

HPLC 测定壮骨缓释微丸中的柚皮苷

冯乾坤, 贾天宝, 王沛*, 张倩, 王继彦
(长春中医药大学, 长春 130117)

摘要 目的:建立壮骨缓释微丸中柚皮苷的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法测定壮骨缓释微丸中柚皮苷的含量。色谱法分析条件为,Agilent C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-磷酸溶液(33:67);流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 27℃,检测波长 283 nm。结果:柚皮苷量在 0.128 8~0.644 0 μg 与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$),平均回收率为 100.02%,RSD 0.192%。结论:方法简便可行、结果准确可靠,重复性好,可作为壮骨缓释微丸中柚皮苷的含量测定方法。

关键词 高效液相色谱法;壮骨缓释微丸;柚皮苷;含量测定

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)13-0092-03

Content Determination of Naringin in Zhuanggu Controlled Release Mini-pill by HPLC

FENG Qian-kun, JIA Tian-bao, WANG Pei*, ZHANG Qian, WANG Ji-yan
(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining naringin in Zhuanggu controlled release mini-pill. **Method:** HPLC was used for determination of naringin in Zhuanggu controlled release mini-pill. The separation was performed on a Agilent SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm,5 μm) at 27℃ with methanol-phosphoric acid(33:67) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, detected at wavelength of 283 nm. **Result:** Naringin was linear in the range of 0.128 8-0.644 0 μg, $r=0.999\ 9$. The average recovery was 100.02% with RSD 0.192%. **Conclusion:** The method is simple and reproducible for the determination of naringin in decoction of Zhuanggu controlled release mini-pill by HPLC.

[Key words] HPLC; controlled release mini-pill of Zhuanggu; naringin; determination

壮骨缓释微丸是吉林省中医药管理局出资支持的新药研发课题,该中药复方是由骨碎补、淫羊藿、

鹿茸等纯中药组成,具有补肝肾、强筋骨、助阳益精和祛风湿功能,并有抑制脊髓灰质病毒、降血压及增

收稿日期 20110223(005)

基金项目 吉林省中医药管理局课题(2010-084)

第一作者 冯乾坤,实验师,从事有机化学及药物分析,Tel:0431-86172694

通讯作者 * 王沛,教授,研究生导师,研究方向:药物新剂型及新药开发,Tel:0431-82225672,E-mail:Wapa1988@163.com

下”与浸泡正常煎煮时 2 种方式的煎出量,不具显著性。故中药煎药机煎煮含挥发性成分饮片时不必“后下”可与其他饮片一起浸泡后煎煮,既保证了煎药质量,又简化了传统煎药方法的操作程序。

参考文献

[1] 李学林. 中药应用形式及特点 [J]. 中医研究, 2006, 19

(2):59.

[2] 李彬. 应用新型煎药机煎药时对加水量的实验研究 [J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(1):68.

[3] 中国药典. 一部 [S]. 2005:45, 59, 69, 91, 98, 152, 211, 214.

责任编辑 蔡仲德

加冠脉流量等多种药理作用。临床主要用于治疗阳痿、腰膝痠弱、风寒湿痹、四肢麻木及股骨头坏死等症^[1-4]。为将其由应用多年的医院协定处方研发成新药,作者对控制该制剂的质量标准进行了研究。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(Waters 600,美国沃特世公司);电热恒温水浴锅(SHS-2,黄石市恒丰医疗器械有限公司);KQ3200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);R201 旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司);SHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);AL-204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号110722-200610);壮骨缓释微丸,是由本研究室自制(批号分别为100702,101101,101102,101104,101105);阴性对照品,由本研究室自制;甲醇(色谱纯西陇化工股份有限公司,水(杭州娃哈哈纯净水),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Autanlit C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 甲醇-磷酸溶液(0.05 mol·L⁻¹) (33:67),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 283 nm,柱温 27 °C,进样量 20 μL。

