

# 腺苷钴胺凝胶中腺苷钴胺的含量测定

吴燕,刘园,张福成,王明磊

(空军总医院药学部,北京 100142)

**摘要** 目的 采用高效液相色谱(HPLC)法测定腺苷钴胺凝胶中的腺苷钴胺含量。方法 色谱柱为 Ultimate Column XB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm),以 0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 为 3.2)-乙腈(83:17)为流动相;柱温:35℃;进样量:10 μL;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长:260 nm。结果 腺苷钴胺在 10~50 μg·mL<sup>-1</sup>范围内线性关系良好( $r=0.9999$ ),平均回收率为 99.49%,RSD 为 0.60%( $n=9$ )。结论 该方法专属性强、准确,可用于测定腺苷钴胺凝胶的含量。

**关键词** 腺苷钴胺;凝胶;色谱法;高效液相;含量测定

中图分类号 R927.2 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)01-0077-03

## Content Determination of Cobamamide in Cobamamide Gel

WU Yan, LIU Yuan, ZHANG Fu-cheng, WANG Ming-lei (Department of Pharmacy, the General Hospital of Air Force, Beijing 100142, China)

**ABSTRACT Objective** To establish a high performance liquid chromatography method for determining cobamamide in cobamamide gel. **Methods** A XB-C<sub>18</sub> Ultimate column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used; the mobile phase was consisted of 0.05 mol·L<sup>-1</sup> monobasic potassium phosphate buffer solution (adjusted to pH 3.2 with phosphoric acid); acetonitrile(83:17); loading volume was 10 μL; the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; and the UV detection wavelength was set at 260 nm. **Results** The linear range for cobamamide was 10~50 μg·mL<sup>-1</sup>,  $r=0.9999$ . The average recovery was 99.49%, with a RSD as 0.60% ( $n=9$ ). **Conclusion** The method is specific and accurate, which is suitable for the content determination of cobamamide in the gel.

**KEY WORDS** Cobamamide; Gel; HPLC; Content determination

腺苷钴胺是氰钴型维生素 B<sub>12</sub> 的同类物<sup>[1]</sup>, 即其 CN 基被腺嘌呤核苷取代, 成为 5'-脱氧腺苷钴胺, 它是体内维生素 B<sub>12</sub> 的两种活性辅酶形式之一, 是细胞生长繁殖和维持神经系统髓鞘完整所必需的物质。可用于巨幼红细胞性贫血、营养不良性贫血等疾病。有文献报道<sup>[2]</sup>, 腺苷钴胺还有治疗白癜风、带状疱疹、脂溢性皮炎等皮肤病的作用。笔者将腺苷钴胺制备成外用凝胶剂, 使用中空纤维膜分离样品, 通过选用合适的色谱柱和液相色谱条件, 测定本室自制的腺苷钴胺凝胶的含量。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 安捷伦 1260 全自动高效液相色谱仪; 电子分析天平为 Sartorius BS 110S 型。聚丙烯中空纤维膜(壁厚 0.2 mm, 内径 1.0 mm, 截留相对分子质量 12 000, 上海蓝景膜技术有限公司)。EP 管(规格:

5 mL, 军事医学科学院)。

**1.2 试剂** 腺苷钴胺凝胶(由空军总医院药学部研制, 规格: 腺苷钴胺 20 mg, 凝胶 30 g; 批号: 20100401, 20100402, 20100403)。腺苷钴胺原料药(纯度 98.1%, 批号: 02091003)。腺苷钴胺对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 140658-200501)。乙腈为色谱纯; 磷酸二氢钾、磷酸均为分析纯; 水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱为 Ultimate Column XB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 为 3.2)-乙腈(83:17)。柱温 35℃; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 260 nm。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 避光操作。精密称取腺苷钴胺对照品约 5 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液; 精密量取 3 mL 置于 10 mL 量瓶中, 流动相定容至刻度, 作为对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液制备** 避光操作。称取腺苷钴胺凝胶适量, 纯化水使其完全溶解, 加氯化钠溶液超声 10 min。放置至室温后取适量, 置于 EP 管中,

收稿日期 2011-03-24 修回日期 2011-05-20

**作者简介** 吴燕(1980-), 女, 湖北红安人, 主管药师, 博士, 主要研究方向: 药学新剂型。电话: 010-66928557, E-mail: pharmacy0909@hotmail.com。

**通讯作者** 张福成(1959-), 男, 河北保定人, 主任药师, 硕士, 主要研究方向: 医院制剂, 药事管理。电话: 010-66928505, E-mail: Zfc59511@sohu.com。

4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 注入中空纤维装置, 3 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取出中空纤维, 用平针注射器将供试品溶液打入进样瓶套管中备用。

