

10 个产地核桃仁中核苷类成分的含量测定

李中桂^{1*}, 郭小华², 曹丽萍³, 王新雨¹

(1. 广东岭南职业技术学院, 广州 510663;

2. 赣南医学院, 江西赣州 341000; 3. 深圳市宝安中医院, 广东深圳 518133)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时分离测定了核桃仁中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵为流动相梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C, 测定了 10 个产地核桃仁中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量。结果: 4 种核苷类成分在各自线性范围内, 峰面积值与进样量呈良好的线性关系 ($r=0.9993\sim0.9999$); 回收率为 98%~101% (RSD < 3%), 结论: 方法简便快速、结果准确、重复性和稳定性好, 可为核桃的含量测定提供参考。

[关键词] 核桃仁; 核苷类成分; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0145-04

[doi] 10.11653/syjf2013100145

Determination of Nucleosides Compounds in Walnut Kernel from 10 Different Regions

LI Zhong-gui^{1*}, GUO Xiao-hua², CAO Li-ping³, WANG Xin-yu¹

(1. Guangdong Lingnan Institute of Technology, Guangzhou 510663, China;

2. Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

3. Baoan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518133, China)

[收稿日期] 20120605(011)

[通讯作者] * 李中桂, 硕士, 助教, 从事中药新药开发与研究, Tel: 020-22305740, E-mail: lizhongguixiejia@163.com

与水蒸汽蒸馏法所得挥发性主要成分差异性较大。 β -月桂烯具有抗氧化活性和致癌作用, 口服 β -月桂烯将诱发鼠的肾、鼻和肝脏非肿瘤引起的病变^[6-7]。因此我国民间假药新鲜全草常用于外用, 而其水煎剂常作为内服药^[1], 具有科学的道理。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草第 3 卷. [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 2045.
- [2] Sireeratawong S, Vannasiri S, Sritiwong S, et al. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of the ethanol extract from root of *Piper sarmentosum* Roxb [J]. J Med Assoc Thai, 2010, 93 Suppl 7: S1.
- [3] Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, et al. Antioxidant, anti-TB activities, phenolic and amide contents of standardised extracts of *Piper sarmentosum* Roxb [J]. Nat Prod Res, 2009, 23(3): 238.

- [4] Ridditid W, Rattanaprom W, Thaina P, et al. Neuromuscular blocking activity of methanolic extract of *Piper sarmentosum* leaves in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation [J]. J Ethnopharmacol, 1998, 61(2): 135.
- [5] 宋艳平, 徐明忠, 梁勇. 假药挥发油化学成分气质联用分析研究 [J]. 分析实验室, 2006, 25(1): 24.
- [6] Ciftci O, Ozdemir I, Tanyildizi S, et al. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver [J]. Toxicol Ind Health, 2011, 27(5): 447.
- [7] National Toxicology Program. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of beta-myrcene (CAS No. 123-35-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies) [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2010, (557): 1.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To determine the content of cytidine, uridine, guanosine and adenosine in walnut kernel by HPLC. **Method:** The HPLC method was used to determine respectively the content of cytidine, uridine, guanosine and adenosine in walnut kernel from 10 different regions. The analysis was carried out on Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Methanol-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate was used as mobile phase with gradient elution; the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, detection wavelength was set at 260 nm and the column temperature was kept at 30 °C. **Result:** The injection amounts of four nucleosides compounds over respective ranges displayed good linear relationship with the peak area and the correlation coefficients equaled or exceeded 0.999 3. The average spike recoveries for four nucleosides compounds ranged from 97% to 102%, with a RSD of less than 3%. **Conclusion:** The method is simple, quick, accurate and reproducible, and can be provide reference for the quality control of the walnut kernel.

[Key words] walnut kernel; nucleosides; HPLC; quantification

核桃为胡桃科植物胡桃的干燥成熟种子,性甘、温,归肾、肺、大肠经,具有补肾,温肺,润肠的功效,属于补益类中药。目前核桃仁含量测定的报道中有测其多酚类^[1]、蛋白质和黄酮^[2]、总单宁^[3]、无机元素^[4]氨基酸^[5]等成分,而核苷类成分的含量测定报道较少。现代研究补益类中药所含核苷成分是生物细胞维持生命的重要物质,具有免疫调节、改善脑细胞代谢、调节中枢神经等多种生理活性,此类成分作为质量控制的指标越来越受到重视。有报道将其作为冬虫夏草、灵芝等补益药的质量控制指标^[6-8],《中国药典》2010年版中以腺苷的含量测定作为冬虫夏草的质量控制指标,现行《中国药典》2010年版中核桃仁质量标准里尚无含量测定项,本文采用高效液相色谱法,对来自 10 个不同产地核桃仁中的核苷类成分胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量进行测定。

