

【 评价方法学 】

氢核磁共振定量法测定槲皮素原料药中的槲皮素

孙文霞, 钟家亮, 侯佳威, 王广东, 郝海军*

中国医药工业研究总院上海医药工业研究院 分析测试中心, 上海 201203

摘要: 目的 建立核磁共振氢谱法测定槲皮素原料药的绝对含量。方法 以 DMSO-d₆ 为溶剂, 马来酸为内标, 采集槲皮素和马来酸混合物的核磁共振氢谱。以槲皮素中化学位移在 $\delta 7.50 \sim 7.58$ 和马来酸化学位移在 $\delta 6.26$ 的质子信号峰为定量峰, 测定槲皮素的量, 并与质量平衡法比较。结果 槲皮素与马来酸峰的面积比 (A_s/A_r) 与其质量比 (m_s/m_r) 的线性回归方程为 $y = 2.963x + 0.1341$ ($r = 0.9993$)。测得 3 批槲皮素的质量分数分别为 85.20%、84.93% 和 85.27%, 平均质量分数为 85.13%, RSD 为 0.21%。测定结果与质量平衡法定值基本一致。结论 所建立的氢核磁共振定量法准确、快速, 为质量平衡法提供有力佐证。

关键词: 槲皮素; 核磁共振波谱法; 定量分析

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)01-0059-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.01.010

Quantitative determination of the absolute content of quercetin by proton nuclear magnetic resonance

SUN Wen-xia, ZHONG Jia-liang, HOU Jia-wei, WANG Guang-dong, HAO Hai-jun

Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Instrumental Analysis & Research Center, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To establish a novel method to determine the absolute content of quercetin by proton nuclear magnetic resonance (qNMR). **Methods** DMSO-d₆ was employed as solvent, and maleic acid as an internal standard. Proton signal peaks at $\delta 7.50 \sim 7.58$ and $\delta 6.26$ of maleic acid were served as quantification peaks. The content of quercetin is determined with qNMR in comparison with the results obtained by mass balance method. **Results** Linear regression of quantitative peak areas ratio (A_s/A_r) of quercetin-maleic acid vs mass ratio (m_s/m_r) yielded a correlation coefficient of 0.9993 and a regression equation of $y = 2.963x + 0.1341$. The contents of three batches quercetin were 85.20%, 84.93%, and 85.27%, the average was 85.13% and its RSD was 0.21%. The results were generally consistent with that of mass balance methods. **Conclusion** This method was easy and simple to handle, and the analysis results were accurate. It could be the complementary for the mass balance method.

Key words: quercetin; NMR; quantitative analysis

槲皮素 (quercetin) 是一种黄酮类化合物, 具有扩张血管、保护内皮功能、抑制心肌肥厚、祛痰、镇咳、抗癌等药理作用^[1]。结构式见图 1。由于无明显的毒副作用, 成为近年来研究的热点^[2-3]。目前, 槲皮素含量测定主要采用高效液相色谱法^[3], 尚未见核磁定量法 (qNMR) 测定其含量的报道。

核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 技术最初主要用于化合物的结构确定, 随着高强度

磁场和傅里叶变换技术的应用, 使得仪器的各项性能得到显著性的改善, 从而为该技术应用用于定量分

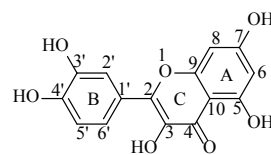


图 1 槲皮素结构式

Fig. 1 The structure of quercetin

收稿日期: 2016-07-13

作者简介: 孙文霞 (1989—), 女, 硕士生, 从事药物多晶型及仪器分析研究。E-mail: 13524668815@163.com

*通信作者: 郝海军 (1981—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事新型给药系统及仪器分析研究。E-mail: haohj2007@126.com

