

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000204

反相高效液相色谱法测定柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷含量

何宜临, 王 璐, 吴小红

(重庆医科大学附属口腔医院修复科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】目的:建立能有效测定柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷含量的反相高效液相色谱法。**方法:**采用静电纺丝技术制备含有柚皮苷的纳米纤维膜样品,采用安捷伦 C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为乙腈-磷酸水(pH 2.8)(23:77),检测波长为 283 nm,流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,进样体积为 20 μl。**结果:**空白纳米纤维膜对柚皮苷的检测无干扰,专属性良好。柚皮苷最低检测限 S/N=3 为 3.4 ng/ml;定量限 S/N=10 为 10.2 ng/ml;在 51 ng/ml~1 836 μg/ml 范围内呈良好的线性关系(相关系数 $r=0.999\ 99$);日内和日间精密度以及重现性均良好;平均回收率为 99.51%,相对标准偏差=0.66%;检测溶液在 24 h 内稳定。**结论:**柚皮苷纳米纤维膜是采用静电纺丝技术制备的含有柚皮苷的纳米级纤维膜,是一种新型的载药引导性骨再生膜。本法简便、准确、快速,可用于柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷的含量测定,为研究其最佳载药量打下基础。

【关键词】纳米纤维膜;柚皮苷;含量测定;高效液相色谱法**【中图分类号】**R917**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-26

Determination of naringin in nanofiber membranes by reversed-phase high-performance liquid chromatographic

He Yilin, Wang Lu, Wu Xiaohong

(Department of Restoration, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University,
Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences)

【Abstract】Objective: To establish a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method to determine the content of naringin in nanofibers. **Methods:** The test film, nanofiber film containing naringin, was prepared using electrospinning equipment. The determination was performed on Agilent C18 chromatographic column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). The acetonitrile-phosphoric water (pH 2.8) (23:77) was used and the detecting wavelength was 282 nm. The column temperature was 30 ℃. The sampling inlet volume was 20 μl. **Results:** Pure PCL nanofiber, having good specificity exerted no interfering effect on naringin determination. The lowest detection limit of naringin S/N=3 was 3.4 ng/ml. The limit of quantitation S/N=10 was 10.2 ng/ml. Good linear dependence (correlation coefficient $r=0.999\ 99$) was detected when the concentration of naringin was within the range of 51–1 836 μg/ml. This method had good precision and repeatability both within and between days. The average recovery of naringin was 99.51% and the relative standard deviation was 0.66%. The test solution was stable within 24 h. **Conclusion:** Naringin nanofiber film can be produced using electrospinning technique which is a nano film with medicine loaded for bone regenerative. This study provides an easy, accuracy, rapid way for the quantitative determination of naringin in nanofibers and solid basis for the evaluation of the optimum content of naringin in nanofibers.

【Key words】 nanofiber membrane; naringin; content determination; high-performance liquid chromatographic

柚皮苷是一种黄酮类化合物,是骨碎补的主要成分^[1-2],大量研究证实,柚皮苷能够促进成骨细胞

增殖和分化^[3-4],具有较好的抗骨质疏松活性^[5-7],是预防和治疗骨质疏松的有效药物。骨质疏松状态下的口腔颌面部骨缺损修复是目前国际上口腔临床医学亟待解决的难题,骨质疏松甚至可能导致修复失败^[8]。引导性骨再生技术^[9]是建立在细胞生物学和生物医学工程之上的新技术,它为骨缺损的治疗开辟了一个新的领域。在引导性骨再生技术中膜材料是关键。其中可降解性膜材料具有可被组织吸

作者介绍:何宜临, Email: elain525@sina.com,

研究方向:口腔修复学,主要从事组织工程骨材料研究。

通信作者:吴小红, Email: hiwxh@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81200767/H1402);重庆市卫生局课题资助项目(编号:2012-2-8);重庆医科大学附属口腔医院院级课题资助项目。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000204.html>

