

HPLC-DAD 法同时测定苦碟子注射液中 10 种核苷类成分

刘睿, 马思萌, 孙璐, 任晓亮, 李遇伯, 张艳军*

天津中医药大学中药学院, 天津 300193

摘要: 目的 建立同时测定苦碟子注射液中 10 种核苷类成分(胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷)量的 HPLC-DAD 方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱。体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 260 nm, 进样量 10 μL。结果 10 种核苷类成分线性关系、精密度、稳定性、重复性均符合方法学测定要求, 加样回收率为 98.63%~102.92%。应用所建立的方法测定了 18 批苦碟子注射液中 10 种核苷类成分的量。结论 所建立的用于同时测定苦碟子注射液中核苷类成分的分析方法简单、重复性好、准确可靠, 可为苦碟子注射液质量控制提供依据。

关键词: HPLC-DAD; 核苷类化合物; 苦碟子注射液; 质量控制; 嘌呤; 嘧啶

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2542-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.010

Simultaneous determination of ten nucleoside components in Kudiezi Injection by HPLC-DAD

LIU Rui, MA Si-meng, SUN Lu, REN Xiao-liang, LI Yu-bo, ZHANG Yan-jun

College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector (HPLC-DAD) method for the simultaneous determination of ten nucleoside components (cytosine, uracil, cytidine, guanine, uridine, thymine, adenine, guanosine, thymidine, and adenosine) in Kudiezi Injection (KI). **Methods** The analyses were performed on a Diamonsil C₁₈ (2) column (200 mm×4.6 mm, 5 μm) eluted with water and acetonitrile in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was set at 35 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** Ten nucleoside compounds have good linear relationship, precision, stability, and repeatability according to the requirements of the methodology determination. The recoveries were 98.63%–102.9%. Ten nucleoside components in eighteen batches of KI were determined by HPLC-DAD method. **Conclusion** The developed HPLC-DAD method is simple, sensitive, and accurate, and has good repeatability. The ten nucleoside components in KI could be rapidly and accurately quantified by HPLC-DAD. This work provides helpful information for the comprehensive quality evaluation of KI.

Key words: HPLC-DAD; nucleosides; Kudiezi Injection; quality control; purine; pyrimidine

苦碟子别名满天星, 苦荬菜, 主要分布于我国东北及内蒙古等地, 为菊科植物抱茎苦荬菜 *Ixeris sonchifolia* (Bunge) Hance 的当年生干燥全草, 性寒, 味苦、辛, 具有清热解毒、排脓止痛之功效^[1]。苦碟子(碟脉灵)注射液(Kudiezi Injection, KI)是以抱茎苦荬菜单味药材为原料提取精制而成的静脉注射液, 具有活血止痛、清热祛瘀的作用^[2], 用于

瘀血闭阻的胸痹、冠心病、心绞痛、脑梗死等。该注射液已上市多年, 疗效确切, 其处方为抱茎苦荬菜 1 000 g, 制成 1 000 mL 注射液, 规格为每支 10 mL 装。实验研究表明, 苦碟子注射液化学成分比较复杂, 而与其临床疗效相关的主要活性成分为核苷类(nucleoside components)、有机酸类和黄酮类成分^[3]。

收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家科技重大专项课题(2011ZX09401-305-42); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20121210120001); 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20110215)

作者简介: 刘睿(1980—), 女, 博士, 讲师, 主要从事中药注射液安全性再评价及中药新型给药系统研究。

Tel: (022)59596221 E-mail: lr_8000@163.com

*通信作者 张艳军 Tel: (022)59596221 E-mail: zyjsunye@163.com

核苷类成分是生物细胞维持生命活动的基本组成元素,参与DNA代谢过程,通过激活人体中的嘌呤受体发挥多种生理作用^[4-5]。如胞苷(cytidine)具有抗肿瘤和抗病毒等作用;尿苷(uridine)参与糖原合成,有助于提高细胞的耐缺氧能力和机体抗体水平,并可以阻断癌细胞和病毒的基因合成;鸟苷(guanosine)具有免疫调节的生理活性;特别是腺苷(adenosine)具有抗心肌缺血、抗凝血、抗炎、改善心脑血管血液循环、防止心率失常、抑制神经递质释放和调节腺苷酸环化酶活性等作用,是苦碟子注射液质量控制的指标成分^[6]。因此,为了控制产品质量,对苦碟子注射液中的核苷类化合物建立快速、简便、准确的测定方法具有重要的实际意义。

目前,核苷类化合物定量测定方法主要有UV法^[7]、TLC法^[8]、HPLC-MS法^[9]、毛细管电泳法^[10]等。UV法与TLC法特异性较差,HPLC-MS法与毛细管电泳法对仪器要求较高,因此,本实验采用HPLC-DAD技术建立同时测定10种核苷类化合物(5种核苷:尿苷、腺苷、鸟苷、胞苷、胸苷和5种碱基:尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶)的分析方法,并应用该方法测定苦碟子注射液中主要核苷类化合物的量,以期为注射液水溶性成分的进一步研究奠定基础,同时为其质量控制提供方法学参考依据。

