

# HPLC法测定板蓝根颗粒提取物的尿苷、鸟苷及腺苷含量

杨通银, 时宏琴

贵州神奇药业有限公司, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年8月19日; 录用日期: 2022年9月16日; 发布日期: 2022年9月23日

## 摘要

目的: 采用高效液相色谱法(HPLC)建立板蓝根颗粒提取物含量测定的质量控制方法。方法: 采用C<sub>18</sub> 4.6 × 250 mm色谱柱(天津喆分医药科技、中谱科技和谱宁科技), 甲醇和水的梯度洗脱, 流速0.8 ml/min, 检测波长为254 nm, 柱温为30℃。结果: 尿苷在5.05 μg/ml~80.88 μg/ml范围内有良好的线性关系; 鸟苷在5.01 μg/ml~80.08 μg/ml范围内有良好的线性关系; 腺苷在6.23 μg/ml~99.60 μg/ml范围内有良好的线性关系, 尿苷回归方程 $y = 0.8851x - 0.1210$  ( $r^2 = 1.000$ ), 鸟苷回归方程 $y = 1.0852x - 0.1685$  ( $r^2 = 1.000$ ); 腺苷回归方程 $y = 1.6328x - 0.2553$  ( $r^2 = 1.000$ )。尿苷回收率为102.6%, RSD为1.2%; 鸟苷回收率为99.1%, RSD为0.9%; 腺苷回收率为98.8%, RSD为1.0%, 回收率良好。结论: 该方法科学、简便、准确, 能有效控制板蓝根颗粒提取物含量测定的质量。

## 关键词

HPLC, 尿苷, 鸟苷, 腺苷, 板蓝根颗粒提取物

## Determination of Uridine, Guanosine and Adenosine Content by HPLC of Extracts from the Blueroot Pellet

Tongyin Yang, Hongqin Shi

Guizhou Shenqi Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang Guizhou

Received: Aug. 19<sup>th</sup>, 2022; accepted: Sep. 16<sup>th</sup>, 2022; published: Sep. 23<sup>rd</sup>, 2022

## Abstract

**Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) for the quality control

of Radix Isatidis granule extract. Methods: A C<sub>18</sub> 4.6 × 250 mm chromatographic column (Tianjin Zhefen Medicine Science and Technology Co., Ltd., Zhongpu Technology Co., Ltd. and Puning Technology Co., Ltd.), and gradient elution of methanol and water were used, the flow rate was 0.8 ml/min, the detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 30°C. Results: Uridine had a good linear relationship in the range of 5.05 µg/ml~80.88 µg/ml. Guanosine has a good linear relationship in the range of 5.01 µg/ml~80.08 µg/ml. Adenosine ranged from 6.23 µg/ml to 99.60 µg/ml, uridine regression equation  $y = 0.8851x - 0.1210$  ( $r^2 = 1.000$ ), guanosine regression equation  $y = 1.0852x - 0.1685$  ( $r^2 = 1.000$ ); The regression equation of adenosine is  $y = 1.6328x - 0.2553$  ( $r^2 = 1.000$ ). The recovery rate of uridine was 102.6%, RSD was 1.2%. The recovery rate of guanosine was 99.1% and RSD was 0.9%. The recovery rate of adenosine was 98.8%, RSD was 1.0%, and the recovery rate was good. Conclusion: The method is scientific, simple and accurate, and can effectively control the quality of the content determination of Radix Isatidis granule extract.

## Keywords

HPLC, Uridine, Guanosine, Adenosine, Radix Isatidis Granule Extract

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

## 1. 引言

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。秋季采挖, 除去泥沙, 晒干。具有清热解毒, 凉血利咽的功效。用于温疫时毒, 发热咽痛, 温毒发斑, 疮腮, 烂喉丹痧, 大头瘟疫, 丹毒, 痈肿[1][2]。其提取物可用于板蓝根颗粒的生产。是一种常用药。板蓝根颗粒的质量标准药典已有规定, 为了更好的控制板蓝根颗粒的质量标准, 需对板蓝根提取物进行控制。故对板蓝根颗粒提取物中尿苷、鸟苷及腺苷的含量测定方法进行了研究, 为板蓝根颗粒提取物的标准控制提供了科学的数据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 仪器

