

## 技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000056

## 超高效液相色谱法同时测定抗病毒口服液中 3 种核苷的含量

何 丹<sup>1</sup>, 杨 林<sup>2</sup>, 况 刚<sup>3</sup>, 张景勍<sup>4</sup>(1. 重庆医科大学药学院药物分析教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市食品药品检验所化学室, 重庆 401121;  
3. 重庆市食品药品检验所中药室, 重庆 401121; 4. 重庆医科大学药学院药剂学教研室, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**建立以超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定抗病毒口服液中尿苷、鸟苷和腺苷含量的方法。**方法:**色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  50 mm), 流动相为水-甲醇不同比例梯度洗脱, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 流速 0.5 ml/min, 检测波长为 254 nm。**结果:**尿苷在 2.033~20.33  $\mu$ g/ml 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为:  $Y=80\ 664X-1\ 046$  ( $r=0.999\ 9$ ); 平均回收率为 98.56%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)=1.21%, 鸟苷在 1.248~12.48  $\mu$ g/ml 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为:  $Y=55\ 261X-742$  ( $r=0.999\ 9$ ); 平均回收率为 98.77%, RSD=1.09%, 腺苷在 1.254~12.54  $\mu$ g/ml 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为:  $Y=52\ 155X-480$  ( $r=0.999\ 9$ ); 平均回收率为 98.88%, RSD=1.22%。**结论:**该方法准确、快速、可靠, 能有效地测定抗病毒口服液中 3 种核苷的含量。

**【关键词】**超高效液相色谱法; 抗病毒口服液; 核苷**【中图分类号】**R917**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-23

## Determination of the content of three nucleosides in Kangbingdu oral liquid by ultra performance liquid chromatography

He Dan<sup>1</sup>, Yang Lin<sup>2</sup>, Kuang Gang<sup>3</sup>, Zhang Jingqing<sup>4</sup>(1. Teaching and Research Section of Pharmacy Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University;  
2. Department of Chemical Pharmacy, Chongqing Institute for Food and Drug Control; 3. Department of Herbs,  
Chongqing Institute for Food and Drug Control; 4. Teaching and Research Section of Pharmaceutics,  
College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for detecting content of uridine, guanosine and adenosine in Kangbingdu oral liquid. **Methods:** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  50 mm) was used and the mobile phase was methanol and water by gradient elution mode; column temperature was 30  $^{\circ}$ C, at a flow rate of 0.5 ml/min and detection wavelength of 254 nm. **Results:** The linear range of uridine was 2.033–20.33  $\mu$ g/ml and the regression equation was as follows:  $Y=80\ 664X-1\ 046$  ( $r=0.999\ 9$ ). The linear range of guanosine was 1.248–12.48  $\mu$ g/ml and the regression equation was as follows:  $Y=55\ 261X-742$  ( $r=0.999\ 9$ ). The linear range of adenosine was 1.254–12.54  $\mu$ g/ml and the regression equation was as follows:  $Y=52\ 155X-480$  ( $r=0.999\ 9$ ). The average recovery rates were 98.56% (RSD=1.21%), 98.77% (RSD=1.09%) and 98.88% (RSD=1.22%) respectively. **Conclusions:** The method is accurate, rapid and reliable and can be used to determine the nucleoside compounds in Kangbingdu oral liquid.

**【Key words】**ultra performance liquid chromatography; Kangbingdu oral liquid; nucleoside

抗病毒口服液是由板蓝根、石膏、芦根、生地、黄、郁金、知母、石菖蒲、广藿香、连翘等 9 味药材组成的复方口服制剂, 具有清热祛湿、凉血解毒的功效, 对于风热感冒及上呼吸道感染、流感、腮腺炎等病毒感染疾患较好的疗效<sup>[1]</sup>, 是常用的中药复方制剂。目前对抗病毒口服液的含量测定多见于连翘苷、芒果苷、菝葜皂苷元以及绿原酸等的测定<sup>[2-4]</sup>, 未见 3 种核苷类成分同时测定的研究报道。板蓝根别