收、不需要二次手术取出的优点,因此在实际应用中多数学者倾向应用。近年来,利用静电纺丝技术制备的聚合物纳米纤维膜具有高孔隙率、高比表面积的特点,能促进成骨细胞的黏附、铺展、细胞外基质的生成和矿化^[10-12],已被广泛应用于骨、肌腱、血管和神经等组织的修复^[13-17]。

研究表明将一定浓度的柚皮苷溶于聚己内酯(polycaprolactone, PCL)和聚乙二醇-*b*-聚己内酯(polyethylene glycol-*b*-polycaprolactone, PEG-*b*-PCL)构成的混合溶液,经电纺制备出的柚皮苷纳米纤维膜可以作为一种新型的载药引导性骨再生膜^[18]。本实验探讨了适用于柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷含量检测的液相色谱条件与样品处理过程,建立了能有效检测柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷含量的反相高效液相色谱(reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析方法,并对该方法进行了系统的方法学验证。为下一步深入研究 PEG-*b*-PCL 和柚皮苷的最佳配比打下基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

柚皮苷纳米纤维膜(静电纺丝技术制备,批号:130101、130102、130103)。

1.2 仪器与试剂

Agilent1200 系列高效液相色谱仪,VWD 检测器,Agilent 化学工作站;KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BS124S 电子天平(万分之一,Sartorius);XS105(十万分之一,Mettler Toledo);UPH-III-40L 超纯水仪;色谱柱:安捷伦 C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。

对照品:柚皮苷购自 Sigma 公司;批号 N1376-25G;CAS:10236-47-2;Naringin:90.0%。试剂:乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯),超纯化水自制,其他试剂均为分析纯。样品:柚皮苷纳米纤维膜(批号:130101、130102、130103)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 依据文献^[19-23]查阅,确定色谱条件如下,流动相:乙腈-水(磷酸调 pH 2.8)(23:77),检测波长:283 nm,流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。理论板数按柚皮苷峰计算应不得低于 2 000。

1.3.2 溶液的制备

1.3.2.1 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品适量,精密称定,置容量瓶中,加 PBS 溶液(pH 7.5)溶解并稀释制成每 1 ml 含 2.04 mg 的溶液,作为对照品储备溶液;精密吸取对照品溶液储备液 5 ml,置 10 ml 容量瓶中,加 PBS 溶液

(pH 7.5)稀释制成每 1 ml 含 1.02 mg 的溶液,作为对照品工作溶液。

1.3.2.2 空白溶液的制备 将 PCL 溶于丙酮,配制成 15% 的 PCL 溶液。将制备好的电纺丝溶液在室温下充分搅动 1 h 后,加入装有 21 号不锈钢钝性针头的 5 ml 注射器,针头与高压直流电源的正极相连,针头下方安装一个接地的铜板,上覆铝箔作为纤维的接收屏(10 cm × 10 cm)与高压直流电源的负极相连。电纺参数为:电压 15 kV,接收距离 12 cm,溶液流量 3 ml/h,电纺时间 20 min。收集接收屏表面获得的无序排列的纳米纤维膜,置于干燥器中干燥保存,得空白纳米纤维膜^[8]。精密称取空白纳米纤维膜约 1.0 g,精密称定,置 25 ml 容量瓶中,加 PBS 溶液(pH 7.5)溶解并至刻度,即得。

1.3.2.3 供试品溶液的制备 将 PCL 溶于丙酮,配制成 15% PCL 溶液。再将柚皮苷与 PEG-*b*-PCL 按 1:1 比例混合溶于 PCL 溶液中得到终质量浓度为 0.33 mg/ml 的电纺丝溶液。将制备好的电纺丝溶液在室温下充分搅动 1 h 后,加入装有 21 号不锈钢钝性针头的 5 ml 注射器,针头与高压直流电源的正极相连,针头下方安装一个接地的铜板,上覆铝箔作为纤维的接收屏(10 cm × 10 cm)与高压直流电源的负极相连。电纺参数为:电压 15 kV,接收距离 12 cm,溶液流量 3 ml/h,电纺时间 20 min。收集接收屏表面获得的无序排列的纳米纤维膜,置于干燥器中干燥保存,得供试品纳米纤维膜。取供试品约 1.0 g,精密称定,置 25 ml 容量瓶中,加 PBS 溶液(pH 7.5)溶解并至刻度,即得。

