

HPLC 同时测定百令胶囊中 5 种核苷类成分的含量

郑瑜倩¹, 程巧鸳², 祝明^{2*}, 张昀³

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004;
3. 中美华东制药有限公司, 杭州 310011)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定百令胶囊中 5 种核苷类成分尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷和腺苷含量的方法。方法:采用 Ultimate AQ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波 260 nm,柱温 25 ℃。结果:在该色谱条件下,尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷和腺苷分离良好,且分别在 35.25~528.8(*r*=1.000),38.07~571.1(*r*=1.000),34.96~524.5(*r*=0.999 8),38.34~575.1(*r*=1.000),39.84~597.6 ng(*r*=1.000) 线性关系良好。加样回收率分别为 101.2%,103.1%,96.7%,101.4%,103.2%,RSD 分别为 1.9%,1.1%,1.3%,2.7%,1.6%。结论:该 HPLC 含量测定方法结果准确、可靠,具有良好的专属性、精密度、重复性和稳定性,可用于百令胶囊的质量控制。

[关键词] 百令胶囊;高效液相色谱法;尿苷酸;尿苷;腺苷酸;鸟苷;腺苷
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0061-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015050061

Simultaneous Determination of Five Nucleosides in Bailing Capsule by HPLC ZHENG Yu-qian¹, CHENG Qiao-yuan², ZHU Ming^{2*}, ZHANG Yun³ (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004; 3. Hangzhou Zhongmei Huadong Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310011, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of five nucleosides, uridine 5'-monophosphate, uridine, adenosine 5'-monophosphate monohydrate, guanosine, adenosine in Bailing capsules. Method: The separation was developed on an Ultimate AQ C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) by gradient elution with methanol-0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution, with flow rate at 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature at 25 ℃. The detection wavelength was at 260 nm. Result: The baseline separation of uridine 5'-monophosphate, uridine, adenosine 5'-monophosphate monohydrate, guanosine, and adenosine was successfully achieved. The results showed that these five ingredients had good linearity within the test ranges of 35.25-528.8 (*r*=1.000), 38.07-571.1 (*r*=1.000), 34.96-524.5 (*r*=0.999 8), 38.34-575.1 (*r*=1.000) and 39.84-597.6 ng (*r*=1.000), respectively. The recovery were 101.2% (RSD 1.9%), 103.1% (RSD 1.1%), 96.7% (RSD 1.3%), 101.4% (RSD 2.7%) and 103.2% (RSD 1.6%), respectively. Conclusion: The developed method of the HPLC-fingerprint and quantitative analysis showed good specificity, precision, reproducibility, stability and could be used for the quality control of Bailing capsules.

[Key words] Bailing capsules; HPLC; nucleoside; uridine 5'-monophosphate; uridine; adenosine 5'-monophosphate monohydrate; guanosine; adenosine

百令胶囊为发酵冬虫夏草菌粉[Cs-C-Q80 中华 (1989)经液体深层发酵所得的菌丝体的干燥粉末]被毛孢 *Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu-et Zeng 制成的胶囊。气微腥,味微咸,具有补肺肾、益精气

[收稿日期] 20140826(016)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304-005)
[第一作者] 郑瑜倩,在读硕士,从事中药质量评价及新药开发研究,Tel:0571-86734991,E-mail:zhengyuqian2012@163.com
[通讯作者] *祝明,主任中药师,从事中药有效成分及质量控制研究,Tel:0571-86734991,E-mail:zhumingd@hotmail.com

的功效,主要用于肺肾两虚引起的咳嗽、气喘、咯血、腰背酸痛及慢性支气管炎的辅助治疗^[1]。据文献报道,发酵冬虫夏草菌粉与天然冬虫夏草作用和成分相似,含有丰富的氨基酸、核苷酸、虫草酸、虫草多糖等物质,尤其以腺苷药理作用显著,如改善心脑血管循环、抑制神经递质释放和调节腺苷酸环化酶活性等^[2-3]。目前有关百令胶囊的研究多集中于临床疗效和药理作用,质控研究较少,现有核苷类的质控研究也多集中于 HPLC 鉴别及腺苷的含量测定^[4-5],但市场上发酵虫草制剂种类众多,且所含核苷类成分相近。张萍等^[6]利用 HPLC 测定百令胶囊、金水宝胶囊等 5 种发酵虫草制剂中尿苷、鸟苷、腺苷、尿嘧啶和腺嘌呤的含量,结果百令胶囊中尿嘧啶、腺嘌呤的含量甚微,但另有两个核苷酸的含量则较高。研究表明^[7-9],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。综上所述,本文拟采用的 HPLC 同时测定百令胶囊中尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷和腺苷 5 种核苷类成分的含量,有望为更有效地控制百令胶囊的质量并区分其他发酵虫草菌粉制剂提供科学实验依据。