岛津 LC-2010CHT 高效液相色谱仪; 赛默飞 U3000 高效液相色谱仪; 中谱科技(C<sub>18</sub> 5 µm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱; 月旭科技(上海)股份有限公司(C<sub>18</sub> 5 µm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱; 天津喆分医药科技有限公司(C<sub>18</sub> 5 µm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱; 岛津(中国)有限公司(C<sub>18</sub> 5 µm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱; 赛多利斯 BP211D 电子天平(十万分之一), 赛多利斯 BSA224S 电子天平(万分之一)。

#### 2.1.2. 试剂与试药

尿苷对照品、鸟苷对照品及腺苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110707-201112, 99.4%)、板蓝根药材(甘肃农垦)。甲醇(HPLC), 冰醋酸(分析纯), 甲醇(分析纯)。

#### 2.1.3. 样品制备

取板蓝根 1400 g, 加水煎煮二次, 第一次 2 小时, 第二次 1 小时, 煎液滤过, 滤液合并, 浓缩至相对密度约为 1.20 (50°C)的清膏, 加乙醇使含醇量达 60%, 静置使沉淀, 取上清液, 回收乙醇并浓缩至相

对密度为 1.10, 再蒸发至相对密度为 1.20 即得[1]。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 溶液的制备

1) 对照品溶液的制备: 取尿苷对照品、鸟苷对照品及腺苷对照品适量, 精密称定, 加 5% 甲醇制成每 1 ml 含尿苷 20  $\mu\text{g}$ 、鸟苷 20  $\mu\text{g}$ 、腺苷 25  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 即得。

2) 供试品溶液的制备: 称取本品 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 5% 甲醇 10 ml, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 5 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 5% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得[1]。

### 2.2.2. 色谱条件的选择

采用  $\text{C}_{18}$  4.6  $\times$  250 mm 色谱柱(天津喆分医药科技、中谱科技和月旭科技), 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ , 流动相: 甲醇为流动相 A, 以水为流动相 B, 按下表中的规定进行梯度洗脱(表 1); 流速为每分钟 0.8 ml, 测定效果较好。理论板数按尿苷峰计算应不低于 10,000 [3] [4]。

