

HPLC法测定土鳖虫中尿嘧啶和尿囊素的含量

景 晶¹, 曹 红² (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071)

[摘要] 目的 建立土鳖虫药材中尿嘧啶和尿囊素的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Alltima NH₂ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (90:10); 流速为 1.0 ml/min, 检测波长 205 nm; 柱温 35 ℃。结果 尿囊素和尿嘧啶的线性范围分别是: 0.404~3.23 μg ($r=0.9995$, $n=5$), 0.820~6.56 μg ($r=0.9995$, $n=5$)。平均回收率分别为 98.8%、99.0%, RSD 分别为 0.96%、0.79% ($n=6$)。结论 该方法简便、准确, 可作为土鳖虫药材的质量控制方法。

[关键词] 土鳖虫; 尿嘧啶; 尿囊素; 高效液相色谱

[中图分类号] R927.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2010)02-0134-03

Determination of allantoin and uracil in *Eupolyphaga seu Steleophaga* by HPLC

JING Jing¹, CAO Hong² (1. Department of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control, Health Dept GLD of PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of allantoin and uracil in *Eupolyphaga seu Steleophaga* by HPLC. **Methods** The HPLC separation was performed on Alltima NH₂ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a mixture of acetonitrile-water (90:10) as the mobile phase, at a flow rate of 1.0 ml/min. Detection wavelength was at 205 nm, and column temperature was at 35 ℃. **Results** The linear response of Allantoin and Uracil range from 0.404~3.23 μg ($r=0.9995$, $n=5$) and 0.820~6.56 μg ($r=0.9995$, $n=5$); the average recovery was 98.8% with RSD 0.96% and 99.0% with RSD 0.79% respectively ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate and suitable for the determination of allantoin and uracil in *Eupolyphaga seu Steleophaga*.

[Key words] *Eupolyphaga seu Steleophaga*; allantoin; uracil; HPLC

土鳖虫是《中国药典》2005年版一部收载品种。咸,寒;有小毒,归肝经。有破瘀血,续筋骨的功效,用于筋骨折伤,瘀血经闭,癥瘕痞块^[1]。现代研究表明,土鳖虫主要含有挥发油、氨基酸、尿囊素、尿嘧啶等成分,其中尿囊素具有镇静作用,可促进伤口愈合并有生肌作用,尿嘧啶参与多种核苷的代谢^[2]。2005年版药典一部中收载了性状、鉴别、检查和浸出物等项目,但缺少含量测定项,不足以对药材质量进行全面有效的控制,笔者在原有药材质量标准的基础上,结合《中国药典》2010年版一部土鳖虫任务书的要求,建立了土鳖虫药材中尿嘧啶及尿囊素的高效液相色谱的含量测定法,结果表明该方法灵敏度高、专属性好、操作简便、重现性好。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 SHIMADZU LC-10AD VP 高效液相色谱仪, SPD-M10AVP-PDA 检测器, CLASS-VP 色谱工

作站。

1.2 试剂 土鳖虫 (北京绿野药业有限公司,批号为 08120701、08041305、08110607 北京峰顺康医药有限公司,批号为 08802901、08813101)。尿嘧啶对照品 (批号为 100469-200401,供含量测定用),尿囊素对照品 (中国药品生物制品检定所,批号为 111501-200202,供含量测定用);乙腈为色谱纯,水为二次蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima NH₂ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (90:10); 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 205 nm; 柱温 35 ℃。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取尿嘧啶和尿囊素对照品 6.56 mg 和 3.23 mg, 加 50% 甲醇溶液 10 ml 制成每 1 ml 含尿嘧啶 656 μg, 含尿囊素 323 μg 的对照品储备液, 精密吸取该对照品储备液适量, 以 50% 甲醇按不同比例稀释, 得尿嘧啶浓度分别为 82.0, 164.0, 328.0, 492.0, 656.0 μg/ml, 尿囊素浓度分别为 40.4, 80.8, 161.5, 242.3, 323.0 μg/ml 的系列混合对照品溶液。

[作者简介] 景 晶 (1985-), 女, 硕士研究生。Tel: 15618723712, E-mail: jingjingkitten@126.com.

[通讯作者] 曹 红。Tel: (010) 66949080, E-mail: caohong66699@sina.com.