1 材料

1.1 仪器 1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent),Milli Q Advantage A10 型超纯水仪(美国 Millipore 公司),AG 285 型电子天平(德国 Mettler 公司)。

1.2 试剂 甲醇(安徽时联特种溶剂股份有限公司,分析纯;Merck 公司,色谱纯),纯净水(杭州娃哈哈实验级桶装纯净水),磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)。

1.3 试药 尿苷酸、尿苷、鸟苷、腺苷酸对照品(日本 Sigma 公司,批号分别为 1001605247,1001441442,1001284159,1001630153)、腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 879-200001),供含量测定用。百令胶囊(0.2,0.5 g/粒 2 个规格,样品均由杭州中美华东制药有限公司提供),至灵胶囊(长兴制药有限公司,批号 20080323),宁心宝胶囊(正大青春宝药业有限公司,批号 1306002),金水宝胶囊(江西济民可信金水宝制药有限公司,批号 130601),乌灵胶囊(浙江佐力药业股份有限公司,批号 20121006)。

2 方法与结果

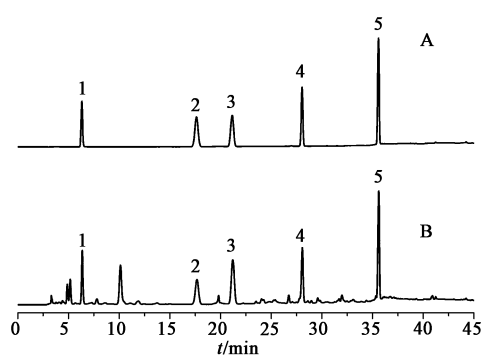
2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取五氧化二磷干燥 24 h 后的尿苷酸 18.36 mg,尿苷 19.83 mg,

腺苷酸 18.21 mg,鸟苷 19.97 mg,腺苷 20.75 mg,用 10% 甲醇配成质量浓度分别为 367.2,396.6,364.2,399.4,415.0 mg·L⁻¹ 的对照品储备液,并于 4℃ 保存。分别精密吸取尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷及腺苷对照品贮备液 8 mL 置 50 mL 量瓶中,用 10% 甲醇定容至刻度,即为混合对照品溶液;精密吸取混合对照品溶液 3 mL 置 10 mL 量瓶中,用 10% 甲醇定容至刻度,即得最终质量浓度分别为 17.63,19.04,17.48,19.17,19.92 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,供含量测定用。

2.2 供试品溶液的制备 取本品 0.25 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 20 min,取出,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL 至蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加 10% 甲醇使溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加 10% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇(A)-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液(B)梯度洗脱(0~13 min,0 A;13~30 min,0~15% A;30~40 min,15%~60% A;40~45 min,60% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 25℃,对照品溶液进样 10 μL,供试品溶液进样 20 μL。

2.4 系统适用性 精密吸取供试品溶液(批号 S7)及对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件进样测定,见图 1。结果表明,在该色谱条件下,各色谱峰分离良好。



A. 混合对照品;B. 供试品;1. 尿苷酸;2. 尿苷;3. 腺苷酸;4. 鸟苷;5. 腺苷

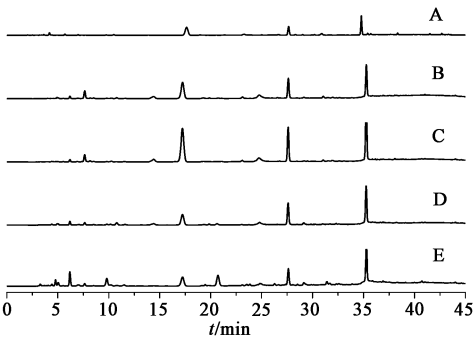
图 1 百令胶囊 HPLC
Fig.1 HPLC chromatograms of Bailing capsule

2.5 专属性试验

2.5.1 空白溶剂干扰试验 百令胶囊由发酵冬虫夏草菌粉直接灌装,无辅料,直接取甲醇溶剂,按 2.3 项下色谱条件进行测定,进样体积为 10 μL,记

录色谱图。色谱图显示 260 nm 波长下溶剂无吸收。

2.5.2 不同发酵虫草制剂专属性试验 按 2.2 项下方法制备百令胶囊(批号 S7)、金水宝胶囊、宁心宝胶囊、至灵胶囊、乌灵胶囊样品的供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,结果见图 2。



