

## RP-HPLC 同时测定暗紫贝母中 10 个核苷及碱基类成分的含量\*

张海娟<sup>1,2</sup>, 马世震<sup>1\*\*</sup>, 肖远灿<sup>1</sup>, 迟晓峰<sup>1</sup>, 董琦<sup>1</sup>, 胡凤祖<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 目的: 建立 RP-HPLC-DAD 同时测定暗紫贝母药材中 5 个核苷类活性成分(尿苷、鸟苷、胸苷、腺苷、肌苷)及 5 个游离的碱基(腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶)含量的方法。方法: 采用 Agilent Zorbax Bonus-RP C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇和水, 梯度洗脱, 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长 260 nm; 柱温 30 °C。结果: 胞嘧啶、尿苷、鸟苷、胸苷、腺苷、腺嘌呤、肌苷、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶的质量浓度分别在 1.78 ~ 56.80 mg · L<sup>-1</sup>、1.84 ~ 59.00 mg · L<sup>-1</sup>、1.58 ~ 50.60 mg · L<sup>-1</sup>、1.73 ~ 55.30 mg · L<sup>-1</sup>、1.78 ~ 57.10 mg · L<sup>-1</sup>、1.63 ~ 52.10 mg · L<sup>-1</sup>、1.79 ~ 57.20 mg · L<sup>-1</sup>、1.80 ~ 57.70 mg · L<sup>-1</sup>、1.63 ~ 52.30 mg · L<sup>-1</sup>、1.63 ~ 52.30 mg · L<sup>-1</sup> 范围内与峰面积呈良好线性关系, 平均回收率为 97.7% ~ 103.2%, RSD ≤ 2.2%。结论: 建立了 RP-HPLC-DAD 同时测定暗紫贝母药材中 10 个核苷及碱基类成分含量的方法, 该方法简单, 重复性好, 准确可靠; 暗紫贝母药材中鸟苷、尿苷、胸苷、腺苷含量较高; 青海久治、大通产暗紫贝母药材中核苷含量均高于四川松潘; 青海 2 个产地比较, 大通产暗紫贝母药材中核苷含量又明显高于久治。

**关键词:** 暗紫贝母; 核苷; 高效液相色谱; 碱基; 含量测定; 尿苷; 鸟苷; 胸苷; 腺苷; 肌苷; 腺嘌呤; 胸腺嘧啶; 鸟嘌呤; 尿嘧啶; 胞嘧啶

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2012)06-0986-04

## RP-HPLC simultaneous determination of ten nucleosides and nucleobases in *Fritillaria unibracteata*\*

ZHANG Hai-juan<sup>1,2</sup>, MA Shi-zhen<sup>1\*\*</sup>, XIAO Yuan-can<sup>1</sup>,  
CHI Xiao-feng<sup>1</sup>, DONG Qi<sup>1</sup>, HU Feng-zu<sup>1</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 81008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract Objective:** To develop an HPLC coupled with a photodiode array detector(HPLC-DAD) method for simultaneous determination of 10 nucleosides and nucleobases in *Fritillaria unibracteata*. **Method:** The analyses were performed on an Agilent Zorbax-Bonus-RP C<sub>18</sub> column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with water and methanol in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; detection wavelength was 260 nm; and column temperature was set at 30 °C. **Result:** The investigated compounds including cytidine, uridine, guanosine, thymidine, adenosine, adenine, thymine, guanine, inosine, uracil were shown good linearity( $r \geq 0.9991$ ) over the tested ranges. The average recoveries were within 97.7% - 103.2% with RSD ≤ 2.2%. **Conclusion:** The developed HPLC method is simple, sensitive and accurate with good repeatability. High content of *Fritillaria unibracteata* is guanosine, uridine, thymidine, adenosine, and Qinghai *Fritillaria unibracteata* nucleotide levels were higher than Sichuan Songpan, but compared the two origins of Qinghai, Qinghai Datong nucleoside content was significantly higher than Qinghai Jiuzhi.

**Key word:** *Fritillaria unibracteata*; nucleosides; HPLC; nucleobases; assay; uridine; guanosine; thymidine; adenosine; inosine; adenine; thymine; guanine; uracil; cytosine

暗紫贝母是名贵中药材川贝母的主要来源之一, 为百合科贝母属植物暗紫贝母(*Fritillaria uni-*

\* 青海省重点攻关项目(2005-N120); 科技部中小企业创新基金(09C26216302702)

