

RP-HPLC法测定含银杏化妆品中槲皮素的含量^Δ

蒋瑶*, 褚燕斌, 孔荔, 张浩琳, 王若晨, 童杰, 马宁[#](长沙医学院药学院, 长沙 410219)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1243-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.32

摘要 目的:建立含银杏化妆品中槲皮素的含量测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为ODS-2HYPERSIL,流动相为甲醇-0.5%磷酸溶液(50:50, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为360 nm,柱温为30℃,进样量为20 μl。结果:槲皮素的进样量在0.011 3~0.067 8 μg范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.999 6$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为97.88%,RSD为0.67%($n=9$)。结论:该方法准确、稳定、重复性好,可用于银杏化妆品的质量控制。

关键词 化妆品;银杏;槲皮素;反相高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Quercetin in Cosmeceuticals Containing Ginkgo by RP-HPLC

JIANG Yao, CHU Yan-bin, KONG Li, ZHANG Hao-lin, WANG Ruo-chen, TONG Jie, MA Ning (School of Pharmacy, Changsha Medical University, Changsha 410219, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of quercetin in cosmeceuticals containing ginkgo. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on ODS-2HYPERSIL column with mobile phase of methanol-0.5% phosphoric acid (50:50, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 30 °C and the volume was 20 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the volume of quercetin and peak area in the range of 0.011 3-0.067 8 μg ($r=0.999 6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests was all less than 2%. Average recovery rate was 97.88% (RSD=0.67%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and reproducible, and can be used for quality control of cosmeceuticals containing ginkgo.

KEYWORDS Cosmeceuticals; Ginkgo; Quercetin; RP-HPLC; Content determination

龙胆苦苷的含量测定方法收载于2010年版《中国药典》(一部)中,以十八烷基硅烷键合硅胶柱为填充剂,以甲醇-水(25:75, V/V)为流动相,检测波长为270 nm^[7]。《中国药典》中橙皮苷的含量测定方法中流动相为甲醇-醋酸-水(35:4:61, V/V/V),检测波长为283 nm^[7]。因龙胆苦苷和橙皮苷的流动相皆为甲醇-水,并参考相关文献^[1-4],试验时以甲醇-水为流动相系统,并加入醋酸和磷酸作改性剂时,各峰峰形较好,分离度较高。

3.3 含量限度的确定

本研究结果表明,合剂中龙胆苦苷的质量浓度为0.330~0.339 mg/ml,橙皮苷质量浓度为0.069~0.076 mg/ml。2010年版《中国药典》(一部)中龙胆药材规定龙胆苦苷的质量分数不得低于3.0%,陈皮药材规定橙皮苷的质量分数不得低于3.5%。按处方量折算,酸性龙胆合剂中龙胆苦苷质量浓度理论值为0.6 mg/ml,橙皮苷质量浓度理论值为0.63 mg/ml。考虑到药材不同及渗滤工艺的提取率较低,根据6批样品的质量浓度测定结果,取平均值的一半,规定合剂龙胆苦苷质量浓度

每1 ml不得少于0.017 mg,橙皮苷质量浓度每1 ml不得少于0.036 mg。

综上所述,本研究可为拟订《中国人民解放军医疗机构制剂规范》中酸性龙胆合剂的含量测定提供可靠依据。

参考文献

- [1] 杨慧玲,司庆文,侯勤正,等.HPLC法测定不同海拔长柄秦艽中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷[J].中草药,2010,41(10):1 720.
- [2] 许秋霞,李小芳,舒予,等.干燥方法对龙胆炮制品中龙胆苦苷含量的影响[J].中国药房,2013,24(7):622.
- [3] 汪金玉,帅欧,林励,等.橘叶黄酮类成分的研究与薄层色谱鉴别[J].广州中医药大学学报,2011,28(2):191.
- [4] 马秋菊,孙萍.消脂通脉颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(35):3 325.
- [5] 杨维霞.秦岭龙胆的化学成分研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [6] 王元清,严建业,师白梅,等.不同批次枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、总黄酮、挥发油的含量比较及质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):146.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010版.北京:中国医药科技出版社,2010:89-176.

