

反相高效液相色谱法同时测定小根蒜中尿苷、鸟苷和腺苷

刘红, 陈燕芹, 邓峰, 贾娇

(毕节学院化学与化学工程学院, 贵州省应用化学特色重点实验室, 贵州毕节 551700)

摘要: 建立同时测定小根蒜中尿苷、鸟苷和腺苷含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)梯度洗脱法。采用 ZORBAX-SB-C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 以水-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 25 °C; 检测波长: 260 nm。尿苷在 0.0784~0.784 μg 范围内线性关系良好, 线性相关系数 $r=0.9995$; 鸟苷在 0.0798~0.798 μg 范围内线性关系良好, 线性相关系数 $r=0.9995$; 腺苷在 0.0852~0.852 μg 范围内线性关系良好, 线性相关系数 $r=0.9994$ 。该法操作简便, 方法可靠, 重现性好, 可以作为小根蒜的质量控制方法之一。

关键词: 高效液相色谱法; 小根蒜; 尿苷; 鸟苷; 腺苷

文章编号: 1673-9078(2013)5-1128-1130

Determination of Uridine, Guanosine and Adenosine Contents in *Allium Macrostemon Bunge* by RP-HPLC

LIU Hong, CHEN Yan-qin, DENG Feng, JIA Jiao

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Bijie University, Key Laboratory on applied Chemistry, Bijie 551700, China)

Abstract: A new method for determination of uridine, guanosine and adenosine contents in *Allium macrostemon bunge* were established by using RP-HPLC gradient elution. The extracts were separated on a ZORBAX-SB-C18 analytical column (4.60 mm×250 mm, 5 μm) with CH₃OH-H₂O as mobile phase at 260 nm. The flow rate was 0.6 mL·min⁻¹ and the column temperature was 25 °C. The linear ranges of uridine, guanosine and adenosine were 0.0784~0.784 μg ($r=0.9995$), 0.0798~0.798 μg ($r=0.9995$) and 0.0852~0.852 μg ($r=0.9994$), respectively. This method showed high reproducibility and can be used for quality control of the *Allium macrostemon bunge*.

Key words: HPLC; *allium macrostemon bunge*; uridine; guanosine; adenosin

小根蒜又名苦蒜、野蒜、山蒜等, 属于百合科多年生草本植物。味辛微苦, 性温, 是食用地下鳞茎及嫩茎叶的野生蔬菜, 分布广泛, 营养价值丰富, 具有抑菌防腐作用, 并且具有保健和食疗效用, 属药食同源植物^[1-2], 有较大的药用和市场开发价值。其干燥鳞茎是中药薤白的药用来源之一^[3], 薤白具有通阳散结、行气导滞的功效, 主要用于胸痹疼痛、痰饮咳喘和泄痢后重^[4]。现代药理研究^[5]表明小根蒜含有抗菌活性物质, 具有抗菌消炎、降压利尿、抗癌、抗血栓、抗动脉硬化等作用。同时小根蒜又是餐桌上的美味佳肴, 通常炒食或腌制吃。

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 贵州省科技创新人才团队项目(合同号: 黔科合人才团队(2010)4011号)

作者简介: 刘红(1980-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事光谱及色谱分析的教学及科研工作

目前, 学者们对小根蒜的生物学特征、营养价值及其医疗保健功效等方面都做了一定的研究, 并取得了不错的结果^[6]。但是尚未见文献对小根蒜中鸟苷、尿苷、腺苷等核苷类化合物同时进行分析测定。据报道腺苷可以改善心脑血管循环, 防止心率失常, 抑制神经递质释放和调节酸环化酶活性等^[7], 鸟苷等核苷类成分能够干扰病毒核酸的合成, 常常是中成药抗病毒的活性成分^[8]。本文采用反相液相色谱法^[9]同时检测小根蒜中鸟苷、尿苷、腺苷的含量, 操作简便, 方法可靠, 重现性好, 可以作为小根蒜的质量控制方法之一。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱系统(包括 VL 型二级管阵列检测器、VL 型二元泵、自动进样器、液相

色谱工作站); AUY220 电子分析天平, 日本岛津; MDS-10 微波消解萃取工作站, 上海新仪; UPT-II-40L 超纯水机, 成都超纯水有限公司; SG5200HPT 超声波清洗器, 上海冠特超声仪器有限公司; SHB-III 循环水真空泵, 郑州长城科工贸公司。

鸟苷(含量≥98%)对照品购于中国药品生物制品检定所, 腺苷(含量≥98%)对照品为sigma试剂, 尿苷(含量≥99%)对照品为sigma试剂。流动相用水为超纯水经 0.45 μm膜过滤; 甲醇为色谱纯, 小根蒜购于贵州毕节市场。

1.2 色谱分析条件

色谱柱: ZORBAX-SB- C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流速为 0.6 mL·min⁻¹; 检测波长: 260 nm, 柱温: 室温 25 °C。流动相及梯度: A 为超纯水, B 为甲醇; 0~10 min, 95% A~82% A; 10~15 min, 82% A~80% A; 15~20 min, 80% A~60% A。