1 材料

DIONEX SUMMIT P680 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),FA1104 型电子天平(瑞士, METLER),KH5200DE 型数控超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司),JI 80-2B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

腺苷(批号 18H0295),胞苷(批号 30270),尿苷(批号 29H0484),鸟苷(批号 128H1478)分别购自 Sigma 公司,纯度 98%;甲醇为色谱纯、水为纯净水,乙酸铵为分析纯。核桃购于广州清平市场,由中药鉴定教研室王新雨老师鉴定为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* L. 的干燥成熟种子。

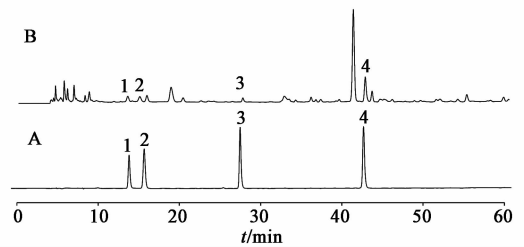
2 方法

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇(A)-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(B)为流动相进行梯度洗脱(表 1),检测波长 260 nm,柱温 30 °C,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,

根据上述的色谱条件,得出的色谱图(见图 1),对对照品和样品均能得到很好的分离。

表 1 流动相梯度洗脱表

t/min	流动相 A (甲醇)/%	流动相 B(10 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵)/%
0~6	1	99
6~15	1~4	99~96
15~25	4~8	96~92
25~60	8~20	92~80



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 胞苷; 2. 尿苷; 3. 鸟苷; 4. 腺苷

图 1 核桃仁中 4 种核苷成分的 HPLC

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷对照品适量,加水制成含尿苷(2 mg·L⁻¹)、胞苷(2 mg·L⁻¹)、鸟苷(2 mg·L⁻¹)、腺苷(2 mg·L⁻¹)的混合对照品溶液,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.3 供试品溶液的制备 将核桃仁粉碎成粗粉,于 40 °C 真空干燥,置干燥器中冷却至室温,精密称其粗粉约 1 g,置具塞锥形瓶中,精密加水 15 mL,称定质量,超声提取 30 min,放至室温,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 方法学的验证

2.4.1 线性范围的考察 分别精密吸取对照品溶

液 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 40 μL 进样, 测定其峰面积。以峰面积值为纵坐标, 进样量 (ng) 为横坐标作图, 进行线性回归分析。结果表明, 4 种核苷成分在各自线性范围内, 峰面积值与进样量呈良好的线性关系 (见表 2)。

表 2 4 种核苷成分的线性关系

成分	回归方程	相关系数 r	线性范围/ng
胞苷	$Y = 24.63X - 0.2744$	0.9997	2.5 ~ 80.0
尿苷	$Y = 34.676X + 0.1152$	0.9993	2.5 ~ 80.0
鸟苷	$Y = 43.67X + 0.0291$	0.9999	2.5 ~ 80.0
腺苷	$Y = 50.209X + 3.6375$	0.9998	2.5 ~ 80.0

2.4.2 精密度试验 分别精密吸取对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 测定其峰面积, 结果胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷峰面积值的 RSD 分别为 1.50%, 1.28%, 1.39%, 0.99%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h, 分别进样 10 μL , 测定各组分的峰面积, 结果样品中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷峰面积值的 RSD 分别为 0.62%, 1.06%, 1.46%, 0.93%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一样品 6 份, 按上述方法制备成供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 测定各组分的峰面积并计算其含量。结果样品中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷含量的 RSD 分别为 1.60%, 1.68%, 1.62%, 0.90%, 表明该法重复性良好。

2.4.5 回收率试验 取 6 份同一批次已知含量的样品约 0.50 g, 精密称定, 分别精密加入一定量的胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷对照品, 按上述方法制备成供试品溶液, 测定各组分的含量并计算回收率, 见表 3。

表 3 4 种核苷成分回收率试验测定

项目	样品含量/ μg	加入量/ μg	实测值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
胞苷	21.80	21.00	43.02	101.05	98.88	1.62
	21.35	21.00	41.97	98.19		
	22.27	21.00	42.68	97.19		
	21.70	21.00	42.15	97.38		
	21.04	21.00	42.13	100.43		
	21.23	21.00	42.03	99.05		
尿苷	15.16	15.00	29.8	97.60	100.02	1.73
	14.79	15.00	29.99	101.33		
	15.03	15.00	30.3	101.80		
	15.78	15.00	30.98	101.33		
	15.10	15.00	30.03	99.53		
	14.89	15.00	29.67	98.53		
鸟苷	7.14	7.00	14.12	99.71	99.74	1.80
	7.80	7.00	14.62	97.43		
	6.95	7.00	14.02	101.00		
	7.32	7.00	14.35	100.43		
	7.74	7.00	14.88	102.00		
	7.27	7.00	14.12	97.86		
腺苷	39.48	40.00	78.82	98.35	98.63	1.13
	39.31	40.00	79.5	100.48		
	39.73	40.00	79.46	99.33		
	40.10	40.00	79.49	98.48		
	39.10	40.00	78.13	97.58		
	39.60	40.00	78.64	97.60		