1.3.2.4 过滤材质的选择 取样品溶液,分别采用尼龙(Nylon)、聚醚砜(polyethersulphone, PES)、聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)和聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)4 种材质滤头过滤,滤液注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.3.2.5 滤膜孔径的选择 取样品溶液,分别采用滤膜孔径 0.22 μm、0.45 μm 的 Nylon 材质滤头过滤,滤液注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.3.2.6 流动相的选择 分别考察不同 pH 值(2.5、2.8、3.0),不同流动相比比例(乙腈-水=21:79、乙腈-水=23:77、乙腈-水=25:75)的流动相对供试品各峰的峰形及分离效果。

1.3.2.7 线性范围 精密吸取 1.3.2.1 项下对照品储备溶液适量,加 PBS 溶液(pH 7.5)稀释制成 0.051、0.102、0.510、1.020、5.1、10.2、51.0、1 020、1 428、1 836 μg/ml。分别精密上述溶液吸取 20 μl,注入液相色谱仪,依照 1.3.1 项下的色谱条件测定,记录色谱峰。以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.2.8 精密度实验 参考《中国药典》2010 年版二部附录 XIX A 药品质量标准分析方法验证指导原则,精密称取供试品适量,加 PBS 溶液(pH 7.5)制成每 1 ml 含有柚皮苷 0.816、1.020、1.224 mg 的低、中、高溶液(约相当于按 1.3.2.3 制备的柚皮苷纳米纤维膜供试品溶液中柚皮苷含量的 80%、100%,

120%)各 1 份,每种浓度样品 1 d 内连续进样 6 次,并计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值,即为日内精密度。连续检测 3 d,每天连续进样 2 次,计算 RSD 值,即为日间精密度。

1.3.2.9 稳定性实验 精密吸取柚皮苷对照品工作溶液及供试品溶液 20 μ l,分别于 0、2、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪,测定峰面积,计算柚皮苷含量及其 RSD。

1.3.2.10 重复性实验 称取 3 批(批号:130101、130102、130103)柚皮苷纳米纤维膜样品各 5 份,每份各约 80 mg,精密称定,置容量瓶中,加 PBS 溶液(pH 7.5)制成每 1 ml 约含柚皮苷 1.02 mg 的溶液,测定含量,计算样品柚皮苷含量及其 RSD。

1.3.2.11 准确度实验 精密称取已知含量的样品 9 份(b1-9),分别以 80%、100%、120%的量加入柚皮苷对照品,按 1.3.2.3 项下方法平行制备 9 份供试品溶液,计算回收率。

1.3.2.12 样品含量测定 分别取柚皮苷纳米纤维膜 3 批样品,按照 1.3.2 项下方法处理,依照上述含量测定方法,进样 20 μ l,测定柚皮苷的含量。

2 结果

2.1 过滤材质及滤膜孔径的选择

2.1.1 过滤材质的选择 实验分别采用了 Nylon(峰面积:851 538)、PES(峰面积:850 291)、PTFE(峰面积:850 408)、PVDF(峰面积:852 326)4 种材质的滤膜。结果表明,4 种滤膜对结果未见明显影响,RSD 为 0.10%因此实验选取了相对性价比比较高的 Nylon 材质的滤头作为供试品制备滤膜。

2.1.2 滤膜孔径的选择 实验结果(孔径 0.22 μ m 对应峰面积:850 192,0.45 μ m 孔径时对应峰面积:851 538)表明,滤膜孔径不影响检测结果,RSD 为 0.08%。因此,本实验采用滤膜孔径为 0.45 μ m 的 Nylon 材质滤头对供试品溶液进行过滤。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 检测波长的确定 制备柚皮苷对照品稀释液照紫外-可见分光光度法(中国药典 2010 版二部附录),于 190~900 nm 波长范围内进行全波长光谱扫描,记录吸收光谱。在 283 nm 处有最大吸收峰,故选用 283 nm 为检测波长。

