

UPLC 同时测定复方守宫散中核苷类含量

吴健^{1,2}, 高家荣^{1,2*}, 韩燕全¹, 李翔¹(1.安徽中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230031; 2.安徽中医药大学, 合肥 230032)

摘要: 目的 建立 UPLC 同时测定复方守宫散中腺嘌呤、腺苷含量的方法。方法 色谱柱 Acquity BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 流速: 0.25 mL·min⁻¹, 柱温: 26 °C, 检测波长: 254 nm。结果 腺嘌呤、腺苷的进样量分别在 0.040 9~0.511 5 mg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)和 0.057 8~0.722 0 mg·mL⁻¹(*r*=0.999 6)内与其峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 97.7%, 97.7%, RSD 分别为 0.96%, 1.18%。结论 该方法快速、可靠、准确, 可作为复方守宫散的质量控制方法。

关键词: 超高效液相色谱; 复方守宫散; 腺嘌呤; 腺苷; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0843-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.018

Simultaneous Determination of Nucleoside Contents in Compound Shougong Powder by UPLC

WU Jian^{1,2}, GAO Jiarong^{1,2*}, HAN Yanquan¹, LI Xiang¹(1. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Grade 3 Laboratory of TCM Preparation, State Administration of TCM, Hefei 230031, China; 2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UPLC method for the determination of adenine and adenosine in Compound Shougong powder. **METHODS** The determination was performed on Acquity BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with mobile phase consisted of methanol-water (gradient elution) at a flow rate of 0.25 mL·min⁻¹. Column temperature was 26 °C. The UV detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** The calibration curves were linear in the range of 0.040 9–0.511 5 mg·mL⁻¹(*r*=0.999 9) for adenine, 0.057 8–0.722 0 mg·mL⁻¹(*r*=0.999 6) for adenosine. The average recoveries were 97.7%, 97.7% and RSDs were 0.96%, 1.18%, respectively. **CONCLUSION** The determination method is fast, reliable, accurate, and can be used for quality control of Compound Shougong powder.

KEY WORDS: UPLC; Compound Shougong powder; adenine; adenosine; content determination

复方守宫散为安徽中医药大学第一附属医院特色中药制剂, 由守宫、何首乌、生晒参、三七、梅花、没药 6 味药组成, 处方来源于安徽中医药大学第一附属医院肿瘤科经验方, 具有补虚解毒, 消肿止痛功效, 临床应用近 20 年, 对于晚期肿瘤及肿瘤化疗患者增强免疫力效果良好^[1]。其君药守宫具有祛风定惊、止咳平喘、散结解毒、通络止痛等功效, 临床用于肿瘤的治疗效果确切^[2-3], 但其抗肿瘤的物质基础尚不明确, 除了小分子多肽

外, 核苷类成分有可能亦是主要活性成分^[4]。在前期生产过程中, 仅采用薄层扫描法对其蒽醌类成分进行测定^[5], 不能全面、有效反映制剂的质量。根据国家食品药品监督管理局对医院制剂质量标准提高的要求, 本实验采用 UPLC 对制剂中的腺嘌呤、腺苷含量进行同时测定, 以达到控制制剂质量、保证用药安全有效的目的。

1 材料

1.1 仪器

基金项目: 国家中医药重点学科(临床中药学)建设项目(国中医药人教发[2012]32 号); 安徽中医药大学青年科学研究基金项目(2013qn019)

作者简介: 吴健, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0551)62838553
药师, 硕导 Tel: (0551)62838556 E-mail: zyfygir2006@163.com

E-mail: wujian7997@163.com *通信作者: 高家荣, 男, 硕士, 主任

Waters Acquity H-Class UPLC 超高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器以及 Empower 2 工作站(美国 Waters 公司); KQ3200DB 型超声仪(江苏昆山超声仪器有限公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius)。

1.2 试药

复方守宫散(安徽中医药大学第一附属医院制剂中心, 批号: 20130525, 20130116, 20120816); 腺嘌呤对照品(批号: 110886-201102, 供含量测定用, 含量: 99.4%)、腺苷对照品(批号: 110879-200202, 供含量测定用, 含量: 100%)均购自中国药品生物制品检定所; 乙腈、甲醇为色谱纯(美国 TEDIA 公司); 蒸馏水(屈臣氏); 微孔滤膜(0.22 μm , 上海陆纳生物科技有限公司); 其他所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Acquity BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm), 柱温: 26 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 甲醇-水, 梯度洗脱, 0~5 min, 甲醇 3% \rightarrow 10%, 5~10 min, 甲醇 10%, 10~12 min, 甲醇 10% \rightarrow 3%, 12~25 min, 甲醇 3%; 流速为 0.25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 254 nm。

