

HPLC 法测定健肾丸中腺苷的含量

崔恩忠 唐安福 贡磊 汤昊 王曙东

(南京军区南京总医院,南京,210002)

摘要 目的:建立健肾丸中腺苷含量的测定方法,为提高该制剂的质量标准提供研究依据。方法:采用高效液相色谱法,流动相:乙腈-水(6:94);色谱柱:Agilent TC-C₁₈(2)柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流速为1.0 mL/min,检测波长为260 nm,柱温为25℃;进样量:10 μL。结果:腺苷在1.25~20.00 μg/mL范围内线性关系良好,平均回收率为101.04%,相对标准偏差(RSD)为1.93%。结论:该方法简便、可靠、重现性好,可用于健肾丸的质量控制。

关键词 健肾丸;腺苷;高效液相色谱法

HPLC Determination of Adenosine in Jianshen Pill

Cui Enzhong, Tang Anfu, Gong Lei, Tang Hao, Wang Shudong

(Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

Abstract Objective: To provide scientific proof for promoting quality standard of Jianshen Pill by determining the level of adenosine in it. **Methods:** HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method was used with Agilent TC-C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and a mobile phase of Acetonitrile-Water (6:94). Flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 25℃. The detection wavelength was 260nm and sample loop volume 10 μL. **Results:** The calibration curve linear within the range of 1.25~20.00 μg/mL of acetonitrile, and the average recovery was 101.04% (RSD = 1.93%). **Conclusion:** The method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the quality control of Jianshen Pill.

Key Words Jianshen Pill; Acetonitrile; HPLC

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.042

健肾丸为南京军区总医院全军肾脏病研究所研制的中药复方制剂,处方由发酵虫草菌粉、黄芪、防风等组成,有补肺益肾,固表止汗之功,用于防治各种慢性肾小球肾炎、肾病综合征,病程日久至肺卫不固、肾气亏虚易于感冒者。该临床使用数十年,有确切疗效。目前该制剂的质量标准仅采用TLC法对黄芪、防风和发酵冬虫夏草菌粉3味药进行薄层色谱鉴别,无定量检测指标,无法全面有效的控制其质量^[1]。为进一步提升其质量标准,本文建立了健肾丸中腺苷HPLC含量测定方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 高效液相色谱仪Waters 1525,2487紫外检测器;FA1104-电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ-500DE型超声机(昆山市超声仪器有限公司生产)。腺苷对照品(110879-200202)购自中国药品生物制品检定所;处方药材均购自南京医药有限公司;健肾丸为南京总医院制剂科生产,批号为140524、140609、140623、140706、140731。甲醇和乙腈:色谱纯(美国默克);水:自制纯化水;其

他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件与系统适应性试验 高效液相色谱仪Waters 1525(双泵),2487紫外检测器;色谱柱:Agilent TC-C₁₈(2)柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A:B=6:94(A:乙腈,B:水);检测波长为260 nm;柱温为25℃;流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL。

1.2.2 溶液的制备 对照品储备液的制备:精密称取腺苷对照品0.5 mg,置25 mL量瓶中,加50%乙醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。供试品溶液的制备:取本品粉末约0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇50 mL,称定重量,超声提取0.5 h,冷却至室温,再称定重量,用50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液。阴性对照溶液的制备:按处方比例及生产工艺制备缺发酵冬虫夏草菌粉、黄芪和防风的阴性样品,按“2.1.2项”下方法制备。

1.2.3 线性关系考察 分别精密腺苷储备液

基金项目:全军医疗机构制剂质量标准提升专项课题重点项目(编号:13ZJZ13)——“肾病系列非标准制剂质量标准提升的研究”

作者简介:崔恩忠(1981.09—),男,学士,药师,研究方向:中药制剂工艺研究,E-mail:cez_life@163.com

通信作者:汤昊(1980.05—),男,硕士,主管药师,研究方向:中药制剂新技术研究,E-mail:tang_hao0518@sina.com

0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 按“2.1.1”项下方法进行测定, 以对照品浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 进行线性回归, 计算回归方程。

1.2.4 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下的腺苷对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次, 以峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.5 稳定性试验 取同一批号的样品, 按“2.1.1”项下样品溶液测定方法进行测定, 在常温下分别于0、1、2、4、8 h 进样, 记录腺苷峰面积, 以峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.6 重复性试验 取同一批号下的样品5份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进行测定, 以测定结果计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.7 加样回收率试验 精密称取腺苷对照品1.4 mg, 置50 mL 容量瓶中, 加75% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。精密称取已知含量的样品0.1 g(腺苷含量为1.4 mg/g), 共9份, 分别置于250 mL 锥形瓶中, 分别精密加入腺苷对照品3 mL, 5 mL 和7 mL, 按“2.1.2”项下样品制备方法即得。精密吸取上述供试液各10 μL 注入色谱仪, 测定含量, 计算回收率。

