

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00443

• 短篇论著 •

HPLC法测定各沪产地龙和广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的含量

季倩¹, 高守红², 张汉明¹, 张磊^{1*}

1. 第二军医大学药学院药用植物学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长征医院药材科, 上海 200003

[摘要] **目的** 测定各种沪产地龙与广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷的含量, 建立地龙药材质量评价的方法。

方法 用0.9%生理盐水超声提取地龙, SORBAX SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Aglient Co., Ltd), 流动相: 5 mmol/L 磷酸二氢钾(pH 2.9), 流速 1 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30℃, 进样量 10 μL, 采用 HPLC 法, 同时测定次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷 4 种核苷类成分的含量。 **结果** 次黄嘌呤的线性范围为 0.500 0~100.00 μg ($r=0.999\ 9$), 平均回收率 99.37%, RSD=1.36% ($n=6$); 黄嘌呤的线性范围为 0.500 0~100.00 μg ($r=0.993\ 1$), 平均回收率 91.57%, RSD=1.40% ($n=6$); 尿嘧啶的线性范围为 0.500 0~100.00 μg ($r=0.999\ 9$), 平均回收率 95.31%, RSD=1.64% ($n=6$); 尿苷的线性范围为 0.500 0~100.00 μg ($r=0.999\ 9$), 平均回收率 100.21%, RSD=1.98% ($n=6$)。 **结论** 该方法重复性、回收率好, 可用于测定地龙与广地龙中次黄嘌呤等 4 种核苷类成分的含量。

[关键词] 沪地龙; 广地龙; 次黄嘌呤; 黄嘌呤; 尿嘧啶; 尿苷; 高压液相色谱法

[中图分类号] R 931.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)04-0443-04

HPLC in determination of hypoxanthine, xanthine, uridine and uracil in Shanghai *Pheretima* and *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)

JI Qian¹, GAO Shou-hong², ZHANG Han-ming¹, ZHANG Lei^{1*}

1. Department of Pharmaceutical Botany, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To establish an effective method for the determining hypoxanthine, xanthine, uridine and uracil in earthworm in Shanghai *Pheretima* and *Pheretima aspergillum* (E. Perrier), contributing to quality control of the medicinal material. **Methods** Hypoxanthine, xanthine, uridine and uracil were extracted from the earthworms with 0.9% NaCl by ultrasonic and determined by HPLC. The chromatographic conditions were: SORBAX SB-Aq column (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Aglient Co., Ltd), 5 mmol/L KH₂PO₄ (pH 2.9) as the mobile phase with a flow rate of 1 mL/min, the detection wavelength was 254nm, the column temperature was set at 30℃, and the injection volume was 10 μL. Hypoxanthine, xanthine, uridine and uracil were determined by HPLC at the same time. **Results** The linear range was 0.5-100 μg ($r=0.999\ 9$) for hypoxanthine, with the average recovery being 99.37%, RSD=1.36% ($n=6$). The linear range was 0.5-100 μg ($r=0.993\ 1$) for xanthine, with the average recovery being 91.57%, RSD=1.40% ($n=6$). The linear range was 0.5-100 μg ($r=0.999\ 9$) for uridine, with the average recovery being 95.31%, RSD=1.64% ($n=6$). The linear range was 0.5-100 μg ($r=0.999\ 9$) for uracil, with the average recovery being 100.21%, RSD=1.98% ($n=6$). **Conclusion** The current method is reproducible and has satisfactory recovery, and it can be used to determine hypoxanthine, xanthine, uridine and uracil in earthworm medicinal material.

[Key words] Shanghai *Pheretima*; *Pheretima aspergillum* (E. Perrier); hypoxanthine; xanthine; uridine; uracil; high pressure liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(4): 443-446]

[收稿日期] 2014-08-28 **[接受日期]** 2014-11-01

[基金项目] 国家发展和改革委员会立项项目 [发改办高技[2011]51号], 上海市科委产学研医合作研究项目 (13DZ1970403). Supported by Program of National Development and Reform Commission (NDRC High-tech [2011] No. 51), and Production, Teaching, Research and Medicine Cooperation Program of Shanghai Science and Technology Commission (13DZ1970403).

