

HPLC法同时测定赤子爱胜蚓药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷的含量

张彬^{1*}, 李倩¹, 党爱华²(1.山西省食品药品检验所, 太原 030001; 2.山西中远威药业有限公司, 太原 030800)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1692-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.36

摘要 目的:建立同时测定赤子爱胜蚓药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil XBP C₁₈, 流动相为 50% 甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μl。结果:尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷检测进样量线性范围分别为 0.05~1.60 μg($r=0.999\ 1$)、0.05~1.60 μg($r=0.999\ 3$)、0.002~0.010 μg($r=0.999\ 1$)、0.007 5~0.24 μg($r=0.999\ 9$)、0.025 0~0.80 μg($r=0.999\ 0$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<3%; 加样回收率分别为 98.30%~100.76% (RSD=0.8%, $n=9$)、98.68%~100.96% (RSD=0.8%, $n=9$)、95.16%~97.67% (RSD=0.9%, $n=9$)、96.15%~99.57% (RSD=1.5%, $n=9$)、96.39%~101.93% (RSD=1.8%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于赤子爱胜蚓药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷含量的同时测定。

关键词 赤子爱胜蚓;尿嘧啶;次黄嘌呤;黄嘌呤;尿苷;腺苷;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Uracil, Hypoxanthine, Xanthine, Uridine and Adenosine in *Eisenia foetida* by HPLC

ZHANG Bin¹, LI Qian¹, DANG Aihua²(1. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China; 2. Shanxi Zhongyuanwei Pharmaceutical Co., Ltd., Taiyuan 030800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of uracil, hypoxanthine, xanthine, uridine and adenosine in *Eisenia foetida*. METHODS: HPLC was performed on the column of Venusil XBP C₁₈ with mobile phase of 50% methanol-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 254 nm with a column temperature at 30 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.05-1.60 μg for uracil ($r=0.999\ 1$), 0.05-1.60 μg for hypoxanthine ($r=0.999\ 3$), 0.002-0.010 μg for xanthine ($r=0.999\ 1$), 0.0075-0.24 μg for uridine ($r=0.999\ 9$) and 0.025 0-0.80 μg for adenosine ($r=0.999\ 0$); RSDs of precision, stability and accuracy tests were lower than 3%; recoveries were 98.30%-100.76% (RSD=0.8%, $n=9$), 98.68%-100.96% (RSD=0.8%, $n=9$), 95.16%-97.67% (RSD=0.9%, $n=9$), 96.15%-99.57% (RSD=1.5%, $n=9$) and 96.39%-101.93% (RSD=1.8%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and stable with good reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of uracil, hypoxanthine, xanthine, uridine and adenosine in *E. foetida*.

KEYWORDS *Eisenia foetida*; Uracil; Hypoxanthine; Xanthine; Uridine; Adenosine; HPLC

我国蚯蚓品种有 160 多种,但可供养殖的种类不多,陆栖蚯蚓主要是正蚓科爱胜蚓属的赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* Savigny, 俗称红蚯蚓,在我国分布很广^[1]。由于此类蚯蚓生长发育快,繁殖率高,以腐殖物为食,易于高密度饲养。其性咸寒,归肝、脾、膀胱经,具有清热定惊、通络、平喘、利尿之功效,临床常用于高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肢体麻木、半身不遂、肺热喘咳、水肿尿少等证的治疗^[2-3]。据文献报道,赤子爱胜蚓体腔液中含有 40 多种不同生物活性的蛋白质,分别具有溶细胞、溶蛋白、溶血栓、抑瘤、促有丝分裂、抑菌和降压等活性^[4-10]。动物药的有效成分之一就是核苷类物质,是由碱基与核糖形成的β-糖苷,组成核苷的碱基主要有腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶等,其中腺嘌呤、鸟嘌呤的中间体是黄嘌呤和次黄嘌呤。核苷类成分不仅是构成核酸 RNA、DNA 单体的前体,也是生物氧化、能量代谢中的能源物质和抗病毒、抗肿瘤药物的中间体,具有重要的生物活性,在生物体内参与调节许多重要的生理过程,如神