Table 1. Mobile phase

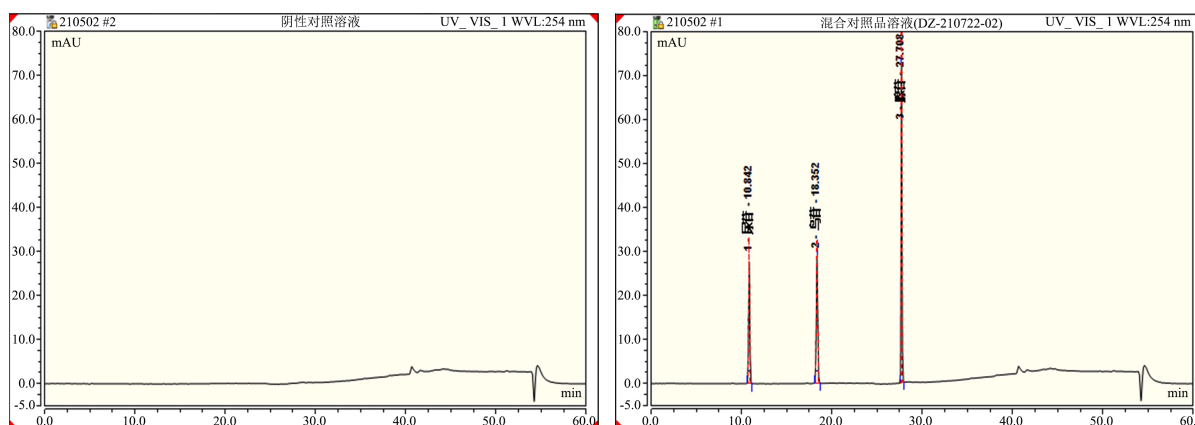
表 1. 流动相

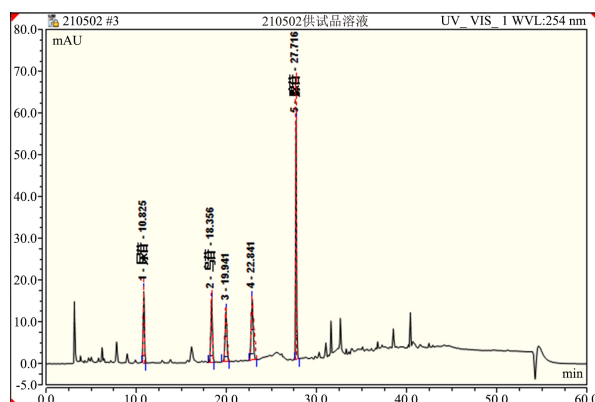
时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~3	3	97
3~20	3 $\rightarrow$ 10	97 $\rightarrow$ 90
20~40	10 $\rightarrow$ 70	90 $\rightarrow$ 30
40~50	70	30

## 3. 方法学验证

### 3.1. 专属性试验

标准制备工艺条件下, 制备缺板蓝根的阴性样品。按上述色谱条件检测, 阴性样品未见吸收峰; 测定样品中尿苷、鸟苷及腺苷对照品的保留时间, 与对照品溶液中尿苷、鸟苷及腺苷的保留时间一致(见图 1)。





**Figure 1.** Negative sample uridine, guanosine and adenosine reference substance sample

**图 1.** 阴性样品尿苷、鸟苷及腺苷对照品样品

### 3.2. 系统适用性试验

按上述色谱条件测定板蓝根提取物中尿苷、鸟苷及腺苷的含量, 尿苷、鸟苷及腺苷峰拖尾因子、分离度符合要求。尿苷的理论板数不低于 10,000。

### 3.3. 线性关系的考察

取尿苷对照品 10.11 mg、鸟苷对照品 10.01 mg 及腺苷对照品 12.45 mg, 精密称定, 置 50 ml 容量瓶中, 加 5% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备液, 分别精密量取上述对照品贮备液溶液适量, 制成每 1 ml 含尿苷为 5.05  $\mu\text{g}$ 、10.11  $\mu\text{g}$ 、20.22  $\mu\text{g}$ 、40.44  $\mu\text{g}$ 、80.88  $\mu\text{g}$ ; 鸟苷为 5.00  $\mu\text{g}$ 、10.01  $\mu\text{g}$ 、20.02  $\mu\text{g}$ 、40.04  $\mu\text{g}$ 、80.08  $\mu\text{g}$ ; 腺苷为 6.23  $\mu\text{g}$ 、12.45  $\mu\text{g}$ 、24.90  $\mu\text{g}$ 、49.80  $\mu\text{g}$ 、99.60  $\mu\text{g}$  的混合对照品溶液, 分别精密吸取 10  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度  $x$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 为横坐标, 峰面积  $y$  (mv) 纵坐标, 作图。尿苷回归方程  $y = 0.8851x - 0.1210$ , 相关系数  $r^2 = 1.000$ ; 鸟苷回归方程  $y = 1.0852x - 0.1685$ , 相关系数  $r^2 = 1.000$ ; 腺苷回归方程  $y = 1.6328x - 0.2553$ , 相关系数  $r^2 = 1.000$ ; 以对照品测定所得峰面积代入上述回归方程计算含量, 所得结果与真实含量平均偏差小于 2%。

试验结果表明: 尿苷在 5.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~80.88  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内有良好的线性关系; 鸟苷在 5.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~80.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内有良好的线性关系; 腺苷在 6.23  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~99.60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内有良好的线性关系。

### 3.4. 精密度试验

称取板蓝根提取物(同一批号)约 0.3 g, 精密称定, 6 份样品(0.3222 g; 0.3006 g; 0.2998 g; 0.3104 g; 0.3010 g; 0.3206 g), 置具塞锥形瓶中, 精密加入 5% 甲醇 10 ml, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 5 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 5% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液。分别精密吸取对照品混合溶液和供试品溶液各 10  $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 尿苷、鸟苷及腺苷峰面积相对标准偏差(RSD)分别为 0.5%, 0.1%, 1.1%, 试验结果表明精密度良好。

