

· 研究报告 ·

用 HPLC 法测定红茴香注射液中槲皮苷的含量

成 程, 陈向梅, 马 健, 赵 胤 (中国人民解放军总医院医疗保障中心药剂科, 北京 100048)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定红茴香注射液中槲皮苷的含量。方法 色谱柱为 Dikma C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (25 : 75) 为流动相, 流速为 1.0 ml/min, 柱温 30 ℃, 检测波长为 256 nm。结果 槲皮苷在 0.215 ~ 3.225 μg 范围内呈良好线性关系, 相关系数为 0.999 6, 该法的平均回收率为 99.39%, RSD 为 0.82% ($n=6$), 重复性为 1.194 mg/ml, RSD 为 0.40%。结论 3 批红茴香注射液的槲皮苷平均含量结果为 1.191 mg/ml, 该法简便、快速、准确, 可作为测定红茴香注射液中槲皮苷含量的方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 红茴香注射液; 槲皮苷

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)05-0447-02

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202103041

Quantitative determination of quercetin in Honghuixiang injection by HPLC

CHENG Cheng, CHEN Xiangmei, MA Jian, ZHAO Chuan (Department of Pharmacy, Medical Security Centre, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To establish quantitative methods to assay quercetin in Honghuixiang injection by HPLC. **Methods** Dikma C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for the assay with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (25 : 75) as the mobile phase. Flow rate was 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was at 256 nm. **Results** Quercetin showed good linear relationship within the range of 0.2150-3.225 μg. The correlation coefficient was 0.999 6. The average recovery was 99.39% with RSD 0.82% ($n=6$). The repeatability was 1.194 mg/ml with RSD 0.40%. **Conclusion** The average quercetin content in three batches of Honghuixiang injection was 1.191 mg/ml. This method is simple, rapid and accurate. It can be used for the determination of quercetin in Honghuixiang injection.

[Key words] HPLC; Honghuixiang injection; quercetin

红茴香注射液是由红茴香根皮经提取制成的灭菌水溶液, 具有消肿散瘀, 活血止痛作用。临床用于腰肌劳损, 关节或肌肉韧带伤痛等。总黄酮是红茴香注射液的主要成分。原标准以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法测定总黄酮的量, 专属性不强。故笔者参考《中国药典》^[1], 以槲皮苷为测定对象, 采用 HPLC 法测定红茴香注射液中槲皮苷的含量^[2-5] 获得满意结果, 现报告如下。

1 仪器和试药

1.1 仪器

Agilent 1100 系列型高效液相色谱仪; HP-Chemstation 色谱工作站。

[作者简介] 成 程, 硕士, 药师, 研究方向: 药物临床试验, Email: cheng85530477@126.com

[通信作者] 赵 胤, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, Email: 13621328693@163.com

1.2 试药

乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。槲皮苷对照品由中国药品生物制品检定所提供 (批号: 111538-200301, 含量测定用), 红茴香注射液由浙江泰康药业有限公司提供 (批号: 20040730)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Dikma C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (25 : 75), 流速 1.0 ml/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 256 nm, 进样量为 10 μl。色谱柱的理论塔板数按槲皮苷峰计算大于 3 000。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取槲皮苷对照品 (120 ℃ 减压干燥至恒重) 适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 0.1 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液

精密吸取本品 3 ml, 置 25 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液

取辅料作为缺样空白样品, 按“2.2.2”项下方法

制备。

2.3 专属性试验

分别取阴性对照溶液, 对照品溶液及供试品溶液适量, 滤过取续滤液 10 μl 注入 HPLC 仪, 分别记录色谱图。实验结果表明, 该方法专属性良好, 阴性对照无干扰, 结果见图 1。

