

Simultaneous Determination of Guanosine and Adenosine in Xiangyungantai by HPLC

Zhengming Hu¹, Yinzhou He¹, Yao Chai², Jing Ji², Rui Liu², Jianming Cheng^{2*}

¹Pharmacy Department, Huaian Hospital, Huaian Jiangsu

²College of Pharmaceutical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu

Email: *cjm7895@163.com

Received: Jan. 20th, 2017; accepted: Feb. 1st, 2017; published: Feb. 7th, 2017

Abstract

Objective: To analyze guanosine and adenosine of Xiangyungantai. **Methods:** HPLC, with water and acetonitrile as the mobile phase, at 260 nm, volume flow of 0.5 ml/min, column temperature of 30°C. **Results:** Guanosine and adenosine were measured in six batches of Xiangyungantai by parallel determination, of which the average content of guanosine is 0.1069 mg/g, and adenosine is 0.1112 mg/g. **Conclusion:** This test method is simple, accurate, reproducible, and can be used for detecting the main nucleoside content of Xiangyungantai.

Keywords

Xiangyungantai, HPLC, Guanine, Adenosine

HPLC法同时测定香云肝泰片中鸟苷和腺苷的含量

胡正明¹, 何银舟¹, 柴尧², 嵇晶², 刘睿², 程建明^{2*}

¹江苏省淮安市淮安医院药剂科, 江苏 淮安

²南京中医药大学药学院, 江苏 南京

Email: *cjm7895@163.com

收稿日期: 2017年1月20日; 录用日期: 2017年2月1日; 发布日期: 2017年2月7日

摘要

目的: 分析香云肝泰片中鸟苷及腺苷的含量。 **方法:** 采用高效液相色谱法(HPLC), 以水和乙腈为流动相,

*通讯作者。

文章引用: 胡正明, 何银舟, 柴尧, 嵇晶, 刘睿, 程建明. HPLC法同时测定香云肝泰片中鸟苷和腺苷的含量[J]. 药物资讯, 2017, 6(1): 1-5. <https://doi.org/10.12677/pi.2017.61001>

检测波长为260 nm, 体积流量为0.5 ml/min, 柱温30℃。结果: 通过平行测定, 6个批号香云肝泰片均检出鸟苷及腺苷, 其鸟苷平均含量为0.1069 mg/g, 腺苷平均含量为0.1112 mg/g。结论: 本检验方法简便、准确、重现性好, 可作为香云肝泰片中主要核苷类成分含量的质量检测方法。

关键词

香云肝泰片, 高效液相色谱, 鸟苷, 腺苷

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

香云肝泰片是由香菇菌丝体和云芝菌丝体经水提醇沉制备而成的薄膜衣片, 具有抗癌保肝, 开胃补虚, 增效解毒, 消水退黄等功效, 用于黄疸肋痛, 积聚症瘕, 慢性迁延性肝炎, 慢性活动性肝炎及肿瘤的综合治疗[1]。其主要活性成分为核苷类及蛋白多糖, 原质量标准只有分光光度法测定蛋白多糖的含量[2], 为进一步控制产品质量, 本文采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定鸟苷和腺苷的含量[3][4]。研究结果表明, 本方法灵敏、快速、可靠, 可用于香云肝泰片的质量控制。

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国沃特世公司), Waters 2489 UV 检测器(美国沃特世公司), TGL-16G 型高速离心机(宜兴市华鼎机械有限公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(深圳市利兴隆机电设备有限公司), BP-211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

2.2. 试剂

香云肝泰片, 南京老山药业股份有限公司。鸟苷、腺苷购自于美国 Sigma 公司, 纯度均大于 99%, 乙腈, 甲醇均为色谱纯, 水为二次纯蒸馏水。

3. 方法与结果

色谱条件

色谱柱: xBridge-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm); 柱温: 30℃; 流动相: A 为乙腈, B 为水, 梯度洗脱条件见表 1; 检测波长: 260 nm; 流速: 0.5 ml/min。进样量: 10 μL。

Table 1. Gradient elution condition

表 1. 梯度洗脱条件

时间(min)	A%	B%
0	2	98
24	15	85
25	40	60
30	40	60

4. 溶液制备

4.1. 对照品溶液制备

精密称取鸟苷对照品 1.02 mg，腺苷对照品 1.07 mg 分别置于 10 ml 容量瓶中，用 50% 甲醇溶液溶解，定容至刻度，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，即得。

4.2. 混合对照品溶液制备

分别精密吸取上述鸟苷，腺苷对照品溶液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中，用 50% 甲醇溶液定容至刻度，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，即得尿苷，鸟苷，腺苷的混合对照品溶液。

4.3. 供试品溶液制备[4]