经传递和心血管活性的调节等。因此,对中药(动物药)中核苷类成分的分析、比较对于揭示中药尤其是补益药的作用机制具有重要的意义。目前,关于赤子爱胜蚓中有效成分含量测定的报道较少,本试验建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定赤子爱胜蚓药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷 5 种核苷类成分的含量,并对 6 个批次的赤子爱胜蚓药材进行了测定,为其质量评价提供了较好的方法和手段。

1 材料

1.1 仪器

2010AHT 型 HPLC 仪,包括紫外检测器(日本岛津公司); TDL-50B 型离心机(北京亚泰科隆有限公司); AS3120B 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); HL104 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂

尿嘧啶对照品(批号:100469-200401,纯度≥99%)、尿苷对照品(批号:110887-200202,纯度≥99%)、腺苷对照品(批号:110879-200202,纯度≥99%)均购自中国食品药品检定研

* 副主任药师。研究方向:药物分析与鉴定。E-mail: binzhang2008sx@163.com

究院;次黄嘌呤对照品(批号:H9377,纯度≥99%)、黄嘌呤对照品(批号:X7375,纯度≥99%)均购自合肥博美生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

赤子爱胜蚓药材(北京绿环泰和生物科技有限公司,批号:20110901、20110902、20110903、20111001、20111002、20111003)经山西中远威药业有限公司党爱华主管药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil XBP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 50% 甲醇(A)-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 100% B; 5~10 min, 100%→99% B; 10~50 min, 99%→0 B); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取尿嘧啶对照品 20 mg、次黄嘌呤对照品 20 mg、尿苷对照品 3 mg、腺苷对照品 10 mg, 精密称定, 置于 100 ml 量瓶中, 加 0.9% 氯化钠注射液溶解并定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。取黄嘌呤对照品 10 mg, 精密称定, 置于 100 ml 量瓶中, 加 0.9% 氯化钠注射液溶解并定容, 摇匀, 即得黄嘌呤对照品贮备液。精密量取上述黄嘌呤对照品贮备液 1 ml, 置于 100 ml 量瓶中, 加 0.9% 氯化钠注射液溶解并定容, 摇匀, 即得黄嘌呤对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取粉碎均质后的样品 5.0 g, 精密称定, 置于 50 ml 离心管中, 加 0.9% 氯化钠注射液 10 ml, 超声(功率: 250 W, 频率: 33 kHz)处理 30 min, 以半径为 16 cm、5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置于 10 ml 量瓶中, 加 0.9% 氯化钠注射液定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。结果, 5 种待测成分峰理论板数均>3 000, 分离度均>1.5, 且对照品色谱各成分峰基线分离完全, 峰形良好, 保留时间稳定。

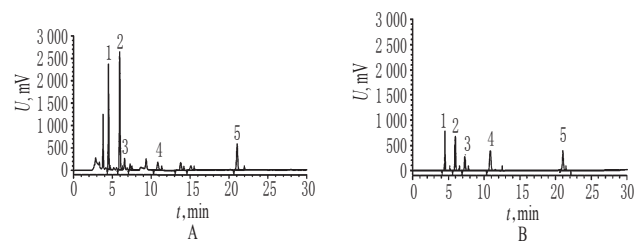


图 1 高效液相色谱图

A. 供试品; B. 对照品; 1. 尿嘧啶; 2. 次黄嘌呤; 3. 黄嘌呤; 4. 尿苷; 5. 腺苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test sample; B. reference substance; 1. uracil; 2. hypoxanthine; 3. xanthine; 4. uridine; 5. adenosine

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.25、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 ml 和黄嘌呤对照品贮备液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0

ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加 0.9% 氯化钠注射液定容, 制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 回归方程与线性范围见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linearity ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
尿嘧啶	$y=1.1267 \times 10^5 x - 8.2848 \times 10^6$	0.999 1	0.05~1.60
次黄嘌呤	$y=1.1809 \times 10^5 x - 7.3605 \times 10^6$	0.999 3	0.05~1.60
黄嘌呤	$y=6.9281 \times 10^4 x - 6.6440 \times 10^6$	0.999 1	0.002~0.010
尿苷	$y=6.4645 \times 10^4 x - 5.0701 \times 10^6$	0.999 9	0.0075~0.24
腺苷	$y=1.0931 \times 10^5 x - 3.6611 \times 10^6$	0.999 0	0.025 0~0.80