A. 乌灵胶囊;B. 至灵胶囊;C. 宁心宝胶囊;D. 金水宝胶囊;E. 百令胶囊

图 2 5 种发酵虫草制剂 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of five preparations of fermental Cordyceps

2.6 线性关系考察 取 2.1 项下制备的对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,分别进样 2,5,10,15,20,30 μL ,记录色谱图。以进样量(ng)为横坐标 X ,峰面积为纵坐标 Y ,制备标准曲线。计算尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷及腺苷的回归方程分别为 $Y = 1\,632.2X + 1.060$ ($r = 1.000$), $Y = 2\,151.8X + 0.121\,5$ ($r = 1.000$), $Y = 2\,238.4X + 10.25$ ($r = 0.999\,8$), $Y = 2\,111.0X + 0.397\,9$ ($r = 1.000$), $Y = 3\,236.7X + 0.334\,0$ ($r = 1.000$), 分别在 35.25 ~ 528.8, 38.07 ~ 571.1, 34.96 ~ 524.5, 38.34 ~ 575.1, 39.84 ~ 597.6 ng 呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液(批号 S7),按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积并计算,尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.1%, 0.2%, 0.2%, 0.3%, 0.2%, 结果表明仪器精密度良好。

2.8 中间精密度试验 由不同人员取样按精密度试验方法操作。按 2.3 项下色谱条件测定峰面积并计算,尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷和腺苷的平均质量分数分别为 1.078, 1.267, 1.080, 1.267, 1.546 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.8%, 1.1%, 1.1%, 0.4%, 0.7%, 说明本方法测定的中间精密度良好。

2.9 重复性试验 精密称取百令胶囊(批号 S7)6 份,按 2.2 项下方法制备各供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定峰面积并计算含量,尿苷酸、尿苷、腺

苷酸、鸟苷及腺苷的质量分数分别为 1.076, 1.260, 1.089, 1.264, 1.536 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.6%, 1.7%, 1.6%, 1.7%, 1.6%, 结果表明方法重复性良好。

2.10 稳定性试验 取 2.7 精密度试验项下供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样测定并计算,尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.4%, 0.2%, 0.3%, 0.6%, 0.4%, 结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

2.11 回收率试验 取百令胶囊(批号 S7)粉末 9 份,每份约 0.125 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷及腺苷对照品溶液适量(3 个水平,平行 3 份),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定并计算回收率,尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷及腺苷的平均回收率分别为 101.2%, 103.1%, 96.7%, 101.4%, 103.2%, RSD 分别为 1.9%, 1.1%, 1.3%, 2.7%, 1.6%, 结果见表 1。

表 1 百令胶囊中 5 种腺苷类成分的加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of five nucleosides in Bailing capsule

成分	称样量 /g	样品 中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
尿苷酸	0.125 8	232.0	183.6	413.9	99.08	101.2	1.9
	0.126 3	232.8	220.3	457.6	102.07		
	0.126 0	232.3	264.4	502.9	102.38		
尿苷	0.125 8	196.0	198.3	398.6	102.17	103.1	1.1
	0.126 3	196.7	238.0	443.2	103.58		
	0.126 0	196.3	285.6	492.3	103.67		
腺苷酸	0.125 8	276.1	182.1	450.7	95.91	96.7	1.3
	0.126 3	277.0	218.5	490.8	97.80		
	0.126 0	276.5	262.2	529.4	96.46		
鸟苷	0.125 8	224.3	199.7	429.8	102.91	101.4	2.7
	0.126 3	225.1	239.6	466.1	100.58		
	0.126 0	224.6	287.6	514.3	100.75		
腺苷	0.125 8	244.0	207.5	454.4	101.41	103.2	1.6
	0.126 3	244.8	249.0	505.4	104.67		
	0.126 0	244.3	298.8	553.3	103.42		

2.12 样品测定 按 2.2 项下方法制备 20 批百令胶囊样品的供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定并计算,结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取溶剂考察 本文曾考察以水, 10% 甲醇,

