

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.09

高效液相色谱法测定板蓝根颗粒中腺苷的含量

王亚芳¹, 钟昆芮¹, 李应超¹, 周艳飞¹, 张小飞¹,
高 婷¹, 秦俊杰^{2,3}, 王海军^{2,3}, 战 皓^{2,3*}

(1.北京市兽药监察所, 北京 100107; 2.北京生泰尔生物科技有限公司, 北京 102206; 3.北京市中兽药工程技术研究中心, 北京 102206)

[收稿日期] 2017-12-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 07-0059-05 [中图分类号] S853.74

[摘 要] 建立了兽用板蓝根颗粒中腺苷含量测定的高效液相色谱法。以 Symmetry C18 柱为固定相, 甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (10 : 90) 为流动相, 检测波长 260 nm, 流速为 1.2 mL/min, 柱温 30 ℃。采用外标法定量计算含量。腺苷的线性范围为 4~20 μg/mL, 回归方程 $y = 71169x - 6732$, $R^2 = 0.9999$; 平均回收率 96.62%, RSD 为 1.08%。方法操作简单、精密度高、稳定性好, 测定结果准确可靠, 可用于板蓝根颗粒中腺苷的质量控制。

[关键词] 腺苷; 板蓝根颗粒; 高效液相色谱法; 质量控制

Determination of Adenosine in Banlangen Granule by HPLC

WANG Ya-fang¹, ZHONG Kun-rui¹, LI Ying-chao¹, ZHOU Yan-fei¹, ZHANG Xiao-fei¹,
GAO Ting¹, QIN Jun-jie^{2,3}, WANG Hai-jun^{2,3}, ZHAN Hao^{2,3*}

(1. Beijing Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100107, China; 2. Beijing Centre Biology Co. Ltd., Beijing 102206, China;

3. Beijing Veterinary Drugs Engineering Research Center, Beijing 102206, China)

Corresponding author: ZHAN Hao, E-mail: zhan_haohao@sina.com

Abstract: A method was developed to determine the content of Adenosine in Banlangen Granule by HPLC, with Symmetry C18 column as stationary phase, mobile phase was methyl alcohol-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (10 : 90), detection wavelength was 260 nm, flow rate was 1.2 mL/min, and column temperature was 30 ℃. It was quantified by external standard method and adenosine in sample quantity is 4~20 μg/mL range, show a good linear relationship, $y = 71169x - 6732$ ($R^2 = 0.9999$). The recovery was 96.62%, RSD was 1.08%. This method is simple and accurate with good stability, it is suitable for determining the content of Adenosine in Banlangen Granule.

Key words: Adenosine; Banlangen Granule; HPLC; quality control

板蓝根为十字花科植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 的干燥根, 具有清热解毒、凉血利咽的功效,

主要包括吲哚类、喹唑酮类、芥子苷类、有机酸类和核苷类等化合物^[1-3]。板蓝根颗粒由单味药材板蓝

作者简介: 王亚芳, 高级工程师, 从事兽药质量控制方面工作。

通讯作者: 战 皓。E-mail: zhan_haohao@sina.com

根经提取、浓缩、加工而成,根据《中国药典》2015 版一部中板蓝根颗粒处方提取制备成便于临床应用的新兽用产品,清热解毒,凉血利咽,用于治疗鸡传染性法氏囊病,猪风热感冒等症。兽用板蓝根颗粒市场基数大,如果在原材料收购、饮片加工和成药生产过程中有不规范环节,会导致产品质量参差不齐,无法保证药效。因此,需要制定一种质量标准对板蓝根颗粒的产品质量进行控制。

板蓝根中核苷类成分,尤其是腺苷,具有抗炎、抗凝血、扩张冠状动脉、松弛支气管平滑肌、镇静中枢神经和抗心律不齐的作用,可以通过参与并干扰细菌病毒的基因表达过程,从而起到一定的抗病毒作用^[4-7]。《中国药典》中仅以亮氨酸、精氨酸为对照作为定性鉴别项,无质量控制标准。为了更好的控制板蓝根颗粒的质量,将活性成分腺苷作为指标性成分,对其含量测定方法进行研究,为进一步完善板蓝根颗粒的质量控制提供了依据。

1 材 料

1.1 仪器 Waters1525 高效液相色谱仪,2487 双通道可调波长紫外检测器,美国 waters 公司;Symmetry C18 柱(5 μm,250 mm×4.6 mm),美国 waters 公司;KQ-500B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试药 板蓝根颗粒批号:080305、080307、080310、080312、080315、080317、080320、080322、080324、080326,北京生泰尔技术研究院试制产品;腺苷对照品,批号:110879-200202,购于中国药品

生物制品检定所;甲醇(色谱纯);双蒸水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Symmetry C18 柱(5 μm,250 mm×4.6 mm);流动相:甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(10:90);检测波长:260 nm;流速:1.2 mL/min;柱温:30 ℃。