[作者简介] 季倩, 硕士, 讲师. E-mail: jiqian1105@smmu.edu.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871307, E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

地龙(*Pheretima*)是我国常用中药,来自钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、威廉腔蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen)、通俗腔蚓 *Pheretima vulgaris* (Chen) 或栉盲远盲蚓 *Pheretima pectinifera* (Michaelsen) 的干燥全体。前1种习称“广地龙”,后3种习称“沪地龙”^[1]。地龙性寒、味咸;归肝、脾、膀胱经;具有清热定惊,通络,平喘,利尿的功效;用于治疗高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肢体麻木、半身不遂、肺热喘咳、尿少水肿、高血压等证。现代药理证明次黄嘌呤是地龙舒张支气管、抗组胺、平喘的药用物质基础^[2];黄嘌呤可扩张支气管,临床用于治疗哮喘^[3];尿嘧啶可抑制5-氟尿嘧啶的分解^[4];尿苷可提升5-氟尿嘧啶的抗肿瘤活性^[5],临床用于肿瘤的联合治疗。

药材市场常见伪品混杂现象,为评价地龙药材的内在质量,对于如何测定次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶以及尿苷这4种成分的含量,前人做了不同程度的探索。李钟等^[6]使用DIKMA C₁₈柱,甲醇-水(95:5)为流动相测定了动物药材中次黄嘌呤和肌苷的含量;使用Waters C18反相色谱柱,以0.05 mol/L KH₂PO₄-乙腈(97:3)为流动相^[7]或以Hypersil C₁₈ BDS柱,0.05 mol/L磷酸二氢铵水溶液为流动相^[8],测定药用动物中次黄嘌呤和尿嘧啶的含量。吴文如等^[9]建立了反相高效液相色谱法,用以测定沪地龙、土地龙 and 不同产地广地龙中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷和肌苷的含量。本实验以次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶及尿苷为指标成分,首次建立了同时评价该4个指标成分的高效液相色谱法,并测定了广地龙、沪产地龙及其易混淆品种中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶及尿苷含量,为地龙药材的初步质量评价提供依据。

1 仪器和试剂

Aglient 1200型高效液相色谱仪(美国);BP211D型电子天平(德国);SK7200H型超声波仪(中国)。次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、尿嘧啶对照药品购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;磷酸二氢钾(色谱纯);0.9%生理盐水(上海长征医院)。待测样品沪地龙(威廉腔蚓、通俗腔蚓、栉盲远盲蚓)、广地龙(参环毛蚓)、日本杜拉蚓为采集自上海浦东新区、杨浦区、闵行区、金山区、嘉定区、奉贤区、南汇区、松江区

以及崇明县的新鲜蚯蚓,经上海交通大学农业与生物学院邱江平教授鉴定为威廉腔蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen, 1895)、通俗腔蚓 *Pheretima vulgaris* (Chen)、栉盲远盲蚓 *Pheretima pectinifera* (Michaelsen, 1931) 和赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* (Savigny, 1826),后按《中国药典(2010版)》一部规定方法加工而成;5个批次的广地龙分别购买自重庆万州、海南海口、湖南怀化、广西隆安和上海。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 使用SORBAX SB-Aq色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Aglient Co., Ltd),流动相:5 mmol/L磷酸二氢钾(以磷酸调pH至2.9),流速1 mL/min,检测波长:254 nm;柱温30℃;进样量10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、尿嘧啶对照品各10 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加流动相溶液超声15 min使其溶解,稀释至刻度,混匀,0.45 μm微孔滤膜过滤除杂质,即得质量浓度为100 μg/mL的对照品溶液。

2.2.2 样品溶液的制备 地龙样品烘干至恒质量,研磨成粉,取0.5 g供试品,加50 mL 0.9%生理盐水溶解,超声提取2 h,0.45 μm微孔滤膜过滤除杂质,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围 精密称取次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷对照品各1 mg,加流动相溶液制成质量浓度为100 μg/mL溶液,精密量取0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0,加流动相溶液至100 μL,按2.1项下条件测定,以加入的次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的质量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,求得回归方程见表1。结果表明尿嘧啶、尿苷,次黄嘌呤,黄嘌呤在0.500 0~100.00 μg范围内线性关系良好,相关性系数均达到0.99以上。