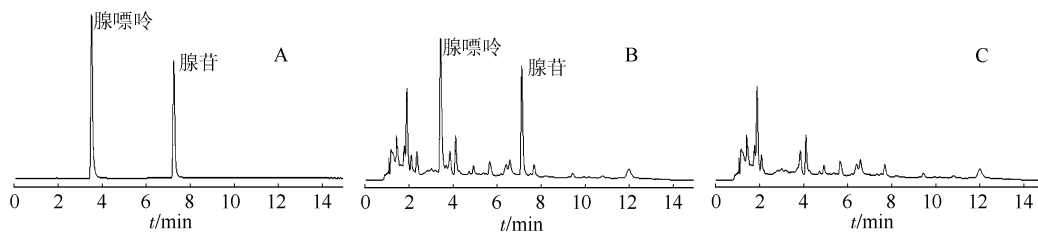


图 1 UPLC 色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性样品

Fig. 1 UPLC chromatograms

A-control; B-sample; C-negative sample

2.5 线性关系考察

精密吸取上述混合对照品溶液适量, 稀释成梯度浓度的混合对照品溶液(腺嘌呤浓度分别为 0.040 9, 0.102 3, 0.204 6, 0.306 9, 0.409 2, 0.511 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 腺苷的浓度分别为 0.057 8, 0.144 4, 0.288 8, 0.433 2, 0.577 6, 0.722 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 精密吸取 0.5 μL 注入 UPLC 仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以对照品浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制标准曲线, 得腺嘌呤的标准曲线为 $Y=23\ 307\ 763.028X-482\ 956.672(r=0.999\ 9, n=6)$, 腺苷的标准曲线为 $Y=11\ 521\ 314.903\ 5X-248\ 347.872(r=0.999\ 6, n=6)$ 。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取适量腺嘌呤、腺苷对照品, 置于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇超声溶解, 冷却至室温, 再用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别制成浓度为 0.409 2 和 0.577 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品母液, 备用。再分别精密量取 1.00 mL 置于 2 mL 量瓶中, 混匀, 即得混合对照品溶液, 其浓度分别为 0.204 6, 0.288 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末 3 g, 加水 100 mL, 称重, 超声处理(功率 100 W, 频率 40 kHz)1 h, 放冷, 称重, 用水补足损失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 50 mL, 用氨水调 pH 至 11.0, 再用饱和的正丁醇水溶液振摇提取 5 次, 每次 50 mL, 合并正丁醇溶液, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加 50% 甲醇溶解, 转移至 2 mL 量瓶中, 定容, 作为供试品溶液。按处方比例制备不含守宫药材的样品, 同法制备阴性对照溶液。

2.4 专属性考察

精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 1.0 μL , 进样测定, 结果阴性对照溶液对测定结果无干扰。结果见图 1。

结果表明腺嘌呤、腺苷的进样量分别在 0.040 9~0.511 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.057 8~0.722 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 0.5 μL , 按“2.1”项下色谱条件重复 6 次进样测定, 记录峰面积。结果腺嘌呤、腺苷的 RSD 分别为 0.04% 和 0.14%($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一批供试品溶液于室温下放置, 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 精密吸取 1.0 μL 进样测定, 记录峰面积。结果腺嘌

呤、腺苷的 RSD 分别为 0.04%和 0.03%($n=6$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取同一批次样品适量, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别精密吸取 1.0 μL 进样测定, 记录峰面积。结果腺嘌呤、腺苷的 RSD 分别为 0.03%和 0.03% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取 9 份同一批已知含量(腺苷 $0.654 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、腺嘌呤 $0.092 2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)的样品粉末 3 g, 精密称定, 分高、中、低 3 个浓度梯度分别精密加入浓度分别为 $0.204 6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (腺嘌呤)、 $0.288 8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (腺苷)对照品溶液 1.5, 1.0, 0.5 mL, 每个浓度梯度平行 3 份。按“2.3”项下方法制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test($n=6$)

