

HPLC法测定接骨七厘片中柚皮苷的含量

张艳艳^{1*}, 曹淑娟¹, 陈汝红², 孙婷²(1.唐山市食品药品检验中心, 河北唐山 063000; 2.河北省食品药品检验院, 石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)28-2676-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.28.29

摘要 目的:建立测定接骨七厘片中柚皮苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈,流动相为甲醇-醋酸-水(36:4:64, V/V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为283 nm,进样量为10 μl。结果:柚皮苷检测质量浓度在22.7~45.4 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.86%;平均回收率为96.8%,RSD=1.1%($n=6$)。结论:该方法简便、快速,重复性好,适用于接骨七厘片中柚皮苷的含量测定。

关键词 HPLC;接骨七厘片;柚皮苷;含量测定

Content Determination of Naringin in Jiegu Qili Tablets by HPLC

ZHANG Yan-yan¹, CAO Shu-juan¹, CHEN Ru-hong², SUN Ting²(1.Tangshan Center for Food and Drug Control, Hebei Tangshan 063000, China; 2.Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of naringin in Jiegu qili tablets. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on Phenomenex Luna C₁₈ column with acetonitrile-acetic acid-water (36:4:64, V/V/V) as mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 283 nm. The injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of naringin were 22.7-45.4 μg/ml($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 96.8%(RSD=1.1%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were ≤0.86%. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and reproducible, and can be used for the content determination of naringin in Jiegu qili tablets.

KEYWORDS HPLC; Jiegu qili tablets; Naringin; Content determination

接骨七厘片为《国家基本药物目录·基层医疗卫生机构配备使用部分》(2009版)收载品种,为骨伤科用药,由乳香(制)、没药(制)、骨碎补(烫)、熟地黄(酒蒸)、当归、土鳖虫、血竭、硼砂、自然铜(醋煅)组成,具有活血化瘀、接骨续筋的作用。该药原质量标准未收载含量测定项,目前已有对处方中的血竭、大黄进行质量控制的文献报道^[1-2]。方中骨碎补为补肾强骨、活血续伤之要药,但市场上骨碎补存在大量伪品及混淆品,有必要对其质量进行控制。本试验中,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定了骨碎补中指标性成分柚皮苷的含量,现报道如下。

1 材料

LC-20AT 高效液相色谱仪,包括SPD-M20A检测器、LC Solution工作站等(日本岛津公司);BP225D型电子天平(德国Sartorius公司)。

柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号:110736-201035,质量分数:93.2%);接骨七厘片(市售,批号:100423、100424、100426);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱

* 主管药师。研究方向:药物分析。电话:0315-2039203。E-mail:tsyjzyy@163.com

温:30 ℃;流动相:甲醇-醋酸-水(36:4:64, V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:283 nm;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数按柚皮苷峰计算不低于3 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品10.16 mg,置于50 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密量取上述储备液3 ml,置于25 ml棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液(柚皮苷质量浓度为22.7 μg/ml)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取重量差异项下的本品,研细,取细粉约3.6 g(相当于处方药材3 g),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定质量,置水浴回流提取3 h,取出,放至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按接骨七厘片处方及制备工艺制备不含骨碎补的阴性样品,按“2.2.2”项下制备方法操作,即得阴性对照溶液。

2.3 专属性考察

精密量取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图1。由图1可见,柚皮苷峰保留时间约为17.1 min,且杂质峰与柚皮苷峰分离完全,不干扰柚皮苷的测定。