2.3.2 精密度 精密量取浓度为100 μg/mL的次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷对照品溶液,连续重复进样5次,计算各对照品色谱峰面积相对标准偏差(RSD),结果次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的RSD分别为1.00%、8.24%、1.00%、0.87%。均<

15%,符合方法学的要求。

表1 回归方程与线性范围的考察结果

组分	线性回归方程	相关系数	线性范围 $m/\mu\text{g}$
尿嘧啶	$y=58.668x+13.579$	0.9999	0.5000~100.00
次黄嘌呤	$y=76.458x+5.448$	0.9999	0.5000~100.00
黄嘌呤	$y=7.276x+18.735$	0.9931	0.5000~100.00
尿苷	$y=40.53x+3.626$	0.9999	0.5000~100.00

2.3.3 稳定性 取2.2.1项下标准品溶液,室温放置0、4、8、12、18、24 h后分别进样,测次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷含量的RSD。4个待测成分中次黄嘌呤在18 h内较稳定($\text{RSD}<2\%$),尿嘧啶在8 h内较稳定($\text{RSD}<2\%$),符合方法学要求。

2.3.4 重复性 取2.2.1项下标准品溶液,连续进样6次,测定峰面积RSD。次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的峰面积RSD分别为0.43%、2.41%、1.79%、1.40%,符合方法学要求。

2.3.5 最低检测限和最低定量限 配制不同浓度对照品溶液,分别进样10 μL ,以 $\text{S/N}=3$ 计算次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的最低检测限分别为0.05、0.05、0.05、0.02 μg ;以 $\text{S/N}=10$ 计算次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的最低定量限分别为0.1、0.1、0.1、0.1 μg 。

2.3.6 加样回收率 取已知含量的地龙药材(CM3O, PD0529, FX0616, MH0530, CM2Y, KQDLL)6份,精密称定后按2.2.2项下方法配制待测样品溶液。分别加入质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷对照品溶液,计算加样回收率。4种成分的回收率分别为99.37% ($\text{RSD}=1.36\%$)、91.49% ($\text{RSD}=1.43\%$)、95.31% ($\text{RSD}=1.64\%$)、100.21% ($\text{RSD}=1.98\%$),RSD均小于5%,符合方法学要求。

2.4 样品含量测定 对采集自上海浦东新区、杨浦区、闵行区、金山区、嘉定区、奉贤区、南汇区、松江区以及崇明县的7批68个地龙样品,测定以次黄嘌呤为主的4种核苷类成分的含量,结果(图1)药典规定的三个沪地龙品种中栲盲远盲蚓的核苷类成分总体高于威廉腔蚓和通俗腔蚓,其中主要成分次黄嘌呤的成分也较其他两种高;此外,非药用品种——杜拉蚓的次黄嘌呤成分远低于药用品种。通过与广地龙(参环毛蚓)的含量比较后发现沪地龙的次黄嘌呤含量虽低于广地龙,但其他3个成分均高于广地龙。