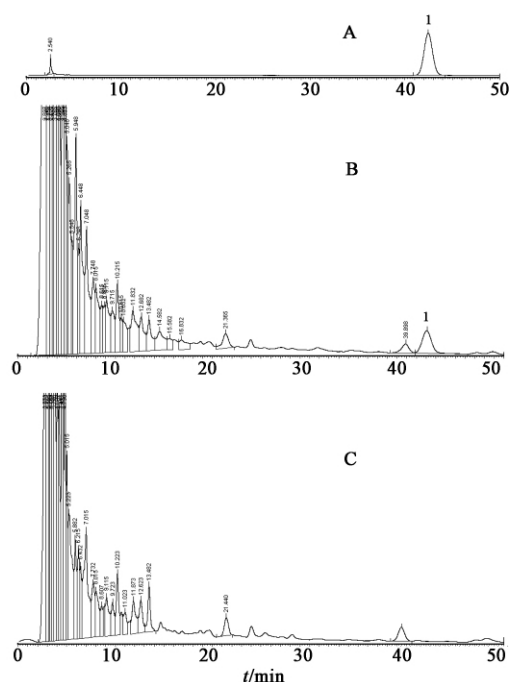
2.2 对照品溶液的制备 精密称取经80 °C干燥至恒重的柚皮苷对照品 6.44 mg,置于100 mL量瓶中,用色谱纯甲醇溶解,并加至刻度,摇匀,既得(每1 mL中含柚皮苷对照品 0.064 4 mg)。

2.3 样品溶液的制备 取壮骨缓释微丸适量,除去衣层,研细,取约2 g,精密称定,加甲醇30 mL,加热回流3 h,放冷,滤过,滤液置于50 mL量瓶中,用少量甲醇分次洗涤容器,洗液滤入同一量瓶中,加甲醇定容至刻度^[4],摇匀,用0.45 μm微膜滤过,取滤液,作为制剂样品供试品^[4]。

2.4 阴性对照品溶液制备 按处方比例称取除骨碎补外的其他药物,按壮骨缓释微丸制法制成的阴性对照品微丸,再按2.3项下方法制备阴性对照品。

2.5 系统适应性试验 分别取标准品溶液、样品溶液、阴性对照品溶液在2.1项下色谱条件下进行分析,理论塔板数不低于4 000,阴性对照对供试品测定无干扰。色谱图见图1。

2.6 标准曲线的制备 精密吸取2.2项下的柚皮苷对照品溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置于



A. 对照品; B. 样品液; C. 阴性对照

图1 壮骨缓释微丸 HPLC

10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,分别精密吸取20 μL进样,测定色谱峰面积。以柚皮苷对照品进样量为横坐标,柚皮苷的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程为 $Y = 2 \times 10^6 X + 19\ 773$ ($r = 0.999\ 9$) ($n = 5$)。柚皮苷在0.128 8 ~ 0.644 0 μg与峰面积呈良好线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取2.2项下的柚皮苷对照品溶液5份,每份3.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,分别精密吸取20 μL进样,分别测定色谱峰面积,同时计算得柚皮苷对照品的平均峰面积为667 301.396, RSD 1.24%,结果表明该试验有良好的精密度。

2.8 稳定性试验 取供试样品适量,精密称定,依照样品溶液的制备方法制备制剂样品溶液,室温(25 °C)下放置分别于0,2,4,8,16 h时,分别测定各样品的峰面积,计算所取供试样品平均峰面积为677 217.293, RSD 1.98%。峰面积无明显变化,说明此时间内,供试样品溶液化学性质稳定。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,分别取已知含量的样品5份,精密称定,按2.3项下操作制备样品溶液,置于50 mL量瓶中,再分别精密加入2.2项下的对照品溶液3 mL,甲醇定容至刻度,摇匀,用0.45