2.2.2 流动相的选择 实验结果表明,当流动性为乙腈-磷酸水(pH 2.8)(23:77)时,供试品各峰分离效果最好,主峰峰形较好,故选用乙腈-磷酸水(pH 2.8)(23:77)为流动相。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适应性 以对照品溶液作为检查系统适应性的溶液,按本文色谱条件连续进样 6 次,峰面积分别是 854 387、853 746、852 733、853 835、849 25、855 644,其峰面积 RSD 为 0.26%,小于 5.0%,表明该系统稳定可靠。

2.3.2 专属性 分别精密量取对照品工作溶液、空白溶液、供试品溶液 20 μ l,注入液相色谱仪。结果表明,在柚皮苷出峰处空白溶液无色谱峰,空白纳米纤维膜对柚皮苷的检测无干扰,本方法专属性良好,见图 1~3。

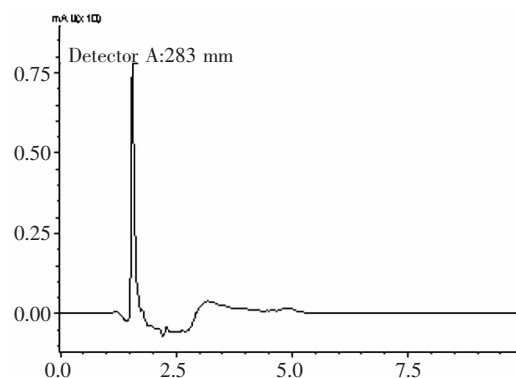


图 1 空白溶液的 HPLC 图

Fig.1 HPLC spectrum of blank solution

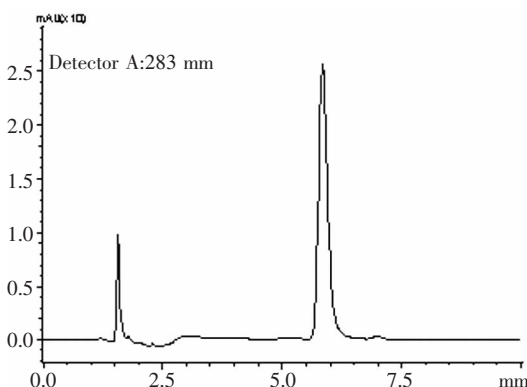


图 2 对照品溶液的 HPLC 图

Fig.2 HPLC spectrum of reference solution

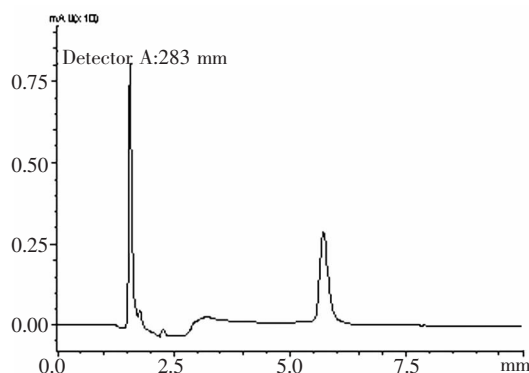


图 3 供试品溶液的 HPLC 图

Fig.3 HPLC spectrum of test solution

2.3.3 检测限、定量限与线性范围 最低检测限 $S/N=3$ 为 3.4 ng/ml;定量限 $S/N=10$ 为 10.2 ng/ml。

以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算线性回归方程为 $Y=3\ 239.2X+10\ 378$ ($r=0.999\ 99$)。结果表明,柚皮苷在 0.051~1 836 μ g/ml 范围内呈良好的线性关系(图 4)。

