技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）08-0956-03

HPLC测定复方维 A 酸脂质体中蒿酮的含量和包封率

杨世艳[1]，何 兵[2]，冯文宇[2]

（1. 泸州医学院附属中医医院超声影像科，泸州 646000；2. 泸州医学院药物研究中心，泸州 646000）

【摘 要】目的：建立复方维 A 酸脂质体中蒿酮的含量和包封率测定的高效液相色谱（High performance liquid chromatography，HPLC）法。方法：色谱柱：迪马 Kromasil C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（75:25）；检测波长：242 nm；柱温：30℃；流速：0.8 ml/min；进样量：10 μl。结果：蒿酮在 25.16~251.60 μg/ml 范围内具有良好的线性关系（r=0.999 9），平均回收率为 99.53%，RSD 为 0.72%。结论：该方法简便快速、准确，具有良好的重复性和回收率，可作为该制剂中蒿酮的定量分析方法。

【关键词】高效液相色谱；复方维 A 酸脂质体；蒿酮；含量测定；包封率

【中国图书分类法分类号】R927.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-28

HPLC determination of the content and entrapment efficiency of artemisia ketone in compound tretinoin liposome

YANG Shi-yan[1], HE Bing[2], FENG Wen-yu[2]

(1. Department of Ultrasonic Image, Hospital (T.C.M.) Affiliated of Luzhou Medical College; 2. Drug Research Center, Luzhou Medical College)

【Abstract】*Objective*: To establish a HPLC method for the content and entrapment efficiency determination of artemisia ketone in compound tretinoin liposome. *Methods*: The separation was carried out on a Dikma Kromasil C18 column (250 mm×4.6mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water (75:25). The detective wavelength was set at 242 nm. The column temperature was 30℃. The flow rate was 0.8 ml/min and the sample size was 10 μl. *Results*: The calibration curve showed good linearity over the range of 25.16~251.60 μg/ml (r=0.999 9). The average recovery was 99.53% with RSD of 0.72%. *Conclusion*: This method is simple, rapid, accurate and with good repeatability and recovery. It can be used as a quantitative analysis method for this preparation.

【Key words】HPLC; compound tretinoin liposome; artemisia ketone; content determination; entrapment efficiency

作者介绍：杨世艳（1980-），女，住院医师，研究方向：靶向脂质超声微泡。

通信作者：何 兵，男，副研究员，Email：lyhb2008@126.com。

基金项目：四川省教育厅重点项目（编号：08ZA114）；四川省卫生厅科研课题（编号：090190）。

表 5 黄芪总黄酮含量测定结果

批号	总黄酮含量（%）	*RSD*（%）
090712	5.32%	1.22
090805	5.28%	1.17
090911	5.41%	0.31

被《中国药典》所采用的最常见的总黄酮测定方法，其中又以 $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH 比色法常用。这种方法以 $NaNO_2$-Al(NO3)3 为显色剂，在碱性条件下，利用其与黄酮物质生成红色铝螯合物为特征，以芦丁为对照，在 510 nm 处测定吸光度，从而得到待测物质总黄酮的含量。

因此本研究采用芦丁作为对照品，采用 $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH 比色法做为紫外测定黄芪总黄酮含量的方法。

实验结果表明该法精密度、重现性、稳定性均较好，平均回收率，为进一步开发利用该药用资源提供了依据。

参 考 文 献

[1] 药典委员会.中国药典（一部）.2010 年版[M]北京：化学工业出版社，2010，283.

[2] 姚美村，齐 莹，开 顺，等.黄芪药效物质基础研究[J].中国野生植物资源，2000，19(2)：361.

[3] 汪德清，田亚平，宋淑珍，等.黄芪总黄酮抗突变作用实验研究[J].中国中药杂志，2003，28(12)：1164.

[4] 汪德清，田亚平，宋淑珍，等.黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究[J].军医进修学院学报，2006，27(1)：13-15.

（责任编辑：张学颖）

复方维 A 酸脂质体是由青蒿油、维 A 酸等组成的脂质体制剂，经体内外药效学试验表明，该制剂具有抗肝癌、肺癌、白血病的作用。蒿酮为青蒿油中主要化学成分，占挥发油的 43%[1]，有关蒿酮含量测定的文献不多，文献[2,3]测蒿酮含量均是采用气相色谱法，试验参照文献[4]采用高效液相色谱（High performance liquid chromatography，HPLC）测定了复方维 A 酸脂质体中蒿酮的含量。该方法简便快速，重复性好，可用于该制剂蒿酮的定量分析。

1 仪器与试药

戴安 HPLC 仪（P680A 四元低压梯度泵，PDA-100 二极管阵列检测器，TCC-100 柱温箱，Chromeleon 色谱工作站），瑞士 Precisa 电子天平（XR 205SM-DR），透析袋（截留分子量 8 000~14 000，美国进口分装）。