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛) 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 ml,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 KHz) 30 min,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,4 000 r/min 离心 5 min,滤过,取续滤液,即得。

2.4 专属性试验 按上述色谱条件,比较了供试品溶液、尿嘧啶和尿囊素对照品溶液、溶剂的色谱图,结果表明,样品中尿嘧啶和尿囊素与其他组分色谱峰能达到基线分离,溶剂中的色谱峰对测定无干扰(见图 1)。

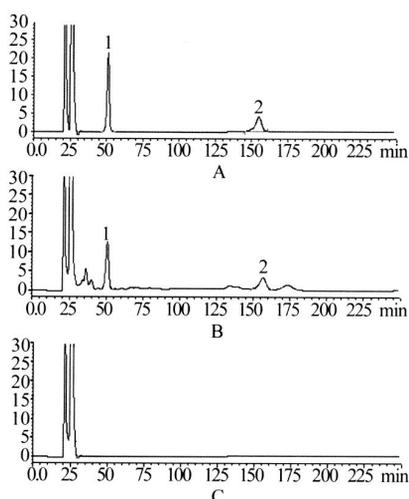


图 1 对照品(A)、土鳖虫样品(B)和空白对照(C) 高效液相色谱图
1 尿嘧啶; 2 尿囊素

2.5 线性关系的考察 分别取上述溶液各 10 μl 进样分析,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行计算,得回归方程。尿嘧啶回归方程为: $Y = 2 \times 10^6 X + 5 280.8$, $r = 0.999 5$ ($n = 5$),在 0.820 ~ 6.56 μg 范围内呈良好的线性关系;尿囊素的回归方程为: $Y = 4.74 \times 10^5 X - 862.91$, $r = 0.999 5$ ($n = 5$),在 0.404 ~ 3.23 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 取“2.2”项下制备的浓度为 161.5 μg/ml 尿囊素对照品溶液及浓度为 82.0 μg/ml 的尿嘧啶对照品溶液,在 1 d 以内分别连续进样 5 次,连续 5 d,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。结果尿囊素及尿嘧啶的日内精密度 RSD 分别为 0.55%, 0.69%; 日间精密度 RSD 分别为 1.34%, 1.78%。表明方法的精密度良好。

2.7 检测限和定量限 将尿嘧啶和尿囊素对照品溶液进行逐级稀释,以信噪比 10:1 时,确定其最低定量限;以信噪比 3:1 时,确定其最低检测限。尿嘧啶与尿囊素的最低定量限分别为 1.73 μg/ml 和 1.60 μg/ml;最低检测限分别为 3.02 μg/ml 和 3.46 μg/ml。

2.8 重复性试验 取同一批号的土鳖虫药材(08802901) 6 份,按 2.3 项下方法制备成供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样 10 μl,测得尿嘧啶的平均含量为: 0.274 mg/g, RSD = 1.50%;尿囊素的平均含量为: 0.589 mg/g, RSD = 2.53%。

2.9 稳定性试验 取重复性试验中的一份供试品溶液,于 0、1、3、5、7、11、15 h 测定尿嘧啶与尿囊素的峰面积,结果供试品溶液在 15 h 内峰面积基本不变, RSD 分别为 1.42% 和 1.81%,供试品溶液在 15 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验 称取已知含量的土鳖虫样品(批号: 08802901) 0.25 g,精密称取 6 份,分别精密加入 1 ml 的尿嘧啶和尿囊素对照品溶液(浓度为 82.0 μg/ml 和 161.5 μg/ml),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样分析,计算回收率,尿嘧啶的平均回收率为 99.0%, RSD = 0.79%,尿囊素的平均回收率为 98.8%, RSD = 0.96%; $n = 6$ 。结果表明本方法具有良好的回收率。结果见表 1。

2.11 样品测定 依上述方法制备对照品溶液和供试品溶液,依相同色谱条件测定,以外标法计算,测定了 5 批样品的含量 ($n = 3$),结果见表 2。

表 1 尿嘧啶与尿囊素加样回收率试验

尿嘧啶						尿囊素					
样品量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	样品量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
67.3	82.0	149.2	99.88			144.8	161.5	306.2	99.94		
65.8	82.0	146.8	98.78			141.5	161.5	301.5	99.07		
70.6	82.0	152.1	99.39	99.0	0.79	151.8	161.5	313.0	99.81	98.8	0.96
52.2	82.0	132.5	97.93			112.3	161.5	270.4	97.89		
57.6	82.0	138.3	98.41			123.7	161.5	282.5	98.33		
75.7	82.0	157.5	99.76			162.7	161.5	320.6	97.77		

表 2 土鳖虫药材中尿囊素、尿嘧啶的含量测定结果 (n=3)

批号	尿嘧啶 (mg/g)	尿囊素 (mg/g)
08802901	0.027 4	0.058 9
08120701	0.026 1	0.058 2
08041305	0.025 9	0.060 1
08813101	0.026 5	0.059 1
08110607	0.026 7	0.058 6

3 讨论

3.1 检测波长的选择 根据土鳖虫中尿囊素的 UV 扫描图谱看出,尿囊素在 210 nm 处有最大吸收波长,而尿嘧啶在 205 nm、256 nm 处均有最大吸收,综合考虑同时测定这两种成分,故确定检测波长为 205 nm。见图 2。