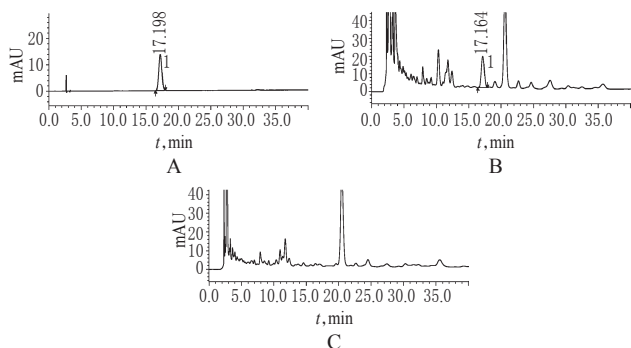


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 柚皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. naringin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,分别制成柚皮苷质量浓度为2.27、4.54、11.35、22.7、34.05、45.4 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品系列溶液,分别精密吸取10 μl ,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以柚皮苷检测质量浓度(x , $\mu\text{g/ml}$)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=19\,906.2x+1\,924.73$ ($r=0.999\,9$)。结果表明,柚皮苷检测质量浓度在22.7~45.4 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl ,按“2.1”项下色谱条件,连续进样6次,记录峰面积。结果,柚皮苷峰面积平均值为459 210, $\text{RSD}=0.43\%$,表明本方法精密度较好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液(批号:100423)适量,分别于放置0、1、2、4、8、12 h时按“2.1”项下的色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,柚皮苷峰面积平均值为501 003, $\text{RSD}=0.75\%$,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:100423)细粉约3.6 g,共6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,柚皮苷的平均含量为123.9 $\mu\text{g}/\text{片}$, $\text{RSD}=0.86\%$,表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取样品(批号:100423,每片含柚皮苷123.9 μg)20片,精密称定,计算得平均片质量为0.364 4 g,即含柚皮苷的量为340.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。取上述样品细粉约1.8 g,精密称定,共6份,备用。精密称取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为306.8 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液,精密量取2 ml,分别加入上述各份备用样品中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取3批样品适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取该供试品溶液和“2.2.1”项下对照品溶液各10 μl ,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算柚皮苷的含量。结果,批号为100423、100424、100426的样品每片含柚皮苷的量分别为123.9、119.2、121.6 μg 。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

取样量, mg	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1.832 2	0.622 9	0.613 6	1.219 3	97.2		
1.805 8	0.614 0	0.613 6	1.204 7	96.3		
1.874 1	0.637 2	0.613 6	1.235 5	97.5	96.8	1.1
1.890 1	0.642 6	0.613 6	1.226 7	95.2		
1.865 6	0.634 3	0.613 6	1.225 8	96.4		
1.822 7	0.619 7	0.613 6	1.221 6	98.1		

3 讨论

接骨七厘片临床疗效确切,方中骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J.Sm 的干燥根茎,具有补肾强肾、续筋止痛的功效,常发现有中华槲蕨、光叶槲蕨、崖姜、大叶骨碎补混充骨碎补供药用,给临床安全、合理用药带来了困扰。本试验采用HPLC法测定骨碎补中柚皮苷的含量,为接骨七厘片的质量控制提供了一定的理论依据。

3.1 检测波长的选择

利用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围扫描对照品溶液吸收光谱,发现柚皮苷在283 nm波长处有最大吸收峰,故采用283 nm波长进行含量测定。

3.2 流动相的选择

笔者参考相关文献^[3-4],曾采用甲醇-醋酸-水、甲醇-水、乙腈-醋酸-水体系及不同比例,结果发现采用甲醇-醋酸-水(36:4:64, $V/V/V$)柚皮苷峰能得到很好的分离,峰形较好,保留时间适当,故优选甲醇-醋酸-水(36:4:64, $V/V/V$)作为本试验的流动相。

3.3 提取溶剂及提取方法的选择

笔者参考相关文献^[9],分别考察了超声提取法和回流提取法,并考察了不同提取溶剂(水、甲醇、乙醇)、提取时间(30 min和1、2、3、4 h)、溶剂体积(25、50、75 ml)对含量测定的影响。结果,超声提取法效果不佳,定为回流提取法;通过考察提取溶剂,发现水、乙醇的提取率均低于甲醇;通过考察回流时间,发现2 h时柚皮苷含量明显低于3 h,而3 h已能够达到最高的提取率。因此,最优提取方法为加甲醇50 ml回流提取3 h。

综上所述,本方法简便、快速,重复性好,适用于接骨七厘片中柚皮苷的含量测定。建议完善接骨七厘片的法定标准,严格控制原料药材的质量及其投料量,以保证药品的安全、有效。

参考文献

- [1] 邓毅峰,王明星,刘永强,等.HPLC法测定接骨七厘片中血竭素的含量[J].中国药房,2011,22(12):1 134.
- [2] 徐成志.HPLC法测定接骨七厘片中大黄素、大黄酚的含量[J].安徽医药,2007,11(9):806.
- [3] 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,2010:239-240.
- [4] 李遇伯,孟繁浩,潘晓峰,等.HPLC法测定骨碎补药材中新北美莠草苷和柚皮苷的含量[J].药物分析杂志,2006,26(6):808.
- [5] 伍奕,蒋晓煌,蒋孟良,等.骨碎补中柚皮苷含量测定方法的优化研究[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):48.

(收稿日期:2013-07-24 修回日期:2014-02-04)