

# HPLC法同时测定红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素A的含量<sup>Δ</sup>

黄燕萍\*(北海食品药品检验所,广西北海 536000)

中图分类号 R283.611;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4092-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.21

**摘要** 目的:建立同时测定红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素A含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-乙腈-0.7%磷酸溶液(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为0.8 ml/min,检测波长为260 nm(0~14 min)和403 nm(>14~35 min)。结果:腺苷和羟基红花黄色素A的质量浓度分别在1.194~71.640、2.070~82.800 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*均为0.999 9);精密度、重复性、稳定性试验的RSD<1%;平均加样回收率分别为101.18%和100.56%,RSD分别为1.33%和1.13%(*n*均为9)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于红花注射液的质量控制。

**关键词** 红花注射液;高效液相色谱法;腺苷;羟基红花黄色素A;含量测定

## Content Determination of Adenosine and Hydroxysafflor Yellow A in Honghua Injections by HPLC

HUANG Yan-ping(Beihai Institute for Food and Drug Control, Guangxi Beihai 536000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of adenosine and hydroxysafflor yellow A in Honghua injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm)with mobile phase composed of methanol-acetonitrile-0.7% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was set at 260 nm within 0-14 min and 403 nm within 14-35 min. RESULTS: The linear ranges of adenosine and hydroxysafflor yellow A were 1.194-71.640 μg/ml(*r*=0.999 9) and 2.070-82.800 μg/ml(*r*=0.999 9). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 1%. The average recoveries were 101.18% (RSD=1.33%, *n*=9) and 100.56% (RSD=1.13%, *n*=9). CONCLUSIONS: The methods is simple, accurate and repeatable, and it is suitable for the quality control of Honghua injections.

**KEY WORDS** Honghua injections; HPLC; Adenosine; Hydroxysafflor yellow A; Content determination

品提取溶剂进行比较,发现用70%乙醇作为提取溶剂所得的成分含量远远高于其他溶剂提取结果,且乙醇无毒、无污染,故选其作为提取溶剂。通过正交试验,最终选择用70%乙醇、80℃回流提取2 h。

### 3.2 检测波长的选择

由于同时测定不同波长的成分,通过全波长扫描发现326 nm波长下3种二咖啡酰奎尼酸类成分的响应值相对最大,因此选择326 nm作为检测波长。

## 4 结论

本试验研究了不同产地加工方法对野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分含量的影响,结果表明40℃烘干品种中3种二咖啡酰奎尼酸类成分的含量最低,晒干品种次之,炒炭品种成分含量总体相对较高。随着锅底温度的升高,3种二咖啡酰奎尼酸类成分的含量有增大趋势,蒸后烘干品种中3,4-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸含量明显高于其他炮制品。由此可见,野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分的含量除与温度有关外,还与烘晒时间长短有一定的关系。

本方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于野菊花中

二咖啡酰奎尼酸类成分的含量测定。本试验结果可为规范野菊花产地加工方法、控制其质量提供依据。

## 参考文献

- [1] 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,2010:295.
- [2] 王丹.药用植物野菊花的研究现状及发展前景[J].现代中药研究与实践,2007,21(4):59.
- [3] 涂兴明,刘淦华,刘承萍,等.不同来源野菊花的质量研究[J].中药新药与临床药理,2010,21(4):425.
- [4] 张沂,凌云,蔡清宇,等.浓缩型咽炎颗粒(无糖型)质量标准研究[J].中国药房,2009,20(6):438.
- [5] 符玲,潘成学,蒋莹,等.不同产地市售野菊花中绿原酸的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):68.
- [6] 郭巧生,房海灵,申海进.不同产地野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量[J].中国中药杂志,2010,35(9):1160.
- [7] 林丽美,王永炎,许招懂,等.反相高效液相色谱法同步测定野菊花中绿原酸、木犀草素-7-O-β-D葡萄糖苷和蒙花苷含量[J].中南药学,2009,7(8):574.
- [8] 赵昱,赵军,李湘萍,等.咖啡酰奎尼酸类化合物研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(11):869.