2 结果

2.1 方法专属性试验 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的保留时间处, 有同一色谱峰, 而阴性对照溶液在相应保留时间处则无峰出现, 表明其对样品测定无干扰。结果见图1。

2.2 腺苷线性关系试验 按1.2.3项下方法进行测定, 以对照品浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 进行线性回归, 得到回归方程: $Y = 30561X + 4205$, $r = 0.9995$ ($n = 5$)。结果显示, 腺苷的浓度在1.25 ~ 20 μg/mL 之间, 与峰面积呈良好的线性关系。见表1、图2。

表1 腺苷线性关系考察结果

浓度(μg/mL)	峰面积(A)
1.25	40899
2.5	80336
5	155945
10	314724
20	613373

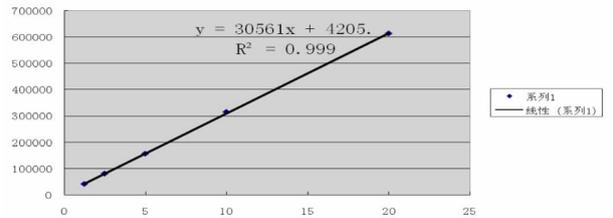


图2 腺苷的标准曲线

2.3 精密度试验 以1.2.4项下方法进行测定, 计算腺苷峰面积的RSD为0.31%。结果显示该方法的精密度良好。

2.4 稳定性试验 以1.2.5项下方法进行测定, 计算腺苷峰面积的RSD为0.88%。表明样品溶液在8 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验 以1.2.6项下方法进行测定, 结果样品中腺苷含量RSD为2.20%。说明该方法重复性良好。

表2 腺苷加样回收率试验结果

取样量 /mg	样品含量 /mg	对照品加入量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.1013	0.2249	0.084	98.86	101.04	1.93
0.1008	0.2237	0.084	98.32		
0.1010	0.2282	0.084	103.35		
0.1008	0.2818	0.140	100.48		
0.1011	0.2801	0.140	99.00		
0.1016	0.2862	0.140	102.86		
0.1017	0.3408	0.196	101.23		
0.1021	0.3446	0.196	102.88		
0.1024	0.3439	0.196	102.33		

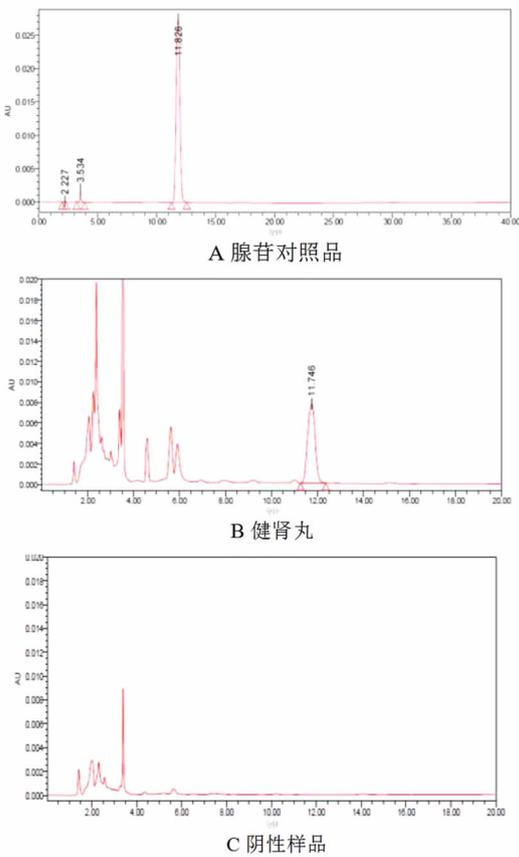


图1 健肾丸 HPLC 图谱

2.6 加样回收率试验 以 1.2.7 项下方法进行测定,计算平均回收率为 101.04%, $RSD = 1.93\%$ 。见表 2。

2.7 样品测定 取 5 批健肾丸(批号为 140524、140609、140623、140706、140731),按 1.2.2 项下制备供试品溶液,按上述色谱条件测定样品,以外标法计算样品中腺苷的含量。见表 3。