2.5 精密密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 0.21%、0.36%、0.63%、1.61%、2.10% (n=6), 表明仪器精密密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号: 20110901)适量, 分别于室温下放置 0、4、8、12、18、24 h 时进样测定, 记录峰面积。结果, 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 0.57%、0.69%、1.92%、1.14%、0.71% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号: 20110901)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量。结果, 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷的含量分别为 0.683 2、1.009 9、0.009 8、0.110 3、0.407 0 mg/g, RSD 分别为 0.27%、0.16%、2.40%、0.60%、1.10% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号: 20110901), 每份 1.0 g, 共 9 份, 分别加入低、中、高质量的尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率, 结果见表 2。

2.9 样品含量测定

取 6 批样品各适量, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

预试验过程中, 笔者对赤子爱胜蚓药材的提取方法如提取试剂、提取温度和提取时间进行了考察。结果表明, 0.9% 氯化钠注射液提取物的色谱峰较多, 而各体积分数的乙醇提取物的色谱峰较少, 直接用水提取背景干扰大; 常温提取优于加热回流; 在提取时间上, 超声提取 30 min 即可提取完全。

3.2 流动相的选择

核苷类成分均为偏碱性的水溶性成分, 极性均较大, 因此

初步选择以大量水相为流动相进行色谱分离。试验中比较了不同缓冲盐水溶液-甲醇、不同比例乙腈-水以及加入不同比例

表2 加样回收率试验结果(n=9)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
尿嘧啶	1.707 8	1.374 4	3.092 1	100.72	99.68	0.8
	1.710 5	1.374 4	3.095 4	100.76		
	1.706 2	1.374 4	3.078 7	99.86		
	1.708 0	1.718 0	3.428 2	100.13		
	1.711 0	1.718 0	3.409 5	98.86		
	1.713 3	1.718 0	3.418 2	99.24		
	1.716 8	2.061 6	3.743 3	98.30		
	1.702 3	2.061 6	3.762 1	99.91		
	1.705 8	2.061 6	3.753 6	99.33		
	次黄嘌呤	2.524 5	2.061 6	4.563 3		
2.526 6		2.061 6	4.568 9	99.06		
2.530 1		2.061 6	4.564 5	98.68		
2.521 7		2.577 0	5.123 5	100.96		
2.525 3		2.577 0	5.112 2	100.38		
2.524 1		2.577 0	5.098 0	99.88		
2.532 2		3.092 4	5.594 1	99.01		
2.530 2		3.092 4	5.586 6	98.84		
2.526 4		3.092 4	5.581 1	98.78		
黄嘌呤		0.025 4	0.017 2	0.041 8	95.35	96.42
	0.024 8	0.017 2	0.041 6	97.67		
	0.024 3	0.017 2	0.041 0	97.36		
	0.024 0	0.021 5	0.044 5	95.16		
	0.024 1	0.021 5	0.044 9	96.74		
	0.024 0	0.021 5	0.044 8	96.54		
	0.024 2	0.025 8	0.049 2	96.90		
	0.025 1	0.025 8	0.049 8	95.74		
	0.024 9	0.025 8	0.049 8	96.32		
	尿苷	0.276 6	0.223 3	0.491 3	96.15	
0.274 1		0.223 3	0.495 6	99.19		
0.274 1		0.223 3	0.491 4	97.31		
0.276 3		0.279 2	0.552 2	98.82		
0.275 6		0.279 2	0.553 6	99.57		
0.275 9		0.279 2	0.552 9	99.21		
0.274 5		0.335 0	0.606 2	99.01		
0.278 6		0.335 0	0.601 0	96.24		
0.276 6		0.335 0	0.599 7	96.44		
腺苷		1.024 8	0.859 0	1.856 3	96.80	98.47
	1.027 6	0.859 0	1.859 6	96.86		
	1.030 1	0.859 0	1.858 1	96.39		
	1.006 1	1.073 8	2.055 2	97.70		
	1.008 0	1.073 8	2.083 8	100.19		
	1.003 2	1.073 8	2.070 8	99.42		
	1.011 6	1.288 5	2.325 0	101.93		
	1.031 2	1.288 5	2.301 1	98.56		
	1.023 6	1.288 5	2.291 9	98.43		