1 仪器与材料

Waters-e2695-HPLC系统(美国Waters公司,包括四元梯度泵,在线真空脱气机,自动进样器,2998光电二极管阵列检测器PDA,Empower 2色谱工作站,柱温箱);Sartorius BT125D型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],KH 2200B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

对照品尿嘧啶(批号100469-200401)、腺苷(批号110879-200202)购于中国药品生物制品检定所,胞嘧啶(批号C94998BGF0)、胸腺嘧啶(批号T55620BGF0)、腺嘌呤(批号A73241BGF0)、鸟苷(批号G24210BGQ0)、胸苷(批号T55590BGF0)购于天津希恩思生化科技有限公司,胞苷(批号101056874)、尿苷(批号1001290893)购于Sigma公司,鸟嘌呤(批号HCCTH-BG,上海化成工业发展有限公司),所有对照品经HPLC峰面积归一化法计算质量分数均大于99%。

苦碟子注射液(通化华夏药业有限责任公司提

供,批号120311T、120312T、120314T、120315T、120316T、120317T、129318T、120319T、120312、120532、120109、110601、111011、120438、120625、120209、111105、111218)。乙腈(色谱纯,Sigma公司),甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司),超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的配制

分别精密称取胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷对照品适量,加水超声溶解,摇匀,制成含胞嘧啶0.50 μg/mL、尿嘧啶1.20 μg/mL、胞苷17.50 μg/mL、鸟嘌呤20.00 μg/mL、尿苷40.00 μg/mL、胸腺嘧啶2.50 μg/mL、腺嘌呤10.00 μg/mL、鸟苷50.00 μg/mL、胸苷10.00 μg/mL、腺苷20.00 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的配制

取苦碟子注射液,采用0.45 μm微孔滤膜滤过,作为供试品溶液,待测。

2.3 色谱条件

色谱柱为Diamondsil C₁₈(2)(200 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长260 nm;体积流量1 mL/min;柱温35 °C;进样量10 μL;流动相为乙腈-水,梯度洗脱条件:0~5 min,2%乙腈;5~9 min,2%~9%乙腈;9~15 min,9%~11%乙腈;15~25 min,11%~40%乙腈。

2.4 专属性试验

在“2.3”项色谱条件下,胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的混合对照品溶液和苦碟子注射液供试品溶液的HPLC谱图见图1,混合对照品溶液及苦碟子注射液供试品溶液中10种核苷类成分达到基线分离。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液适量,加水稀释至不同质量浓度,摇匀,制得系列混合对照品溶液,HPLC测定。以峰面积积分值为纵坐标(Y),对照品质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程:胞嘧啶 $Y=33\ 450 X+409.28$, $r=0.999\ 6$;尿嘧啶 $Y=22\ 040 X+1\ 162$, $r=0.999\ 5$;胞苷 $Y=18\ 925 X+2\ 042.4$, $r=0.999\ 9$;鸟嘌呤 $Y=6\ 926.8 X+280.65$, $r=0.999\ 3$;尿苷 $Y=24\ 749 X-4\ 250.2$, $r=0.999\ 9$;胸腺嘧啶 $Y=30\ 395 X+818.91$, $r=$

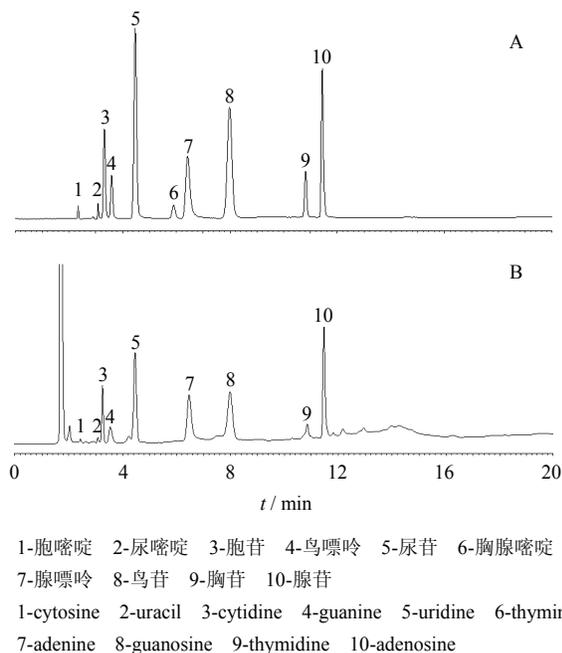


图1 混合对照品 (A) 和苦碟子注射液 (B) HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and KI (B)