蒿酮对照品（Sigma-Aldrich 公司提供，批号：053989/1）；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为重蒸馏水，复方维A 酸脂质体及阴性对照样品（自制，批号：091016、091021、091030，规格：10 ml）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：迪马 Kromasil C18（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（75:25）；检测波长：242 nm；柱温：30℃；流速：0.8 ml/min；进样量：10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取蒿酮对照品适量，加甲醇稀释制成浓度为 0.125 8 mg/ml 的溶液即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品 1 ml，以异丙醇稀释到 25 ml，摇匀即得。

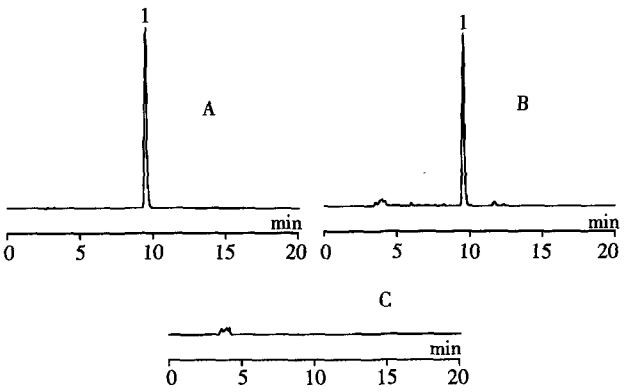
2.2.3 阴性对照溶液 取按处方工艺制得不含青蒿油的阴性对照样品，按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适应性与阴性对照试验

在上述色谱条件下，分别对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液进样，所得色谱图见图 1。蒿酮与相邻色谱峰的分离度大于 1.5，拖尾因子为 1.06，理论板数以蒿酮峰计大于 10 000，阴性对照在蒿酮峰处无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取蒿酮对照品溶液（1.258 mg/ml）1、2、3、4、5、10 ml，分别置于 50 ml 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得 25.16、50.32、75.48、100.64、125.80、251.60 μg/ml 的系列对照品溶液。再分别精密吸取 10 μl 注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定峰面积，以峰面积 A 对浓度 C（μg/ml）进行线性回归，得回归方程：A=108.275 3C-0.4971，r=0.999 9。结果表明，蒿酮在 25.16~251.60 μg/ml 范围内，具有良好线性关系。



A. 对照品；B. 供试品；C. 阴性对照；1. 蒿酮

图 1 复方维 A 酸脂质体 HPLC 色谱图

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液，重复进样 6 次，测得蒿酮峰面积 RSD 为 0.36%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取本品（批号：091016）的供试品溶液，室温下放置，分别于制备后 0、4、8、12、24、36 h 进样测定，测得蒿酮峰面积 RSD 为 0.79%（n=6），表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批样品（批号：091016），照“2.2.2”项下方法，平行制备 6 份供试品溶液，分别进样测定，测得蒿酮平均含量为 3.051 6 mg/ml，RSD 为 0.52%（n=6），表明本法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密吸取已知含量（3.051 6 mg/ml）的本品（批号：091016）9 份，每份 0.5 ml，分成 3 组，每组 3 份，分别精密添加蒿酮对照品溶液（0.521 6 mg/ml）2、3、4 ml，照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，并计算回收率。结果见表 1。试验结果表明本法具有良好的回收率。

表 1 样品回收率试验测定结果

样品含量	加入量（mg）	测得量（mg）	回收率（%）
1.525 8	1.043 2	2.556 4	98.79
1.525 8	1.043 2	2.564 6	99.58
1.525 8	1.043 2	2.567 2	99.83
1.525 8	1.564 8	3.087 2	99.78
1.525 8	1.564 8	3.098 1	100.48
1.525 8	1.564 8	3.063 8	98.29
1.525 8	2.086 4	3.590 3	98.95
1.525 8	2.086 4	3.608 4	99.82
1.525 8	2.086 4	3.617 6	100.26

2.9 样品测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μl，按“2.1”项下色谱条件测定，记录蒿酮的峰面积，并用外标法计算蒿酮含量，结果见表 2。

2.10 包封率测定

取脂质体 1 ml，加入已处理的透析袋内，将透析袋浸入透析液（即制备脂质体的水合介质）100 ml 中，置于磁力搅拌

表 2 复方维 A 酸脂质体中蒿酮含量测定结果（n=3）

批 号	蒿酮含量（mg/ml）	RSD（%）
091016	3.05	0.46
091021	3.56	0.37
091030	3.28	0.52

器上搅拌，定时更换透析液，透析 12 h，将透析袋内容物取出置 25 ml 量瓶中，加异丙醇稀释至刻度，按“2.1”项下色谱条件测定含量，作为$W_{包}$。另取脂质体 1 ml，加异丙醇稀释到 25 ml，测定含量，作为总药量$W_{总}$。根据公式

