

## RP-HPLC 同时测定韭菜子中尿苷、腺苷的含量

盛康美<sup>1</sup>, 杨立新<sup>2</sup>, 赵海誉<sup>2</sup>, 司南<sup>2</sup>, 杨健<sup>2</sup>, 王宏洁<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医科学院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定韭菜子中的尿苷和腺苷的 RP-HPLC 含量测定方法。方法: CNW C<sub>18-WP</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 A(水)-B(乙腈), 梯度洗脱(0~20 min, 100%~80% A, 0%~20% B); 检测波长 260 nm。结果: 尿苷和腺苷分别在 9.56~95.60 ng 和 10.20~102.0 ng 与峰面积呈良好线性关系, *r* 分别为 0.999 7, 0.999 6; 平均回收率分别为 98.04%, 101.99%, RSD 分别为 0.99%, 1.44%。结论: 该方法简便易行, 具有良好的重复性和稳定性, 可用于韭菜子质量控制。

**[关键词]** 韭菜子; 尿苷; 腺苷; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0152-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013140152

## Simultaneous Determination of Uridine and Adenosine in Allii Tuberosi Semen by RP-HPLC

SHENG Kang-mei<sup>1</sup>, YANG Li-xin<sup>2</sup>, ZHAO Hai-yu<sup>2</sup>, SI Nan<sup>2</sup>, YANG Jian<sup>2</sup>, WANG Hong-jie<sup>2\*</sup>

(1. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the RP-HPLC quantitative determination method of uridine and adenosine in Allii Tuberosi Semen. **Method:** CNW C<sub>18-WP</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was applied with water (A) -acetonitrile (B) as mobile phase. The gradient elution condition was 0-20 min, 0%-20% B and the detection wavelength was set at 260 nm. **Result:** Uridine and adenosine revealed good linear relation from 9.56 to 95.60 ng and from 10.20 to 102.0 ng respectively with correlation coefficient (*r*) of 0.999 7 and 0.999 6. The average recoveries of them were 98.04% and 101.99% with RSD of 0.99% and 1.44%. **Conclusion:** This method was simple and accurate with good repeatability and stability, which was suitable for the quality control of Allii Tuberosi Semen.

**[Key words]** Allii Tuberosi Semen; uridine; adenosine; quantitative determination

韭菜子始载于《名医别录》, 具有固精、助阳、补肾、暖腰膝的功效, 临床上可用于治疗阳痿、早泄、遗精、多尿等症。现代研究也表明采用其醇水提取液可以提高正常小鼠和氢化可的松所致肾虚虚模型小鼠的交配能力<sup>[1]</sup>。70% 乙醇提取物能够提高去势大鼠阴茎对外部刺激的兴奋性, 增强模型动物的

耐寒、耐疲劳能力, 增加自主活动次数<sup>[2]</sup>。目前对韭菜子的化学成分研究报道较少。现有研究表明韭菜子主要含有生物碱、挥发油、皂苷及蛋白质、氨基酸、油脂类成分<sup>[3]</sup>以及腺苷、尿苷等核苷类成分。腺苷是一种遍布人体细胞的内源性核苷, 可直接进入心肌磷酸化生成腺苷酸, 参与心肌能量代谢, 同时还参与扩张冠脉血管, 增加血流量。尿苷常用于抗巨型红血球贫血, 治疗肝、脑血管、心血管等疾病。二者均具有显著的生理活性<sup>[4]</sup>。韭菜子在临床应用中大多以水煎服常见, 腺苷和尿苷均为水溶性较大的化学成分。本研究将以腺苷和尿苷的含量作为