(收稿日期:2014-03-12 修回日期:2014-09-04)

(编辑:孙冰)

^Δ 基金项目:2013年度国家级大学生研究性学习和创新性实验计划项目(No.201310823003);2013年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(No.湘教通[2013]36号)

* 本科生。研究方向:中药质量控制。E-mail:949402144@qq.com

[#] 通信作者:教授。研究方向:中西药质量控制。电话:0731-88498780。E-mail:majsjym@163.com

化妆品(Cosmeceutical)是指具有药物性质的化妆品。由药物(Pharmaceutical)和化妆品(Cosmetic)两个词组合而成,又称功能化妆品(Function-cosmetics)、疗效化妆品(Cos-medics)、医学化妆品(Medicined cosmetics)、生理活性化妆品(Physiologically active cosmetics)或美容药等,是集清洁、保养、美化、修饰于一体,具有抑制色素生长、保持皮肤柔润娇嫩、提升皮肤弹性等功效的化妆品。

含银杏的化妆品在国内、外化妆品市场上占有较大份额,深受女士的喜爱。研究表明,槲皮素是银杏提取物的重要有效成分之一,能润泽肌肤、抑制黑色素生长、保持皮肤光泽与弹性、延缓皮肤衰老^[1-5]。本研究首次采用高效液相色谱(HPLC)法测定含银杏化妆品中槲皮素的含量,并对市售多种产品进行了检测,以为控制含银杏化妆品质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-600型HPLC仪,包括LC-P600型高压恒流泵和LC-UV600型紫外检测器(南京科捷分析仪器有限公司);LC-100型液相色谱工作站(上海伍丰科学仪器有限公司);AL204型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);AS3120型超声波清洗器(天津市奥特赛恩斯仪器有限公司);溶剂过滤器(天津津腾实验设备有限公司);RE-52C型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限公司);超纯水机(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 样品与试剂

银杏叶水漾精华(A,网购,批号:P3x2);银杏柔润凝水柔肤液(B,网购,批号:G08A45);银杏天然爽肤水(C,网购,批号:VO304);银杏柔白水分精华液(D,网购,批号:05A73YCB);银杏果嫩白精华液(E,网购,批号:20140209);槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100081-200907,纯度>98%);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ODS-2HYPERASIL(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.5%磷酸(50:50,V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:360 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取经五氧化二磷减压干燥24 h的槲皮素对照品1.0 mg,置于100 ml棕色量瓶中,加流动相稀释并定容,摇匀,即得质量浓度为10 μg/ml的对照品溶液,避光保存。

2.2.2 供试品溶液 取产品A约9 g,精密称定,置于100 ml圆底烧瓶中,精密加入25 ml甲醇-25%盐酸(4:1,V/V)的混合溶液,摇匀使溶解,加热回流2 h,放冷;转移至50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,置于旋转蒸发器中旋转蒸干,残渣加流动相使溶解,定容至10 ml量瓶中;取上清液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 取产品A约9 g,精密称定,置于100 ml圆底烧瓶中,精密加入25 ml甲醇-水(4:1,V/V)的混合溶液,摇匀使溶解,加热回流2 h,放冷;转移至50 ml量瓶中,加甲醇定容,置于旋转蒸发器中旋转蒸干,残渣加流动相使溶解,定容至10 ml量瓶中;取上清液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 系统适用性试验

分别吸取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰。结果显示,槲皮素与供试品中其他组分的色谱峰可达到基线分离,分离度>1.5;所测成分理论板数以槲皮素峰计均不低于2 500;阴性样品无干扰。色谱见图1。

