

天南星、半夏、白附子中 8 种核苷成分的含量测定

黄鲛^{1,2}, 易进海^{1*}, 刘玉红¹, 黄志芳¹, 陈燕¹, 刘云华¹

(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定天南星、半夏、白附子中 8 种核苷成分含量的方法。方法: 采用 Phenomenex Luna PFP(2) 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 260 nm。结果: 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷进样量分别在 0.004 34 ~ 0.434 μg ($r=0.999\ 9$), 0.002 34 ~ 0.234 μg ($r=0.999\ 9$), 0.004 07 ~ 0.407 μg ($r=0.999\ 7$), 0.010 90 ~ 1.090 μg ($r=0.999\ 9$), 0.002 01 ~ 0.201 μg ($r=0.999\ 9$), 0.00732 ~ 0.732 μg ($r=0.999\ 9$), 0.001 22 ~ 0.122 μg ($r=0.999\ 7$), 0.002 07 ~ 0.207 μg ($r=0.999\ 9$) 有良好的线性关系; 平均回收率分别为 104.2% (RSD 2.1%), 98.7% (RSD 2.4%), 103.7% (RSD 3.0%), 99.4% (RSD 1.4%), 101.8% (RSD 2.0%), 102.9% (RSD 1.9%), 98.3% (RSD 2.8%), 102.3% (RSD 2.7%)。结论: 方法简便、准确、快速, 结果可靠, 为测定天南星、半夏、白附子中 8 种核苷成分提供依据。

[关键词] 天南星; 半夏; 白附子; 核苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0059-04

[doi] 10.11653/syfy2013160059

Determination of Eight Nucleosides in Rhizoma Arisaema, Rhizoma Pinellie and Rhizoma Typhonii

HUANG Jiao^{1,2}, YI Jin-hai^{1*}, LIU Yu-hong¹, HUANG Zhi-fang¹, CHEN Yan¹, LIU Yun-hua¹

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of eight nucleosides in Rhizoma Arisaema, Rhizoma Pinellie and Rhizoma Typhonii. **Method:** The chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Luna PFP (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with methanol-water solution as mobile phase (gradient elution). The flow rate was 0.8 mL · min⁻¹, the column temperature was maintained at 35 °C and the detective wavelength was set at 260 nm. **Result:** The linear ranges of uracil, hypoxanthine, xanthine, uridine, inosine, guanosine, thymidine and adenosine were 0.004 34-0.434 μg ($r=0.999\ 9$), 0.002 34-0.234 μg ($r=0.999\ 9$), 0.004 07-0.407 μg ($r=0.999\ 7$), 0.010 90-1.090 μg ($r=0.999\ 9$), 0.002 01-0.201 μg ($r=0.999\ 9$), 0.007 32-0.732 μg ($r=0.999\ 9$), 0.001 22-0.122 μg ($r=0.999\ 7$), 0.002 07-0.207 μg ($r=0.999\ 9$) respectively. The average recoveries of the eight nucleosides were 104.2%, 98.7%, 103.7%, 99.4%, 101.8%, 102.9%, 98.3%, 102.3% and RSDs were 2.1%, 2.4%, 3.0%, 1.4%, 2.0%, 1.9%, 2.8%, 2.7% respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and rapid. It can be used for determination of nucleosides in Rhizoma Arisaema, Rhizoma Pinellie and Rhizoma Typhonii.

