

HPLC 同时测定全蝎不同工艺提取物中 5 种核苷类化合物含量

田晓然, 付廷明, 郭立玮*
(南京中医药大学, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 比较水煎煮、醇提取以及湿法超微粉碎 3 种提取工艺对全蝎中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷 5 种核苷类成分含量的影响。**方法:** 全蝎经不同工艺提取, 采用 HPLC 外标法测定提取物中 5 种核苷化合物含量。Agilent C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.07% 冰乙酸-甲醇梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。**结果:** 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷 5 种核苷化合物均在一定质量浓度范围内线性关系良好, *r* 均 > 0.999 5, 样品中 5 种核苷化合物的加样回收率 98.9% ~ 103.9%, RSD 均 < 3%。**结论:** 该 HPLC 简便快速、灵敏度高、重复性好, 可应用于同时测定尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷 5 种核苷化合物含量并比较不同全蝎提取物之间的差异。

[关键词] 全蝎; 高效液相色谱法; 核苷类化合物

[中图分类号] R283.6, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0013-04

[doi] 10.11653/syjf2013080013

HPLC Simultaneous Determination of Five Nucleoside Compounds in Extracts of *Buthus martensii* by Different Extraction Technologies

TIAN Xiao-ran, FU Ting-ming, GUO Li-wei*
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To compare effects of 3 extraction technologies (water boiling, alcohol extraction and wet ultrafine grinding) on the content of uracil, hypoxanthine, xanthine, guanosine and adenosine from *Buthus martensii*. **Method:** Samples of *B. martensii* were extracted with different technologies, the content of five nucleosides was determined by HPLC. Conditions were as followings: Agilent Zorbax C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), gradient eluted with 0.07% ice acetic acid-methanol as mobile phase, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength 254 nm and column temperature 35 °C. **Result:** Uracil, hypoxanthine, xanthine, guanosine, adenosine had a good linear relationship in a certain range of concentration, *r* > 0.999 5, the average recoveries of five nucleoside compounds in all samples were between 98.9% -103.9% with RSD < 3%. **Conclusion:** This established HPLC was convenient and accurate with good repeatability, it could be used to determine simultaneously the content of five nucleosides (uracil, hypoxanthine, xanthine, guanosine, adenosine) and compare difference among extracts of *B. martensii* by different technologies.

[Key words] *Buthus martensii*; HPLC; nucleosides

核苷是生物细胞维持生命的重要物质, 具有免疫调节等多种药理生理活性, 是冬虫夏草和灵芝等中药的质量控制指标^[1-2]。国内外均有采用 HPLC 对天然药用生物体内核苷类化合物进行含量测定^[3-4]、成分分析^[5-9]及分离检测^[10-11]的报道。

全蝎为一种常见的动物类中药材, 其主要药效成分为蝎毒蛋白, 此外还含有三甲胺、甜菜碱、牛磺酸、胆甾醇、卵磷脂、多种氨基酸及大量核苷类等成

[收稿日期] 20121118(006)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制项目(2011ZX09401-308-8)

[第一作者] 田晓然, 硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 025-86798399, E-mail: mumumu1021@126.com

[通讯作者] * 郭立玮, 研究员, 从事中药复方分离工程研究, Tel: 025-86798066, E-mail: guoliwei815@yahoo.com.cn

分^[12],但全蝎现有的质量控制方法并不明确,2010年版《中国药典》只规定其醇浸出物含量,多数研究者着眼于其蛋白质类成分的定性定量研究^[13-14],对全蝎中核苷类化合物的分离分析未有报道。本实验建立的 HPLC 对设备要求低,且操作简单、快速,避免了大量缓冲盐的介入对色谱柱寿命的影响,实现了对全蝎不同工艺提取物中 5 种核苷类成分的同时测定,为全蝎的质量控制提供参考。

1 材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (Agilent 公司), Zorbax C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent 公司), LIBROR AEL-40SM 型精密光电分析天平 (日本岛津公司), 超微粉碎机 (自制)。