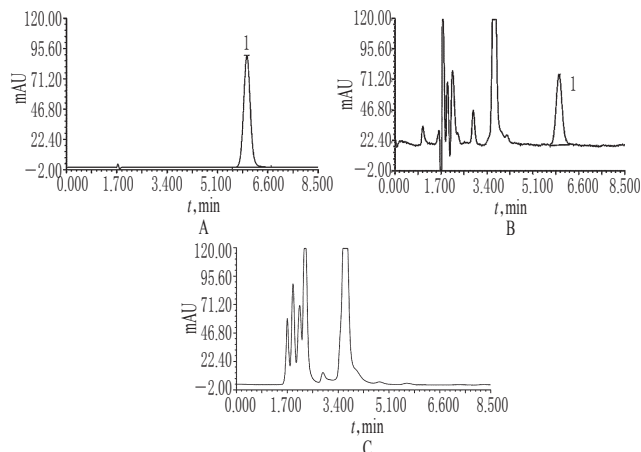


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性样品;1.槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference;B.test samples;C.negative samples;1. quercetin

2.4 线性关系考察

精密吸取槲皮素对照品适量,用流动相依次稀释,制成质量浓度分别为0.565、1.130、1.695、2.260、2.825、3.390 μg/ml的对照品溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件分别进样20 μl测定,记录峰面积。以对照品的进样量(x,μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得槲皮素的回归方程为 $y=62\ 480x-622.64$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,槲皮素的进样量在0.011 3~0.067 8 μg范围内与各自峰面积呈良好线性关系。

2.5 检测限与定量限

取质量浓度为50 μg/ml的槲皮素对照品溶液适量,用流动相逐级稀释,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件进样测定。当信噪比为3:1时测得槲皮素的检测限为0.058 μg/ml;当信噪比为10:1时测得槲皮素的定量限为0.149 μg/ml。

2.6 精密度的试验

精密吸取质量浓度为1.130 μg/ml的对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,RSD=1.73%(n=6),表明仪器精密性良好。

2.7 重复性试验

精密称取样品A适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品A中槲皮素的含量。结果,样品A中槲皮素的平均含量为1.715 2 μg/g,RSD=1.36%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液适量,于室温下放置,分别于配制0、2、4、6、8、10、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.52%(n=8),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品A共9份,每份约9g,精密称定,每3份为一组,分别精密加入高、中、低质量浓度的对照品溶液各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
15.46	18.53	33.75	99.29		
15.46	18.53	33.03	97.18		
15.46	18.53	33.23	97.76		
15.46	15.36	30.24	98.12		
15.46	15.36	30.12	97.73	97.88	0.67
15.46	15.36	31.13	97.76		
15.46	12.43	27.36	98.10		
15.46	12.43	27.11	97.20		
15.46	12.43	27.26	97.74		

2.10 样品含量测定

分别精密称取5种药妆产品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算样品含量。结果,仅样品A中槲皮素含量得以检出,其含量为1.715 2 μg/g;其余产品不含槲皮素或槲皮素含量在检测限以下。

3 讨论

3.1 流动相的选择

流动相的选择是HPLC法分离的关键环节,根据有关槲皮素含量测定的相关文献,笔者考察了甲醇-0.4%磷酸(50:50, V/V)^[6]、甲醇-0.4%磷酸(45:55, V/V)^[7]、甲醇-0.5%磷酸(50:50, V/V)^[8]3种流动相体系对化妆品中槲皮素的洗脱效果。结果显示,前两个流动相使待测成分发生了严重的拖尾现象;而甲醇-0.5%磷酸(50:50, V/V)可有效改善其色谱行为,色谱峰形对称、尖锐,且所有样品在槲皮素出峰时间段内无其他成分干扰。

3.2 提取方法的选择

槲皮素为黄酮苷元,其水溶性较差,可溶于甲醇、乙酸乙酯、冰醋酸等,而其苷类则较易溶于水^[9]。本研究采用甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)的混合液来提取并水解样品中的槲皮素。该方法操作简单,同时所选取样品中的其他成分对槲皮素的测定均无干扰作用。本研究曾考察过先水解后进一步萃取的方法^[10],目的是为了减少供试品溶液中的杂质,但用此法制备的样品始终未能在槲皮素的相应时间段内出峰。