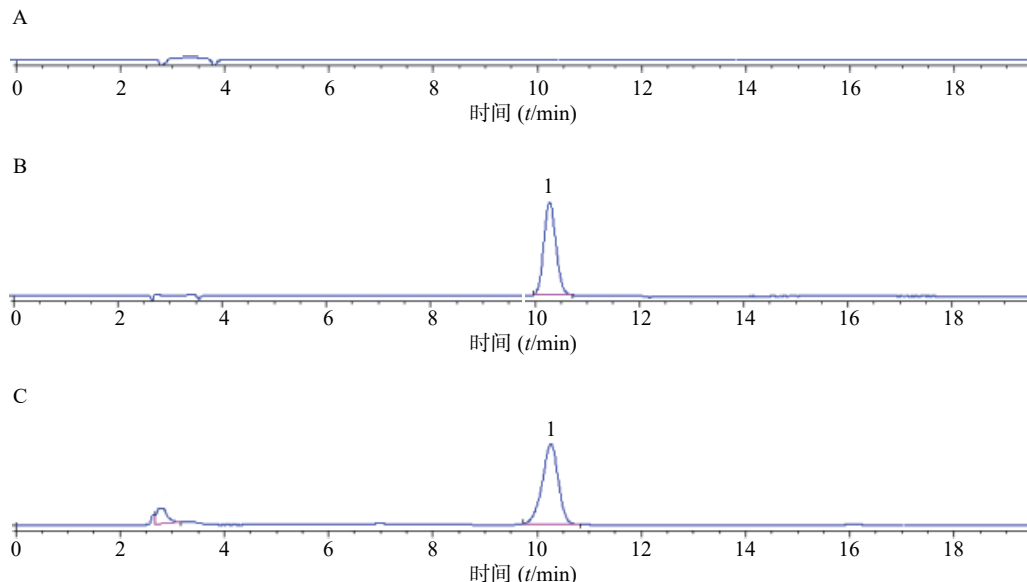


图 1 红茴香注射液 HPLC 图

A. 阴性对照溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 槲皮苷

2.4 线性关系考察

精密称取经减压干燥 24 h 的槲皮苷对照品适量, 加甲醇配成每 1 ml 含槲皮苷 0.215 0 mg 的对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件进行测定, 记录色谱图, 以槲皮苷峰面积的积分值为 Y , 进样量为 $X(\mu\text{g})$, 回归得线性方程 $Y=1\,515.9X+57.088\,2$, $r=0.999\,8$, 表明在 0.215 ~ 3.225 μg 范围内呈良好线性关系。

2.5 重复性试验

取同一批供试品 6 份 (批号: 20040730), 分别按供试品溶液制备法制备, 按“2.1”项色谱条件测定。结果表明含量值分别为: 1.187、1.189、1.197、1.196、1.196、1.198 mg/ml, RSD 为 0.40% ($n=6$), 表明此方法重复性较好。

2.6 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液 (批号: 20040730) 10 μl , 重复进样 6 次, 按“2.1”项下色谱条件测定。峰面积分别为 2 214.51、2 217.06、2 232.75、2 236.86、2 250.09、2 190.69, RSD 为 0.86% ($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一批号供试品溶液 (批号: 20040730)

10 μl , 分别于 0、0.5、1、2、8、12、24 h 测定峰面积值, 结果为 2 220.96、2 223.36、2 230.08、2 235.78、2 246.88、2 200.44、2 227.17, 平均峰面积为 2 226.38, RSD 为 0.64% ($n=6$), 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已测定含量的样品 6 份, 每份 3 ml, 分别加入槲皮苷对照品溶液 10 ml (浓度为 0.225 4 mg/ml), 按供试品溶液的制备方法操作, 进行回收率测定, 结果分别为 100.49%、99.33%、98.14%、99.82%、98.89%、99.65%, 平均加样回收率为 99.39%, RSD 为 0.82% ($n=6$)。

2.9 样品含量测定

分别取 3 批不同批号的红茴香注射液样品, 按“2.2”项下制备供试品溶液, 样品测定结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 (mg/ml)

批号	槲皮苷	平均含量
20040730	1.194	1.191
20040824	1.186	
20041222	1.192	

(下转第 453 页)