[Key words] Rhizoma Arisaema; Rhizoma Pinellie; Rhizoma Typhonii; nucleoside; HPLC

[收稿日期] 20111011(011)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB522804)

[第一作者] 黄鲛, 硕士, 从事中药化学成分与质量标准研究, Tel:028-85210843, E-mail: huangjiaolxj@163.com

[通讯作者] * 易进海, 研究员, 从事中药化学成分与质量评价研究, Tel:028-85210843, E-mail: yijinhai@yahoo.com.cn

天南星、半夏、白附子为常用有毒中药,均来源于天南星科植物,以炮制品入药。天南星为天南星科植物天南星、异叶天南星或东北天南星的干燥块茎;半夏为天南星科植物半夏的干燥块茎;白附子为天南星科植物独角莲的干燥块茎。三者具有相似的功效^[1],天南星燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿,半夏燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结,白附子祛风痰、定惊搐、解毒散结、止痛。三者主要化学成分有生物碱、氨基酸、挥发油、有机酸、核苷等。核苷类成分具有广泛的生理活性,是生物细胞维持生命活动的基本组成元素,参与 DNA 代谢过程,具有抗肿瘤、抗病毒、基因治病、免疫调节、改善脑细胞代谢、镇静中枢神经、抗血小板凝集、抗心律失常和抗惊厥等多种生物活性^[2-6];还有学者认为核苷可能是补益中药的共同物质基础^[6],与补益功效存在一定的关联性^[7]。核苷常作为半夏等根及根茎类中药材的含量测定指标性成分^[8-9],已有文献报道半夏中核苷成分的含量测定^[10-13],但天南星和白附子中核苷类成分的研究较少。本文采用高效液相色谱法测定天南星、半夏和白附子中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷和腺苷共 8 种核苷类成分的含量,为其质量评价与控制提供参考方法。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD 检测器,柱温箱,自动进样器,工作站),KQ-100 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),DL-5000B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),Sigma 3K15 型高速冷冻离心机,岛津 AUW220D 型 1/10 万电子天平,Millipore Milli-Q Integral 3 型超纯水机。甲醇为美国 Fisher 色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

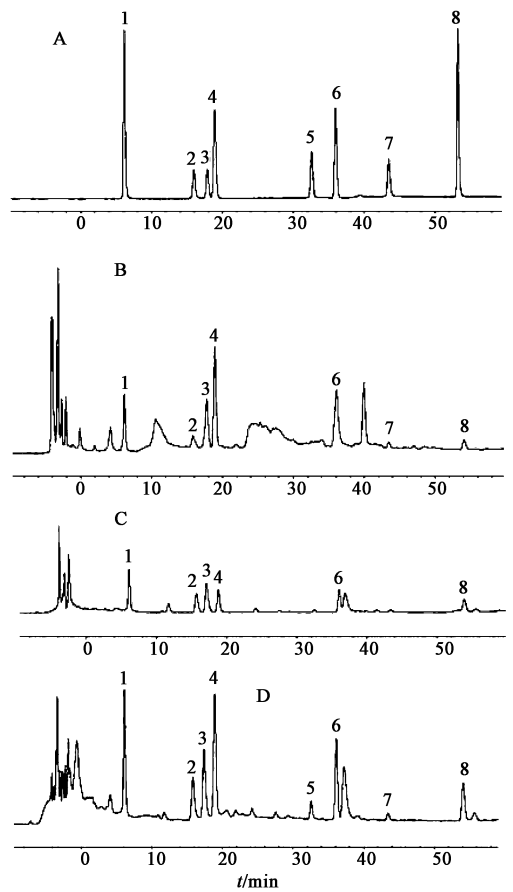
对照品尿嘧啶(批号 100469-200401)、尿苷(批号 887-200202)、肌苷(批号 140669-200702)购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用,次黄嘌呤(批号 060M1199V)、黄嘌呤(批号 090M0206V)、胸苷(批号 011M0016V)购自 Sigma 公司,纯度 99%,鸟苷(批号 10111132)、腺苷(批号 10121731)购自上海同田生物技术有限公司,纯度 98%。

样品分别购于四川省中药材公司、四川德仁堂公司、北京同仁堂公司、成都荷花池药材市场,经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定,制天南星为天南星科植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott 干燥块茎的炮制加工品,法/姜半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 干燥块