析奠定了基础^[4-6]。qNMR法测定含量的基础是质子吸收峰面积与所包含的质子成正比,通常以已知含量的内标为参比,就可测得化合物的绝对含量。该法测定样品含量时不需对照品,无需引入校正因子,不受样品中水分、残留溶剂等干扰,且定性检定和定量分析同步完成,与HPLC法相比具有较大的优势^[5]。《中国药典》2010年版二部附录IX首次收录了qNMR法,其在含量测定方面的应用逐渐得到重视。本研究采用内标法对槲皮素含量测定方法进行系统的方法学验证,并与质量平衡法进行比较,为槲皮素原料药质量控制提供新方法。

1 仪器与试剂

Bruker-400型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦公司); 915KFTi-touch 卡氏水分仪(瑞士万通); 分析天平(德国sartorius公司); 氘代DMSO(DMSO-d₆, Sigma公司); 槲皮素原料药(批号 20131206, 南京景竹生物科技有限公司); 马来酸对照品(批号 190015-201302, 中国食品药品检定研究院); 槲皮素对照品(批号 100081-201209, 中国食品药品检定研究院)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的配制

精密称取马来酸 56.78 mg 溶于 25 mL DMSO-d₆ 中,作为内标溶液。另精密称取槲皮素原料药 4.19 mg,溶于 1.0 mL 内标溶液,转移 0.5 mL 至核磁管中待测。

2.2 实验条件

采用 zg30 脉冲序列在恒温(295 K)下获取¹H-NMR。实验参数设置为:谱宽(SWH) 8012 Hz,中心频率(O1) 2 757 Hz,采样时间(AQ) 4.0 s,弛豫延迟时间(D1) 15 s,脉冲宽度(P1) 9.54 μs,采样次数(NS) 64 次。

2.3 ¹H-NMR 内标法测定槲皮素方法的建立

2.3.1 氘代溶剂的选择及槲皮素¹H-NMR谱图的归属 合适的氘代溶剂对内标及槲皮素溶解性较好,且内标谱峰不与样品峰谱峰发生重叠。氘代CDCl₃易挥发,测试过程中可能会导致样品浓度发生变化,因而选用DMSO-d₆作为溶剂。DMSO-d₆空白实验的¹H-NMR谱图,溶剂峰归属为δ2.50 (quintet, DMSO-d₆峰),δ3.32 (s, H₂O)。槲皮素¹H-NMR谱图及峰归属分别见图2、表1。与文献报道基本一致^[6]。

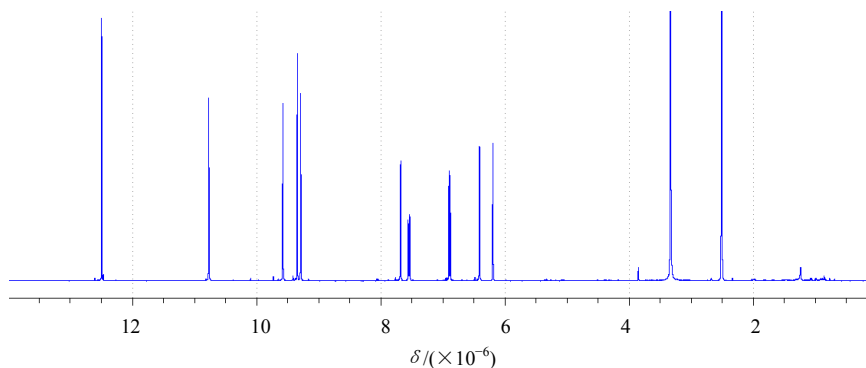


图2 槲皮素的¹H-NMR谱图

Fig. 2 Determination of quercetin with ¹H-NMR spectral

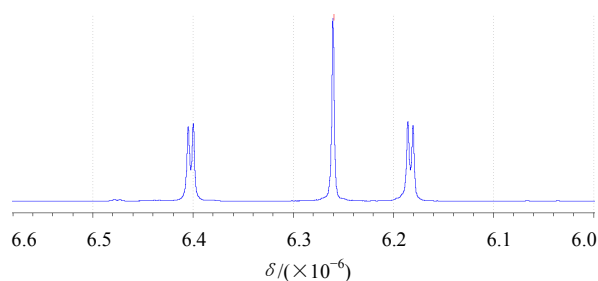
表1 槲皮素¹H-NMR谱解析

Table 1 ¹H-NMR spectral data for quercetin.