包封率=($W_{包}/W_{总}$)×100%

结果见表 3。

表 3 复方维 A 酸脂质体中蒿酮包封率测定结果（n=3）

批 号	蒿酮含量（mg/ml）	RSD（%）
091016	89.5	1.13
091021	91.6	0.72
091030	87.2	0.95

3 讨 论

3.1 测定方法的选择

蒿酮属于挥发性成分，一般采用 GC 法测定[2,3]，但蒿酮具有紫外吸收，故也可采用 HPLC 测定[4]。实验参照文献[2]色谱条件测定了上述 3 批制剂中蒿酮的含量，结果分别为 3.07%、3.52%、3.25%，说明两种方法测定蒿酮并无显著性差异。但采用 GC 法测定蒿酮，由于青蒿油中每一种成分均会出峰，要 40 min 后所有色谱峰才会出完，然后等柱温下降到初始温度平衡系统，又要等待近 10 min，这时才能进下一针样品。而采用 HPLC 测定蒿酮，由于青蒿油中具有紫外吸收的成分不多，故出的色谱峰并不多，只有蒿酮 1 个主峰和 5 个小峰。且由于是等度洗脱，无需回到初始比例平衡系统，只需 12 min 即可检测完。

可见 GC 更适合以蒿酮为参照峰的指纹图谱检测，而 HPLC 更适合以蒿酮为指标成分的含量测定，且 HPLC 测定蒿酮可以明显缩短检测时间，也无太多杂峰。

3.2 破膜溶剂的选择

对包封在脂质体中药物的测定，一般需加入一定量破膜溶剂以对磷脂双分子层进行破坏，让药物从载体中完全释放出来，从而保证测定结果的准确性。取 1 ml 脂质体，试验分别以 10%Triton X-100 乙醇溶液[5]、甲醇[6]、乙醇[7]、水-异丙醇-乙醚(2:2:1)[8]、异丙醇-水(4:6)[9]、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇、异丙醇稀释到 25 ml，结果只有 10%Triton X-100 乙醇溶液和异丙醇能将脂质体溶解为澄清溶液，但 Triton X-100 在 242 nm 仍有较强的紫外吸收，在蒿酮后面会出现一怪峰，影响测定。故最后选择以异丙醇作破膜溶剂。

3.3 测定波长选择

采用二极管阵列检测器在 190~380 nm 范围内分别扫描对照品、样品溶液中蒿酮峰的紫外吸收，对照品和样品中的蒿酮均在 241.7 nm 有最大吸收，故检测波长选择 242 nm。

3.4 包封率测定方法选择

脂质体包封率测定方法有葡聚糖凝胶柱层析法、超速离心法和透析法等。葡聚糖凝胶柱层析法成本较高，且需绘制洗脱曲线确认脂质体与游离药物是否分离，操作较繁琐。而超速离心法脂质体在高速离心时有可能凝聚而被破坏。由于蒿酮脂溶性较强，透析时，包封于脂质体内的药物和游离药物之间的动态平衡不易破坏，即不易发生渗漏，故可采用透析法测定包封率。经试验发现，在透析袋中，8 h 药物的释放就可以达到平衡，为保证药物完全释放，实验选择在 12 h 取样测定药物包封率。

参 考 文 献

[1] 何 兵，冯文宇，田 吉，等.GC-MS 分析酉阳青蒿挥发油化学成分[J].华西药学杂志，2008，23(1)：30-31.

[2] 孙 晔，陈 希，张 蕙，等.川产黄花蒿中桉油精、蒿酮、樟脑、石竹烯、氧化石竹烯含量的气相色谱法测定[J].药物分析杂志，2006，26(2)：239-241.

[3] 孙 晔，陈 希，李 萍，等.青银注射液中桉油精、蒿酮、樟脑、石竹烯含量的气相色谱法测定[J].中国新药杂志，2006，15(4)：291-293.

[4] 何 兵，田 吉，李春红，等.SPE-HPLC 测定双青咽喉片中蒿酮的含量[J].中成药，2009，31(1)：142-144.

[5] 熊 非，朱家壁，田 煦，等.RP-HPLC 测定甘草酸单铵脂质体的含量及包封率[J].药物分析杂志，2004，24(4)：364-366.

[6] 靖 会，赵惠茹，张宇洁.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素脂质体中雷公藤甲素的含量[J].陕西中医学院学报，2006，29(1)：57-58.

[7] 雷杰杰，邓意辉，陈国良，等.RP-HPLC 测定齐多夫定棕榈酸酯脂质体药物含量[J].中国药学杂志，2005，40(7)：538.

[8] 杨继红，蒋学华，杨俊毅，等.HPLC 测定葛根素长循环脂质体中葛根素的含量和包封率[J].华西药学杂志，2006，21(1)：66-68.

[9] 郭 丹，李国锋，杨西晓，等.地塞米松磷酸钠脂质体的 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志，2004，35(6)：356-357.

（责任编辑：关蕴良）