茎的炮制加工品,制白附子为天南星科植物独角莲 *Typhonium giganteum* Engl. 干燥块茎的炮制加工品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Luna PFP (2) 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 35 °C,流动相 A 为水, B 相为甲醇,梯度洗脱(0 ~ 6 min, 100% A; 6 ~ 30 min, 100% ~ 80% A; 30 ~ 35 min, 80% A),流速 0.8 mL · min⁻¹,检测波长 260 nm,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,所测 8 种核苷成分基本达到基线分离,混合对照品及样品色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B. 制天南星; C. 法半夏; D. 制白附子
1. 尿嘧啶; 2. 次黄嘌呤; 3. 黄嘌呤; 4. 尿苷;
5. 肌苷; 6. 鸟苷; 7. 胸苷; 8. 腺苷

图 1 混合对照品和样品 HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、腺苷、胸苷和腺苷对照品适量,精密称定,加水配置成每 1 mL 含尿嘧啶 0.021 69 mg、次黄嘌呤 0.011 7 mg、黄嘌呤 0.020 37 mg、尿苷 0.054 5 mg、肌苷 0.010 06 mg、鸟苷 0.036 63 mg、胸苷 0.006 12 mg、腺苷 0.010 36 mg 的混合对照品溶液 I。精密吸取溶液 I 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用

水定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液Ⅱ。

2.2.2 供试品溶液的制备 取各批次天南星、半夏和白附子的炮制品粉末约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加水20 mL,精密称定质量,超声处理(功率100 W,频率40 kHz)30 min,放冷,用水补足减失质

量,滤过,即得。

2.3 检测限与定量限 在选定的色谱条件下,当信噪比约为3时,计核苷类成分的检测限(LOD);当信噪比约为10时,计核苷类成分的定量限(LOQ),结果见表1。

表1 8种核苷类成分的线性关系、定量限和检测限

成分	线性范围/ μg	回归方程	r	LOD/ ng	LOQ($n=5$)	
					ng	RSD/%
尿嘧啶	0.004 34 ~ 0.434	$Y=5.125 \times 10^3 X + 2.622$	0.999 9	0.22	0.71	1.2
次黄嘌呤	0.002 34 ~ 0.234	$Y=4.188 \times 10^3 X + 1.917$	0.999 9	0.47	0.94	1.3
黄嘌呤	0.004 07 ~ 0.407	$Y=2.654 \times 10^3 X + 8.901$	0.999 7	0.81	1.63	0.9
尿苷	0.010 90 ~ 1.090	$Y=2.621 \times 10^3 X + 4.240$	0.999 9	0.55	1.09	1.4
肌苷	0.002 01 ~ 0.201	$Y=1.936 \times 10^3 X + 1.626$	0.999 9	0.60	1.01	1.8
鸟苷	0.007 32 ~ 0.732	$Y=2.682 \times 10^3 X + 6.008$	0.999 9	0.37	1.46	0.7
胸苷	0.001 22 ~ 0.122	$Y=2.321 \times 10^3 X + 4.438$	0.999 7	0.49	0.61	1.7
腺苷	0.002 07 ~ 0.207	$Y=4.085 \times 10^3 X + 3.159$	0.999 9	0.41	1.04	1.3

2.4 线性关系考察 精密吸取2.2.1项下混合对照品溶液Ⅰ5,10,15,20 μL 和混合对照品溶液Ⅱ2,5,10,15,20 μL ,注入液相色谱仪中,以进样量(μg)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表2。该方法在实验范围内线性关系良好。

表2 样品加样回收率试验($n=6$)

成分	取样量/ g	样品中含 有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	平均 回收率/ $\%$	RSD/ $\%$
尿嘧啶	0.504 9	0.023 0	0.021 7	0.045 5	104.2	2.1
次黄嘌呤	0.504 9	0.044 6	0.046 8	0.090 8	98.7	2.4
黄嘌呤	0.504 9	0.052 7	0.061 1	0.115 2	103.7	3.0
尿苷	0.504 9	0.043 4	0.054 5	0.097 2	99.4	1.4
肌苷	0.504 9	0.004 0	0.004 0	0.008 1	101.8	2.0
鸟苷	0.504 9	0.025 7	0.036 7	0.063 1	102.9	1.9
胸苷	0.504 9	0.002 4	0.003 1	0.005 4	98.3	2.8
腺苷	0.504 9	0.021 1	0.020 7	0.042 2	102.3	2.7