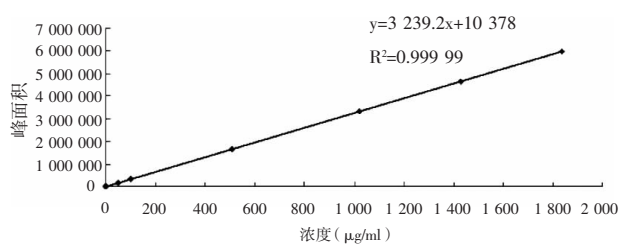


图 4 柚皮苷线性关系图

Fig.4 Linear relationship diagram

2.3.4 日内精密度和日间精密度实验 计算峰面积的 RSD 值,柚皮苷的低中高 3 种浓度日内精密度分别为 0.15%($n=6$)、0.16%($n=6$)、0.16%($n=6$);柚皮苷的低中高 3 种浓度日间精密度分别为 0.11%($n=6$)、0.23%($n=6$)、0.14%($n=6$)。结果表明, RSD 值均小于 2%,该方法的精密度良好(表 1)。

表 1 日内精密度和日间精密度实验结果

Tab.1 Results of precision test both within and between days

浓度 (mg/L)	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
低	0.818 0 $\pm$ 0.001 2	0.15	0.817 0 $\pm$ 0.000 9	0.11
中	1.021 0 $\pm$ 0.001 6	0.16	1.021 0 $\pm$ 0.002 3	0.23
高	1.225 0 $\pm$ 0.001 9	0.16	1.225 0 $\pm$ 0.001 7	0.14

2.3.5 稳定性实验 结果表明,对照品平均峰面积为 856 117.333 30, RSD 为 0.15%($n=6$);供试品平均峰面积为 868 793.125 72, RSD 为 0.44%($n=6$),对照品溶液及供试品溶液在 24 h 内稳定性良好(表 2)。

表 2 稳定性实验结果

Tab.2 Results of stability test

进样 次数	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
对照品 峰面积	854 837	855 891	856 549	854 958	856 121	858 351	0.15
供试品 峰面积	872 054	862 971	871 858	866 567	867 277	872 032	0.44

2.3.6 重复性实验 计算 3 批样品柚皮苷含量及其 RSD 值。结果表明此方法的重复性良好(表 3)。

表 3 重复性实验结果

Tab.3 Results of repeatability test

批号	柚皮苷 (mg/g)	
	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
130101	27.484 $\pm$ 0.026	0.09
130102	27.278 $\pm$ 0.069	0.25
130303	26.876 $\pm$ 0.098	0.37

2.3.7 准确度实验 计算回收率,结果见表 4。表明此方法的回收率良好。

表 4 准确度实验结果

Tab.4 Results of accuracy test

样 品	供试品所 含柚皮苷 的量 (mg)	加入柚 皮苷的 量 (mg)	测得柚皮 苷的量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
b1	13.79		21.38	99.24		
b2	13.72	7.65	21.34	99.61		
b3	13.74		21.25	98.15		
b4	13.71		26.45	99.89		
b5	13.70	12.75	26.47	100.15	99.51	0.66
b6	13.75		26.48	99.82		
b7	13.70		31.51	99.76		
b8	13.69	17.85	31.56	100.10		
b9	13.70		31.34	98.82		

2.4 样品含量测定

样品含量测定结果为:130101 批含量 27.48 mg/g, 130102 批含量 27.28 mg/g, 130103 批含量为 26.88 mg/g。

3 讨 论

以 PCL 为原材料、静电纺丝技术制备的纤维膜可达纳米级,所制备的膜材料有合适的机械性能和完整性^[19],将其与柚皮苷结合制备出控释柚皮苷纳米纤维膜,为骨质疏松状态下的颅颌面骨缺损修复提供新材料。故本实验需要建立的是测定包裹在静电纺丝技术制备的纳米纤维膜中的柚皮苷含量的高效液相色谱法,目前尚未见有关报道。

根据《中国药典》2010 版并结合文献^[20-24],柚皮苷的测定方法包括紫外分光光度法、高效液相色谱法等多种,但是高效液相色谱测定更为灵敏,测定方便,稳定可靠,准确度高;且柚皮苷极性中等,采用反相柱在甲醇或乙腈等的洗脱条件下能较好洗脱,保留时间较短,分离良好,易于高通量的测定。因此,本研究采用 RP-HPLC 来测定柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷的含量。

