宇, 等. 槲皮素的药理学研究进展 [J]. 华西药杂志, 2008, 23 (6): 689-691

[2] 崔福德, 药剂学 [M]. 第 6 版, 北京: 人民卫生出版社, 2008: 421-426

[3] 张洪. 大黄素固体脂质纳米粒的制备及理化性质研究 [J]. 中国药师, 2010, 13 (3): 326-328

[4] 张红. 柚皮苷固体脂质纳米粒包封率及体外释放度测定 [J]. 中国药师, 2010, 13 (3): 318-320

[5] Pugundla N, Engelberth A, Vandhana Ravindranath S, et

al. Switchgrass Water extracts: Extraction, Separation and Biological activity of Rutin and Quercetin [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57 (17): 7763-7767

[6] 李志浩, 李鹏, 郑芳, 等. 白术内酯 I 脂质体的制备工艺 [J]. 中国药师, 2010, 13 (4): 473-475

[7] 刚宏林, 杨莉斌, 胡荣. 鸦胆子油脂体体的制备与质量评价 [J]. 医药导报, 2010, 29 (1): 75-76

[8] 孙维通, 黄桂华, 叶杰胜, 等. 鱼精蛋白凝聚法测定脂质体和纳米脂质体包封率 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41 (22): 1716-1719

[9] 邵红霞, 奉建芳, 龙晓英. 脂质体包封率的测定方法 [J]. 中南药学, 2009 (3): 212-214

[10] 熊非, 朱家壁, 王维, 等. 灯盏花素纳米脂质体包封率测定方法研究 [J]. 药学学报, 2004, 39 (9): 755-757

[11] 李保奇, 邓英杰, 杨静文. 超滤-HPLC 法测定盐酸托替膦脂质体包封率 [J]. 中国新药杂志, 2007, 17 (1): 58-61

[12] 秦晶, 陈大为, 乔明曦, 等. 微柱离心法测定阿魏酸脂质体的包封率 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42 (14): 1116-1117