doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.15.017

一测多评法测定混合核苷片中核糖核苷含量

李 婵[1],温锦荣[2],刘 昭[2],张国荣[2],王 震[2△]

(1. 陕西省药品和疫苗检查中心,陕西 西安 710065; 2. 西安万隆制药股份有限公司,陕西 西安 710119)

摘要:目的 建立同时测定混合核苷片中腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷含量的一测多评法。**方法** 采用高效液相色谱法,色谱柱为迪马 Platisil ODS 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为 30% 甲醇 - 5% 甲醇(梯度洗脱),流速为 1.0 mL / min,检测波长为 260 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。建立胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷与内参物腺嘌呤核苷的相对校正因子,计算含量,并与外标法测定结果进行比较。**结果** 胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷的相对腺嘌呤核苷的校正因子分别为 1.84,1.40,1.25;且在不同高效液相色谱系统和色谱柱条件下的重现性均良好(*RSD* < 5.0%);4 种组分采用一测多评法与外标法所测得结果一致(*RSD* < 5.0%)。**结论** 所建立的一测多评法操作简便、结果准确,可用于混合核苷片中 4 种有效成分的质量评价。

关键词:一测多评法;相对校正因子;混合核苷片;质量标准

中图分类号:R927.2;R975⁺.5 **文献标志码:A** **文章编号:1006 - 4931(2022)15 - 0080 - 05**

Content Determination of Ribonucleoside in Mixed Nucleoside Tablets by the QAMS

LI Chan[1], WEN Jinrong[2], LIU Zhao[2], ZHANG Guorong[2], WANG Zhen[2]

(1. Shaanxi Center for Drug and Vaccine Inspection, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Xi'an Wanlong Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710119)

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi - components by single marker (QAMS) for simultaneous determination of adenosine, cytidine, uridine and guanosine in Mixed Nucleoside Tablets. **Methods** The high - performance liquid chromatography (HPLC) method was adopted, the chromatographic column was Diamonsil Platisil ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 30% methanol - 5% methanol (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. The relative correction factors (RCFs) of cytidine, uridine and guanosine were established with adenosine as the internal reference. The contents of the above four ribonucleoside components were calculated, and the results were compared with those by the external standard method (ESM). **Results** The RCFs of cytidine, uridine and guanosine relative to adenosine were 1.84, 1.40 and 1.25 respectively, and the reproducibility was good with the different chromatographs and chromatographic columns (*RSD* < 5.0%). The contents determination of the above four ribonucleoside components by the QAMS were consistent with those by the ESM (*RSD* < 5.0%). **Conclusion** The established QAMS is simple and accurate, which can be used for the quality evaluation of four effective components in Mixed Nucleoside Tablets.

Key words: QAMS; relative correlation factor; Mixed Nucleoside Tablets; quality standard

混合核苷为核糖核酸经麦芽根浸提液在酸性条件下进行酶解所得产物与玉米淀粉的混合物,含胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷等多种核苷。混合核苷片是以混合核苷为主药制成的片剂,临床用于急慢性肝炎、肝损伤及肝硬化的辅助治疗,也可用于因辐射及放射治疗或化学治疗引起的白细胞减少症和非特异性血小板减少症或白细胞减少症[1-2]。现行国家药品标准中采用紫外 - 可见分光光度法控制制剂中核苷混合物的总量[3],但检测范围广,在该波长处有吸收的物质均可被检出。在原标准基础上建立高效液相色谱法[4-8],采用一测多评法实现多成分的质量控制,同时解决对照品不易获得的情况,选定合适的内参物,根据制剂各成分间存在的线性或比例关系,建立内参物与其他成分间的相对校正因子[9-14],只需测定内参物的含量,通过校正因子计算其他成分的含量。为此,本研究中建立了鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷与内参物腺嘌呤核苷的相对校正因子,通过外标法测定腺嘌呤核苷的含量,根据腺嘌呤核苷与其他成分间的相对校正因子计算胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷的含量,并与外标法测定的4种核糖核苷含量结果进行比较。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津LC - 2030C Plus型高效液相色谱仪、岛津LC - 2010C_{HT}型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Waters 2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);TDL - 40B