1.3 对照品、供试品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的鸟苷、腺苷、尿苷对照品适量, 配成含腺苷42.6 mg/L、鸟苷39.9 mg/L、尿苷39.2 mg/L的混合对照品溶液。

准确称取0.5 g粉碎均匀的试样(精确到0.0001 g)于50 mL锥形瓶中, 加入超纯水25 mL, 称重, 于25 °C下超声提取30 min, 取出, 用超纯水补足减失重量, 过0.45 μm滤膜, 取续滤液供测定用。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

选择高灵敏度的检测波长可以提高分析的精密程度, 同时也可以降低最小检测量。在190~400 nm下用二极管阵列检测器对混合对照品进行光谱扫描并保存全光谱, 可以观测到尿苷、鸟苷和腺苷在260 nm处都有较大的吸收峰, 故选择260 nm作为其检测波长。

2.2 流动相的选择

本实验曾尝试用等度洗脱分离该两个化合物, 但由于等度洗脱时鸟苷峰形不好, 且样品中尿苷、鸟苷和腺苷与相邻峰的分度不能满足分析要求, 用线性梯度时鸟苷峰形不好, 经实验得出了1.2中梯度洗脱程序, 在该条件下, 尿苷、鸟苷和腺苷的色谱峰能与基线分离、与周围峰的分度均大于2.0。

2.3 提取方法的选择

本实验考察了冷浸、超声和微波3种提取方法, 结果表明, 超声法提取效率最高。

2.4 系统适应性试验

分别吸取上述对照品溶液、供试品溶液, 按色谱条件对样品溶液、对照品溶液进行测定, 结果理论塔

板数按尿苷计不低于 10000、按鸟苷计不低于 20000, 按腺苷计不低于 40000, 鸟苷和腺苷峰与周围峰的分度均大于 2.0。该色谱条件下对照品及小根蒜的色谱图见图 1。

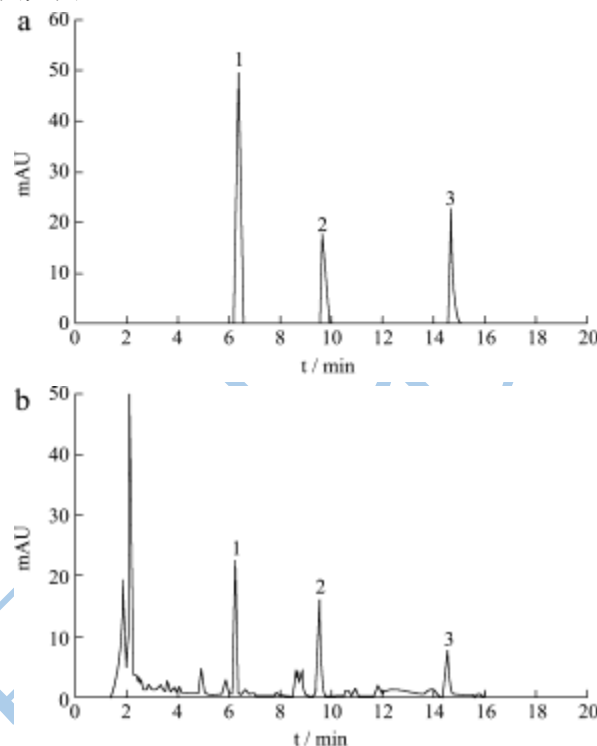


图 1 对照品 (a) 及小根蒜 (b) 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of the standard (a) and samples (b) of allium macrostemon bunge

注: 1.尿苷, 2.鸟苷, 3.腺苷。

2.5 线性考察

用自动进样器精密吸取混合对照品溶液2、5、8、10、15、20 μL进样, 于260 nm处测定峰面积。以进样量(μg)为横坐标(x), 以峰面积为纵坐标(y)计算回归方程。结果: 尿苷的回归方程为 $y=10303x+11.373$, 线性范围为相关系数 $r=0.9995$, 线性范围为0.0784~0.784 μg; 鸟苷的回归方程为 $y=3922.7x-1.8317$, 相关系数 $r=0.9995$, 线性范围为0.0798~0.798 μg; 腺苷的回归方程为 $y=6059.7x+4.7463$, 相关系数 $r=0.9994$, 线性范围为0.0852~0.852 μg。

2.6 精密度实验

表 1 精密度实验结果

Table1 The precision of the experiments							
	1	2	3	4	5	6	平均值 RSD/%
尿苷	2115.2	2161.2	2130.3	2139.6	2131.9	2117	2132.53 0.79
鸟苷	836.3	823.5	819.3	822.8	819.7	810.7	822.05 1.01
腺苷	1346.4	1326	1348	1326.2	1328.9	1350.61	1337.68 0.88

精密吸取混合对照品溶液5 μL连续进样6次测定, 测定尿苷、鸟苷和腺苷的峰面积。计算得峰面积的相

对标准偏差(RSD)分别为0.79%、1.01%、0.88%，说明方法的精密度良好。

2.7 稳定性实验

按照2.1色谱条件，将样品溶液在室温(25℃)下放置0、2、4、6、8、12、24 h，取样10 μL注入液相色谱仪，记录色谱峰面积。计算得尿苷、鸟苷和腺苷峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为1.09%、1.66%、1.84%，表明样品溶液至少在24h内保持稳定。