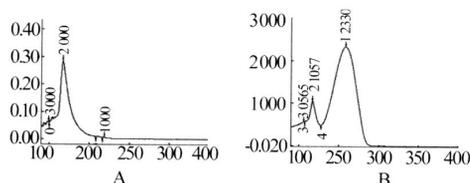


图 2 尿囊素 (A)和尿嘧啶 (B)的紫外光谱图

3.2 色谱柱的选择 曾试验了 Discovery C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)柱, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm ×4.6 mm, 5 μm)柱等色谱柱,结果发现,尿囊素在 C₁₈柱上的保留时间很短,不能与其他杂质成分分离进行含量测定。又试验了将其进行衍生化后在反相 C₁₈柱上进行分析的方法,结果发现衍生化方法前处理过程多,操作繁琐,包括水解和衍生化等多重步骤,可操作性差,尔后选用 AlltimaNH₂ (150

mm ×4.6 mm, 5 μm)色谱柱试验,结果发现尿囊素和尿嘧啶在该柱上均能与其他物质的色谱峰分开,峰形良好,故本文最终选用 Alltima NH₂ (150 mm ×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行分析。

3.3 流动相的选择 曾试验了乙腈-水 (88:12),乙腈-水 (90:10),乙腈-水 (92:8)等流动相系统,结果发现选择乙腈-水 (88:12)作为流动相时,尿嘧啶的出峰时间较早,可能造成杂质干扰,选择乙腈-水 (92:8)作为流动相时,尿囊素和尿嘧啶的保留时间变化不大,但峰形较差,选择乙腈-水 (92:10)作为流动相时,尿囊素和尿嘧啶与其他物质的峰完全分离,峰形较好。综合考虑,最终确定乙腈-水 (90:10)作为本方法的流动相。

3.4 柱温的选择 曾考察了不同柱温对尿嘧啶和尿囊素分离的影响,结果发现,当柱温为 25、30、40 时,尿嘧啶和尿囊素的峰形较差,并且有其他物质峰的干扰,当柱温为 35 时,尿囊素和尿嘧啶的峰形较好,与其他物质峰可以完全分开。所以最终选择 35 作为柱温。

3.5 本研究建立的 HPLC方法,同时测定土鳖虫药材中尿嘧啶和尿囊素的含量,该法精密度高,操作简便、准确可靠,为土鳖虫药材的全面质量控制提供了参考。

【参考文献】

[1] 中国药典 2005年版 [S]. 一部. 2005.
 [2] 李 伟,文红梅,钟 进,等. HPLC测定地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷的含量 [J]. 中药材, 1996, 19(12): 625
 [收稿日期] 2009-09-06
 [修回日期] 2009-11-30

(上接第 100页)

[20] Lin WQ, Cormier M, Samiee A, et al. Transdermal delivery of antisense oligonucleotides with microprojection patch (Macroflux) technology [J]. Pharm Res, 2001, 18 (12): 1789.
 [21] 刘建平,徐 斌,杨 彬. 穴位对氨茶碱经皮吸收的影响 [J]. 中国针灸, 2003 (6): 355.
 [22] Doukas AG, Kollias N. Transdermal drug delivery with a pressure wave [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56 (5): 559.
 [23] 旷英姿,马全红. 茶多酚脂质体透皮实验研究 [J]. 株洲工学院学报, 2006, 20 (2): 28.
 [24] 谭 敏,胡 敢,王 昆. 丙酸氯倍他素脂质体的药效和安全性评价 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34 (4): 463.
 [25] 刘 辉,汤 韧,何晓霞,等. 脂质体处方和制备方法对阿昔洛韦棕榈酸酯脂质体稳定性的影响 [J]. 药学报, 2002, 37 (7): 563.
 [26] 杨惊宇,严 冬,罗杰英,等. 新型药物剂型——微乳 [J]. 中

国医学工程, 2005, 13 (4): 378.
 [27] 李湘斌,毕津莲. 载氨氯地平传递体透皮释药研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18 (10): 1371.
 [28] Manconi M, Sinico C, Valenti D, et al. Niosomes as carriers for tretinoin. A study into the in-vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin [J]. Int J Pharm, 2006, 311 (1): 11.
 [29] 李 熙,刘玉亭,吴淑梅,等. 青藤碱微乳透皮特性的研究 [J]. 中成药, 2008, 30 (8): 1119.
 [30] Park ES, Cui Y, Yun BJ, et al. Transdermal delivery of piroxicam using microemulsions [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28 (2): 243.
 [31] Chen HB, Chang XL, Du DR, et al. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery [J]. Int J Pharm, 2006, 315 (1-2): 52.

[收稿日期] 2009-07-03
 [修回日期] 2009-10-12