2.5 样品的测定 按上述方法制备各供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定各组分的峰面积并计算其含量 (见表 4)。

3 讨论

核苷类成分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、

基因治疗等多种生物活性。中草药尤其是补益类中药广泛含有核苷类成分, 如冬虫夏草、灵芝、大枣、枸杞子等。然而核苷类成分因植物基源不同其组成及其含量存在明显差异, 可根据中药中核苷类成分分布情况并对其进行质量控制^[9]。在预实验过程中, 笔者对现有文献报道的 10 多种核苷类成分的对

表 4 10 个不同产地核桃中核苷类成分的含量测定

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	产地	胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	总量
1	云南 楚雄	31.801	25.81	7.608 7	63.513	128.73
2	云南 大理	43.382	30.168	14.266	78.975	166.79
3	云南 昌宁	-	74.749	28.702	88.504	191.95
4	贵州 安龙	-	32.556	5.095 1	22.886	60.537
5	贵州 兴义	-	27.528	7.099 2	35.016	69.643
6	新疆 阿克苏	21.569	28.031	12.296	16.105	78.00
7	新疆 和田	34.252	37.668	16.27	18.268	106.46
8	新疆 喀什	23.223	30.084	11.549	15.17	80.025
9	山西 汾阳	17.157	62.556	11.583	82.132	173.43
10	山西 孝义	24.02	38.673	25.408	31.216	119.32

照品色谱峰与样品色谱峰进行比对,结果表明,核桃中主要存在的核苷类成分有胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷。故将这 4 种成分作为核桃中所含核苷类成分的代表进行含量测定。

核苷类成分为水溶性成分,本文直接以纯水作为溶媒,采用超声提取,方法简单,易操作。选择甲醇-10 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液作为流动相,采用梯度洗脱,各成分均能较好分离^[10-11]。

不同产地之间或者同一产地之间的核桃仁中各核苷含量和成分组成均有显著差异。若仅以单一核苷作为质量控制指标可能难以客观评价其质量,但若仅以核苷总量来评价核桃质量的优劣,也可能忽略其所含某一核苷成分的突出作用。如尿苷作用突出在提高机体抗体水平、抗癌、抗病毒等^[9],云南大理和山西汾阳两产地核苷总量相差不大,但是二者尿苷含量却有显著差别,当比较提高机体免疫力功能时,核苷总量不能客观反映二者质量区别。因此,既考虑到核苷总体含量,又注意到某成分的突出作用,会更客观反映出核桃质量。

[参考文献]

[1] 万政敏,郝艳宾,杨春梅,等. 核桃仁种皮中的多酚类物质高压液相色谱分析[J]. 食品工业科技, 2007, (7):212.
[2] 卫强,张国升,程经旺,等. 油炸前后核桃中蛋白质和黄酮含量的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1):8.

[3] 刘慧文. 分光光度法快速测定核桃仁中总单宁含量[J]. 现代仪器, 2010(2):35.
[4] 张甲生,孙春华,周淑贤. 核桃仁中无机元素含量的测定[J]. 世界元素医学, 2009(2):38.
[5] 杨俊,王文辉,李翼,等. 柱前衍生超高效液相色谱法测定核桃仁中的氨基酸含量[J]. 食品与发酵工业, 2011(2):187.
[6] Yang F Q, Li S P, Li P, et al. Optimization of CEC for simultaneous determination of eleven nucleosides and nucleobases in Cordyceps using central composite design [J]. Electrophoresis, 2007, 28(11):1681.
[7] Gao J L, Wang Y T, Li S P, et al. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC-DAD-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44:807.
[8] Guo S, Duan J A, Tang Y P, et al. Characterization of nucleosides and nucleobases in furits of *Ziziphus jujuba* Mill. By UPLC-DAD-MS [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(19):10774.
[9] 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(17):98.
[10] 毛艳,杨伟俊,玛依拉·买买提依明,等. RP-HPLC 法测定维感泡腾片中腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):25.

[责任编辑 顾雪竹]