0.999 0; 腺嘌呤 $Y=54\ 625 X-7\ 279.1$, $r=0.999\ 9$; 鸟苷 $Y=20\ 168-7\ 737.1$, $r=0.999\ 7$; 胸苷 $Y=20\ 646 X-1\ 227.4$, $r=0.999\ 8$; 腺苷 $Y=32\ 173 X-12\ 900$, $r=0.999\ 5$; 结果表明胞嘧啶在 15.63~500.00 ng/mL、尿嘧啶在 0.037 5~1.20 μg/mL、胞苷在 0.546 9~17.50 μg/mL、鸟嘌呤在 0.625~20.00 μg/mL、尿苷在 1.25~40.00 μg/mL、胸腺嘧啶在 0.078 13~2.50 μg/mL、腺嘌呤在 0.312 5~10.00 μg/mL、鸟苷在 1.562 5~50.00 μg/mL、胸苷在 0.312 45~10.00 μg/mL、腺苷在 0.625~20.00 μg/mL 线性关系良好。

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 其中胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的浓度分别为 0.125、0.300、4.375、5.000、10.00、0.625、2.500、12.50、2.500、5.000 μg/mL, 在“2.3”项色谱条件下, 连续进样 6 次, 记录峰面积。结果胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 1.5%、1.7%、0.3%、0.1%、0.1%、0.5%、0.2%、0.2%、0.2%、0.2%。结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取苦碟子注射液 (批号 120319T), 制备供试品

溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 在“2.3”项色谱条件下, 进样分析, 记录峰面积。结果胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 3.2%、2.8%、3.4%、3.9%、1.9%、3.3%、2.1%、2.0%、2.9%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取苦碟子注射液 (批号 120319T), 按“2.2”项下方法制成供试品溶液, 平行测定 6 次, 在“2.3”项色谱条件下分别测定, 计算每种对照品的色谱峰面积。结果胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的质量浓度分别为 0.763、0.131、2.831、0.438、6.138、1.911、7.123、0.903、4.598 μg/mL; RSD 分别为 3.0%、4.2%、2.3%、4.3%、1.8%、3.7%、0.8%、3.1%、2.2%。结果表明, 该方法的重复性良好。

2.9 回收率试验

精密量取已测定的苦碟子注射液 (批号 120319T) 5.0 mL, 平行 6 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 分别精密加入一定质量浓度的混合对照品溶液 5.0 mL, 其中胞嘧啶 0.14 μg/mL、尿嘧啶 0.27 μg/mL、胞苷 3.10 μg/mL、鸟嘌呤 4.60 μg/mL、尿苷 6.00 μg/mL、胸腺嘧啶 1.20 μg/mL、腺嘌呤 2.90 μg/mL、鸟苷 7.2 μg/mL、胸苷 1.60 μg/mL、腺苷 5.00 μg/mL, 摇匀, 在“2.3”项色谱条件下进样分析, 记录峰面积, 计算加样回收率。结果胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的平均回收率分别为 99.61%、101.08%、101.54%、100.95%、101.53%、102.92%、99.12%、102.14%、98.63%、102.96%, RSD 分别为 2.55%、2.10%、2.61%、2.33%、2.57%、2.27%、1.98%、2.27%、2.54%、0.69%。结果表明, 平均回收率在 98.63%~102.96%, RSD≤2.61%。

2.10 样品测定

取苦碟子注射液适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样分析, 记录峰面积, 用回归方程计算 10 种核苷类化合物的量, 测定结果见表 1。结果表明, 苦碟子注射液中包含除胸腺嘧啶外的其他 9 种核苷类成分, 但是与临床疗效相关的苦碟子注射液质量控制的指标成分腺苷的批间差异较小, 且量较高的鸟苷和尿苷的批间差异不大。