本文采用的 RP-HPLC 分析方法,既能实现样品处理、又能有效检测柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷含量,操作简单、效率高;而且,其可靠性通过了系统化的方法学验证。结果显示,所建立的测定柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷含量的 RP-HPLC 的专属性、线性范围、准确度、精密度、检出限和定量下限完全能够满足检测要求。此方法可用于柚皮苷纳米纤维膜中柚皮苷的含量测定。

参 考 文 献

- [1] 刘振丽,吕爱平,张秋海,等.骨碎补脂溶性成分的研究[J].中国中药杂志,1999,24(4):222-223.
- [2] 常德有,董福慧.骨碎补的研究概况[J].吉林中医药,2006,26(6):61-62.
- [3] Wang XL,Wang NL,Zhang Y,et al.Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *drynaria fortunei* (KUNZE) JSM.on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line [J].Chem Pharm Bull(Tokyo),2008,56(1):46-51.
- [4] Jeong JC, Lee JW, Yoon CH, et al. Stimulative effects of *drynariae rhizoma* extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells[J].J Ethnopharmacol,2005,96(3):489-495.
- [5] Wu JB, Fong YC, Tsai HY, et al. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts[J].Eur J Pharmacol,2008,588(2-3):333-341.
- [6] Hirata M. Naringin suppresses osteoclast formation and enhances bone mass in mice[J].J Health Sci,2009,55(3):463-467.
- [7] 韦敏,杨中林,李萍.柚皮苷及其磷脂复合物促进成骨细胞活性和小肠段吸收比较[J].中国天然药物,2007,5(5):366-369.
- [8] Erdoğan O, Shafer DM, Taxel P, et al. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation[J].Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,2007,104(6):e1-e13.
- [9] 薛英,刘强.膜引导性骨再生研究进展[J].国际骨科学杂志,2006,27(2):110-112.
- [10] Venugopal J, Low S, Choon AT, et al. Electrospun-modified nanofibrous scaffolds for the mineralization of osteoblast cells[J].J Biomed Mater Res A,2008,85(2):408-417.
- [11] 李蒙蒙,朱瑛,仰大勇,等.静电纺丝纳米纤维薄膜的应用进展[J].高分子通报,2010(9):42-51.
- [12] Jang JH, Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering[J].Adv Drug Deliv Rev,2009,61(12):1065-1083.
- [13] Sui G, Yang X, Mei F, et al. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration[J].J Biomed Mater Res A,2007,82(2):445-454.
- [14] Nie H, Soh BW, Fu YC, et al. Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery[J].Biotechnol Bioeng,2008,99(1):223-234.
- [15] Sahoo S, Ouyang H, Goh JC, et al. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering[J].Tissue Eng,2006,12(1):91-99.
- [16] Lee SJ, Yoo JJ, Lim GJ, et al. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application[J].J Biomed Mater Res A,2007,83(4):999-1008.
- [17] Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, et al. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend[J].Biomaterials,2007,28(19):3012-3025.
- [18] 纪艳,王璐,游涛,等.柚皮苷纳米纤维膜载药量影响成骨细胞的增殖和分化[J].中国组织工程研究,2013,17(25):4577-4584.
- [19] Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, et al. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering [J].Biomaterials,2003,24(12):2077-2082.
- [20] 李劲.高效液相色谱法测定骨刺宁胶囊中柚皮苷的含量[J].中国医药指南,2012,10(35):448-449.
- [21] 王希东,李文俊,王秀琴. HPLC 法测定壮心口服液柚皮苷和橙皮苷的含量[J].实用医药杂志,2013,30(1):54-55.
- [22] 陈香.反相高效液相色谱法测定橘红胶囊中柚皮苷含量[J].中国药业,2012,21(18):40-41.
- [23] 陈静,高彦祥,吴伟莉,等.高效液相色谱法测定柑橘汁中的柠檬苦素和柚皮苷[J].色谱,2006,24(2):157-160.
- [24] Ishii K, Furuta T, Kasuya Y. Determination of naringin and naringenin in human urine by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction[J].J Chromatogr B:Biomed Sci Appl,1997,704(1-2):299-305.

(责任编辑:冉明会)

《中华医学教育探索杂志》在线投稿
网址: yxjyts.alljournals.ac.cn