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品Ⅰ5 μL ,注入液相色谱仪,重复进样5次,按2.1项下色谱条件进行检测,记录峰面积,尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷峰面积的RSD分别为0.13%,0.21%,0.15%,0.31%,0.19%,0.22%,0.17%,0.23%($n=5$),表明仪器精密度好。

2.6 稳定性试验 取制天南星(1号)粉末约1 g,精密称定,按照2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,1,2,4,8 h取20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。结果尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷的RSD分别为2.1%,1.4%,2.0%,2.4%,1.7%,1.6%,2.9%,1.8%。同法考察了法半夏(7号)和制白附子(11号)供试品溶液的稳定性,结果表明天南星、半夏、白附子的供试品

溶液在8 h内稳定。

2.7 重复性试验 取制天南星(1号)粉末约1 g,精密称定,共5份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,精密吸取20 μL ,分别注入液相色谱仪,记录峰面积,计算,尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷和腺苷的平均含量分别为0.045 5,0.088 3,0.104 3,0.085 9,0.007 9,0.051 0,0.004 7,0.041 9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;RSD分别为2.0%,2.1%,3.1%,2.8%,3.7%,2.3%,1.7%,3.8%,表明该方法重复性良好。

2.8 回收率试验 取已知尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷、胸苷和腺苷含量的制天南星(1号)粉末约0.5 g,共6份,精密称定,准确加入适量的对照品,照含量测定项下操作,测定含量,计算平均回收率与RSD,结果见表2。

2.9 样品测定 取各样品按2.2.2项下操作,制成供试品溶液,在2.1项色谱条件下进行分析,测定8种核苷成分的峰面积,并用外标法计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 提取方法的考察 文献报道的核苷含量测定的供试品溶液制备方法各不相同,常采用水、30%甲醇、70%甲醇、90%甲醇超声或回流提取^[10-14],如《中国药典》测定冬虫夏草中腺苷的含量用90%甲醇回流提取^[1]。本文系统比较了上述提取溶媒及超声、回流提取方法对核苷成分提取效果的影响,结果表明水和30%甲醇超声、回流提取效果相当,且明显优于70%甲醇和90%甲醇,故本文以水超声提取制备供试品溶液。

表 3 天南星、半夏、白附子 8 种核苷成分含量测定

mg·g⁻¹

No.	样品	来源	尿嘧啶	次黄嘌呤	黄嘌呤	尿苷	肌苷	鸟苷	胸苷	腺苷	总量
1	制天南星	成都荷花池	0.045 5	0.088 3	0.104 3	0.085 9	0.007 9	0.051 0	0.004 7	0.041 9	0.429 5
2	制天南星	北京同仁堂	0.018 9	0.068 1	0.049 4	0.130 4	0.012 1	0.094 5	0.007 0	0.054 4	0.434 8
3	制天南星	四川德仁堂	0.048 3	0.020 9	0.084 1	0.187 3	-	0.129 6	0.011 1	0.016 2	0.497 5
4	制天南星	四川省中药材公司	0.050 3	0.017 4	0.104 1	0.071 6	0.008 6	0.054 8	-	0.062 3	0.369 1
5	姜半夏	成都荷花池	0.008 7	0.027 5	0.006 1	0.094 3	-	0.066 5	0.002 4	0.004 7	0.210 2
6	法半夏	北京同仁堂	0.038 3	0.024 4	-	0.112 2	-	0.100 7	-	0.025 9	0.301 5
7	法半夏	四川德仁堂	0.032 3	0.025 7	0.049 2	0.024 8	0.007 9	0.031 6	-	0.014 2	0.185 7
8	法半夏	四川省中药材公司	0.069 6	0.017 2	-	0.104 6	-	0.096 2	0.004 6	0.023 7	0.315 9
9	制白附子	成都荷花池	0.052 9	0.073 0	0.072 5	0.160 0	0.024 7	0.094 2	0.009 9	0.035 4	0.522 6
10	制白附子	北京同仁堂	0.040 1	0.073 3	0.103 2	0.048 9	0.011 6	0.037 1	0.006 0	0.017 8	0.338 0
11	制白附子	四川德仁堂	0.105 8	0.068 1	0.111 9	0.243 3	0.054 8	0.175 2	0.014 3	0.060 6	0.834 0
12	制白附子	四川省中药材公司	0.057 8	0.064 6	-	0.033 4	0.014 7	0.032 5	0.004 9	0.011 7	0.219 6

