

RP-HPLC 法测定维感泡腾片中腺苷的含量

毛 艳, 杨伟俊*, 玛依拉·买买提依明, 贺金华
(新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的: 采用 RP-HPLC 法建立维感泡腾片中腺苷的含量测定方法。方法: 以甲醇-水(8:92)为流动相, Shimadzu C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, S-5 μm) 色谱柱, 检测波长为 260 nm, 柱温为 35 °C, 流速为 1.0 mL · min⁻¹。结果: 腺苷在 4.3 ~ 33.8 μg 范围内呈良好的线性关系($r=0.9997$), 腺苷的平均回收率为 101.0% ($n=9$, RSD = 1.4%)。结论: 该方法快速简便易行, 重复性良好, 结果准确, 可作为维感泡腾片中腺苷质量评价的方法。

[关键词] 维感泡腾片; 腺苷; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)02-0025-03

Determination of Adenosine in Weigan Effervescent Tablets by RP-HPLC

MAO Yan, YANG Wei-jun*, MA Yila · maimaitiyiming, HE Jin-hua
(Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for the quantification of adenosine in Weigan Effervescent Tablets. **Methods:** The analysis was carried out on a Shimadzu C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, S-5 μm) and the mobile phase was a mixture of methanol-water (8:92) with a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 260 nm, and the column temperature was 35 °C. **Results:** The linear response ranges of adenosine was 4.3 ~ 33.8 μg ($r=0.9997$), and the average recovery was 101.0% ($n=9$, RSD = 1.4%). **Conclusion:** The method is quick, simple and reproducible for the determination of adenosine in Weigan Effervescent Tablets.

[Key words] Weigan Effervescent Tablets; adenosine; HPLC; assay

[收稿日期] 2009-06-26

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技基础平台建设项目 (PT0708)

[通讯作者] * 杨伟俊, Tel: (0991) 2320292; E-mail: wilfred3106@163.com

维感泡腾片主要由板蓝根和一支蒿两味药材组成,具有清热解毒、消肿、凉血利咽、抗过敏和抗肝炎之功效。而《中国药典》^[1]未规定其药材的质量控制的含量测定方法和指标。自中国药典收载板蓝根药材以来,质量标准中仅做精氨酸的薄层鉴别,而缺少含量测定项,难于准确反应板蓝根的内在质量。本文选择板蓝根和一支蒿共有的水溶性核苷成分——腺苷作为评价维感泡腾片的一种检测指标,其能够干扰病毒核酸的合成,是活性成分之一,性质比较稳定,能够反映药材中核苷类的含量水平^[2],本文建立了其高效液相色谱法,对维感泡腾片中腺苷的含量进行了测定和分析。

1 仪器与试剂

Shimadzu 全自动液相色谱仪(紫外检测器, LC 2010C 系统控制器); Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1 数据工作站。

腺苷对照品(中国药品生物制品鉴定所)、维感泡腾片(由新疆药物研究所自制)。甲醇、乙腈试剂均为色谱纯,磷酸二氢钾和氢氧化钠为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取置于五氧化二磷减压干燥 12 h 的腺苷对照品约 8.45 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加 15% 甲醇水溶液溶解并定容至刻度,摇匀,即得 $0.338 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的腺苷对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取维感泡腾片 20 片,研细,过六号筛,取约 1 g 细粉,精密称定,置于 50 mL 锥形瓶中,精密量取 15% 甲醇水溶液 20 mL, 密塞,称定重量,超声处理 20 min,放冷,再称定重量,用 15% 甲醇水补足减失重量,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Shimadzu C_{18} (4.6 mm × 250 mm, $5 \mu\text{m}$) Code NO. 02485-81; 流动相为甲醇-水 (8:92); 检测波长为 260 nm; 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.4 系统适用性 在选定色谱条件下进行对照品,样品和阴性样品溶液的测定,记录色谱峰。计算系统适用性,结果腺苷峰的理论塔板数为 14137,分离度为 4.6,拖尾因子为 1.02,均符合《中华人民共和国药典》规定。

2.5 线性关系的考察 精密吸取“2.1”中腺苷对照品溶液 ($0.338 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.125, 0.25, 0.4, 0.5, 1

