

0、1、2、4、6、8 h 依法操作,进样量 20 μ L,测定峰面积。结果 5-羟基 4-氧代戊酸峰面积的 RSD 为 2.67%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性较好。

2.8 重现性试验:精密称取同一批的药材的样品 5 份,制备供试品溶液,结果 5-羟基 4-氧代戊酸质量分数的 RSD 为 2.29%。

2.9 加样回收率试验:精密称取已测知 5-羟基 4-氧代戊酸质量分数的样品约 0.5 g,再分别精密加入约 0.24 mg 5-羟基 4-氧代戊酸对照品,按样品测定项下操作依法测定,计算得平均回收率为 100.46%,RSD 为 2.51% ($n=5$)。

2.10 样品测定:按上述测定方法测定不同批次的九节菖蒲药材中 5-羟基 4-氧代戊酸的质量分数。结

果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination results of samples ($n=3$)

批次	5-羟基 4-氧代戊酸/%
1	0.512
2	0.496
3	0.475

3 讨论

3.1 5-羟基 4-氧代戊酸紫外最大吸峰波长位于 210 nm 处,由于处于末端吸收,易受药材中其他成分干扰,故将检测波长移至 214 nm。

3.2 供试品溶液制备曾采用直接用水超声提取,但出峰多干扰大,分离度差,故采用水提后,醋酸乙酯萃取制备供试品溶液,以除去极性大的杂质。

HPLC 法测定沪地龙中次黄嘌呤

胡 馨,王 倩

(上海市中药研究所,上海 200127)

沪地龙是钜蚓科通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* Michaelsen 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 的干燥体。夏季捕捉,及时剖开腹部,除去内脏及泥砂,洗净,晒干或低温干燥。地龙具有清热定惊、通络、平喘、利尿的功能,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、尿少水肿及高血压^[1]。地龙分为广地龙与沪地龙,过去主要使用广地龙,而近年来上海也养殖地龙,但对沪地龙的研究较少,据报道次黄嘌呤是地龙扩张支气管成分,从地龙中分离出的次黄嘌呤有抗组胺、降血压等作用^[1]。笔者曾经用紫外分光光度法测定沪地龙中次黄嘌呤^[2],本实验在此基础上采用 RP-HPLC 法测定了上海地区沪地龙中的次黄嘌呤,方法简便可靠。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪。甲醇、四氢呋喃为色谱纯,水为超纯水。次黄嘌呤对照品由 Sigma 公司提供,沪地龙为上海德华药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱用十八烷基键合相硅胶为填充剂;水-甲醇-四氢呋喃 (100:0.12:0.04) 为流

动相;检测波长为 254 nm。理论塔板数按次黄嘌呤峰计应不低于 2 000。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取次黄嘌呤对照品适量,加水制成 30 μ g/mL 的溶液,即得储备液。

2.3 供试品溶液的制备:取沪地龙粉末 (过 60 目筛) 0.2 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加入 80 mL 水,超声提取 30 min,放冷,加水至刻度,摇匀,静置,上清液用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过,即得。

2.4 标准曲线的制备:分别精密吸取次黄嘌呤储备液 0.25、0.5、1、2、3、4 和 5 mL 置于 50 mL 量瓶中,加水至刻度,精密吸取 10 μ L,注入液相色谱仪,测定,以质量浓度 (C) 为横坐标,峰面积 (A) 为纵坐标,绘制标准曲线,得方程: $A = 35.956 C - 0.1702$, $r = 0.9999$ 。结果表明次黄嘌呤在 0.15~3.0 μ g/mL 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:同一次黄嘌呤对照品溶液,以相同进样量重复进样 5 次,测定,结果峰面积 RSD 为 0.83% ($n=5$)。

2.6 重现性试验:取同一批号的样品 6 份,制备供试品溶液,进样,测定,计算得次黄嘌呤的质量分数,结果 RSD 为 0.16% ($n=6$)。

收稿日期:2004-07-19

作者简介:胡 馨(1963—),女,满族人,高工,上海市中药研究所分析测试中心主任,研究方向为中药及天然药物分析研究,新药质量标准研究。Tel: (021) 58810853-310 E-mail: huxin736@126.com

2.7 稳定性试验:取同一批供试品溶液分别于 0、1、2、4、5、6、7、8 h,进样,依法测定次黄嘌呤的峰面积,其 RSD 为 1.55% ($n=5$)。结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 回收率试验:采用加样回收法。已知质量分数的沪地龙样品中加入一定量的次黄嘌呤对照品,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算回收率,结果次黄嘌呤平均回收率为 99.67%,RSD 为 1.71% ($n=5$)。