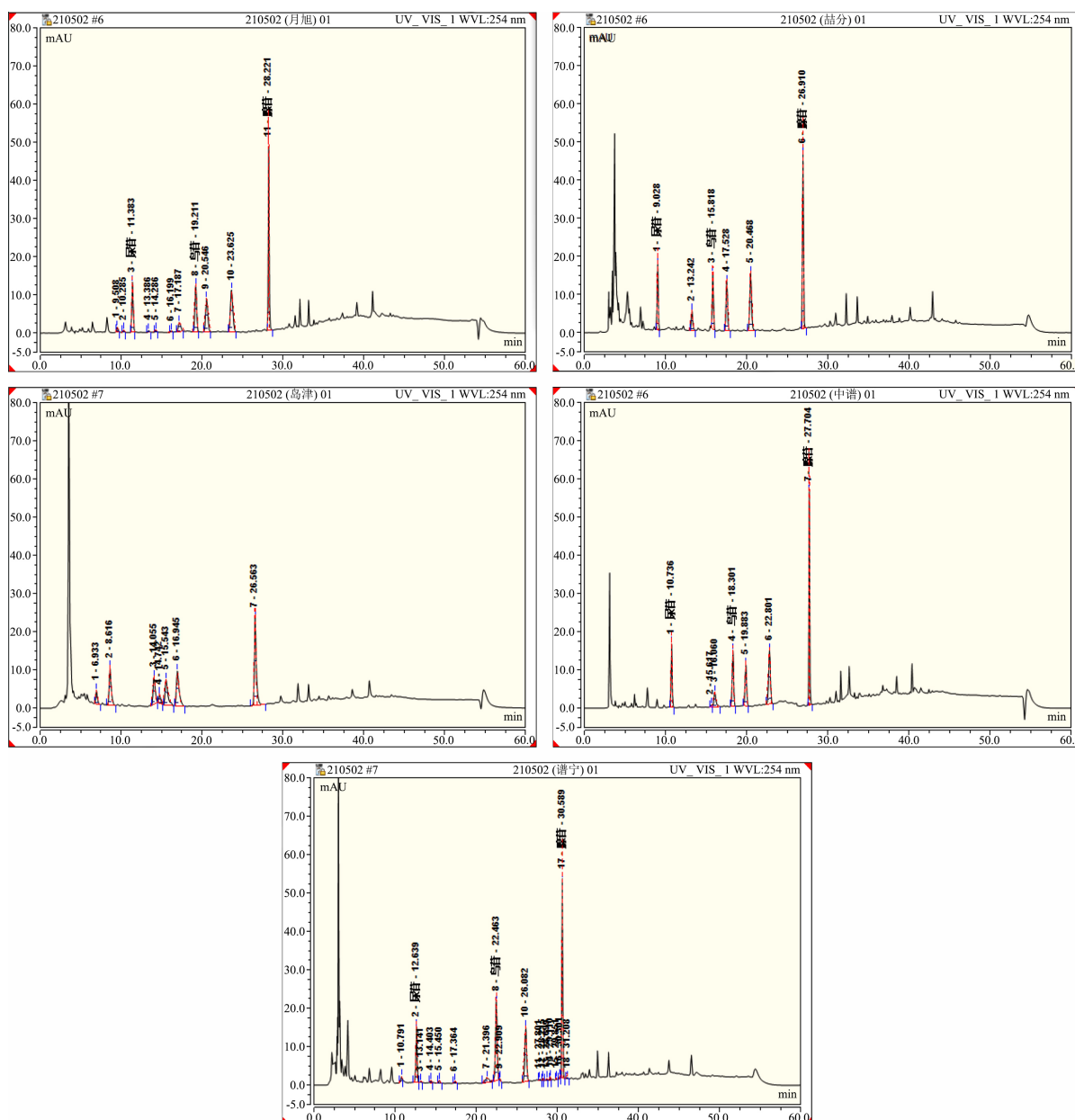
### 3.5. 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h, 进样 6 次, 峰面积相对标准偏差(RSD)分别为 0.89% (尿苷), 0.91% (鸟苷), 1.31% (腺苷)。试验结果表明, 供试品溶液在 48 小时内稳定性良好。