成分	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
腺嘌呤	0.201 6	0.102 3	0.301 9	98.04		
	0.200 9	0.102 3	0.300 3	97.17		
	0.201 1	0.102 3	0.302 2	98.83		
	0.202 2	0.204 6	0.406 1	99.66		
	0.201 6	0.204 6	0.399 8	96.87	97.7	0.96
	0.202 8	0.204 6	0.401 5	97.12		
	0.201 4	0.306 9	0.499 5	97.13		
	0.201 5	0.306 9	0.501 1	97.62		
	0.200 2	0.306 9	0.498 6	97.23		
腺苷	0.028 4	0.014 5	0.042 3	95.86		
	0.028 3	0.014 5	0.042 6	98.62		
	0.028 4	0.014 5	0.042 5	97.24		
	0.028 5	0.028 9	0.057 1	98.96		
	0.028 4	0.028 9	0.056 2	96.19	97.7	1.18
	0.028 6	0.0289	0.056 7	97.23		
	0.028 4	0.043 4	0.071 2	98.62		
	0.028 4	0.043 4	0.070 9	97.93		
	0.028 2	0.043 4	0.071 1	98.85		

2.9 样品含量测定

称取 3 批次样品各 3 份, 每份 3 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件各进样 1.0 μL 测定, 记录峰面积, 计算样品中腺嘌呤、腺苷的含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	腺嘌呤/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	腺苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
20130525	0.065 4	0.092 2
20130116	0.065 1	0.090 9
20120816	0.064 9	0.090 7

3 讨论

守宫为动物类药材, 由于动物类药材的成分复杂, 受影响因素多, 在中药制剂生产中很难对其进行有效的质量控制, 而往往其很可能为发挥作用的有效活性成分。因此, 本实验对安徽中医药大学第一附属医院在临床应用反映较好的复方守宫散进行了深入的研究, 采用 UPLC 对守宫中的核苷类成分进行了同时含量测定。UPLC 较 HPLC 具有灵敏度高、分析时间短、分离度高、进样量少等特点, 提高了分析效率, 节省了溶剂损耗, 降低分析成本, 更符合实际工作的需要, 在中药分析中应用广泛^[6-8]。

本实验研究中对超声提取和水浴回流提取方法进行了对比, 发现由于回流时温度较高, 制剂中动物类药材中的脂肪成分混入了提取液中, 导致用水饱和的正丁醇提取过程中易发生乳化现象, 超声提取则不易发生此情况。

此实验中, 需严格控制提取液的 pH 值至 11.0, 因核苷类成分的碱基呈弱碱性, 在 pH 11.0 时可抑制核苷成分的解离, 使核苷类呈分子状态, 而氨基酸和小分子多肽类为离子态, 水饱和的正丁醇可将核苷类成分充分萃取, 有效分离核苷与杂质。

实验结果表明, 本研究建立的测定方法可行, 分离度较高, 可作为复方守宫散的质量控制方法, 同时为其进一步作用机制和物质基础研究提供了依据。

REFERENCES

- [1] XU X Z, SU L, FAN QY, et al. The efficacy of Compound Shou Gong powder combined with radiotherapy and chemotherapy in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer: a report of 90 cases [J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll(安徽中医学院学报), 2010, 29(3): 15-17.
- [2] GENG D, SUN H Y, WANG C M. Effects on tumor activity of aqueous and ethanol extracts from *Gekko swinhonis* Gunther [J]. China Pharm(中国药房), 2012, 23(35): 3268-3270.
- [3] SONG J Y, WANG X L, WANG J G, et al. Inhibitory effects of gecko alcohol extract on human esophageal squamous carcinoma cell line EC-109 proliferation and associated mechanism [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2011, 34(7): 1020-1023.

- [4] JIANG G X, WANG C M, GENG D. Research progress and mechanism research on anti-tumor material finding from gecko [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2013, 28(4): 1037-1040.
- [5] WU J, GAO J R, XIA L M, et al. Study on quality of Compound Shougong powder [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2011, 18(1): 43-46
- [6] WANG Y Z, JIANG L, HAN Y Q, et al. Simultaneous determination of the contents of paeonol and paeoniflorin in Danzhi Jiangtang capsule by UPLC [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2012, 21(12): 1337-1340.
- [7] MA T C, JIA Y, LUO J, et al. Simultaneous determination of eight active components in Chuanxiong Rhizoma from different areas by UPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(10): 902-906.
- [8] LUO J, FAN X H, CUI S J, et al. UPLC fingerprint of Anemarrhenae Rhizoma and its hierarchical cluster analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(1): 28-31.

收稿日期: 2013-09-22