δ	氢个数	多重性	峰归属
6.17~6.19	1	d	6-H
6.39~6.41	1	d	8-H
6.82~6.90	1	d	5'-H
7.50~7.58	1	dd	6'-H
7.60~7.70	1	d	2'-H
9.28	1	s	3'-OH
9.33	1	s	4'-OH
9.56	1	s	3-OH
10.76	1	s	7-OH
12.48	1	s	5-OH

2.3.2 内标和定量峰的选择 本实验选用DMSO-d₆作为溶剂,马来酸作为内标,与槲皮素混合物¹H-NMR谱图见图3(图谱中仅显示δ6.0~6.6)。由图谱可知,马来酸溶剂峰归属为δ6.26 (s, DMSO-d₆),与槲皮素附近的谱峰分离度较好,并选取槲皮素δ7.50~7.58 (dd, 6'-H)处作为槲皮素的定量峰。

2.3.3 线性关系考察 精密称取槲皮素 0.64、1.93、3.08、4.83、6.19 mg 分别加入 1 mL 马来酸对照液,混匀后置于 5 mm 核磁管中。以槲皮素与马来酸定

图3 马来酸与槲皮素的¹H-NMR谱图Fig. 3 Determination of maleic acid and quercetin with ¹H-NMR spectral

量峰面积比 (A_s/A_r) 对槲皮素与马来酸质量比 (m_s/m_r) 作线性回归, 得出回归方程为 $y=2.963x+0.1341$ ($r=0.9993$)。结果表明, 以马来酸作为内标, 用 qNMR 内标法测定样品中槲皮素含量, 在 0.64~6.19 mg/mL 线性关系良好。

表2 加样回收率实验 ($n=6$)Table 2 Experiment of average recovery rate ($n=6$)

样品含量/mg	标准品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.48	2.54	4.05	101.57	99.54	1.57
1.31	2.54	3.82	98.82		
3.12	2.54	5.60	97.64		
2.96	2.54	5.53	101.18		
4.24	2.54	6.74	98.42		
4.04	2.54	6.57	99.61		

2.3.8 方法耐用性 取供试品, 分别在耐用条件为温度 (295 ± 5) K, 弛豫时间 (15 ± 1) s, 脉冲宽度 (9.54 ± 0.5) μ s, 扫描次数 (64 ± 5) 次进行耐用性实验。在上述耐用条件下, 计算得到的 RSD 值最大为 0.72%。因此采用的测试条件耐用性良好, 满足分析要求。

2.3.9 定量结果 平行配制 3 份样品, 按照如下公式计算槲皮素的量, 经计算 3 份槲皮素质量分数分别为 85.20%、84.93%和 85.27%, 平均质量分数为 85.13%, RSD 为 0.21%。

$$\text{槲皮素}\% = [(A_s/n_s) \times M_s \times m_r] / [(A_r/n_r) \times M_r \times m_s] \times W_r$$

其中, A_s 为槲皮素定量峰的积分面积; n_s 为槲皮素定量峰代表的氢个数; M_s 为槲皮素相对分子质量; A_r 为马来酸定量峰的积分面积; n_r 为马来酸定量峰代表的氢个数; M_r 为马来酸相对分子质量; m_r 为马来酸质量; W_r 为马来酸质量分数; m_s 为槲皮素质量。

2.4 质量平衡法测定结果

HPLC 面积归一化法结果为 99.36%, 卡氏水分

2.3.4 仪器精密度 取供试品溶液, 按“2.2”项下条件连续测定 5 次, 获取 ¹H-NMR, 调整相位并积分。计算定量峰与内标峰面积的比值。结果显示, 其 RSD=0.84%。

2.3.5 重复性 取供试品溶液, 按照“2.2”项下条件进行测定, 获取 ¹H-NMR, 调整相位并积分。计算定量峰与内标峰面积的比值, 结果 RSD=1.39%。