2.2 对照品溶液的制备 称取腺苷对照品约 10 mg,精密称定,置 50 mL 的容量瓶中,加水溶解并定容至刻度,滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物,研细,精密称定 2 g,置具塞三角瓶中,加 20 mL 水超声处理 15 min,取出,放置至室温,过滤,滤液转移至 25 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.4 线性关系考察 精密量取腺苷对照品储备液,逐级稀释得到浓度分别为 4、8、12、16、20 μg/mL 的溶液,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过。按上述色谱条件分别进样 20 μL,测定峰面积。以腺苷浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果显示腺苷浓度在 4~20 μg/mL 内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程 $y = 71169x - 6732$, $R^2 = 0.9999$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取腺苷对照品溶液 20 μL,在上述色谱条件下重复进样 6 次,测定峰面积,并计算相对标准偏差(RSD),试验结果见表 1。经过计算,RSD=0.06%,表明该方法精密度良好。

表 1 精密度试验测定结果 (n=6)
Tab 1 Precision test results (n=6)

编号	进样量/μL	峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	20	519077	518894	0.06
2	20	518661		
3	20	518802		
4	20	519248		
5	20	518430		
6	20	519145		

2.6 重现性试验 称取板蓝根颗粒粉末,在不同实验室分别由 6 个分析人员,平行制备 6 份供试品溶液,分别测定,根据峰面积值,计算腺苷含量及

RSD 值,试验结果见表 2。结果显示腺苷平均含量为 0.184 mg/g,RSD 为 1.50%,表明该方法重现性良好。

表 2 重现性试验结果 (n=6)

Tab 2 Reproducibility test results (n=6)

编号	进样量/ μL	峰面积	含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	平均含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%
1	20	525794	0.187	0.184	1.50
2	20	517189	0.184		
3	20	518965	0.185		
4	20	522392	0.186		
5	20	502834	0.179		
6	20	518369	0.185		

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进行测定。根据峰面积值,计算腺苷含量及 RSD 值,见表 3。结果显

示腺苷平均含量 0.180 mg/g,RSD 为 0.43%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

表 3 稳定性试验结果 (n=6)

Tab 2 Stability test results (n=6)

编号	进样时间/h	进样量/ μL	峰面积	含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	平均含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%
1	0	20	503456	0.179	0.180	0.43
2	2	20	504583	0.180		
3	4	20	508328	0.181		
4	6	20	503789	0.179		
5	8	20	507392	0.181		
6	12	20	503194	0.179		

2.8 加样回收率试验 取已知含量的板蓝根颗粒样品 6 份,每份约 1.0 g,精密称取,分别精密加入适量腺苷对照品,按上述样品溶液制备方法和色谱条

件测定峰面积,计算腺苷的加样回收率及 RSD 值,结果见表 4。结果显示,腺苷的平均加样回收率为 96.62% (RSD=1.08%)。

表 4 加样回收率实验结果 (n=6)

Tab 4 Experimental results of recovery

编号	样品中的量/ μg	加入的量/ μg	测得的量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	178.46	100	273.64	95.18	96.62	1.08
2	176.45	100	272.75	96.30		
3	172.63	100	269.65	97.02		
4	175.53	100	271.36	95.83		
5	174.63	100	272.64	98.01		
6	176.35	100	273.74	97.39		

2.9 样品测定 取 10 批板蓝根颗粒样品,分别按上述样品溶液制备方法和色谱条件,测定峰面积,计算腺苷含量和 *RSD* 值,含量测定结果见表 5,色谱图见图 1。由表 5 可知,板蓝根颗粒中腺苷的含

量为 0.182 mg/g (*RSD* = 1.52%) ;图 1 所得到的液相色谱图峰型较对称,分离度高,保留时间适当。表明该方法灵敏度高、重现性好且稳定。

表 5 板蓝根颗粒中腺苷含量测定结果 (*n* = 3)

Tab 5 Determination of adenosine content in Banlangen Granule(<i>n</i> = 3)					
批号	样品 1/(mg · g ⁻¹)	样品 2/(mg · g ⁻¹)	样品 3/(mg · g ⁻¹)	平均含量/(mg · g ⁻¹)	<i>RSD</i> /%
080305	0.178	0.179	0.180	0.182	1.52
080307	0.179	0.178	0.181		
080310	0.179	0.178	0.179		
080312	0.184	0.185	0.183		
080315	0.187	0.186	0.188		
080317	0.182	0.183	0.184		
080320	0.183	0.184	0.181		
080322	0.179	0.181	0.180		
080324	0.180	0.182	0.180		
080326	0.184	0.184	0.183		