- 41(22): 165-171.
- [4] 李贞卓, 包海鹰. 血红铆钉菇化学成分和药理活性研究概述[J]. 菌物研究, 2015, 13(3): 181-186.
- [5] 王贺, 宋文刚, 任婷, 等. 血红铆钉菇多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2019, 20(1): 64-67.
- [6] 张海悦, 杨雪, 李震, 等. 血红铆钉菇黄酮体外抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 109-113.
- [7] MARTÍN M P, SIQUIER J L, SALOM J C, et al. Barcoding sequences clearly separate *Chroogomphus mediterraneus* (Gomphidiaceae, Boletales) from *C. rutilus*, and allied species[J]. *Mycoscience*, 2016, 57(6): 384-392.
- [8] LUO J, ZHOU W, CAO S, et al. Chemical constituents of *Chroogomphus rutilus* (schaeff.) o. k. mill[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 61: 203-207.
- [9] SONG S, YANG H, SU C P, et al. Ultrasonic-microwave assisted synthesis of stable reduced graphene oxide modified melamine foam with superhydrophobicity and high oil adsorption capacities[J]. *Chem Eng J*, 2016, 306: 504-511.
- [10] 李志锐, 韩淑琴. 超声-微波协同萃取玛卡多糖工艺研究[J]. 农产品加工, 2017(3): 22-23, 27.
- [11] GAO C J, WANG Z Y, SU T T, et al. Optimisation of exopolysaccharide production by *Gomphidius rutilus* and its antioxidant activities in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(3): 2299-2305.
- [12] 唐超, 王清吉, 葛蔚, 等. 血红铆钉菇多糖对小鼠S₁₈₀肉瘤的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2966-2967.
- [13] WANG C, ZHANG J, WANG F, et al. Extraction of crude polysaccharides from *Gomphidius rutilus* and their antioxidant activities in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 94(1): 479-486.
- [14] 李燕华, 李仲昆, 李丛元, 夏洪颖. 车前草粗多糖对人巨噬细胞免疫功能的调节作用及其机制研究[J/OL]. 中药材, 2020(11): 2795-2798.
- [15] 王晶, 史琪, 随晶晶, 等. 鳞柄小奥德蘑多糖对巨噬细胞免疫功能的调节作用[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(5): 845-850, 892.
- [16] 孙林浩, 程安怡, 黄小红, 等. 黄芪多糖对大黄鱼头肾巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1): 27-34.
- [17] 刘肖肖, 汪雯翰, 冯婷, 等. 金针菇子实体多糖FVPB1对小鼠T细胞和巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食用菌学报, 2019, 26(4): 123-130.
- [18] 季瑞雪, 鹿保鑫, 王新茹, 等. 野生亚侧耳多糖的提取和对巨噬细胞RAW264.7的免疫调节作用研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 271-276.
- [19] 木尼萨·迪力夏提. 阿里红多糖对RAW_{264.7}巨噬细胞免疫调节作用机制的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- [20] 热西代姆·阿卜力孜, 李敏, 胡君萍. 锁阳多糖对巨噬细胞RAW_{264.7}的免疫调节作用的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5694-5698.
- [21] 张丽娟, 王珍, 廖尚高. 太子参多糖对RAW 264.7巨噬细胞免疫调节作用的初步研究[J]. 中国野生植物资源, 2018, 37(4): 14-17.
- [22] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树果实多糖对巨噬细胞RAW_{264.7}的免疫调节作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 12-18, 309.
- [23] 热孜亚木·吾甫尔, 李月红, 海力茜·陶尔大洪. 恰麻古多糖对巨噬细胞RAW_{264.7}体外免疫调节作用初探[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 15-20.
- [收稿日期] 2021-02-01 [修回日期] 2021-08-22
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 448 页)

3 讨论

3.1 测定波长的选择

取对照品溶液依法操作, 在 200 ~ 400 nm 的波长范围内扫描, 结果在 256.6 nm 处有最大吸收, 因此选择 256 nm 作为测定波长 (图 2)。

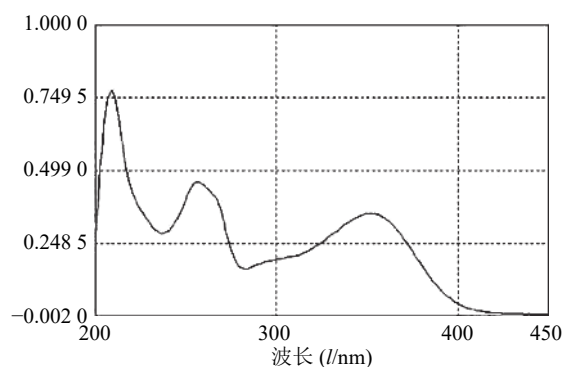


图 2 槲皮苷对照品紫外扫描图

3.2 溶剂的选择

槲皮苷易溶于甲醇、乙醇, 用甲醇作溶剂的峰形比用乙醇作溶剂的峰形好, 因此选择用甲醇作为溶剂。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 邱晓静, 苏文镜. HPLC法测定红茴香注射液中芦丁的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(3): 70-71.
- [3] 王姿媛, 胡惠兰. HPLC法测定哥王药材中的槲皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 127-129.
- [4] 常明泉, 潘涛. HPLC法测定氯定庆溶液中苯甲酸钠的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 60-62.
- [5] 董丹华, 刘玉军. HPLC法测定圣愈汤冻干粉中4个指标成分的含量[J]. 中国药房, 2020, 31(5): 576-580.

[收稿日期] 2021-03-19 [修回日期] 2021-06-30
[本文编辑] 李春德