(收稿日期:2012-10-17 修回日期:2013-02-04)

Δ 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(No.桂科攻10124001A-66)

\* 副主任药师。研究方向:食品与药品检验。电话:0779-6803508。E-mail:huangyanping500@163.com

红花注射液是《中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第二十册)》记载的药品<sup>[1]</sup>,是由红花经提取而成的黄色至棕红色的灭菌水溶液。它具有活血化瘀之功效,临床上主要用于治疗闭塞性脑血管疾病、冠心病和脉管炎等症。红花的主要活性成分羟基红花黄色素A具有抗心肌缺血、抑制血小板聚集、抗氧化的作用;腺苷是生物碱类成分,具有扩张冠状血管、防止心律失常、降血压、抗凝血和减弱心肌收缩力的作用。原标准中只有该制剂的定性鉴别试验,无含量测定项。有文献<sup>[2-4]</sup>测定了红花注射液中腺苷、羟基红花黄色素A、槲皮素、金橙Ⅱ等的含量,但尚未见同时测定红花注射液中腺苷、羟基红花黄色素A两种成分的文献报道。因此,笔者参考有关文献<sup>[2-12]</sup>,建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定红花注射液中腺苷、羟基红花黄色素A含量的方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200系列HPLC仪,含1200 LC型色谱工作站、G1322A(DEGASSER)型溶剂脱气机、G1311A(Quat Pump)型四元泵、G1329A(ALS)型自动进样器、G1314B VWD型紫外检测器(美国Agilent公司);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司);HT-230A型柱温箱(天津市恒奥科技发展有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

红花注射液(A厂,批号:110805,111201;B厂,批号:11070601、12040201);腺苷、羟基红花黄色素A对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110879-200202、111637-200905);流动相用甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-乙腈(B)-0.7%磷酸溶液(C),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.8 ml/min;检测波长:260 nm(0~14 min)、403 nm(>14~35 min);柱温:30℃;进样量:10 μl。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution of mobile phase

t, min	A, %	B, %	C, %
0	6.0	0.4	93.6
14	6.0	0.4	93.6
>14	30.0	2.0	68.0
35	30.0	2.0	68.0
>35	6.0	0.4	93.6

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取腺苷和羟基红花黄色素A对照品各适量,分别加25%甲醇溶解并稀释制成腺苷和羟基红花黄色素A的质量浓度分别为0.995 0、1.035 0 mg/ml的单一成分对照品贮备液。精密量取两种对照品贮备液各适量,用25%甲醇稀释制成混合对照品溶液(腺苷质量浓度为0.398 0 mg/ml、羟基红花黄色素A质量浓度为0.414 0 mg/ml),即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密量取本品1 ml,置于10 ml量瓶中,加25%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 线性关系考察

取“2.2”项下混合对照品溶液适量,加25%甲醇按倍比稀释法制成系列质量浓度的溶液。按上述色谱条件各进样10 μl测定,记录峰面积。以对照品质量浓度(c)为横坐标,峰面积积分值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得腺苷、羟基红花黄色素A的回归方程分别为 $A=34.271c+0.704(r=0.999\ 9)$ 、 $A=32.861c+19.055(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,腺苷和羟基红花黄色素A的质量浓度分别在1.194~71.640、2.070~82.800 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

### 2.5 系统适用性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按上述色谱条件注入HPLC仪,记录色谱图(见图1)。结果发现,在该色谱条件下,腺苷和羟基红花黄色素A与相邻组分峰的分离度均>1.5,理论板数按腺苷峰计算应不低于2 500。

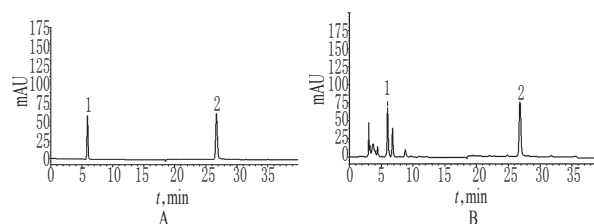


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1.腺苷;2.羟基红花黄色素A

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B. test samples; 1. adenosine; 2. hydroxysafflor yellow A

### 2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液10 μl,按上述色谱条件进样测定,重复6次,记录峰面积。结果显示,腺苷和羟基红花黄色素A的RSD分别为0.08%、0.07%(n均为6),表明仪器精密度良好。

### 2.7 重复性试验

精密量取同一批样品(批号:110805)1 ml,共6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定10 μl,记录峰面积。结果显示,腺苷和羟基红花黄色素A的RSD分别为0.25%、0.20%(n均为6),表明本方法重复性良好。

### 2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:110805)适量,分别于0、1、2、4、6、8、10、12 h时按上述色谱条件进样10 μl测定,记录峰面积。结果显示,腺苷和羟基红花黄色素A的RSD分别为0.51%、0.63%(n均为8),表明供试品溶液在12 h内稳定。

### 2.9 加样回收率试验

精密量取已测定腺苷和羟基红花黄色素A含量的红花注射液(批号:110805)9份,各0.5 ml,每3份为一组,分别按低、中、高质量浓度精密加入腺苷和羟基红花黄色素A对照品贮

备液各适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按拟定方法进样测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests (n=9)