表 3 腺苷含量测定结果

序号	样品批号	腺苷(mg/g)
1	140524	0.998
2	140609	0.602
3	140623	0.666
4	140706	0.650
5	140720	0.703

3 讨论

3.1 最大吸收波长的选择 参照《中国药典》2015 版一部百令胶囊中腺苷的含量测定方法^[2],选择最大吸收波长为 260 nm。

3.2 流动相的选择 参照《中国药典》2015 版一部百令胶囊和金水宝胶囊中腺苷的含量测定方法及其他相关文献^[2-9],进行了选择试用,结果发现当流动相(乙腈-水)比例为 6:94 时,腺苷出峰时间及分离度等条件都较好,故选其为最佳流动相。

3.3 腺苷提取条件的选择 通过参考相关文献^[2-10],实验对腺苷提取时间(20 min、30 min、40 min)及溶剂用量(50 倍、100 倍、150 倍)分别进行了考察,结果发现提取时间在 30 min 时腺苷含量最高,提取溶剂用量在 100 倍和 150 倍时,腺苷提取率无明显差别,但均高于 50 倍用量,故最终确定腺苷提取条件选择加入 100 倍溶剂超声处理 30 min,结果显示腺苷提取效果较好。

3.4 指标成分的选择 冬虫夏草作为传统名贵中药,具有调节免疫、抑制肿瘤、降血压血脂、平喘祛痰、治疗高血糖症、肝脏疾病及改善肾功能等作用^[11-12],由于药材资源紧张,现大多采用人工发酵培养冬虫夏草菌丝体,以满足药材市场。本实验研究的健肾丸由发酵冬虫夏草菌粉、黄芪、防风、白术和甘草共 5 味中药组成,处方分析后认为发酵冬虫夏草菌粉为方中君药,其主要含核苷类如腺苷等^[4-5]成

分,可能为补益中药的共有物质基础^[13],现代药理学研究表明^[11-12]核苷酸及核苷能促进肠道的正常发育、成熟和修复,对维持机体正常免疫功能和肝脏正常功能有重要意义。经查阅文献^[14]并通过实验研究,发现方中臣药黄芪和防风亦含有腺苷,故增加了健肾丸中总腺苷指标成分的含量测定。其他指标成分后期继续进行考察,以不断提高制剂质量标准。

本实验利用高效液相色谱法测定健肾丸中腺苷的含量,所测结果重复性、精密度较好,适用于本品的质量控制,同时进一步提高了该制剂的质量标准。

参考文献

- [1]王曙东,盛华,崔恩忠,等.清肾丸定性定量研究[J].中中药学,2014,12(7):674-677.
- [2]国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015 年版(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:832.
- [3]国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015 年版(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:1073.
- [4]陈志远,贡涛,丁康,等.UPLC-MS/MS 同时测定蛹虫草中 6 种成分的含量[J].中国实验方剂学,2015,21(21):43-46.
- [5]梅雪艳,李媛媛,沈于兰.冬虫夏草、虫草菌丝体及蛹虫草中核苷类成分的测定[J].药学与临床研究,2015,23(1):27-29.
- [6]席桂同.高效液相色谱法测定灵芝提取物中尿苷和腺苷含量[J].世界中医药,2014,9(7):934-936,940.
- [7]吴春敏,叶榕平.HPLC 法测定冬虫夏草中腺苷含量[J].中草药,1999,30(9):658.
- [8]范志华,汤卫华,林霖.HPLC 法测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量[J].现代食品科技,2007,23(7):94-97.
- [9]刘少静,刘银,张根,等.RP-HPLC 定量分析人工北虫草中 3 种核苷类有效成分[J].食品研究与开发,2015,36(4):127-129.
- [10]徐梅.RP-HPLC 法同时测定复方双花口服液液中 6 种活性成分[J].中成药,2015,37(7):1482-1486.
- [11]Pagratis N C, Bell C, Chang Y F, et al. Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(1):68-73.
- [12]King DJ, Ventura DA, Brasier AR, et al. Novel combinatorial selection of phosphorothioate oligonucleotide aptamers[J]. Biochemistry, 1998, 37(47):16489-16493.
- [13]张元杰,钱正明,陈肖家,等.HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):33-36.
- [14]姜艳艳,刘斌,石任兵,等.防风化学成分分离与结构鉴定[J].药学报,2007,42(5):505-510.

(2015-07-07 收稿 责任编辑:王明)