表3 样品含量测定结果(n=2,mg/g)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=2, mg/g)

样品批号	尿嘧啶	次黄嘌呤	黄嘌呤	尿苷	腺苷
20110901	1.709	2.527	0.025	0.276	1.018
20110902	1.745	2.623	0.029	0.289	1.033
20110903	1.766	2.587	0.027	0.283	1.026
20111001	1.543	2.563	0.016	0.276	1.056
20111002	1.562	2.586	0.017	0.256	1.048
20111003	1.579	2.576	0.019	0.268	1.062

甲酸和冰乙酸-水的流动相系统。结果表明,含有0.01 mol/L磷酸二氢钾缓冲盐的水-甲醇系统,其对照品色谱中各待测成分峰形较好。不同比例的乙腈-水系统虽能较好分离混合对照品中的各待测成分,但对样品的分离效果不太理想。不同质量浓度的甲酸和冰乙酸-水系统比较,由于较大程度上增加了核苷类等弱碱性成分的解离,在溶液中形成极性较强的离子,而在洗脱过程中随流动相洗脱不易被保留,样品色谱峰出现较大干扰。此外,等度洗脱难以实现同时分离,故决定应用梯度洗脱。测定结果显示,应用本试验确定的洗脱系统所得的图谱信息丰富,保留时间适中,分离度较好,较适用于赤子爱胜蚓药材的含量测定。

3.3 检测波长的选择

对样品进行全波长扫描发现,样品在254 nm波长处有最大吸收,同时5种待测成分在此波长下均有很强的吸收,因此选择测定波长为254 nm。

3.4 其他

由于本次试验的6批赤子爱胜蚓药材均由同一企业提供,因此各批次5种成分含量测定结果的差异不大,其中尿嘧啶、次黄嘌呤含量较高,其余成分含量较低。提示需要进一步收集样品,以研究不同产地、气候和饲养条件下样品中各成分含量与相关影响因素之间的关系。

参考文献

- [1] 舒妙安.塑料大棚养殖蚯蚓技术[J].水产养殖,2000(6):9.
- [2] 山东省食品药品监督管理局.山东省中药材标准[S].2002年版.济南:山东友谊出版社,2002:115.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1 122.
- [4] 张阳,王艳红,张华,等.一种蚯蚓体腔液蛋白的分离纯化及其生物活性[J].天然产物研究与开发,2011,23(1):89.
- [5] 金莉蓉,徐桂芝.脑梗死的凝血纤溶状态和蚓激酶的作用[J].中国新药与临床杂志,1999,18(1):48.
- [6] 姜东胜,孔维红,刘复强,等.赤子爱胜蚓纤溶酶对实验性血栓的药理作用研究[J].实验血液学杂志,1994,2(4):427.
- [7] 王建华,关涛,王晓媛,等.蚯蚓体腔液体外抗肿瘤作用的实验研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(6):409.
- [8] Hrzenjak M, Kobrehel D, Levanat S, et al. Metogenicity of the earthworm's (*Eisenia foetida*) insulin-like proteins [J].*Comp Biochem Physiol B*, 1993, 104(4):723.
- [9] 潘卫东,刘向辉,戈峰.赤子爱胜蚓体液中几种抗菌成分的比较研究[J].中国生化药物杂志,2004,25(4):199.
- [10] 李承德,毛淑梅,康白,等.地龙降压蛋白对自发性高血压模型大鼠血管紧张素 II 及 AT₁受体表达的影响研究[J].中国药房,2008,19(24):1 850.

(收稿日期:2015-10-08 修回日期:2015-12-07)

(编辑:张 静)