

# 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 CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O as mobile phase at 260 nm. The flow rate was 0.6 mL·min<sup>-1</sup> 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<sup>[1-2]</sup>, 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<sup>[3]</sup>, 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<sup>[4]</sup>。现代药理研究<sup>[5]</sup>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<sup>[6]</sup>。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血液循环, 防止心率失常, 抑制神经递质释放和调节酸环化酶活性等<sup>[7]</sup>, 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<sup>[8]</sup>。本文采用反相液相色谱法<sup>[9]</sup>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<sup>-1</sup>; 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。

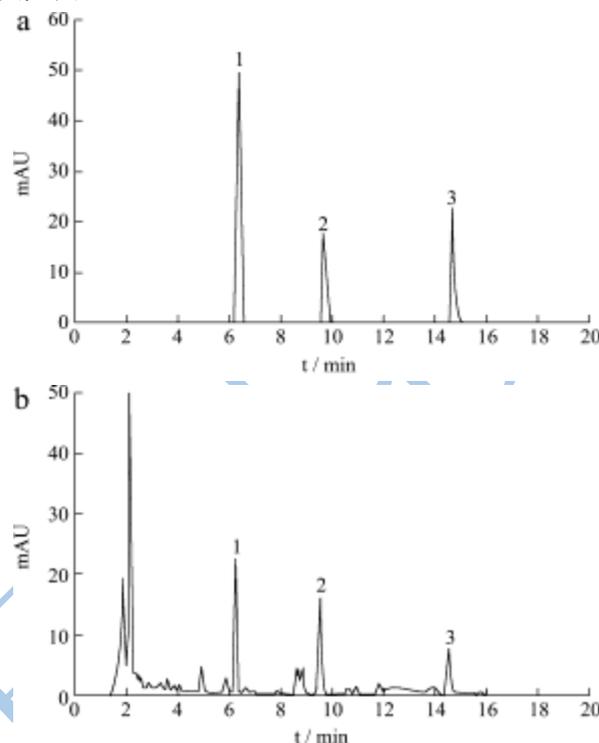


图 1 对照品 (a) 及小根蒜 (b) 色谱图

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

| Table 1 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24 h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