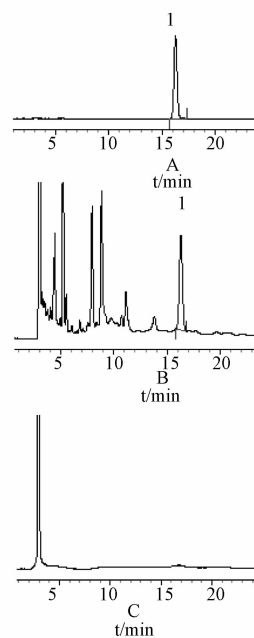


图 1 腺苷对照品(A)、维感泡腾片(B)和阴性样品(C)色谱图

mL 置 10 mL 容量瓶中,加 15% 甲醇水溶液至刻度,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。分别精密吸取上述溶液各 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪。以对照品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作标准曲线,回归方程: $Y = 31\ 613X + 7\ 881$, $r = 0.999\ 7$,结果腺苷对照品浓度在 $4.225 \sim 33.800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,与峰面积线性关系良好。

2.6 检测限(LOD)和定量限(LOQ) 取“2.1”中腺苷对照品 ($0.338 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),用甲醇依次稀释制成一系列溶液,按信噪比为 2:1,测得对照品检测限为 $81.12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;按信噪比为 10:1,测得对照品定量限为 $676 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度试验 取同一供试品溶液,依测定法连续进样 6 次,记录色谱峰面积,结果腺苷 RSD 为 0.74%。

2.8 重复性试验 取同一批的供试品,依“2.2”供试品溶液制备方法平行制备 6 份,依测定法进行测定。结果腺苷平均含量为 $297 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.8%。

2.9 供试液稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 h 依测定法进行测定,结果腺苷 RSD 为 1.6%,表明供试液在 36 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验 称取已知含量的供试品约

0.5 g, 精密称定, 共 9 份, 3 份为 1 组, 分别加入一定量腺苷对照品溶液, 依法进行测定, 结果见表 1。

表 1 腺苷加样回收率试验

编号	样品重 (g)	样品含量 (μg)	对照品加入量 (μg)	实测总量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.500 98	136.0	67.6	206.2	103.9		
2	0.500 01	135.7	67.6	205.4	103.1		
3	0.500 29	135.8	67.6	204.4	101.6		
4	0.500 27	135.8	135.2	272.2	100.9		
5	0.500 18	135.8	135.2	276.4	103.8	101.0	1.4
6	0.500 17	135.8	135.2	274.2	102.4		
7	0.500 04	135.7	202.8	336.5	99.0		
8	0.500 11	135.7	202.8	335.9	98.7		
9	0.500 02	135.7	202.8	330.5	96.0		

3 讨论

本实验考察了甲醇-磷酸盐水溶液 (pH = 6.5) 为流动相时^[3], 出峰时间较快分离度也不好、乙腈-水 (6:94) 为流动相时^[4], 拖尾现象较严重。当采用甲醇-水 (8:92) 时^[5] 腺苷与其邻峰的分离度较好, 无拖尾现象, 且无其它峰干扰, 操作简便实用。

腺苷为水溶性成分, 本实验中比较了水、15% 甲醇水、50% 甲醇水和甲醇做为提取溶媒, 结果水和 15% 甲醇水的提取效率相近, 考虑到样品放置的稳定性, 最终决定选择 15% 甲醇水做为提取溶媒。

常规的提取方法有冷浸、加热回流和超声提取,

由于冷浸提取时间较长, 提取效率低, 故实验中仅考察加热回流和超声提取。实验结果表明: 超声提取 20 和 30 min 腺苷的含量没有显著差别, 但比超声提取 10 min 时含量较高。超声提取和加热回流提取样品中的腺苷含量差别不大, 但当加热回流提取时间超过 1 h 之后含量反而有所下降, 可能与腺苷受热转化或被包裹有关。因此最终选择 15% 甲醇水作为提取溶媒, 超声提取 20 min 为样品处理方法。

本文采用 RP-HPLC 法测定了维感泡腾片中腺苷的含量, 处理方法便捷, 测定方法简单, 测定结果准确可靠, 可以作为维感泡腾片生产过程的质量控制指标。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 142.
- [2] 赵宇新, 李曼玲. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定中药板蓝根中精氨酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 10.
- [3] 侯雅明, 王雨林, 胡意冰, 等. 高效液相色谱法测定板蓝根颗粒中腺苷的含量[J]. 湖南中医杂志, 2005, 21(3): 112-895.
- [4] 陈 矛, 梁惠瑜, 杨东升, 等. 板蓝根颗粒中腺苷的 HPLC 分析[J]. 广东药学, 2003, 13(6): 6.
- [5] 许润春, 杨 明, 苏艳桃, 等. HPLC 测定板蓝根中腺苷含量中成药[J]. 2005, 27(6): 742.