第一作者:李婵,女,硕士,副主任药师,研究方向为药物分析,(电话)029 - 622288161(电子信箱)23359070@qq.com。

△**通信作者:**王震,男,硕士,正高级工程师,研究方向为精细化工,(电话)029 - 85691803(电子信箱)wz641024@163.com。

型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);MS105DU 型电子天平(梅特勒 - 托利多仪器 < 上海 > 有限公司,精度为 0. 1 mg);CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器 < 北京 > 有限公司,精度为 0. 1 mg)。

1. 2 试药

腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110879 - 201703,纯度为 99. 7%);鸟苷对照品(批号为 T277G005,标定纯度为 0. 3%),胞苷对照品(批号为 R088G005,标定纯度为 99. 4%),均购自德国 CNW Technologies GmbH 公司;尿苷对照品(Sigma - Aldrich 公司,批号为 BCCC2099,标定纯度为 100. 0%);混合核苷片(西安万隆制药股份有限公司,国药准字 H20057365,批号分别为 181206, 181207, 181208, 181209, 181210, 181211, 200902, 201001, 201002, 201003);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

2 方法与结果

2. 1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:迪马 Platisil ODS 柱(250 mm × 4. 6 mm, 5 μm);流动相:30% 甲醇(A) - 5% 甲醇(B),梯度洗脱(程序见表 1);流速:1. 0 mL / min;检测波长:260 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。在此色谱条件下混合对照品溶液胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷保留时间的 *RSD* 分别为 0. 03%, 0. 08%, 0. 11%, 0. 05%,峰面积的 *RSD* 分别为 0. 06%, 0. 05%, 0. 09%, 0. 19%。4 种核苷保留时间的 *RSD* 均小于 1. 0%,峰面积的 *RSD* 均小于 2. 0%,表明系统适用性试验结果符合要求。胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷的理论板数分别为 8 192, 10 698, 15 208, 144 254;分离度分别为 7. 128, 19. 965, 26. 910。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution procedure of the mobile phase (%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0 min	0	100	27 min	74	26
6 min	0	100	28 min	0	100
17 min	5	95	35 min	0	100

2. 2 溶液制备

供试品溶液:取样品 20 片,研细,取细粉适量(约相当于核苷混合物 0. 16 g),精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水适量,超声处理 10 min 使提取完全,用水稀释并定容,摇匀,离心(转速为 3 500 r / min)10 min,精密量取上清液 5. 0 mL,置 50 mL 容量瓶中,用水释,摇匀并定容,0. 45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

混合对照品溶液:取胞嘧啶核苷对照品 15 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水使溶解并定容,摇匀,作为胞嘧啶核苷对照品母液(质量浓度为 0. 15 mg / mL)。分别取尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷对照品 11. 5 mg,精密称定,分别置 25 mL 容量瓶中,加水使溶解并定容,摇匀,作为尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷对照品母液(质量浓度均为 0. 46 mg / mL)。分别精密量取上述 4 种核苷对照品母液各 1. 0 mL,置 50 mL 容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,即得。

阴性对照品溶液:按处方比例制备不含混合核苷的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备相应的阴性对照品溶液。

对照品定位溶液:精密量取上述 4 种核苷对照品母液各 1. 0 mL,分别置 50 mL 容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,即得。

2. 3 方法学考察

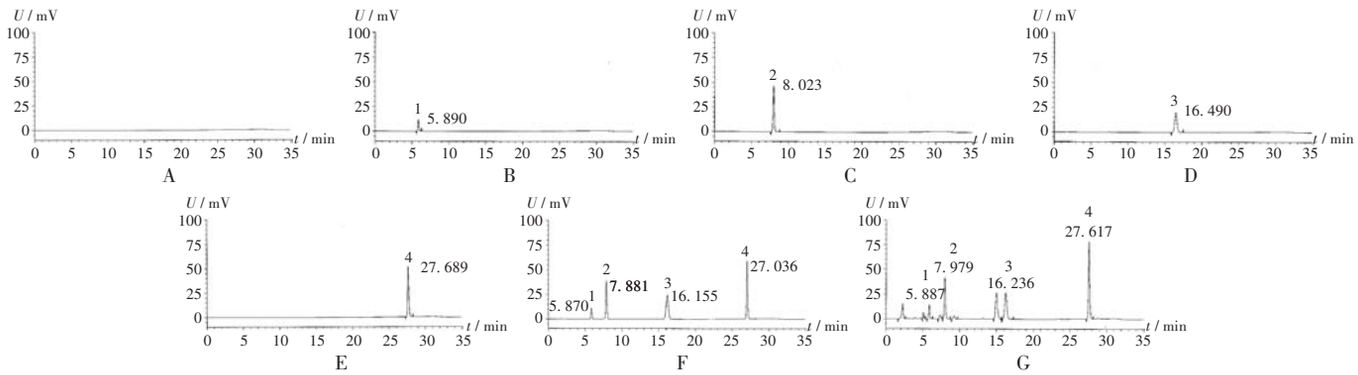
专属性试验:取 2. 2 项下阴性对照品溶液、对照品定位溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按 2. 1 项下色谱条件进样测定,结果各成分与相邻组分分离较好。色谱图见图 1。