3.3 水解条件的选择

银杏药妆产品的产品成分中包含有银杏叶提取物,而槲皮素是银杏叶提取物中黄酮类化合物的主要成分之一^[11],因此在分析测定槲皮素含量时,一般先要通过在酸性条件下水解,使黄酮苷转化成槲皮素等黄酮苷元。笔者曾考察甲醇-1.5 mol/L盐酸(1:1, V/V)^[12]、甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)^[13]两种溶液对样品的水解效果。结果显示,在水解时间相同的情况下,后者水解测得的槲皮素含量更高,因此最终确定采用甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)的混合溶液对产品进行水解。又参考邓丹丹等^[14]的研究,最终确定样品的水解时间为2 h。

3.4 方法适用性考察

试验所选的药妆品均呈液体,产品的成分、性质相似。对未检测出槲皮素的样品(即样品B、C、D、E)进行加样回收试

验,结果平均回收率分别为99.31%、101.28%、98.41%、99.49%。结果表明,该提取方法适用于测定所选的含银杏药妆品中槲皮素的含量。

3.5 阴性样品的制备方法

银杏叶提取物中的黄酮类化合物未经酸水解一般不能得到槲皮素,因此在含量测定时,槲皮素在相应时间段内不会出峰。因此,本研究阴性样品的制备为将“2.2.2”项下供试品溶液制备过程中的甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)混合溶液改为甲醇-水(4:1, V/V)混合溶液,其余试验条件不变,依法操作即得。

综上,本研究选择当前市场上热销的5种知名药妆品作为研究对象,建立了HPLC法以测定其中主要有效成分槲皮素的含量。结果表明,只有样品A中可检测出槲皮素,而其余4种药妆品中均未检出,说明这些药妆品中可能不含槲皮素或者槲皮素的含量低于检测限。槲皮素作为银杏药妆品中的重要活性成分,若其含量未能得到有效控制,无疑损害了消费者的利益,所以增加银杏药妆品中槲皮素含量的控制标准以保证其质量,是非常必要的。因此,笔者呼吁相关部门有必要制订药妆品的质量标准,进一步规范药妆品市场,保护消费者的权益。

参考文献

- [1] Oricha BS. Cosmeceuticals: a review[J]. *Afr J of Pharm Pharmacol*, 2010, 4(4):127.
- [2] 陈学森,张艳敏,林群.银杏叶药用有效成分研究进展[J]. *山东农业大学学报:自然科学版*, 2000, 31(1):101.
- [3] 韩洪杰,王昌禄,陈勉华,等.槲皮素对线虫抗衰老的影响及其机制的初步研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2011, 33(2):35.
- [4] 孙笑槐.银杏叶中有效成分的研究进展[J]. *中国科技信息*, 2011(4):111.
- [5] Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, et al. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin[J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(10):763.
- [6] 袁铁流. HPLC法测定银杏叶中槲皮素含量的研究[J]. *湖南中医杂志*, 2000, 16(3):73.
- [7] 危华玲,陈英,陈晓宇,等.复方银杏叶片中槲皮素的含量测定[J]. *中国药师*, 2008, 11(1):12.
- [8] 朱颖虹,向飞军,郭静.复方罗布麻颗粒中总黄酮的含量测定[J]. *现代食品与药品杂志*, 2006, 16(3):50.
- [9] 孟德胜,汪士良.槲皮素及其苷类研究进展[J]. *中国药房*, 2000, 11(5):232.
- [10] 郝枝花,蒋大圆,尚余乐.HPLC测定芙蓉膏水解产物中槲皮素的含量[J]. *安徽医药*, 2009, 13(11):1350.
- [11] 何健.银杏叶的研究进展[J]. *中国药房*, 2011, 22(15):1434.
- [12] 周欣,钟世江,陈树琳.高效液相色谱法测定银杏叶提取物中槲皮素的含量[J]. *中国中药杂志*, 1997, 22(10):616.
- [13] 国家药典委员会. *中华人民共和国药典:一部*[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社, 2010:392-393.
- [14] 邓丹丹,赵浩如,黄罗生.水解时间对银杏黄酮含量的影响[J]. *中成药*, 2004, 26(8):662.

(收稿日期:2014-09-09 修回日期:2015-01-13)

(编辑:孙冰)