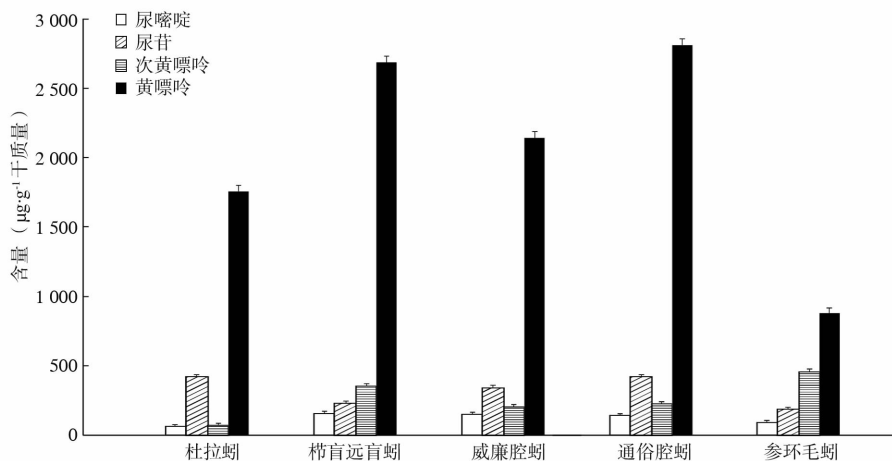


图1 各种沪产地龙与广地龙的次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷含量测定

$n=8, \bar{x}\pm s$

3 讨论

沪地龙作为上海市道地药材,是一味行之有效的平喘良药,临床应用广泛。但尚无有关质量控制的报道。本实验以沪地龙中次黄嘌呤为主的4种核

苷类成分为测定指标,建立HPLC含量测定方法,旨在为沪地龙药材质量控制和为临床提供参考。

在建立本方法之初,曾使用Diamonsil C₁₈ (DIKMA Co., Ltd), CALESIL ODS-100 100051 (Promptar Co., Ltd), SORBAX SB-Aq C₁₈

(Aglient Co., Ltd) 等不同类型、不同厂家的色谱柱, 流动相: 甲醇-0.02% 甲酸(10:90), 甲醇-0.001% 氨水(10:90), 甲醇-水(梯度洗脱), 甲醇-5 mmol/L 磷酸二氢钾(梯度洗脱), 5 mmol/L 磷酸二氢钾; 供试品溶液制备方式也尝试了水提取、乙醇提取、甲醇提取、生理盐水提取等, 提取效果呈现“甲醇提取<水提取<乙醇提取<生理盐水提取”的趋势。结果表明, 使用 SORBAX SB-Aq C₁₈ (Aglient Co., Ltd) 色谱柱、流动相: 5 mmol/L 磷酸二氢钾(pH 2.9), 配合生理盐水制备供试品溶液测定次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷, 分离度符合色谱要求并且分离度的重现性较好。我们在进行稳定性实验发现, 次黄嘌呤的水溶液不稳定, 放置 18 h 以上其内酰胺结构会发生分解; 其他如黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷这 3 个成分的水溶液的稳定时间低于 8 h, 测定该成分时, 对照品和供试品溶液须随测随配。

HPLC 通过将混合物分离后, 再对目标物质进行定量分析, 具有灵敏度高、专属性好、干扰少等优点; 而紫外分光光度法测定时, 所有在测定波长处有紫外吸收的物质的吸收叠加在一起, 专属性差、易干扰。本实验结果用与紫外分光光度法测定结果^[10]不同, 各沪地龙品种与广地龙中次黄嘌呤含量依次为参环毛蚓>栉盲远盲蚓>威廉腔蚓>通俗腔蚓。虽然广地龙中次黄嘌呤含量高于沪地龙, 但沪地龙中的黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷含量均高于广地龙。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:113.
- [2] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1997:1104.
- [3] Persson C G A, Pauwels R. Pharmacology of anti-asthma xanthines[M]//Page C P, Barnes P J. Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer Verlag, 1991:207.
- [4] Ikenaka K, Shirasaka T, Kitano S, Fujii S. Effect of uracil on metabolism of 5-fluorouracil *in vitro* [J]. Gan, 1979, 70:353-359.
- [5] Klubes P, Leyland-Jones B. Enhancement of the anti-tumor activity of 5-fluorouracil by uridine rescue[J]. Pharmacol Ther, 1989, 41(1-2):289-302.
- [6] 李 钟, 黄艳玲, 李文姗. 炮制对广地龙次黄嘌呤和肌苷含量的影响[J]. 中药材, 2009, 32:31-33.
- [7] 王梦月, 韦静斐, 史海明, 李晓波. HPLC 法测定海龙中胸腺嘧啶、次黄嘌呤、尿嘧啶的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35:2277-2279.
- [9] 万 丹, 蔡 萍, 张水寒. 土鳖虫超微粉体中尿嘧啶、次黄嘌呤的含量测定[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31:36-40.
- [10] 吴文如, 李 薇, 赖小平. HPLC 法测定不同产地地龙中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14:914-917.
- [11] 胡 馨, 黄文辉. 各种沪产地龙与广东产地龙中次黄嘌呤的测定和比较[J]. 中成药, 1994, 16:42-43.

[本文编辑] 尹 茶