取香云肝泰片，研磨成细粉，称取该粉末约 0.5 g，精密称定，置于 50 ml 具塞锥形瓶中，精密加入 10 ml 的 50% 甲醇溶液，称定重量，摇匀，密塞，超声提取 2 h (功率 500 W，频率 24 KHz)，静置放冷，用 50% 甲醇溶液补减失的重量，高速离心(12,000 r/min)10 分钟，取上清液过 0.22 μm 滤膜，即得。

5. 系统适应性考察

5.1. 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL ，按上述色谱条件进行测定，记录鸟苷，腺苷的峰面积。以进样量为横坐标，峰面积为纵坐标，计算回归方程。结果鸟苷的回归方程为： $Y = 6497680.67 X - 9663.40$ ($R^2 = 0.9995$)，线性范围：0.0204~0.1224 μg ；腺苷的回归方程为： $Y = 10429839.79 X - 32641.00$ ($R^2 = 0.9995$)，线性范围：0.0214~0.1284 μg 。

5.2. 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 5 μL ，按上述色谱条件连续测定 6 次，记录鸟苷、腺苷的峰面积，结果鸟苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 0.79% 和 0.45%，说明本方法精密度良好。

5.3. 重复性试验

取香云肝泰片 6 片，按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液，精密吸取供试品溶液 10 μL ，按上述色谱条件进行测定，记录峰面积，计算含量，结果鸟苷、腺苷重复性的 RSD 分别为 0.60% 和 0.71%，说明本方法重复性良好。

5.4. 稳定性试验

按供试品溶液制备方法制备一份供试品溶液，精密吸取供试品溶液 10 μL ，按上述色谱条件分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 进行测定，记录峰面积，结果鸟苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 0.52% 和 0.35%，说明供试品溶液在 5 h 内稳定。

5.5. 加样回收率试验

取香云肝泰片，研磨成细粉，称取该粉末约 0.5 g，精密称定，置于 50 ml 具塞容量瓶中，分别精密吸取 0.4 ml, 0.5 ml, 0.6 ml 的鸟苷、腺苷混合对照品溶液加入到锥形瓶中，平行 2 份，再用 50% 甲醇溶液补足至 10 ml，称定重量，摇匀，密塞，超声提取 2 h，静置放冷，用 50% 甲醇溶液补减失的重量，高速离心(12,000 r/min) 10 分钟，取上清液过 0.22 μm 滤膜，制成供试品溶液 6 份，精密吸取供试品溶液 10 μL ，按上述色谱条件测定，记录峰面积，计算含量。结果见表 2，鸟苷的平均回收率为 101.01%，RSD

为 1.81%，腺苷的平均回收率为 100.34，RSD 为 2.99%，说明本法回收率良好。

5.6. 样品含量测定结果

现阶段，核苷类物质的含量测定主要采用紫外分光光度法[5]、薄层色谱法[6]、高效液相色谱法[7] [8] 和毛细管电泳法[9] [10]。本文采用 HPLC 法测定香云肝泰片中主要核苷类成分鸟苷及腺苷的含量(如图 1)。取 6 批样品，按照上述供试品溶液的制备方法制备供试品，依上述色谱条件测定含量，分别进样 10 μ L。计算样品中鸟苷及腺苷含量(结果见表 3)。该方法简便、易操作，结果准确、重现性好，可作为香云肝泰片的质量控制方法。

Table 2. Results of sample recovery

表 2. 加样回收试验测定结果

成分	样品含量/ μ g	加标量/ μ g	实测量/ μ g	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
鸟苷	0.0553	0.0408	0.0975	103.29	101.01	1.81
	0.0553	0.0408	0.0968	101.82		
	0.0553	0.0510	0.1075	102.33		
	0.0553	0.0510	0.1064	100.30		
	0.0553	0.0612	0.1166	100.05		
	0.0554	0.0612	0.1155	98.24		
腺苷	0.0548	0.0428	0.0991	103.44	100.34	2.99
	0.0547	0.0428	0.0991	103.70		
	0.0548	0.0535	0.1068	97.23		
	0.0547	0.0535	0.1067	97.17		
	0.0548	0.0642	0.1201	101.73		
	0.0548	0.0642	0.1182	98.73		