名为靛青根, 具有清热解毒、凉血消肿、利咽之功效。核苷类成分是板蓝根药材中含量较高的活性成分之一, 药理活性明确<sup>[5-6]</sup>, 常常是中成药抗病毒的活性成分之一。目前关于中药材及中成药中核苷类成分的测定方法的文献报道主要是采用高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>, 很少采用超高效液相色谱法 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 法测定。本文采用 UPLC 法同时对抗病毒口服液中的尿苷、鸟苷及腺苷进行含量测定。该方法高效、快速, 重复性和精密性良好, 适用于抗病毒口服液中 3 种核苷类成分的同时测定。

作者介绍: 何 丹, Email: ildocor@163.com,

研究方向: 药物分析。

通信作者: 张景勍, Email: zjqrae01@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000056.html>

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司);AG 135 型电子分析天平(瑞士 Mettler toledo 公司);抗病毒口服液(批号20120501;20120425;20120603,杭州老桐君制药有限公司);尿苷对照品(纯度:98%,批号:100635-200401,中国食品药品检定研究院);鸟苷对照品(纯度:98%,批号:12111835,上海同田生物有限公司);腺苷对照品(纯度:98%,批号:110879-200202,中国食品药品检定研究院)。甲醇为色谱纯(山东禹王实业总公司化工厂),实验用水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

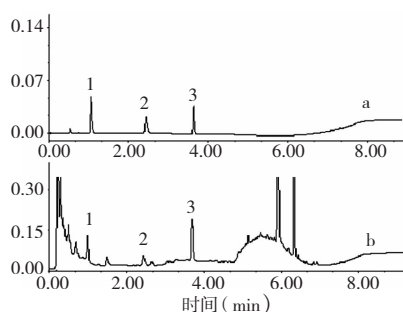
### 1.2 色谱条件与系统适用性

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm);柱温:30 ℃;流动相为水-甲醇按表 1 梯度洗脱;检测波长 254 nm;流速 0.5 ml/min;进样量 0.5 μl,在此条件下,尿苷,鸟苷和腺苷的保留时间分别为 0.97、2.29 min 和 3.43 min,与其他组分分离良好,分离度均大于 1.5,理论塔板数按尿苷计算均大于 5 000,结果见色谱图 1。

表 1 梯度洗脱表

Tab.1 Table of mobile phase gradient elution

| 时间 (min) | 水 (%) | 甲醇 (%) |
|----------|-------|--------|
| 0        | 100   | 0      |
| 1.1      | 100   | 0      |
| 2        | 98    | 2      |
| 3        | 90    | 10     |
| 4        | 85    | 15     |
| 7        | 0     | 100    |
| 8        | 0     | 100    |
| 8.5      | 100   | 0      |
| 11       | 100   | 0      |



a. 混合对照品溶液; b. 抗病毒口服液  
1. 尿苷; 2. 鸟苷; 3. 腺苷

图 1 抗病毒口服液含量测定色谱图

Fig.1 UPLC chromatogram of Kangbingdu oral liquid

### 1.3 对照品储备液的制备

精密称取尿苷对照品 20.33 mg、鸟苷对照品 12.48 mg 和腺苷对照品 12.54 mg,置 100 ml 量瓶中,加少量甲醇溶解,加水稀释至刻度,摇匀,得尿苷浓度为 203.3 μg/ml、鸟苷浓度为 124.8 μg/ml、腺苷浓度为 125.4 μg/ml 的混合对照品储备液。精密吸取上述混合对照品储备液 5 ml,置 50 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得尿苷浓度为 20.33 μg/ml、鸟苷浓度为 12.48 μg/ml、腺苷浓度为 12.54 μg/ml 的混合对照品溶液。

### 1.4 供试品溶液的制备

取批号为 20120501、20120425 和 20120603 的抗病毒口服液适量,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品溶液。

## 2 结果

### 2.1 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 ml,置 10 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。按 1.2 项下色谱条件测定,以峰面积 Y 对浓度 X(μg/ml)进行线性回归。尿苷的回归方程为:Y=80 664X-1 046(r=0.999 9);鸟苷的回归方程为:Y=55 261X-742(r=0.999 9);腺苷的回归方程为:Y=52 155X-480(r=0.999 9)。结果表明,尿苷浓度在 2.033~20.330 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系;鸟苷浓度在 1.248~12.480 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系;腺苷浓度在 1.254~12.540 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.2 精密度试验