全蝎购自安徽省亳州市永刚饮片有限公司,经南京中医药大学药学院药用植物鉴定教研室刘训红教授鉴定,系为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体,置于 30 °C 真空干燥箱干燥备用。尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷对照品 (纯度均 > 99.5%, 美国 Sigma 公司,批号分别为 201203, 201109, 201201, 201203, 201203), 冰乙酸、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品储备液的配制 取干燥至恒重的各对照品适量,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后作为母液,母液稀释 10 倍后制得尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷质量浓度分别为 15.90, 37.80, 42.10, 50.06, 26.37 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.2 不同提取工艺样品溶液的制备

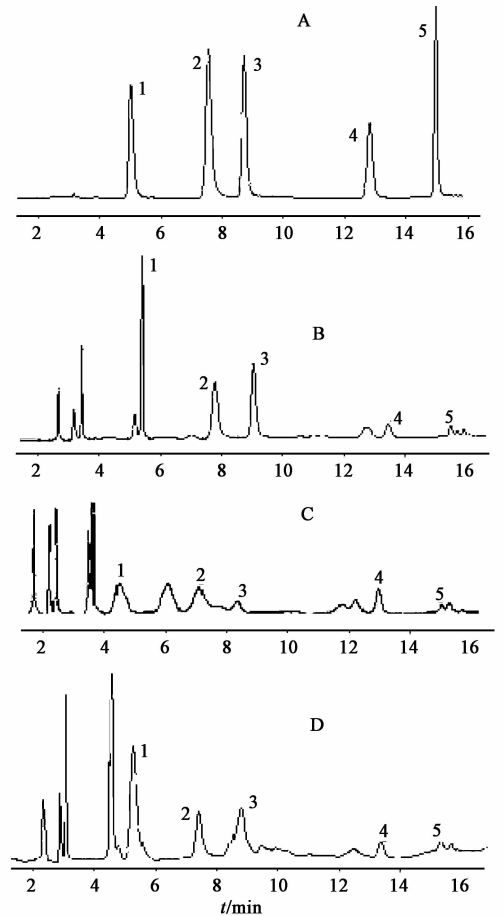
2.2.1 水煎煮法 (WDE) 称取干燥全蝎粗粉适量,加 8 倍量水浸泡 1 h,煎煮 20 min,过滤,残渣加 8 倍量水煎煮 20 min,过滤,合并滤液,离心 10 min (10 000 r·min⁻¹),精密量取适量上清液,加乙醇至体积分数为 70%,沉淀过夜。取上清液浓缩至一定体积,离心 10 min (12 000 r·min⁻¹),取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 醇提法 (AE) 称取与 2.2.1 项下相同质量的干燥全蝎粗粉,加 8 倍量 50% 乙醇浸泡 1 h,热回流提取 1 h,过滤,残渣加 8 倍量 50% 乙醇回流 30 min,过滤,按 2.2.1 项下自“合并滤液”至“取续滤液”,即得。

2.2.3 湿法超微粉碎法 (WUGE)^[15] 称取与 2.2.1 项下相同质量干燥全蝎药材,加 12 倍量水浸泡 1 h,湿法超微粉碎 10 min,提取液按 2.2.1 项下

自“离心 10 min (10 000 r·min⁻¹)”至“取续滤液”,即得。

2.3 色谱条件 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水 (含 0.07% 冰乙酸) (A)-甲醇 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 3% B; 3 ~ 5 min, 3% ~ 8% B; 5 ~ 10 min, 8% ~ 10% B; 10 ~ 15 min, 10% ~ 35% B; 15 ~ 20 min, 35% ~ 3% B), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。见图 1。



A. 混合对照品; B. 水煎煮法样品; C. 醇提法样品;
D. 湿法超微粉碎法样品; 1. 尿嘧啶;
2. 次黄嘌呤; 3. 黄嘌呤; 4. 鸟苷; 5. 腺苷

图 1 全蝎各提取液 HPLC

由图 1 可知,3 种提取工艺样品溶液的色谱图峰容量不同,WDE 样品的峰数 12 个,AE 样品的峰数为 15 个,而 WUGE 样品的峰数为 10 个,说明 3 种工艺提取液中,除本文分离检测的 5 种核苷类成分外,其他成分的含量也有较大差异。因此,可根据核苷类成分的不同选择相应提取方法。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系与最低检测限的考察 精密量取

2.1 项下混合对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 分别进样 10 μL , 以各对照品峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行回归分析, 回归方程、最低检测限 ($S/N = 3$) 和最低定量限 ($S/N = 10$), 见表 1。