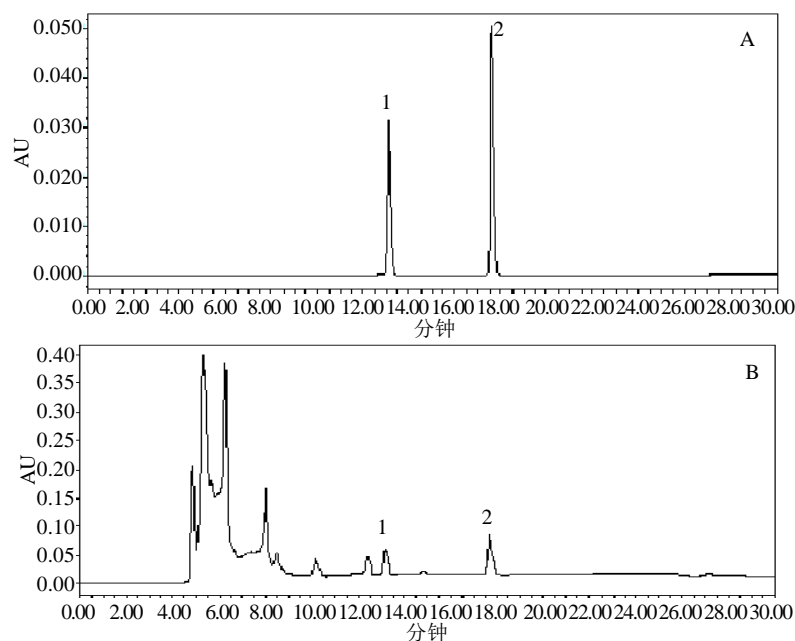


Figure 1. A: Chromatogram of mixed controls: 1 Guanosine 2 Adeosine; B: Chromatogram of samples

图 1. A 为混合对照品色谱图: 1. 鸟苷; 2. 腺苷; B 为样品色谱图

Table 3. Results of content of Xiangyungantai
表 3. 香云肝泰片样品含量检测结果

批号	药品重(g)	鸟苷(mg/g)	腺苷(mg/g)
130526	0.5001	0.1106	0.1109
130622	0.4999	0.1080	0.1109
130711	0.5003	0.1093	0.1115
130723	0.5002	0.1090	0.1114
130904	0.4997	0.1107	0.1115
131227	0.4995	0.1103	0.1109
平均	0.5000	0.1096	0.1112
RSD (%)		0.97	0.29

6. 讨论

1) 鸟苷和腺苷在 260 nm 处均有中等强度的吸收峰, 故选择 260 nm 为检测波长。

2) 实验中比较了回流和超声提取, 结果超声提取简便快捷; 考察了水、不同浓度乙醇和甲醇等几种溶剂, 结果 50% 甲醇提取率最高。

3) 根据所测 6 批香云肝泰片样品的含量结果, 鸟苷的平均含量为 0.1096 mg/g, 腺苷的平均含量为 0.1112 mg/g, 暂定香云肝泰片中鸟苷含量不得少于 0.10 mg/g, 腺苷含量不得少于 0.11 mg/g。

参考文献 (References)

- [1] 吴迎辉. 高效液相法测定香云肝泰片中麦角甾醇的含量[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(21): 125.
- [2] 陈乃华, 张蕾翠, 纪卫. 醇沉时间对香云肝泰片多糖测定的影响[J]. 江苏药学与临床研究, 1996, 4(4): 64.
- [3] Ji, J., Chen, S.-Y., Liu, R., *et al.* (2013) Development and Application of a Method for Determination of Nucleosides and Nucleobases in *Matracta veneriformis*. *Nature Product Research*, **34**, 96-102.
- [4] 姚静倩, 吴皓, 王令充, 等. HPLC 测定三角帆蚌中主要核苷类成分的含量[J]. 中国海洋药物, 2009, 28(4): 31-34.
- [5] 徐汝明, 陆阳, 陈泽乃, 等. 紫外分光光度法测定贝母中腺苷, 胸苷含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 22(9): 682-683.
- [6] Wang, J., Wang, Y.-T. and Li, S.-P. (2007) Simultaneous Determination of Five Nucleosides and Nucleobases in Panax Notoginseng Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, **16**, 79-83.
- [7] 黄兰芳, 郭方道, 梁逸曾, 等. HPLC-ESI-MS 测定冬虫夏草和蚕蛹虫草中腺苷和虫草素含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 762-764.
- [8] Guo, S., Duan, J.-A., Tang, Y.-P., *et al.* (2010) Characterization of Nucleosides and Nucleobases in Fruits of *Ziziphus Jujube* by UPLC-DAD-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 10774-10780.
<https://doi.org/10.1021/jf102648q>
- [9] 李进, 冯成强, 倪雪梅, 等. 毛细管电泳法测定青海不同产地冬虫夏草核苷类的含量[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(14): 1105-1107.
- [10] 郭怀忠, 陈蓉, 李芳, 等. 毛细管区带电泳法测定板蓝根注射液中四种核苷的含量[J]. 色谱, 2004, 22(5): 539-542.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：pi@hanspub.org