取混合对照品溶液,按 1.2 项下方法连续进样 6 次,测定峰面积。结果尿苷、鸟苷和腺苷的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.32%、0.31%和 0.29%。符合精密度试验要求。

### 2.3 稳定性试验

取混合对照品溶液,室温下放置 0、1、2、4、6、8 h,按 1.2 项下色谱条件分别进样 0.5 μl 测定峰面积。结果峰面积基本不变,尿苷、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.29%、0.30%和 0.33%,表明溶液在 8 h 内基本稳定。

### 2.4 重复性实验

取批号为 20120501 抗病毒口服液,按供试品配制方法平行配制 6 份,按 1.2 项下方法进样分析,按外标法以峰面积计算含量,尿苷、鸟苷和腺苷的平均含量分别为 24.19 μg/ml、12.54 μg/ml 和 25.48 μg/ml, RSD 分别为 0.79%、0.89%和 0.44%。

### 2.5 加样回收率试验

取已知含量的抗病毒口服液,精密量取 5 ml,共 27 份,置 10 ml 量瓶中,分别精密加入相当于制剂中尿苷、鸟苷和腺苷含量的 80%、100%和 120%的混合对照储备液,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,按 1.2 项下色谱条件进样 0.5 μl,按外标法计算回收率。结果尿苷、鸟苷和腺苷的平均回收率分别为 98.56%、98.77%和 98.88%, RSD 分别为 1.21%、1.09%和 1.22%,结果见表 2~4。

表 2 尿苷加样回收率测定结果 (n=9)

Tab.2 Average recovery of uridine (n=9)

| 样品中的含量(μg) | 加入量(μg) | 测得量(μg) | 回收率(%) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
|------------|---------|---------|--------|----------|--------|
| 120.95     | 140     | 261.85  | 100.70 |          |        |
| 120.95     | 140     | 257.45  | 97.49  |          |        |
| 120.95     | 140     | 258.95  | 98.56  |          |        |
| 120.95     | 120     | 239.85  | 99.08  |          |        |
| 120.95     | 120     | 237.35  | 97.04  | 98.56    | 1.21   |
| 120.95     | 120     | 239.35  | 98.66  |          |        |
| 120.95     | 100     | 220.50  | 99.55  |          |        |
| 120.95     | 100     | 218.08  | 97.13  |          |        |
| 120.95     | 100     | 219.75  | 98.80  |          |        |

表 3 鸟苷加样回收率测定结果 ( $n=9$ )  
Tab.3 Average recovery of guanosine ( $n=9$ )

| 样品中的<br>含量( $\mu\text{g}$ ) | 加入量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 测得量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 回收率<br>(%) | 平均回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------|------------|
| 62.7                        | 70                       | 132.46                   | 99.65      |              |            |
| 62.7                        | 70                       | 131.93                   | 98.90      |              |            |
| 62.7                        | 70                       | 131.16                   | 97.80      |              |            |
| 62.7                        | 60                       | 122.62                   | 99.87      |              |            |
| 62.7                        | 60                       | 123.06                   | 100.6      | 98.77        | 1.09       |
| 62.7                        | 60                       | 121.31                   | 97.69      |              |            |
| 62.7                        | 50                       | 112.11                   | 98.82      |              |            |
| 62.7                        | 50                       | 111.57                   | 97.74      |              |            |
| 62.7                        | 50                       | 111.64                   | 97.87      |              |            |

表 4 腺苷加样回收率测定结果 ( $n=9$ )  
Tab.4 Average recovery of adenosine ( $n=9$ )

| 样品中的<br>含量( $\mu\text{g}$ ) | 加入量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 测得量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 回收率<br>(%) | 平均回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------|------------|
| 127.4                       | 140                      | 266.9                    | 99.64      |              |            |
| 127.4                       | 140                      | 264.1                    | 97.64      |              |            |
| 127.4                       | 140                      | 264.5                    | 97.93      |              |            |
| 127.4                       | 120                      | 248.6                    | 101.00     |              |            |
| 127.4                       | 120                      | 245.2                    | 98.17      | 98.88        | 1.22       |
| 127.4                       | 120                      | 247.0                    | 99.67      |              |            |
| 127.4                       | 100                      | 227.3                    | 99.86      |              |            |
| 127.4                       | 100                      | 226.0                    | 98.56      |              |            |
| 127.4                       | 100                      | 224.9                    | 97.51      |              |            |