**2.2.3 空白辅料溶液制备** 取辅料适量, 同“2.2.2”项方法制成空白辅料溶液。

**2.3 专属性实验** 避光操作。精密量取 30 μg · mL<sup>-1</sup> 对照品溶液, 供试品溶液和空白辅料溶液, 分别进样 10 μL, 记录色谱图, 主峰与杂质峰分离度 > 2; 理论板数按腺苷钴胺计算 > 2 000。对称因子 1.02, 保留时间 4.319 min。空白辅料对主药无干扰, 结果见图 1。

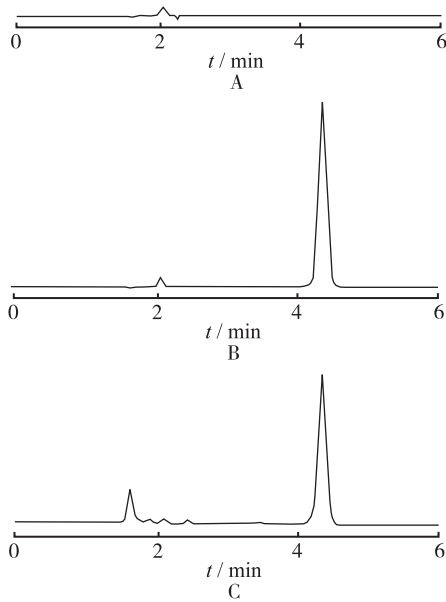


图 1 空白辅料(A)、对照品(B)和供试品(C)的 HPLC 图

1. 腺苷钴胺

Fig. 1 HPLC chromatogram of blank excipient, reference and sample

1. cobamamide

**2.4 线性关系考察** 避光操作。精密量取对照品储备液适量, 分别用流动相稀释至每毫升含腺苷钴胺 10, 20, 30, 35, 40, 50 μg 的溶液, 按上述色谱条件进行测定。以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程为:  $Y = 12\ 974X + 6\ 126.2$ ,  $r = 0.999\ 9$ 。结果表明腺苷钴胺在 10 ~ 50 μg 范围内呈良好的线性关系。

**2.5 精密度实验** 取 30 μg · mL<sup>-1</sup> 对照品溶液, 按“2.1”项色谱条件, 连续进样 6 次, 测得峰面积的 RSD 为 0.05% ( $n = 6$ )。

**2.6 稳定性实验** 取供试品溶液(批号: 20100401), 按上述色谱条件分别在 0, 2, 4, 8 h 进样, 测定, 其峰面

积的 RSD 为 1.09%, 表明供试品溶液在避光条件下 8 h 内稳定。

**2.7 回收率实验** 精密称取供试品重量的空白辅料, 避光条件下分别按照标准品浓度的 80%, 100%, 120% 加入腺苷钴胺标准品溶液后, 按照“2.2.2”处理, 过滤。按样品含量测定方法测定含量, 平均回收率为 99.49%, RSD 为 0.60% ( $n = 9$ )。结果见表 1。

**2.8 样品测定** 取本品, 按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液; 分别量取对照品溶液和供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 按外标法以峰面积计算含量。结果批号为 20100401, 20100402, 20100403 样品的标示百分含量分别为 100.02%, 100.44%, 99.97%。

表 1 腺苷钴胺加样回收实验结果

Tab. 1 Result of recovery rate of cobamamide

原有量	加入量	测得值	回收率	平均值	RSD
	μg			%	
12	12	23.88	99.00		
12	12	23.93	99.42	98.81	0.74
12	12	23.76	98.00		
15	15	30.22	101.47		
15	15	30.03	100.20	100.60	0.75
15	15	30.02	100.13		
18	18	35.86	99.22		
18	18	35.88	99.33	99.09	0.33
18	18	35.77	98.72		

### 3 讨论

有关腺苷钴胺的 HPLC 测定文献报道较少, 本实验选用 Hedera ODS-2、Lidrospher C<sub>18</sub>、Uitimate Column XB-C<sub>18</sub>、Venusil XBP C<sub>18</sub> 4 种色谱柱, 用《中华人民共和国药典》2010 年版<sup>[3]</sup>测定其含量的 HPLC 条件进行测定。Hedera ODS-2 柱和 Lidrospher C<sub>18</sub> 柱的色谱峰保留时间适宜, 但是有严重的拖尾; Venusil XBP C<sub>18</sub> 柱的色谱峰保留时间适宜, 但是对称因子 1.5 未达到要求; 采用 Uitimate Column XB-C<sub>18</sub> 柱获得色谱图对称因子 1.03, 达到要求, 通过对流动相比比例进行进一步优化, 获得主峰保留时间约为 4 min, 峰形良好。总结实验结果, 选用 Uitimate Column XB-C<sub>18</sub> 进行测定。