线性关系考察、检测限与定量限确定:分别精密量取 2. 2 项下核苷对照品母液 1. 0 mL,置 25 mL 容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,作为线性溶液 6;分别精密量取上述溶液 1, 2, 3, 5, 8 mL,置 10 mL 容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,分别作为线性溶液 1 - 5。按 2. 1 项下色谱条件进样测定,以胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷质量浓度(X, μg / mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,详见表 2。取 2. 2 项下对照品溶液,逐级稀释,以信噪比分别为 10∶1 和 3∶1 的质量浓度计算定量限和检测限。按 2. 1 项下色谱条件进样测定。结果见表 2。

重复性试验:取样品(批号为 201001)适量,精密称定,按 2. 2 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2. 1 项下色谱条件进样测定,记录各成分的峰面积,计算得胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷的平均含量分别为 2. 30%, 6. 03%, 6. 62%, 9. 10%, *RSD* 分别为 1. 40%, 0. 63%, 0. 88%, 0. 44%(n = 5),表明方法重复性良好。

精密度试验:取重复性试验项下供试品溶液 6 份,按 2. 1 项下色谱条件进样测定,记录各成分的峰面积,计算胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷的含量,平均含量分别为 2. 28%, 6. 12%, 6. 58%, 9. 01%, *RSD* 分别为 1. 80%, 1. 60%, 0. 92%, 1. 10%(n = 6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,按 2. 1 项下色谱条件分别于 0, 2, 5, 9, 12 h 时进样测定,记录各成分的峰面积,计算胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷峰面积的 *RSD* 分别为 1. 6%,



1. 胞嘧啶核苷 2. 尿嘧啶核苷 3. 鸟嘌呤核苷 4. 腺嘌呤核苷

A. 阴性对照品溶液 B. 胞嘧啶核苷定位溶液 C. 尿嘧啶核苷定位溶液 D. 鸟嘌呤核苷定位溶液 E. 腺嘌呤核苷定位溶液 F. 混合对照品溶液 G. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Cytidine 2. Uridine 3. Guanosine 4. Adenosine

A. Negative reference solution B. Cytidine positioning solution C. Uridine positioning solution D. Guanosine positioning solution E. Adenosine positioning solution F. Mixed reference solution G. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 线性关系考察、定量限与检测限确定结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOQ and LOD

成分	回归方程	线性范围 (μg/mL)	r	定量限 (μg/mL)	检测限 (μg/mL)
胞嘧啶核苷	Y=35 383X+416.92	0.60~6.00	1.000 0	0.030 00	0.009 00
尿嘧啶核苷	Y=46 911X+249.91	1.85~18.48	1.000 0	0.018 50	0.005 55
鸟嘌呤核苷	Y=52 020X+1 090.2	1.86~18.58	1.000 0	0.027 90	0.008 37
腺嘌呤核苷	Y=65 093X+2 398.5	1.91~19.12	1.000 0	0.009 55	0.002 87

0.58%，0.79%，0.50%（n=5），表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

加样回收试验：取胞嘧啶核苷对照品30 mg、鸟嘌呤核苷对照品75 mg、尿嘧啶核苷对照品75 mg、腺嘌呤核苷对照品115 mg，精密称定，分别置100 mL容量瓶中，加水溶解、稀释并定容，摇匀，作为各个成分的回收率对照品母液。取样品（批号为201001）细粉适量（约相当于核苷混合物0.08 g），精密称定，分别加入上述回收率对照品母液4，5，6 mL，按2.2项下方法制备供试品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定，记录各成分的峰面积。计算得胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷的回收率分别为99.4%，99.1%，100.5%，99.9%，*RSD*分别为0.83%、0.28%，0.81%，0.63%（n=9），表明结果准确度良好。