## 2.6 检测限和定量限

取批号为 20120501 抗病毒口服液, 按供试品配制方法配制样品溶液, 按 1.2 项下方法进样分析, 信噪比(signal/noise, S/N)=3 测定检测限, S/N=10 测定定量限。该色谱条件下, 尿苷的检测限为 0.093 ng, 定量限为 0.306 ng, 鸟苷的检测限为 0.089 ng, 定量限为 0.297 ng, 腺苷的检测限为 0.081 ng, 定量限为 0.269 ng。

## 2.7 含量测定

3 批样品按供试品配制方法配制, 按 1.2 项下方法进样分析, 按外标法以峰面积计算含量, 尿苷、鸟苷和腺苷的平均含量见表 5。

表 5 抗病毒口服液含量测定 ( $n=3$ )

Tab.5 Determination of content of Kangbingdu oral liquid ( $n=3$ )

| 批号       | 尿苷( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 鸟苷( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 腺苷( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 20120501 | 24.19                         | 12.54                         | 25.48                         |
| 20120425 | 22.64                         | 13.36                         | 26.61                         |
| 20120603 | 23.79                         | 12.76                         | 26.15                         |

## 3 讨论

UPLC 技术采用 1.7  $\mu\text{m}$  颗粒度色谱柱填料与传统的 5.0  $\mu\text{m}$  颗粒度的色谱柱填料的 HPLC 技术

相比能获得更高的柱效, 并且在更宽的线速度范围内柱保持恒定, 因而有利于提高流动相速度, 缩短分析时间, 提高分析通量<sup>[9]</sup>。同时可显著改善色谱峰的分离度和检测灵敏度<sup>[10]</sup>, 在多成分的中药复方制剂的分析测定和中药指纹图谱研究中应用广泛<sup>[11]</sup>。

《中国药典》2010 版中抗病毒口服液的鉴别项规定连翘苷, 菝葜皂苷元、百秋李醇和石菖蒲药材, 含量测定项规定对连翘苷进行测定, 作为质量控制指标<sup>[1]</sup>。目前国内文献中还未见采用 UPLC 法对抗病毒口服液中的核苷类成分进行含量测定的报道, 而核苷成分药理作用明确, 含量也较高。从本文的研究结果看, UPLC 法测定抗病毒口服液中核苷类成分分离效果好, 方法准确可靠, 可为抗病毒口服液的质量控制提供参考。在研究中当甲醇比例增加后洗脱出含量较大的极性小的成分, 在以后的工作中可做进一步研究, 确定化合物结构并同时测定以上成分。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1335.
- [2] 李芳美, 林朝展, 甄松峰, 等. RP-HPLC 法测定抗病毒口服液中芒果苷和连翘苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(1): 47-49.
- [3] 唐德智. HPLC 法测定复方抗病毒口服液中绿原酸的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(1): 42-43.
- [4] 曾道元, 黎利华. 薄层扫描法测定抗病毒口服液中菝葜皂苷元的含量[J]. 中国药房, 2003, 14(8): 496-497.
- [5] 肖珊珊, 金郁, 孙毓庆. 板蓝根化学成分、药理及质量控制研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(6): 456-458.
- [6] 肖慧, 刘清飞, 王义明, 等. 高效液相法测定板蓝根药材中三种核苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1654-1657.
- [7] 丁兴红. HPLC 法测定蕲蛇中核苷类成分的研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(6): 906-908.
- [8] 王棘, 毕开顺. HPLC 测定宁心宝胶囊中核苷类化合物含量[J]. 中成药, 2008, 30(4): 537-539.
- [9] 杨义芳. 超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1259-1263.
- [10] Trivedi HK, Patel MC. Development and validation of a stability-indicating RP-UPLC method for determination of rosuvastatin and related substances in pharmaceutical dosage form[J]. Scientia Pharm, 2012, 80(2): 393-406.
- [11] Kong WJ, Zhao YL, Xiao HX, et al. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of rhizoma coptidis chinensis based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods[J]. Phytomedicine, 2009, 16(10): 950-959.

(责任编辑: 关蕴良)