\*\* 通讯作者 Tel: 13709763487; E-mail: szma@nwipb.ac.cn

bracteata Hsiao) 干燥鳞茎,常用于肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、咯痰带血等症的治疗<sup>[1]</sup>。暗紫贝母主要分布于四川西部、青海南部以及甘肃南部海拔2800~4400 m的高寒草甸、高寒灌丛草地和高寒草甸地区<sup>[2]</sup>。暗紫贝母野生资源量少,目前已被列为三级濒危保护药材物种。最新研究表明,贝母的水溶性成分具有抗炎、抑制血小板凝聚、降压、松弛平滑肌等作用,而贝母的抗炎作用能协同治疗呼吸道感染,是贝母止咳化痰的药理学基础<sup>[3-6]</sup>。核苷类成分是贝母重要的水溶性成分,本实验拟建立同时测定暗紫贝母中核苷类及游离碱基成分的方法,对其成分进行定性、定量分析,以便能更好地、全面地开发利用暗紫贝母,且为其质量控制提供进一步依据。

### 1 仪器与材料

**1.1 仪器** Waters 515 双泵, Waters 2996 PAD 二极管阵列检测器, Waters Empower 色谱工作站。

**1.2 药品** 对照品鸟苷(批号: 1000880080)、尿嘧啶(批号: 1000996074)、胸苷(批号: 1001031694)、胸腺嘧啶(批号: 101063335)、胞嘧啶(批号: 1001028769)、腺嘌呤(批号: 1000977038)、肌苷(批号: 086K1243)均购于Sigma公司,纯度 $\geq 99\%$ ;对照品腺苷(批号: 110879-200202)、尿苷(批号: 887-200202)、鸟嘌呤(批号: 140631-200904)购于中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$ 。

**1.3 试剂** 色谱级甲醇,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

**1.4 药材** 6份暗紫贝母样品分别是四川松潘2份、青海久治2份和四川松潘野生鳞茎引种到青海大通牛场地区2份,所有样品均经中科院西北高原生物研究所马世震教授鉴定为暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao)干燥鳞茎,药材经烘干后粉碎,过80目筛,备用。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Zorbax Bonus-RP C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A相为超纯水, B相为甲醇, 梯度洗脱程序见表1; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 30℃; 检测波长: 260 nm; 进样量: 对照品溶液 10 μL, 供试品溶液 20 μL。

#### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 分别精密称取对照品鸟苷

表1 流动相洗脱程序  
Tab1 Mobile phase elution procedure

t/min	A/%	B/%
0	99.5	0.5
25	90.0	10.0
27	99.5	0.5
30	99.5	0.5

5.77 mg、尿嘧啶 5.90 mg、胸苷 5.71 mg、胸腺嘧啶 5.23 mg、胞嘧啶 5.68 mg、腺嘌呤 5.21 mg、肌苷 5.72 mg、腺苷 5.23 mg、尿苷 5.06 mg、鸟嘌呤 5.53 mg 置于 10 mL 量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,配制成相应的单一对照品溶液。分别取单一对照品溶液适量,配制成一定浓度的混合对照品溶液,置于 4℃ 的冰箱内,待用。

**2.2.2 供试品溶液** 精密称取暗紫贝母粉末各 1.0 g 于 50 mL 锥形瓶中,精密加水 10 mL,称定重量,混匀,密封,在室温下超声(200 W, 40 kHz) 45 min,取出,冷却至室温,用蒸馏水补足减失重; 3000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤,待测。

**2.3 线性关系的考察** 精密对上述混合对照品溶液进行等倍稀释,稀释后浓度分别为原浓度的 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 将得到的 5 个不同浓度的混合对照品溶液按“2.1”中色谱条件进行分析,以峰面积 Y 对其浓度 X 建立回归方程,见表 2。

**2.4 精密度试验** 选取青海久治暗紫贝母为供试品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取该溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次,计算各化合物色谱峰面积, RSD 小于 2.4%。表明本方法精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取青海久治暗紫贝母样品 5 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。计算 10 个核苷类和碱基类成分含量,其 RSD 小于 2.8%。表明本方法重复性良好。

**2.6 回收率试验** 精密称取已知核苷及碱基类含量的样品,分别精密加入一定量的对照品,按照“2.2.2”项下制备供试溶液并进行测定,计算回收率,10 个核苷及碱基类成分的平均回收率(n=6)在 97.7%~103.2%, RSD $\leq 2.2\%$ ,表明回收率良好,见表 3。

表 2 10 个化合物的线性回归方程及相关系数  
Tab 2 Regression equations and correlations of ten compounds