表 1 5 种核苷类成分的回归方程、相关系数、线性范围、定量限和检出限

成分	回归方程	r	线性范围 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	检出限 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
尿嘧啶	$Y = 41.84X - 4.56$	0.999 5	1.59 ~ 15.90	0.03	0.10
次黄嘌呤	$Y = 28.85X - 6.79$	1.000 0	3.78 ~ 37.80	0.05	0.15
黄嘌呤	$Y = 19.20X - 0.81$	0.999 5	4.21 ~ 42.10	0.07	0.22
鸟苷	$Y = 10.38X - 0.51$	1.000 0	5.01 ~ 50.06	0.13	0.40
腺苷	$Y = 28.80X - 0.79$	1.000 0	2.64 ~ 26.37	0.05	0.15

2.4.2 精密度考察 取同一份混合对照品溶液, 同 1 d 连续进样 6 次, 计算各成分对应的色谱峰面积; 每天进样 2 次, 连续测定 3 d, 计算各成分对应的色谱峰面积。结果尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷日内峰面积 RSD 分别为 0.10%, 0.21%, 0.16%, 0.18%, 0.21%; 日间峰面积 RSD 分别为 0.14%, 0.23%, 0.15%, 0.17%, 0.20%。说明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性考察 精密称定全蝎药材适量, 以水煎煮法为例, 按 2.2.1 项下方法制备样品溶液 6 份, 各取 10 μL 进样测定, 计算各成分含量。结果尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷 RSD 分别为 1.94%, 0.04%, 0.04%, 0.84%, 0.93%, 说明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性考察 取重复性试验的同一批样品溶液, 常温下放置。于 24 h 内每隔 4 h 进样分析, 每次 10 μL , 测定峰面积, 计算各组分含量。结果显示峰面积变化趋势不明显, 尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟苷、腺苷 RSD 分别为 0.80%, 0.05%, 0.10%, 0.99%, 1.31%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率考察 精密称取已知含量的全蝎药材 6 份, 按 5 种核苷类成分在原药材中质量分别精密加入等量对照品, 按 2.2.1 项下方法制备样品溶液, 计算加样回收率, 结果平均回收率 98.9% ~ 103.9%, RSD 均 < 3.0% (表 2), 符合含量测定的准确性要求。

表 2 水煎煮法样品中 5 种核苷类成分加样回收率 ($n = 6$)

成分	样品中 质量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	平均回 收率/%	RSD /%
尿嘧啶	6.007	6.131	12.242	101.7	1.84
次黄嘌呤	9.159	9.386	18.674	101.4	1.05
黄嘌呤	13.698	13.687	27.236	98.9	1.47
鸟苷	6.437	6.475	12.913	100.0	0.85
腺苷	1.049	1.021	2.11	103.9	1.03

2.4.6 样品测定 精密称取全蝎药材适量, 按 2.2 项下方法分别制备样品溶液 ($n = 3$), 测定 5 种核苷类成分峰面积, 分别计算 5 种核苷类成分含量。结果见表 3, 说明 3 种工艺提取物中尿嘧啶含量差异不明显, 但其余 4 种核苷类化合物含量受提取工艺的影响较大。其中, 次黄嘌呤在水煎煮和醇提法中含量较高, 黄嘌呤的含量仅在水煎煮提取液中较高, 鸟苷和腺苷只在醇提法中含量显著。与其他两种方法比较, 湿法超微粉碎法对 5 种核苷类化合物含量的影响无明显差异。此外, 由图 1 可以辨认出, 3 种提取工艺样品溶液的色谱图峰容量不同, 水煎煮法样品的峰数 12 个, 醇提法样品的峰数为 15 个, 而湿法超微粉碎法样品的峰数为 10 个, 从而说明, 3 种工艺提取液中, 除本文分离检测的 5 种核苷类成分外, 其他成分的含量也有较大差异。

表 3 全蝎药材 3 种提取工艺中 5 种核苷类成分含量 ($n = 3$)

提取方法	尿嘧啶	次黄嘌呤	黄嘌呤	鸟苷	腺苷
水煎煮	0.615	0.916	1.369	0.638	0.106
乙醇提取	0.625	1.098	0.359	1.099	0.801
湿法超微粉碎	0.637	0.471	0.753	0.194	0.084