耐用性试验：取2.2项下混合对照品溶液与供试品溶液，按2.1项下色谱条件采用不同色谱仪、色谱柱进行检测，记录各成分的峰面积，按外标法以峰面积计算胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷的标示含量。与2.1项下色谱条件比较，不同色谱仪和色谱柱所得胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷的标示含量的变化率分别为1.20%，0.25%，1.50%，0.23%，4种成分标示含量总和的变化率为0.83%，均小于2.0%，表明方法耐用性良好。

2.4 相对校正因子（$f_{s/i}$）

$f_{s/i}$的建立：根据公式$f_{s/i}=(A_s\times C_i)/(A_i\times C_s)$计算一测多评的$f_{s/i}$[14]。式中，$A_s$代表内参物腺嘌呤核苷峰面积，$C_s$代表内参物腺嘌呤核苷质量浓度，$A_i$代表其他组分峰面积，$C_i$代表其他组分浓度。以腺嘌呤核苷为内参物，计算腺嘌呤核苷与胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷的$f_{s/i}$分别为1.84，1.40，1.25，*RSD*分别为0.22%，1.75%，0.41%。结果见表3。

表3 胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷与腺嘌呤核苷的相对校正因子

Tab. 3 RCFs of cytidine, uridine and guanosine relative to adenosine

腺嘌呤核苷		胞嘧啶核苷			尿嘧啶核苷			鸟嘌呤核苷		
质量浓度(μg/mL)	峰面积	质量浓度(μg/mL)	峰面积	$f_{s/i}$	质量浓度(μg/mL)	峰面积	$f_{s/i}$	质量浓度(μg/mL)	峰面积	$f_{s/i}$
1.91	126 302	0.60	21 610	1.84	1.85	84 592	1.45	1.78	97 472	1.26
3.82	251 186	1.20	42 761	1.85	3.70	174 677	1.39	3.56	194 199	1.26
5.74	375 494	1.80	64 085	1.84	5.54	261 504	1.39	5.33	291 335	1.25
9.56	624 509	3.00	106 590	1.84	9.24	433 833	1.39	8.89	483 858	1.25
15.30	1 002 017	4.80	170 899	1.84	14.78	696 062	1.39	14.22	776 918	1.25
19.12	1 244 278	6.00	212 222	1.84	18.48	864 793	1.39	17.78	965 587	1.25

不同高效液相色谱系统和色谱柱对$f_{s/i}$的影响：分别用 Waters 2695、岛津 LC－2030C Plus 2 种高效液相色谱系统进行试验，考察了迪马 Platisil ODS 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）和 Inertsil™ ODS－3 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）对$f_{s/i}$的影响，各成分在不同色谱系统和不同色谱柱上$f_{s/i}$的 *RSD* 均小于 5.0%[15]。详见表 4。

表 4　不同色谱仪和色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 4　Effects of different chromatographs and chromatographic columns on the RCFs

色谱仪	色谱柱	$f_{d/a}$	$f_{d/b}$	$f_{d/c}$
Waters 2695	迪马 Platisil ODS	1.89	1.38	1.28
	Inertsil™ ODS－3	1.82	1.38	1.31
岛津 LC－2030C Plus	迪马 Platisil ODS	1.72	1.36	1.25
	Inertsil™ ODS－3	1.84	1.40	1.25
$\overline{X}$		1.82	1.38	1.27
RSD(%)		3.93	1.19	2.26

注：a 为胞嘧啶核苷，b 为尿嘧啶核苷，c 为鸟嘌呤核苷，d 为腺嘌呤核苷。

Note: a refers to cytidine, b refers to uridine, c refers to guanosine, and d refers to adenosine.

2.5　一测多评法与外标法测定结果比较

取 10 批样品，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，测定各成分的峰面积。以腺嘌呤核苷为内参物，计算腺嘌呤核苷与其他 3 种成分的$f_{s/i}$，并通过$f_{s/i}$计算各自的标示含量。以外标法计算 4 种成分的标示含量，并对比 2 种方法所测得结果的差异。结果见表 5。外标法与一测多评法所测得结果的 *RSD* 均小于 5.0%，差异无显著性，表明一测多评法可用于混合核苷片中多种成分含量的测定。