μm 微膜滤过,取滤液,分别吸取 20 μL 进样测定色谱峰峰面积(表 1)。加样平均回收率为 100.02%,RSD 0.192%。

表 1 橙皮苷加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.960 2	0.251 9	0.193 2	0.444 7	99.91		
2	1.997 0	0.256 9	0.193 2	0.449 2	99.80		
3	1.972 6	0.253 7	0.193 2	0.448 2	100.3	100.02	0.192
4	1.973 8	0.253 9	0.193 2	0.447 0	99.98		
5	2.001 0	0.257 3	0.193 2	0.450 8	100.1		

2.10 样品测定 分别取壮骨缓释微丸成品 5 批(100702,101101,101102,101104,101105)适量,按 2.3 项下操作制备供试品溶液,再按上述色谱条件进行分析,根据外标法测定面积并计算柚皮苷含量。结果见表 2。

表 2 橙皮苷壮骨缓释微丸中的柚皮苷含量($n=3$)

No.	1/mg	2 /mg	3 /mg	平均含量 /mg
1	0.177 583	0.177 591	0.177 592	0.177 589
2	0.175 393	0.175 386	0.175 383	0.175 388
3	0.176 146	0.176 147	0.176 148	0.176 147
4	0.177 620	0.177 620	0.177 623	0.177 621
5	0.177 018	0.177 020	0.177 013	0.177 017

3 讨论

本复方主药骨碎补为水龙骨科多年生蕨类植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm 的干燥根茎,是著名的骨伤科常用中药。其性温,味苦,归肾、肝经,具有补肾强骨、续伤止痛的功效。经研究骨碎补主要含有二氢黄酮、黄烷-3-醇及其衍生物、二聚物和三聚物类、三萜、酚酸、原儿茶酸等多种化学成分,其中二氢黄酮(以柚皮苷为代表)是其主要活性成分,有促进骨折愈合、防治骨质疏松、抗氧化、调血脂、抗炎、镇痛等生物活性^[10-13]。所以我们选择了控制骨碎补中的柚皮苷的含量为该中药复方的质量

指标。

参考文献

- [1] 马克昌,高子范,冯坤,等. 骨碎补提取液对小鸡骨发育的促进作用 [J]. 中医正骨,2007,2(4):7.
- [2] 马克昌,高子范,张灵菊,等. 骨碎补对大白鼠骨质疏松模型的影响 [J]. 中医正骨,2007,4(4):3.
- [3] 周铜水,周汉荣. 骨碎补对大鼠实验性骨损伤愈合的影响 [J]. 中药材,2006,25(5):249.
- [4] 王志儒,王文彬,乔亭祥,等. 用放射性同位素 45 钙对中草药骨碎补治疗骨伤作用原理的探讨 [J]. 北京中医学院学报,2002,3(3):13.
- [5] 刘斌,司徒镇强,吴军正,等. 枸杞和骨碎补对 HGF 体外附着与生长的影响 [J]. 中华口腔医学杂志,2002,27(3):159.
- [6] 樊粤光. 骨碎补提取液对体外分离破骨细胞性骨吸收的作用 [J]. 中国中医骨伤科杂志,2003,11(6):4.
- [7] 王华松. 骨碎补对骨折愈合中 $\text{TGF}\beta_1$ 表达的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志,2001,9(4):10.
- [8] 董福慧,郑军. 骨碎补对骨愈合过程中相关基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(7):518.
- [9] 才谦,刘玉强. HPLC 法测定舒筋定痛片中柚皮苷的含量 [J]. 中成药,2008,30(4):附 3.
- [10] Chang E J, Lee W J, Cho S H, et al. Proliferative effects of flavan-3-ols and propylgallate on MCF-7 and osteoblastic cells [J]. Arch Pharm Res, 2003,26(8):620.
- [11] 周铜水,周荣汉. 槲蕨根茎的脂溶性成分研究 [J]. 中草药,1994,25(4):175.
- [12] Wang X L, Wang N L, Zhang Y, et al. Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cells line [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2008,56(1):46.
- [13] Li F, Meng F, Xiong Z, et al. Stimulative activity of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. extracts and two of its flavonoids on the proliferation of osteoblastic like cells [J]. Pharmazie, 2006,61(11):962.

责任编辑 蔡仲德