3 讨论

核苷类成分主要包括碱基和核苷两大类, 碱基指嘌呤和嘧啶等, 包括游离的尿嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤等; 核苷是由碱基通过糖苷键与戊糖缩合而成, 包括腺苷、鸟苷、脱氧尿嘧啶核苷等^[16]。这类化合物均为偏碱性的水溶性成分, 极性均较大, 因此初步选择以大量水相为流动相进行色谱分离。实验中比较了不同缓冲盐水溶液-甲醇、不同比例乙腈-水及加入不同比例甲酸和冰乙酸-水的流动相系统。结果表明含有 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 缓冲盐的水-甲醇系统^[17], 其色谱图中各对照品峰间隔较宽, 且前沿峰明显, 更换相同质量浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 后, 其峰形得到改善, 但混合对照品的分离效果较差。不同

比例的乙腈-水系统混合对照品虽能较好分离,但此系统对全蝎样品的分离效果不太理想。不同质量浓度的甲酸和冰乙酸-水系统比较,甲酸较冰乙酸的酸性略强,较大程度上增加了核苷类等弱碱性成分的解离,在溶液中形成极性较强的离子,在洗脱过程中随流动相洗脱不易被保留,样品色谱峰出现较大的大包,而不同比例的冰乙酸-水系统则较好的实现了样品中核苷类成分的基线分离,其分离度和峰形也较为理想。此外,对样品进行全波长扫描发现样品在 254 nm 处有最大吸收,同时 5 种待测成分在此波长下均有很强吸收,因此选择测定波长为 254 nm。

WUGE 为本课题组探索应用于中药提取的一种新型技术,尤其对于动物类中药,该方法能在常温下使药材细胞壁破碎,使有效成分溶出的同时尽量减少高温对成分的破坏,其破壁率高达 95%,明显高于组织破碎法;经粒径分布统计显示此法粉碎片粒子粒径约 10 μm ,仅为组织破碎法的 1/10。动植物药材的细胞粒径分布在 10 ~ 100 μm ,此法对大多数细胞进行高效破碎,使有效成分更快溶出,大大降低了提取时间。

[参考文献]

[1] 周慧燕,陈珏,许丽丽. 冬虫夏草中核苷类化学成分的含量测定研究进展 [J]. 中成药, 2011, 33 (11):1955.

[2] 顾中演,翁新楚. 灵芝药材质量的 HPLC 指纹图谱评价方法 [J]. 上海大学学报:自然科学版, 2008, 14 (6):652.

[3] 陈玉婷,朱曼萍,王丹红,等. HPLC 测定冬虫夏草不同药用部位腺苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (9):857.

[4] 王艳,杨培民,代龙,等. HPLC 测定水蛭仿生酶解有效部位中次黄嘌呤及鸟苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):234.

[5] 李伟,文红梅,钟进,等. 地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿

嘧啶、尿苷的含量 [J]. 中药材, 1996, 19(12):625.

[6] 刘丽芳,金蓉鸾,徐国钧,等. HPLC 法测定 10 种动物药中尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、尿苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(2):73.

[7] 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、尿苷和腺苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 30(1):33.

[8] 周冉,李淑芬. RP-HPLC 同时快速测定鹿茸中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (4):575.

[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(4):98.

[10] 张道来,陈军辉,周明,等. 反相高效液相色谱法同时测定罗氏海盘车中的 7 种核苷化合物 [J]. 色谱, 2010, 28(8):795.

[11] 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.

[12] 罗跃,彭延古,易小明. 全蝎的化学成分及其作用的研究进展 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28 (3):78.

[13] Hanen Louati, Nacim Zouari, Nabil Miled, et al. A new chymotrypsin-like serine protease involved in dietary protein digestion in a primitive animal, *Scopio maurus*: purification and biochemical characterization [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10(1):121.

[14] 孟琳,姬涛,侯林,等. 全蝎匀浆提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4):577.

[15] 郭立玮. 中药分离原理与技术 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2010:348.

[16] 张建芝. 核苷类成分的分析及流动相选择对中药分离的影响 [D]. 长沙:湖南师范大学, 2010.

[17] 韦静雯,王梦月,史海明,等. HPLC 法测定海龙中胸腺嘧啶、次黄嘌呤、尿嘧啶的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17):2277.

[责任编辑 全燕]