表2 稳定性实验结果

Table 2 The stability of the experimental result by using the

HPLC method

	0	2	4	6	8	12	24	平均值	RSD/%
尿苷	803.5	806.2	809	814.9	790.9	813	795.80	804.76	1.09
鸟苷	600.4	602.3	595.3	610.8	590.2	614.5	588.00	600.21	1.66
腺苷	775.9	774.9	770.1	790	792.5	760.2	753.70	773.90	1.84

2.8 重复性实验

精密称取同一小根蒜鳞茎样品5份，按供试品溶液的制备项下操作，各进样10 μL，按上述色谱条件注入液相色谱仪，测得尿苷、鸟苷和腺苷的平均含量分别为383 μg/g、746 μg/g、639 μg/g，RSD分别为0.79%、1.87%、0.91%，说明本方法重复性较好。

表3 重复性实验结果

Table 3 The repeatability of the experimental results

质量/g	尿苷		鸟苷		腺苷	
	峰面积	含量/(μg/g)	峰面积	含量/(μg/g)	峰面积	含量/(μg/g)
1	0.5028	803.5	382.27	600.4	763.35	775.9
2	0.5041	807.07	383.00	556.82	744.21	782.7
3	0.5714	906.00	379.91	657.60	735.5	886.5
4	0.5120	830.44	388.17	606.98	757.82	807.0
5	0.5289	846.50	383.14	604.80	730.98	830.8
平均值		383		746		639
RSD/%		0.79		1.87		0.91

2.9 加标回收率实验

精密称取已知含量的5份小根蒜鳞茎样品0.5 g(精确到0.0001 g)于25 mL锥形瓶中，按样品制备方法加入适量对照品制得加标样品溶液，按色谱条件分别进样测定，回收率结果见表4。

2.10 样品分析

分别取3份小根蒜的鳞茎、茎、叶样品，按“1.3”项下所述方法制备供试品溶液，按“1.2”项下色谱条件测定。结果见表2。从表2可以看到，小根蒜的叶和茎中的三种核苷都比鳞茎多，腺苷在叶里的含量最高。

3 结论

本方法前处理简单、快速，线性范围宽，精密度高，回收率高，可满足日常样品的检测需求。测定结果表明，小根蒜不同部位都含有腺苷等三种核苷类化合物，其中叶和茎中的三种核苷都比鳞茎多，腺苷在叶里的含量最高。

表4 回收率测定结果

Table 4 The experimental result of the recovery test

成分	样品含量/(m/μg)	加标量/(m/μg)	测得量/(m/μg)	回收率/%	平均值/%	RSD/%
尿苷	191.15	441	618.05	96.80	97.71	1.03
	190.96	196	382.35	98.16		
	191.65	490	646.81	96.84		
	194.48	490	653.09	97.58		
	198.62	490	664.86	99.20		
鸟苷	366.21	342	709.94	100.51	99.57	2.11
	365.84	342	702.47	98.43		
	372.72	510	871.10	97.72		
	381.97	510	883.61	98.36		
	380.65	510	905.07	102.83		
腺苷	318.84	355	667.02	98.08	97.19	1.94
	318.53	355	669.20	98.78		
	324.48	680	975.07	95.68		
	332.54	680	976.47	94.70		
	331.38	680	1002.84	98.74		

表5 样品含量测定结果(μg/g)

Table 5 The result of the samples

	序号	尿苷	鸟苷	腺苷
鳞茎	1	191.15	372.72	324.48
	2	190.96	381.97	332.54
	3	191.65	380.65	331.38
茎	4	883.33	1682.76	1508.74
	5	871.44	1675.78	1481.69
	6	894.13	1715.46	1495.71
	7	780.78	1669.65	1832.32
叶	8	781.44	1649.82	1823.02
	9	759.43	1650.23	1728.77

参考文献

[1] 朱小梅,洪立洲,王茂文,等.小根蒜的研究进展与利用前景[J].安徽农学通报,2010,16(9):114-115
 [2] 鄢教雅.食药两用小根蒜“茺白”[J].食品与健康,2000,2(2):

- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2010:353
- [4] 焦阳,尹海波,张乐,等.基于 ICP-MS 对不同产地小根蒜无机元素的主成分分析和聚类分析[J].药物分析杂志,2011,31(11):2063-2066
- [5] 梁晓天.常用中药基础研究[M].北京:科学出版社,2004
- [6] 陈海峰.中药小根蒜活性成分的深入研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2005
- [7] 范志华,汤卫华,林霖.HPLC 测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量[J].现代食品科技,2007,23(7):94-97
- [8] 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、鸟苷和腺苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):33-36
- [9] 乔长晟,姜少丽,马正旺,等.反相高效液相色谱测定发酵液中的聚苹果酸[J].现代食品科技,2012,28(4):453-455

现代食品科技