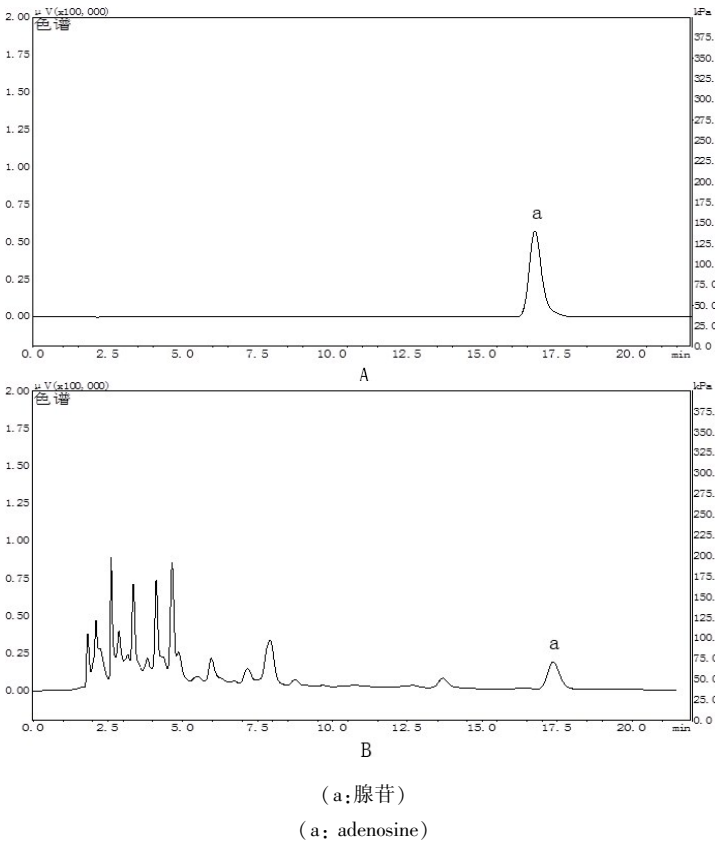


图 1 腺苷对照品 (A) 及供试品溶液 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of adenosine (A) and sample (B) of Banlangen Granule

3 讨论与结论

3.1 流动相比比例的考察 研究分别考察了甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液以 12 : 88, 10 : 90 比例下的色谱效果。当甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液比例为 12 : 88 时,腺苷的保留时间为 15.8 min,但色谱峰容易受到杂质峰干扰;将比例稍作调整,当比例为 10 : 90 时,腺苷保留时间为 17.3 min,腺苷峰分离度高,故选择流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(10 : 90)。

3.2 流速的考察 分别以流速 0.8、1、1.2 mL/min 进行优选,当流速为 0.8 mL/min 时,腺苷的保留时间为 27.3 min,出峰较慢;当流速为 1.0 mL/min 时,腺苷保留时间为 20.9 min,出峰时间较理想,但有拖尾现象;当流速为 1.2 mL/min 时,腺苷的保留时间为 17.3 min,腺苷峰分离度高且保留时间适宜,故选择流速为 1.2 mL/min。

3.3 测定结果分析 对 10 批板蓝根颗粒样品中腺苷的含量进行了测定,由测定结果可知,同一批样品腺苷含量较稳定,且 10 批样品腺苷含量范围为 0.178 ~ 0.188 mg/g,表明板蓝根颗粒制备方法稳定、重复性能较好。同时,以相同制备方法和色谱条件对 3 个厂家的兽用板青颗粒中腺苷含量进行检测,结果显示,腺苷含量范围为 0.006 ~ 0.098 mg/g,不同厂家样品中腺苷含量差异显著,其内在质量差异较为明显。

研究所建立的含量测定方法,腺苷与板蓝根颗粒中其他组分可以得到较好的分离,实验操作简单、快速、稳定且重复性良好,同时为板蓝根颗粒的质量控制提供了一种新方法。此外,板蓝根颗粒中有效成分众多,如何更全面的反应板蓝根颗粒的内在质量,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. China Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China volume I 2015 edition[S].
- [2] 孙 巍. 板蓝根的化学成分和药理作用综述[J]. 中国医药指南, 2014, 12(09): 35-36.
Sun W. Summarize of the components and pharmacological action on Radix Isatidis[J]. Guide of China Medicine, 2014, 12(9): 35-36.
- [3] 赵 颖. 板蓝根的主要药理活性概述[J]. 黑龙江科技信息, 2011, (2): 2.
Zhao Y. Overview of major pharmacological activities on Radix Isatidis[J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2011, (2): 2.
- [4] 王九洲, 赵 静. 板蓝根的化学成分、药理作用及在兽医临床上的应用[J]. 养殖技术顾问, 2014, (9): 232.
Wang J Z, Zhao J. Chemical composition, pharmacological action of Radix Isatidis and its clinical application in veterinary medicine [J]. Technical Advisor for Animal Husbandry, 2014, (9): 232.
- [5] 黄家娣. 板蓝根化学成分和药理作用综述[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(15): 197-198.
Huang J D. Summarize of the components and pharmacological action on Radix Isatidis [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2009, 3(15): 197-198.
- [6] 黄 伟, 陈海燕. 板蓝根有效成分抗病毒研究进展[J]. 数理医药学杂志, 2015, 28 (1): 96.
Huang W, Chen H Y. Advances in antiviral research of effective components of the Radix Isatidis [J]. Journal of Mathematical Medicine, 2015, 28 (1): 96.
- [7] 林丽君, 聂黎行, 戴 忠, 等. 板蓝根的研究概况[J]. 中国药业, 2015, 24(21): 1-4.
Lin L J, Nie L X, Dai Z, et al. A survey of the research of Radix Isatidis[J]. China Pharmaceuticals, 2015, 24(21): 1-4.

(编辑:陈 希)