腺苷钴胺性质不稳定, 在光照条件下易降解<sup>[4]</sup>, 主要降解产物为羟钴胺素<sup>[5]</sup>。所以整个操作过程应在避光条件下, 且腺苷钴胺溶液应避光保存。

本实验用中空纤维分离样品, 所采用的 U 型中空纤维膜与离心力完全平行, 可消除浓差极化现象, 且由于中空纤维的管状结构, 是由管外至管内的过滤方式, 因此离心力不影响膜的孔径和超滤性能。中空纤维膜

与离心力完全平行,最大限度减少浓度极化现象。此方法简便快速,结果准确,克服浓差极化现象,容易收集,在凝胶剂样品前处理中是一种有效的分离方法。

#### 参考文献

- [1] 王雷,张玉明. 维生素 B<sub>12</sub> 的光解研究及发酵液中维生素 B<sub>12</sub> 检测新方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(4): 81-85.
- [2] 方春红,付继承,梁红. 表皮移植联合叶酸及腺苷钴胺治疗白癜风临床疗效观察[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2005,

21(7): 505-506.

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1085-1086.
- [4] 雷嘉川,余建清,宋金春,等. 光和温度对输液中腺苷钴胺稳定性的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(6): 23-24.
- [5] 封叔华,李力更. 腺苷钴胺及其片剂的稳定性考察[J]. 中国生化药学杂志, 1997, 18(5): 249-250.

DOI 10.3870/yydb.2012.01.030

## 金菊消痔栓的质量标准研究

陈瑾

(四川省医学科学院、四川省人民医院药剂科,成都 610072)

**摘要** 目的 建立金菊消痔栓的质量标准。方法 采用薄层色谱法鉴别金菊消痔栓中大黄、冰片;用高效液相色谱法对制剂中绿原酸进行定量分析。结果 定性鉴别大黄、冰片分离度好,专属性强;绿原酸的含量测定线性范围为 5.4~108.8 μg ( $r=0.9999, n=6$ ),平均回收率为 99.03% (RSD=1.61%,  $n=6$ )。结论 该研究建立的方法准确可靠,灵敏度高,专属性强,可有效控制金菊消痔栓的质量。

**关键词** 金菊消痔栓;绿原酸;质量标准;色谱法,高效液相;色谱法,薄层

中图分类号 R286;R927.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)01-0079-03

### Research of Quality Standard for *Jinju Xiaozhi* Suppository

CHEN Jin (Department of Pharmacy, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

**ABSTRACT Objective** To establish the quality standard for *jinju xiaozhi* suppository. **Methods** *Radix et Rhizoma Rhei* and *Borneolum* in *jinju xiaozhi* suppository were identified by TLC (thin layer chromatograph). Chlorogenic acid was determined by HPLC. **Results** The characteristic identification by TLC was distinct and highly specific. The results of quantitative evaluation showed that chlorogenic acid had the linear range of 5.4-108.8 μg ( $r=0.9999, n=6$ ), and the average recovery was 99.03% (RSD=1.61%,  $n=6$ ). **Conclusion** The method is reliable, accurate and specific, which is benefit for the quality control of *jinju xiaozhi* suppository.

**KEY WORDS** *Jinju xiaozhi* suppository; Chlorogenic acid; Quality standard; HPLC; TLC

金菊消痔栓(批准文号:川药制字 Z20080179)为四川省人民医院的医院内制剂,由金银花、蒲公英、野菊花、大黄、黄芩等 8 味中药制备而成,具有清热解毒、消肿镇痛、凉血止血之功效,临床上主要用于各期内外痔、混合痔以及肛瘘、肛窦炎、肛周脓肿、肛管炎、肛裂、肛隐窝炎所致的肛门肿胀、疼痛、出血等症。为有效控制该制剂质量,保证临床疗效,笔者在本实验建立大黄和冰片的薄层色谱(TLC)定性鉴别方法,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中绿原酸的含量,为本品质量标准的制订提供依据。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 日本岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪,包括:LC-20AD 泵, SIL-20A 型自动进样器, SPD-M20A 型二极管阵列检测器(波长范围 190~800 nm), XMT-G-3000 柱温箱;美国安捷伦 1100 型高效液相色谱仪;日本岛津 AUW220D 型双量程分析天平。

**1.2 试剂** 大黄对照药材(中国药品生物制品检定所,批号:120902-200609),冰片对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110743-200303),绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110753-200413,供含量测定用),金菊消痔栓(四川省人民医院生产,批号:20090912, 20091217, 20100413, 20100727, 20100903, 20101207)。乙腈为色谱纯,水为去离子纯化水,其余试剂均为分析纯。

收稿日期 2011-04-27 修回日期 2011-05-29

**作者简介** 陈瑾(1969-),女,上海人,副主任药师,硕士,从事医院中药新制剂研究。电话:(0)13666169113, E-mail: jchen0@163.com。