成分	取样量,ml	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
腺苷	0.50	0.103 5	0.099 5	0.202 0	99.03	101.18	1.33
	0.50	0.103 5	0.099 5	0.204 8	101.85		
	0.50	0.103 5	0.099 5	0.203 4	100.36		
	0.50	0.103 5	0.199 0	0.302 2	99.87		
	0.50	0.103 5	0.199 0	0.305 5	101.51		
	0.50	0.103 5	0.199 0	0.304 1	100.82		
	0.50	0.103 5	0.298 5	0.412 0	103.36		
	0.50	0.103 5	0.298 5	0.405 6	101.21		
	0.50	0.103 5	0.298 5	0.409 9	102.63		
	0.50	0.103 5	0.298 5	0.406 5	99.52		
羟基红花黄色素A	0.50	0.249 0	0.258 8	0.510 2	100.95	100.56	1.13
	0.50	0.249 0	0.258 8	0.512 3	101.74		
	0.50	0.249 0	0.517 5	0.770 3	100.73		
	0.50	0.249 0	0.517 5	0.763 6	99.45		
	0.50	0.249 0	0.517 5	0.779 3	102.47		
	0.50	0.249 0	0.776 3	1.025 3	100.00		
	0.50	0.249 0	0.776 3	1.018 3	99.09		
	0.50	0.249 0	0.776 3	1.034 0	101.13		

## 2.10 样品含量测定

取不同批号的红花注射液各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样分析,以外标一点法计算样品中腺苷和羟基红花黄色素A的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/ml, n=3)

Tab 3 Content determination of samples (mg/ml, n=3)

批号	腺苷	羟基红花黄色素A
110805	0.207	0.498
111201	0.201	0.144
11070601	0.055	0.069
12040201	0.208	0.138

## 3 讨论

### 3.1 流动相的选择

笔者曾尝试用单一流动相进行洗脱,并比较了甲醇-水(15:85, V/V)<sup>[6-8]</sup>、磷酸盐缓冲液(pH6.5)-甲醇(85:15, V/V)<sup>[9]</sup>、乙腈-0.2%磷酸溶液-四氢呋喃(28:70:2, V/V/V)<sup>[10]</sup>、乙腈-0.5%磷酸溶液(11:89, V/V)<sup>[11]</sup>等不同流动相的试验结果,发现分离效果均不理想或只能测定单一成分。后选择文中所用流动相,待测的两种成分分离较好且峰形较佳。

### 3.2 最大吸收波长的选择

分别精密称取腺苷、羟基红花黄色素A对照品各适量,加适量25%甲醇溶解并稀释制成对照品溶液,在190~600 nm波长范围内进行紫外-可见分光光度法扫描,发现腺苷在203、

260 nm波长处有最大吸收,羟基红花黄色素A在223、403 nm波长处有最大吸收,当选择单一波长测定时,则必有其中一种成分响应值很小,故选用文中所用的双波长为测定波长,同时测定两种成分,所得结果较佳。

## 4 结论

由表3可以看出,不同厂家不同批号的红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素A的质量浓度相差很大,提示不同生产工艺制备出的红花注射液内在质量差异较大。现有红花注射液的质量控制方法比较简单,不能有效地控制其质量,而本试验所建立的方法简便、准确、可靠、重复性好,可用于红花注射液的质量控制。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂: 第二十册[S]. 1998: 108.
- [2] 张作军. HPLC法测定红花注射液中腺苷的含量[J]. 中国医药指南, 2011, 9(33): 21.
- [3] 徐风云, 刘玉根. RP-HPLC法测定红花注射液中槲皮素的含量[J]. 医学信息: 中旬刊, 2011, 24(9): 5 017.
- [4] 梁选革, 张若燕, 刘莉丽. HPLC法测定红花注射液中色素金橙Ⅱ[J]. 中国药事, 2012, 26(2): 137.
- [5] 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: 141.
- [6] 毛艳, 杨伟俊, 玛依拉·买买提依明, 等. RP-HPLC法测定维感泡腾片中腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 25.
- [7] 周成惠, 李春雪, 张镛小, 等. HPLC测定不同产地掌叶半夏中腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 77.
- [8] 令红艳. 不同板蓝根制剂腺苷含量测定及其抗炎作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 143.
- [9] 李军, 岳易恒, 张丽萍, 等. HPLC法测定不同产地山药中腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 55.
- [10] 王亚洲, 杨春旭. HPLC同时测定蝎龙接骨散中羟基红花黄色素A和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 109.
- [11] 谭生建, 贺业谦, 王杰松, 等. HPLC法测定五味清浊散中羟基红花黄色素A的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 205.
- [12] 李雪莹, 武永刚. 红花药材黄色素类成分的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2011, 22(39): 3 707.

(收稿日期: 2012-12-15 修回日期: 2013-05-02)