**[收稿日期]** 20130301(101)

**[第一作者]** 盛康美, 主管护师, 从事中药质量管理, Tel: 13261264841, E-mail: shengkangmei@163.com

**[通讯作者]** \* 王宏洁, 副研究员, 从事中药化学研究, Tel: 010-64021008, E-mail: wang66397@yahoo.com.cn

指标,对韭菜子中水溶性活性成分腺苷、尿苷同时进行含量测定,为进一步深入研究韭菜子提供科学依据。

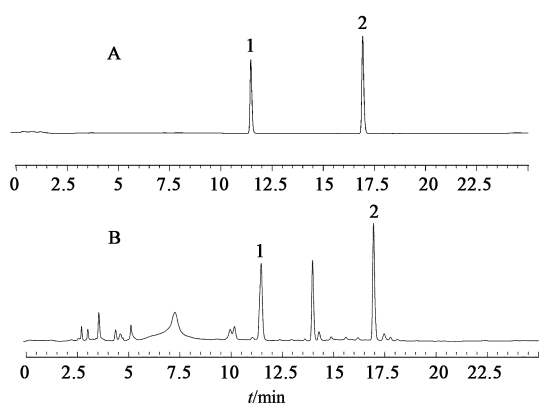
## 1 材料

**1.1 仪器** 日本岛津20A高效液相色谱仪(DGU-20A型脱气机,LC-20AT型四元泵,SIL-20A型自动进样器,CTO-10As型恒温箱,SPD-M20A DAD检测器),KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),腺苷、尿苷(含量98%,MERCK德国进口分装),乙腈、甲醇(DikmaPure),高纯水自制。

**1.2 药物** 韭菜子(生品):本草方源药业有限公司,北京市双桥燕京中药饮片厂,经中国中医科学院中药研究所程明副研究员鉴定为百合科植物韭 *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. 的种子。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** CNW C<sub>18-WP</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A(水)-B(乙腈),梯度洗脱(0~20 min,100%~80% A),检测波长260 nm,柱温35℃,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>。理论板数按尿苷、腺苷峰计算均不低于5 000。见图1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 尿苷;2. 腺苷

图1 韭菜子样品HPLC色谱

**2.2 韭菜子中被测成分的确定** 使用HPLC-DAD方法来测定样品中腺苷、尿苷成分。经过HPLC-DAD分析,在紫外波长260 nm检测条件下,样品色谱图中的被测峰,与腺苷、尿苷对照品的出峰时间相同,且对照品与样品中腺苷、尿苷峰的3D光谱相同,因此初步确定样品中所测定的化学成分即为腺苷、尿苷。

### 2.3 样品提取条件的选择

**2.3.1 样品提取方法的选择** 根据文献报道及腺苷、尿苷化学成分的理化特性,提取方法选择了水浴加热提取与超声提取两种方法,根据实验结果表明,加热提取60 min与超声提取30 min提取结果接近。

选定超声提取的方法提取样品。

**2.3.2 样品提取时间的选择** 选择超声提取15,30,45 min,结果表明超声提取30,45 min提取结果相同,因此选定超声提取30 min。

**2.3.3 样品提取溶剂的选择** 腺苷、尿苷为水溶性成分,根据文献报道<sup>[5]</sup>及《中国药典》<sup>[6]</sup>中相关成分的测定文献,选择稀乙醇作为提取溶剂。

**2.4 供试品溶液的制备** 韭菜子粉碎,过40目筛,取本品粉末2 g,精密称定,置50 mL三角瓶中,加入稀乙醇20 mL,称质量,超声提取30 min,放至室温,用稀乙醇补充减失质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm),取续滤液作为供试品溶液。

**2.5 线性关系考察** 精密称取腺苷、尿苷对照品适量置5 mL量瓶中,用稀乙醇配制成质量浓度为腺苷1.02 g·L<sup>-1</sup>、尿苷0.956 g·L<sup>-1</sup>的溶液,摇匀。分别精密吸取0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1 mL置10 mL量瓶中,加入稀乙醇稀释至刻度,摇匀。分别取10 μL注入高效液相色谱仪,测定,得回归方程  $Y_{\text{腺苷}} = 1.18084 \times 10^7 X - 4075.77$  ( $r = 0.9997$ );  $Y_{\text{尿苷}} = 1.58936 \times 10^7 X + 3358.84$  ( $r = 0.9996$ ),尿苷和腺苷分别在9.56~95.60,10.2~102.0 ng与峰面积呈良好线性关系。

**2.6 精密度试验** 按供试品溶液的制备方法制备样品溶液,连续进样5次,进行精密度试验。腺苷、尿苷峰面积的RSD分别为1.89%,1.88%。表明进样的精密度良好。

**2.7 稳定性试验** 按供试品溶液的制备方法制备样品溶液,室温下自然放置,分别于0,2,4,6,8,12,24 h进样测定。腺苷、尿苷峰面积的RSD分别为1.97%,1.92%。可见样品溶液中腺苷、尿苷的含量在24 h内稳定性良好。

**2.8 重复性试验** 分别精密称取6份,按照按2.4样品的提取处理方法,对样品进行提取处理。试验结果表明腺苷、尿苷含量的RSD分别为1.60%,2.60%,可见该方法有良好的重复性。

**2.9 加样回收率试验** 采用加样回收法,精密称取已知含量(尿苷0.32 mg·g<sup>-1</sup>、腺苷0.28 mg·g<sup>-1</sup>)同一批号的样品6份,分别精密加入对照品溶液(18.0,17.5 mg·L<sup>-1</sup>)20 mL,按2.4项下制备溶液及上述色谱条件,测定、计算加样回收率。试验表明该方法可靠。结果见表1~2。