3　讨论

混合核苷片中主要有效成分为胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷等，其中腺嘌呤核苷对照品易得，性质较稳定。故选择腺嘌呤核苷为内参物。混合核苷片中鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、尿嘧啶核苷、胞嘧啶核苷均易溶于水。水作提取溶剂具有干扰小、不污染环境等优点[16]。故选择水提法。本研究中，供试品溶液于 200～400 nm 波长范围进行紫外扫描，于 257.8 nm 波长处有最大紫外吸收，且空白辅料溶液在此范围内无紫外吸收。参考现行国家标准中含量测定方法，选择 260 nm 作为最终吸收波长。

综上所述，一测多评法可用于测定混合核苷片中多种成分的含量，可为其质量标准的研究提供参考。

表 5　外标法与一测多评法测定结果比较(%)

Tab. 5　Comparison of content determination of four components in Mixed Nucleoside Tablets by the ESM and the QAMS(%)

批号	腺嘌呤核苷	胞嘧啶核苷			尿嘧啶核苷			鸟嘌呤核苷		
	ESM	ESM	QAMS	*RSD*	ESM	QAMS	*RSD*	ESM	QAMS	*RSD*
181206	6.73	1.34	1.36	0.75	3.56	3.67	1.53	6.83	6.80	0.23
181207	6.88	1.76	1.78	0.57	5.72	5.89	1.47	6.77	6.74	0.23
181208	7.45	1.95	1.97	0.52	6.23	6.41	1.43	7.33	7.30	0.21
181209	7.18	1.84	1.86	0.55	6.00	6.17	1.40	7.08	7.05	0.22
181210	7.58	2.09	2.11	0.48	6.36	6.54	1.40	7.54	7.51	0.20
181211	7.12	1.82	1.84	0.55	5.98	6.15	1.41	7.04	7.01	0.22
200902	8.72	2.41	2.44	0.62	6.42	6.61	1.46	7.45	7.42	0.21
201001	9.50	2.48	2.51	0.61	6.57	6.76	1.43	6.69	6.66	0.23
201002	9.53	2.43	2.46	0.62	6.51	6.69	1.37	6.66	6.64	0.16
201003	9.43	2.34	2.37	0.64	6.46	6.64	1.38	6.57	6.54	0.23

注：ESM 为外标法，QAMS 为一测多评法。

Note: ESM is short for the external standard method, and QAMS is short for the quantitative analysis of multi－components by single marker.

参考文献

[1] 刘晓兰，赖根福．叶下珠胶囊与混合核苷片连用治疗慢性乙肝 122 例疗效观察[J]．中国实用医药，2009，4(1)：135.
[2] 吴丽娜，张振勇，吴　荣，等．混合核苷片联合同步放化疗治疗局部晚期头颈部恶性肿瘤的疗效和安全性[J]．现代肿瘤医学，2021(18)：3169－3172.
[3] 国家药典委员会．国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第十三册[M]．北京：化学工业出版社，2015：25－28.
[4] 张建芝，宋昌慧，陈　波，等．RP－HPLC 同时测定贝母药材中 5 种核苷类化合物[J]．中国中药杂志，2010，35(1)：67－70.
[5] 张元杰，钱正明，陈肖家，等．HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、乌苷和腺苷的含量[J]．药物分析杂志，2010，30(1)：33－36.
[6] 张海娟，马世震，肖远灿，等．RP－HPLC 法同时测定暗紫贝母中 10 个核苷及碱基类成分的含量[J]．药物分析杂志，2012，32(6)：986－989.
[7] 王　欣，孟宪杰，张　恙．高效液相法测定板蓝根注射液中三种核苷的含量[J]．现代中西医结合杂志，2012，21(6)：646－647.
[8] 黄　远，董福越，李楚源．板蓝根中主要化学成分含量测定方法研究进展[J]．中国药业，2020，29(7)：150－156.
[9] 王瑞芬，李凤琴．一测多评法在冬菊利咽合剂质量控制中的应用研究[J]．中国现代应用药学，2020，37(8)：977－980.
[10] FENG YM, LI Q, YANG L, et al. Simultaneous determination of osthol, columbianadin, and isoimperatorin in *Angelicae pubescentis* Radix by high－performance liquid chromatography (HPLC) using a quantitative analysis of multi－components by single marker (QAMS) calibration method[J]. Instrumentation Science & Technology, 2020, 48(5): 550－560.
[11] MAI JN, LIANG J, LIU XF, et al. Simultaneous Determination of 5 Components in the Leaves of *Dimocarpus longan* by Quantitative Analysis of Multicomponents by Single Marker (QAMS)