### 3.6. 耐用性

在同一台高效液相色谱仪上, 选用 5 棵不同厂家的色谱柱进行分析, 并记录色谱图。色谱柱厂家分

别为: 中谱科技( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱; 月旭科技(上海)股份有限公司( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱; 天津喆分医药科技有限公司( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱; 岛津(中国)有限公司( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱和上海谱宁( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱。色谱图见图 2。试验结果表明, 同是  $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$  的色谱柱, 不同厂家的分离度和基线不一样。其中天津喆分( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱、中谱科技( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱和上海谱宁( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )色谱柱的分离效果最好, 推荐使用。



**Figure 2.** Yuexu Technology Co., Ltd. ( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ ) Zhefen Medicine Science and Technology Co., Ltd. ( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ ) Shimadzu ( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ ) Zhongpu Technology Co., Ltd. ( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ ) Puning Technology Co., Ltd. ( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )

**图 2.** 月旭科技( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )喆分医药科技( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )岛津(中国) ( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ ) D: 中谱科技( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )谱宁分析( $C_{18}5 \mu m \times 4.6 mm \times 250 mm$ )

### 3.7. 加样回收率试验

称取本品(同一批号) 6 份, 各 0.15 g 精密称定, 加入一定体积(根据重复性试验结果含量, 计算样品 0.15 g 中含量的 100%)的对照品溶液, 精密加入 5% 甲醇 10 ml, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 5 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 5% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 按含量测定项下的方法进行测定, 记录色谱图, 计算回收率。尿苷回收率为 102.6%, RSD 为 1.2%; 鸟苷回收率为 99.1%, RSD 为 0.9%; 腺苷回收率为 98.8%, RSD 为 1.0%。试验结果表明, 回收率良好。

### 3.8. 样品含量测定

分别取十批样品适量, 精密称定, 按含量测定项下的方法进行测定, 计算样品含量。结果得出十批样品的尿苷、鸟苷及腺苷总和平均值为 1.51 mg/g。

## 4. 讨论

### 4.1. 流动相选择

板蓝根提取物成分复杂, 固选择流动相为梯度洗脱(如表 1), 分离效果相对较难, 选择降低流速(0.8 ml/分钟), 提高分离度。

### 4.2. 样品溶液稳定性考察

同一样品溶液, 放置不同的时间进行测定, 在 48 小时内均符合规定, 但是在 24 小时内的样品溶液更接近真实值。固选择样品处理完成后在 24 小时内进样。

### 4.3. 耐用性的选择

以同一批号的样品分别在不同厂家的 C<sub>18</sub> 色谱柱进行分离。发现不同厂家的色谱柱分离度有差异, 色谱图也不一样。故确定为分离效果更好的天津喆分(C<sub>18</sub>5 μm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱、中谱科技(C<sub>18</sub>5 μm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱和上海谱宁(C<sub>18</sub>5 μm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱为推荐色谱柱。

## 5. 结论

HPLC 法作为中药质量研究的方法之一, 本实验以板蓝根颗粒提取物开展研究, 结果发现不同厂家的 C<sub>18</sub> 色谱柱对板蓝根颗粒提取物的分离效果影响较大, 其中天津喆分(C<sub>18</sub>5 μm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱、中谱科技(C<sub>18</sub>5 μm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱和上海谱宁(C<sub>18</sub>5 μm 4.6 mm × 250 mm)色谱柱的分离效果最好。10 批次的板蓝根提取物样品测定结果, 符合分离度要求。

本实验通过 HPLC 法建立的板蓝根提取物中尿苷、鸟苷、腺苷的含量测定方法操作简单, 具有较好的重复性和可靠性。为板蓝根颗粒提取物及其制剂的质量控制提供参考。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会, 编. 中国药典(2020 年版一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 吴敏, 范春玲, 等. HPLC 法测定板蓝根提取物中(R,S)-告依春的含量[J]. 海峡药学, 2014, 3(26): 55-57.
- [3] 任国萍, 李铮, 等. HPLC 法同时测定板蓝根药材中尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春和腺苷[J]. 中国新药杂志, 2012(19): 2330-2334.
- [4] 谢宗明, 周灵芝, 李卫红, 等. HPLC 法测定板蓝根药材及其颗粒剂中的腺苷[J]. 中医药导报, 2009, 15(9): 53-55.