**2.10 不同批号样品中腺苷、尿苷的含量** 按2.4样品的提取处理方法测定不同批号样品中腺苷、尿苷的含量,计算结果见表3。

表 1 尿苷加样回收率试验

No.	称样量 /g	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.025 4	0.674 4	96.70		
2	1.010 6	0.673 0	97.62		
3	1.024 5	0.678 4	97.89	98.04	0.99
4	1.011 2	0.676 0	98.40		
5	1.004 7	0.678 4	99.64		
6	1.018 3	0.676 8	97.99		

注:加入量均为 0.360 0 mg。

表 2 腺苷加样回收率试验

No.	称样量 /g	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.025 4	0.350 0	0.640 0	99.89		
2	1.010 6	0.350 0	0.645 6	102.69		
3	1.024 5	0.350 0	0.642 4	100.65	101.99	1.44
4	1.011 2	0.350 0	0.643 6	102.07		
5	1.004 7	0.350 0	0.647 8	103.79		
6	1.018 3	0.350 0	0.648 4	102.86		

注:加入量均为 0.350 0 mg。

表 3 不同批号样品中腺苷、尿苷的含量  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	腺苷	尿苷
20111226	0.39	0.39
20120803	0.32	0.27
20120428	0.35	0.28

### 3 讨论

由于临床上疗效显著、应用广泛,因此在市场出现大量韭菜子的伪品,如紫花曼陀罗子<sup>[7]</sup>、葱子<sup>[8]</sup>等。随着科技水平的发展与提高,对韭菜子的研究逐步增多与深入<sup>[9-13]</sup>。腺苷做为韭菜子中的活性成分(一种内源性核苷),不仅在细胞内代谢中的跨膜核苷转运中起着重要的作用,还具有扩张冠状血管、增加冠状动脉血流量、扩张周围血管等作用<sup>[14]</sup>,可能与其助阳、补肾等功效具有相关性。

本文运用 RP-HPLC 同时测定腺苷、尿苷 2 种活性成分。实验结果表明,腺苷含量为 0.32 ~ 0.39

$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,尿苷含量为 0.27 ~ 0.39  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。二者成分在药材中的含量相差不大。其测定方法简单、分离度、重复性好,可为韭菜子的质量控制提供可借鉴的定量方法,也为韭菜子的更深入研究提供研究数据。

### [参考文献]

- [1] 吴文辉,胡昌江,刘俊达,等. 韭菜子不同炮制品对正常和肾虚小鼠交配能力的影响[J]. 中成药,2012,34(7):1322.
- [2] 王成永,时军,桂双英,等. 韭菜子提取物的温肾助阳作用研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(13):1017.
- [3] 肖培根. 新编中药志. 第 2 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:509.
- [4] 贺晓楠,王雪梅,陈树涛,等. 腺苷对急性心肌梗死患者再灌注损伤的作用观察[J]. 山东医药,2011,51(52):89.
- [5] 严华,张幸梅,宋金翠,等. 灵芝胶囊中腺苷、腺嘌呤的 TLC 鉴别及腺苷的 HPLC 法含量测定[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1800.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:823.
- [7] 罗定强,冯鲁田,黄艳,伪品紫花曼陀罗子冒充韭菜子成因及其鉴别[J]. 安徽医药,2009,13(4):390.
- [8] 刘知远. 韭菜子与葱子的鉴别[J]. 海峡药学,2006,18(1):114.
- [9] 李义梅,姬平. 韭菜子及其炮制品的质量控制[J]. 中国药业,2013,22(4):65.
- [10] 孔德平,钱大玮,郭盛,等. 9 种果实,种子类补益中药的核苷类成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):98.
- [11] 张玲,徐新刚,王淑静,等. 韭菜子脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 时珍国药研究,1995,6(4):19.
- [12] 胡国华,陈昊,马正智. 韭菜籽挥发油组分的分析鉴定[J]. 食品科学,2009,30(6):232.
- [13] 江宝红,鞠建明,蔡雪萍,等. 多指标优选蛹虫草提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):29.
- [14] 滕红. 腺苷在心血管疾病中的应用[J]. 中国实用医药,2011,24(6):161.

[责任编辑 顾雪竹]