表 2 百令胶囊中 5 种腺苷类成分的含量测定

Table 2 Determination of five nucleosides in Bailing capsule

样品	称样量 /g	含量 mg/粒				
		尿苷酸	尿苷	腺苷酸	鸟苷	腺苷
S1	0.201 4	0.236 2	0.294 4	0.279 7	0.326 4	0.355 9
S2	0.202 4	0.226 0	0.259 5	0.277 0	0.274 9	0.312 8
S3	0.203 6	0.268 0	0.308 6	0.283 9	0.368 9	0.404 3
S4	0.200 6	0.211 4	0.311 2	0.215 1	0.332 9	0.367 9
S5	0.202 3	0.274 3	0.294 5	0.310 9	0.354 3	0.390 4
S6	0.201 4	0.216 4	0.227 8	0.234 3	0.236 7	0.297 5
S7	0.206 2	0.221 9	0.259 9	0.224 6	0.260 6	0.316 7
S8	0.201 7	0.196 7	0.250 5	0.210 9	0.245 5	0.289 9
S9	0.210 3	0.237 3	0.238 8	0.272 9	0.241 1	0.289 8
S10	0.209 4	0.297 5	0.249 1	0.372 4	0.296 8	0.339 1
S11	0.208 0	0.318 3	0.219 3	0.432 6	0.271 9	0.299 5
S12	0.506 1	1.016 0	0.759 2	1.265 0	0.871 0	1.024 5
S13	0.502 8	0.889 0	0.683 3	1.101 0	0.790 6	0.874 1
S14	0.503 5	0.805 5	0.748 6	0.951 6	0.857 5	0.950 5
S15	0.501 3	0.7942	0.6594	0.943 0	0.758 4	0.857 2
S16	0.501 9	0.9019	0.7108	1.195 0	0.807 1	0.951 9
S17	0.503 1	0.9289	0.7517	1.141 0	0.871 0	0.100 0
S18	0.501 1	0.7773	0.7921	0.936 4	0.960 1	0.989 5
S19	0.501 6	0.7023	0.7555	0.924 7	0.850 0	0.901 3
S20	0.503 4	0.8151	0.6489	1.001 0	0.745 8	0.855 9

注:S1 ~ S11 规格为 0.2 g/粒,S12 ~ S20 规格为 0.5 g/粒。

70% 甲醇和甲醇为提取溶剂,发现以水和 10% 甲醇为提取溶剂时,尿苷酸、腺苷酸含量逐渐下降,尿苷、鸟苷、腺苷含量则逐渐升高,可能与核苷酸在水和低浓度甲醇中容易酶解为核苷有关。以 70% 甲醇为提取溶剂时,各成分较稳定,且提取效率优于甲醇,故选择以 70% 甲醇为提取溶剂。

3.2 检测波长及流动相选择 采用二极管阵列检测器记录 200 ~ 400 nm 的光谱图,发现尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷、腺苷均在 260 nm 处有最大吸收且干扰峰均较少,故选择 260 nm 作为检测波长。考察了甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液、乙腈-0.04 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液洗脱系统,结果甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液梯度洗脱条件色谱峰分离良好,故确定为流动相。

3.3 色谱柱及柱温的考察 比较了 Ocra-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),Venusil MP-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),Ultimate AQ-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),Sepax HP-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),结果除 Ocra-C₁₈ 柱有拖尾现象外,其余均分离良好。另比较了柱温 20,25,30,35 ℃,结果不同温度下,样品均可较好分离。

由图 2 和表 2 可知,百令胶囊中的尿苷酸和腺苷酸含量较高,且明显高于其余 4 种发酵虫草制剂,具有一定的专属性。说明同时测定尿苷酸、尿苷、腺苷酸、鸟苷、腺苷 5 种核苷类成分的含量,可以为更有效地控制百令胶囊的质量并区分其他发酵虫草菌粉制剂提供科学实验依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:681.

[2] 张智,谢意珍,李森柱,等. 冬虫夏草研究进展[J]. 微生物学杂志,2002,22(5):51-54.

[3] Ribeiro J A. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system [J]. Pharmacol Toxicol, 1995,77(5):299-305.

[4] 李学全,吴小红. 百令胶囊中甘露醇及腺苷含量测定方法的改进[J]. 中国药师,2010,13(5):683-684.

[5] 祝明,金樟照,陈勇,等. 百令胶囊的指纹图谱鉴别研究[J]. 中成药,2007,29(9):1254-1256.

[6] 张萍,肖新月,李远科. 5 种发酵虫草制剂中核苷及碱基成分的分析[J]. 药物分析杂志,2009,29(6):889-893.

[7] Pagratis N C, Bell C, Chang Y F, et al. Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-dxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor [J]. Nat Biotechnol, 1997,15(1):68-73.

[8] Kubik M F, Bell C, Fitzwater T, et al. Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro/amino-modified RNA ligand to human IFN-gamma that inhibit receptor binding[J]. J Immuno, 1997,159(1):259-267.

[9] King D J, Ventura D A, Brasier A R, et al. “Novel combinatorial selection of phosphorothioate oligonucleotide aptamers” [J]. Biochem, 1998,37(47):16489-16493.

[责任编辑 顾雪竹]