2.9 样品测定:分别吸取次黄嘌呤对照品溶液及沪地龙供试品溶液各 10 μ L 进样,测定,按外标一点法计算,结果见表 1。高效液相色谱图见图 1。

3 讨论

表 1 样品中次黄嘌呤的测定结果 ($n=2$)
Table 1 Determination of 6-hydroxypurine in samples ($n=2$)

产地与批号	样品品种	次黄嘌呤/%
金山 2bd-20	威廉环毛蚓	0.047 3
奉贤 2bd-21	威廉环毛蚓	0.026 9
奉贤 2bd-22	威廉环毛蚓	0.052 1
松江 2bd-20	通俗环毛蚓	0.031 7
松江 2bd-21	通俗环毛蚓	0.039 8
松江 2bd-22	通俗环毛蚓	0.035 8
松江 2bd-23	通俗环毛蚓	0.044 3
金山 2bd-21	通俗环毛蚓	0.062 7
奉贤 2bd-23	栉盲环毛蚓	0.039 6
奉贤庄行 2bd-24	栉盲环毛蚓	0.071 2

(上接第 865 页)
行测定。以峰面积积分值为纵坐标,质量浓度为横坐标,经处理得回归方程: $Y=41\,571\,C+9\,287.2$, $r=1.000$,表明葛根素在 1.736~43.400 μ g 时,质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取 8.68 μ g/mL 葛根素对照品溶液 10 μ L,照上述色谱条件进样测定,重复进样 5 次,计算得葛根素峰面积积分值 RSD = 0.52%。

2.6 重现性试验:取同一批号(批号:020410)的样品制备 5 份供试品溶液,测定,结果葛根素质量分数的 RSD=1.37% ($n=5$)。

2.7 稳定性试验:取同一份供试品溶液,每隔 2 h 进样 1 次,连续考察 10 h,测定葛根素峰面积积分值,结果其 RSD=1.15% ($n=6$)。

2.8 回收率试验:称取葛根素 9.11 mg,置 25 mL 量瓶中,加 30%乙醇稀释至刻度,摇匀,再吸取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加 3%乙醇稀释至刻度,摇匀

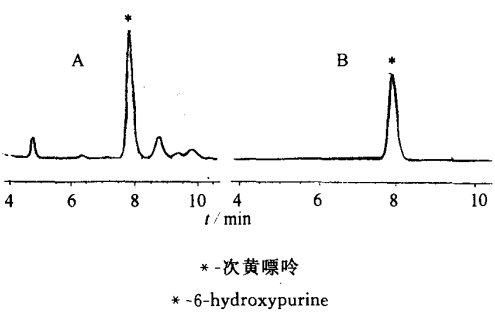


图 1 样品(A)和次黄嘌呤(B) HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of sample (A) and 6-hydroxypurine (B)

3.1 地龙中的次黄嘌呤在水中溶解性最好,稀乙醇中次之,随着乙醇体积分数的升高溶解度下降。

3.2 在分离条件的筛选中曾经使用过磷酸氢二铵缓冲液为流动相,但分离较差,在反复比较后采用了水与甲醇的流动相加四氢呋喃改善峰形。

3.3 沪地龙样品中含次黄嘌呤的量差别较大,在不同季节里收获的沪地龙中也有较大差别,该方法可以作为衡量地龙品质好坏的依据之一。

References:

[1] Zheng H Z, Dong Z, She J. *Modern Study and Application of Chinese Materia Medica* (中药现代化研究与应用) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1998.
[2] Hu X, Huang W H. Comparison and determination of 6-hydroxypurine in different *Pheretima* between Shanghai and Guangdong [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1994, 16 (1): 42-43.

即得。取同一批(批号:020410)表实感冒颗粒 5 份,各 1 g,分别置具塞三角瓶中,各加入葛根素对照品溶液 1 mL,按供试品溶液制备方法制备,测定,计算回收率,结果葛根素回收率为 98.91%,RSD 为 1.15%。

2.9 样品测定:照上述色谱条件及方法测定 3 批表实感冒颗粒中的葛根素,结果见表 1。

表 1 表实感冒颗粒中葛根素的测定结果 ($n=3$)
Table 1 Puerarin in Biaoshi Ganmao Granule ($n=3$)

批 号	葛根素/(μ g $\cdot$ g ⁻¹)	RSD/%
020515	61.89	1.21
020517	61.89	1.51
020520	77.27	1.13
020410	73.14	1.27

3 讨论

经测定,葛根素在 251.0 nm 处有最大吸收,故选为检测波长,保证了检测的灵敏度。

通过方法学考察、样品定量测定分析,该方法简便、准确,为表实感冒颗粒的质量控制提供了保证。