表 1 不同批次苦碟子注射液中核苷类成分测定结果

Table 1 Determination of nucleoside components in KI from different batches

批号	质量浓度 / (μg·mL ⁻¹)										总和
	胞嘧啶	尿嘧啶	胞苷	鸟嘌呤	尿苷	腺嘌呤	鸟苷	胸苷	腺苷	胸腺嘧啶	
120311T	0.09	0.26	2.78	4.94	6.78	3.47	8.05	1.01	5.05	—	32.43
120312T	0.11	0.25	2.74	6.95	6.28	2.33	7.65	0.74	4.39	—	31.44
120314T	0.08	0.23	2.57	4.47	6.11	2.41	7.65	0.75	5.42	—	29.69
120315T	0.11	0.30	2.56	4.83	6.43	2.44	9.16	1.14	4.90	—	31.87
120316T	0.11	0.22	2.91	5.06	7.38	2.90	8.95	1.34	4.87	—	33.74
120317T	0.09	0.29	2.76	6.69	5.53	2.55	7.49	0.84	4.26	—	30.50
129318T	0.11	0.34	2.72	4.66	6.77	2.34	7.64	1.64	4.87	—	31.09
120319T	0.10	0.24	3.32	4.93	6.34	2.42	7.30	1.00	4.46	—	30.11
120312	0.07	1.92	6.62	0.20	4.66	1.28	5.21	0.80	4.34	—	25.10
120532	0.12	2.69	5.86	0.41	6.10	2.05	7.18	1.15	3.87	—	29.43
120109	0.11	2.11	12.20	0.25	5.57	1.55	6.91	0.89	5.51	—	35.09
110601	0.08	1.76	7.75	0.22	4.90	1.38	6.53	0.86	4.28	—	27.76
111011	0.07	1.73	6.15	0.21	4.42	1.04	5.73	0.73	4.06	—	24.16
120438	0.10	2.40	6.23	0.40	5.31	1.96	7.26	0.95	4.33	—	28.93
120625	0.10	1.92	12.51	0.30	4.68	1.34	6.31	0.91	4.89	—	32.96
120209	0.09	1.89	11.68	0.27	5.35	1.69	6.49	0.92	5.30	—	33.69
111105	0.09	1.71	10.08	0.16	4.82	1.18	5.55	0.84	4.32	—	28.75
111218	0.06	1.75	9.89	0.18	4.43	1.14	5.38	0.76	3.97	—	27.55

“—” 未检出
“—” undetected

3 讨论

采用 DAD 检测器进行全波长扫描 (200~400 nm), 分析 10 种核苷类化合物的紫外光谱, 结果表明, 检测波长为 260 nm 时, 10 种化合物均有较强吸收, 且分离效果良好。综合考虑检测时各色谱峰的响应和干扰因素, 最终选择 260 nm 为本实验的检测波长。

核苷类成分呈弱碱性, 极性大, 较难分离。实验中分别对甲醇-水和乙腈-水作为流动相系统进行考察。结果表明, 核苷类成分在乙腈-水梯度洗脱系统的分离效果更好, 且 HPLC-DAD 法操作简便, 核苷类成分在适宜的色谱条件下可以获得理想的分离效果, 在本文选定的色谱条件下, 苦碟子注射液中核苷类物质的色谱峰 15 min 内既可完成分析, 分离效果良好, 该法测定快速、结果准确, 稳定性良好, 是一种测定苦碟子注射液中核苷类成分的可靠方法, 可为苦碟子注射液品质评价体系提供实验依据。

通过对 18 批苦碟子注射液中核苷类成分的分

析, 结果表明, 该注射液中含有 9 种核苷, 其中含量较高的有鸟苷、尿苷、腺苷、鸟嘌呤及胞苷等, 不同批次注射液中各核苷的量具有一定的差异, 但与临床疗效相关的腺苷批间差异较小^[1]。说明以核苷为指标的注射剂生产工艺较为稳定, 也提示应对其他核苷类成分开展相关研究, 以期对苦碟子注射液的质量及安全性进行更加全面的评价。

参考文献

- [1] 高 晟, 周 静. 苦碟子注射液临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 180-184.
- [2] 叶晓勤, 魏 戊, 谢雁鸣, 等. 苦碟子注射液治疗缺血性中风急性期上市后再评价 [J]. 中国新药杂志, 2011, 36(20): 2793-2795.
- [3] 王凤秋, 刘志梅, 张建军, 等. HPLC 法测定辽宁地区苦碟子中腺苷的含量 [J]. 沈阳医学院学报, 2010, 12(2): 110-111.
- [4] 冷玲颖, 蔡志强, 孙铁民. 核苷类抗病毒前药的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(4): 310-316.
- [5] Yang F Q, Li D Q, Feng K, *et al.* Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products

- in *Cordyceps* by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 5501-5510.
- [6] 吴镜湘, 徐美英. 腺苷心肌保护作用研究进展 [J]. 中国心血管杂志, 2002, 7(5): 364-366.
- [7] 徐汝明, 刘海卫, 陆 阳, 等. 双波长紫外分光光度法测定贝母中腺苷和胸苷的含量 [J]. 药学学报, 1997, 32(8): 617-619.
- [8] 马 艳, 汪 宇, 杨光照, 等. 双波长薄层扫描法测定虫草类制剂中核苷类化合物的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2376-2377.
- [9] 黄林芳, 段宝忠, 王丽芝, 等. 川贝母新资源太白贝母中水溶性成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 585-588.
- [10] 杨丰庆, 张雪梅, 葛莉亚, 等. 毛细管电泳-质谱联用法测定灵芝药材中核苷类成分 [J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(4): 337-341.
- [11] 戴锦娜, 尹 然, 陈晓辉, 等. 苦碟子化学成分和药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2006, 21(2): 94-96.