2.3.6 样品稳定性 取供试品溶液分别于 0、2、4、8、12 h 按照“2.2”项下条件进行测定, 获取 ¹H-NMR、积分。计算定量峰与内标峰面积的比值。计算 RSD 为 1.56%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.7 加样回收率试验 取 6 份已测定含量的槲皮素样品, 分别加入槲皮素对照品, 并加入内标溶液配制样品溶液, 按照“2.2”项下的测定条件获取 ¹H-NMR, 计算回收率。结果见表 2。

测定结果为 13.94%, 炽灼残渣为 0.11%, 残留溶剂为 0.0009%。质量平衡法计算结果为: $(100\% - \text{水分}\% - \text{炽灼残渣}\% - \text{残留溶剂}\%) \times \text{HPLC 面积归一化法测定结果}\% = 85.39\%$ 。可见, qNMR 测定结果基本与质量平衡法结果一致。

3 讨论

D1 要足够长, 以使原子核完全弛豫, 从而使被积分的信号强度与原子核数目成正比。本实验分别考察了 D1 为 1、5、10、15、20、30 s 时对槲皮素定量峰的影响。结果表明, 当 $D1 > 15$ s 时, A_s/A_r 的比值趋于稳定, 因此选择 D1 为 15 s。考察了扫描次数 (NS) 对定量峰积分面积的影响。在 D1 设置为 15 s 前提下, 分别对 NS 为 16、32、64、96、128 进行了考察。结果表明, 当 $NS > 64$ 时, A_s/A_r 的比值趋于稳定。因此 NS 设定为 64。O1 的位置对定量分析的结果也会产生一定的影响, 为使定量峰和内标峰在近似的射频场内测定, 从而保证积分结果的准确性, O1 应位于内标峰和样品定量峰的中

间处,因此,O1 设定为 2 757 Hz,对应的 O1P 值为 6.89。

槲皮素原料药中可能存在分子结构相近的山柰酚、异鼠李素等有关物质, δ 6.0~7.0 的质子峰会有有关物质质子峰干扰。因此最终选取了槲皮素 δ 7.50~7.58 (dd, 6'-H) 处作为定量峰。定量峰一般首先考虑峰型简单的质子峰^[7],当峰型简单的质子不适合作为定量峰时,也可选择多重峰^[8]。但对定量峰积分时应将该峰放大,仔细调整相位,选取峰型轮廓线与基线重合处为其起、止点,多次积分后取其平均值。

质量平衡法测定结果与 qNMR 测定结果基本一致。但采用 qNMR 技术测定槲皮素含量,无需对照品,测试过程简单,快速准确,且结果可靠。为槲皮素原料药、相关制剂及标准品的质量控制提供有价值的参考。

参考文献

[1] 孙 涓,余世春. 槲皮素的研究进展 [J]. 现代中药研

究与实践, 2011, 25(3): 85-88.

- [2] Hao H J, Jia Y Z, Zhang H Q, et al. Preparation of monolithic osmotic tablet of quercetin loaded by solid dispersion [J]. J Chin Pharm Sci, 2015, 24(6): 383-392.
- [3] 邓向涛,郝海军,贾幼智,等. 槲皮素固体分散体亲水性骨架缓释片的研制及体外释放 [J]. 中药材, 2015, 38(11): 2408-2410.
- [4] Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications [J]. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 2010, 57(2): 229-240.
- [5] 刘 阳,周 颖,张才煜,等. 核磁共振定量法测定脒基吡唑含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1087-1089.
- [6] 刘 阳,张才煜,程奇蕾,等. 核磁共振法测定 13-顺阿维 A [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 251-254.
- [7] 翟广玉,朱 玮,渠文涛,等. 槲皮素的光谱分析 [J]. 光谱实验室, 2012, 29(4): 2443-2449.
- [8] 易进海,刘云华,陈 燕,等. 核磁共振波谱法测定藜本内酯对照品的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 680-682.