注：“-”示未检出。

3.2 色谱条件优化 比较了十八烷基硅烷键合硅胶柱 (Eclipse XDB C₁₈, Phenomenex Luna C₁₈) 和五氟苯基柱 (Phenomenex Luna PFP) 对核苷类成分分离效果。结果表明,用十八烷基硅烷键合硅胶柱,尿嘧啶在 5 min 内出峰,保留时间较短,受杂质峰干扰较大;而五氟苯基柱对芳环、杂环化合物有较强的吸附分离能力,尿嘧啶等核苷类成分的保留时间显著延长,所测 8 种核苷成分基本达到基线分离。故本实验采用五氟苯基柱,以甲醇-水体系为流动相,优化梯度程序,最终确定了文中所述的流动相。此外,本文通过二极管阵列检测器考察了核苷各成分的紫外吸收光谱,选取 260 nm 作为检测波长,使各检测成分在选定流动相体系中有最大吸收。

3.3 测定结果 表 3 测定结果表明,制天南星、法/姜半夏和制白附子中均含有尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟苷和腺苷,且不同来源样品中核苷成分的含量差异较大,可能与品种基源、产地或加工炮制有关。炮制方法对核苷成分含量的影响,笔者将在后续研究中进一步考察。

[参考文献]

[1] 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,2010:53,98,106,110.
 [2] Kinahan J J, Kowal E P, Grindey G B. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L1210 [J]. Cancer Research,1981,41(2):445.
 [3] Lee J, Chuang T H, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7 [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(11):6646.

[4] 王锐. 嘧啶核苷的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2007,18(3):539.
 [5] 肖维强,黄炳雄,王晓蓉,等. HPLC 法测定龙眼肉中的几种核苷类物质 [J]. 食品科学,2007,28(1):282.
 [6] 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.
 [7] 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.
 [8] 张建芝,宋昌慧,陈波,等. RP-HPLC 同时测定贝母药材中 5 种核苷类化合物 [J]. 中国中药杂志,2010,35(1):67.
 [9] 肖珊珊,金郁,郭怀忠,等. RP-HPLC 法测定板蓝根药材中核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志,2006,26(1):48.
 [10] 吕爱娟,张志澄,张科卫,等. RP-HPLC 法同时测定半夏中 5 种核苷含量的研究 [J]. 药物分析杂志,2007,27(7):1051.
 [11] 张科卫,吴皓,李伟. HPLC 同时测定半夏药材中次黄嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷的含量 [J]. 药物分析杂志,2005,25(5):487.
 [12] 赵杨,靳风云,伍庆,等. 高效液相色谱法测定贵州不同产地半夏药材中鸟苷和腺苷的含量 [J]. 时珍国医国药,2007,18(1):23.
 [13] 王学军,徐文芬,冉懋雄,等. HPLC 法测定不同产地半夏药材中腺苷的含量 [J]. 西北药学杂志,2010,25(2):102.
 [14] 陆丹,罗芬,池玉梅,等. 高效液相色谱法同时测定中药材虎掌南星的核苷类成分 [J]. 色谱,2011,29(1):83.

[责任编辑 顾雪竹]