编号 (No.)	成分 (component)	回归方程 (regression equation)	$r$	线性范围 (linear range) /mg · L <sup>-1</sup>
1	胞嘧啶( cytosine)	$Y = 3.773 \times 10^4 X + 775.1$	0.9995	1.78 ~ 56.80
2	尿嘧啶( uracil)	$Y = 5.625 \times 10^4 X + 5.37 \times 10^3$	0.9998	1.84 ~ 59.00
3	尿苷( uridine)	$Y = 2.985 \times 10^4 X + 1.279 \times 10^4$	0.9995	1.58 ~ 50.60
4	鸟嘌呤( guanine)	$Y = 3.340 \times 10^4 X - 1.205 \times 10^4$	0.9999	1.73 ~ 55.30
5	胸苷( thymidine)	$Y = 2.548 \times 10^4 X + 4.646 \times 10^3$	0.9998	1.63 ~ 52.30
6	腺嘌呤( adenine)	$Y = 2.352 \times 10^4 X - 1.038 \times 10^4$	0.9991	1.63 ~ 52.10
7	肌苷( inosine)	$Y = 6.446 \times 10^4 X - 5.784 \times 10^4$	0.9993	1.79 ~ 57.20
8	鸟苷( guanosin)	$Y = 3.517 \times 10^4 X - 1.521 \times 10^4$	0.9998	1.80 ~ 57.70
9	胸腺嘧啶( thymine)	$Y = 3.993 \times 10^4 X - 1.052 \times 10^3$	0.9997	1.78 ~ 57.10
10	腺苷( adenosine)	$Y = 3.969 \times 10^4 X - 1.506 \times 10^4$	0.9995	1.63 ~ 52.30

表 3 10 个化合物回收率( %  $n = 6$ )  
Tab 3 Recovery of ten compounds

	胞嘧啶 ( cytosine)	尿嘧啶 ( uracil)	尿苷 ( uridine)	鸟嘌呤 ( guanine)	胸苷 ( thymidine)	腺嘌呤 ( adenine)	肌苷 ( inosine)	鸟苷 ( guanosin)	胸腺嘧啶 ( thymine)	腺苷 ( adenosine)
回收率( recovery)	99.45	97.67	101.12	99.89	101.11	101.25	103.24	98.87	99.64	100.23
RSD/%	2.23	2.01	2.12	1.89	1.34	2.15	1.47	2.15	2.08	1.62

2.7 样品分析 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下方法测定其核苷及碱基类成分的含量,结果见表4。HPLC 图谱见图1。

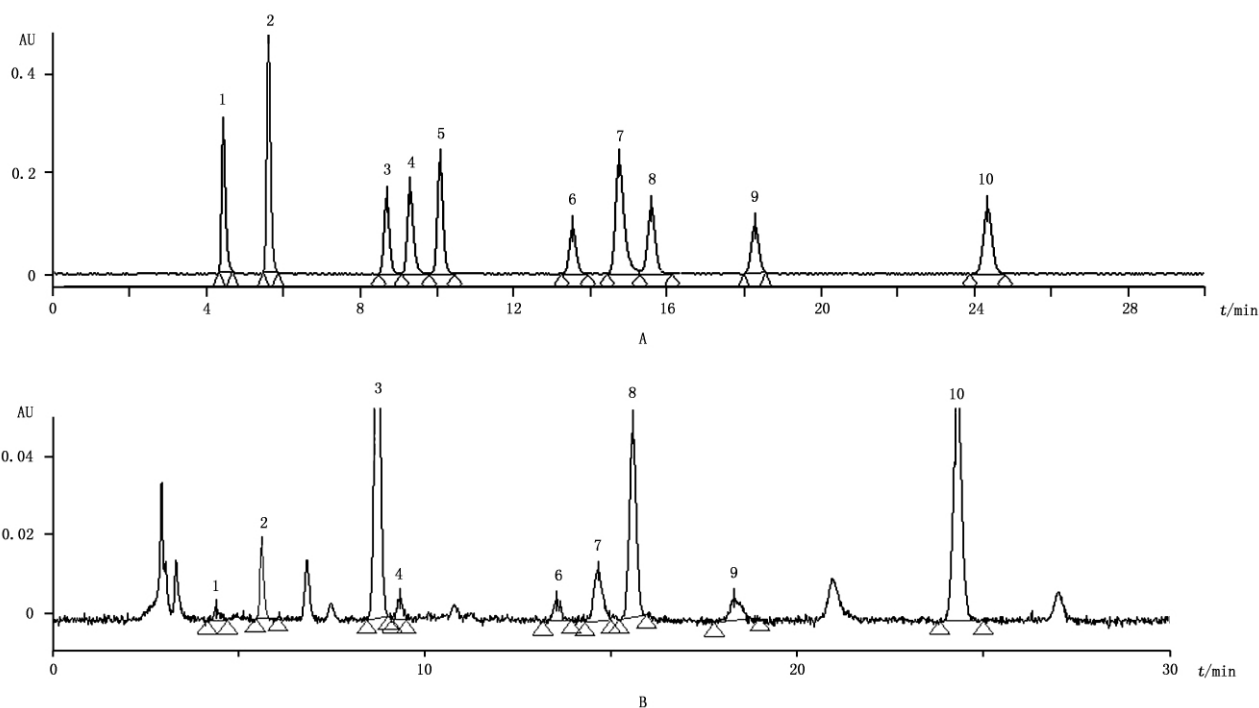


图 1 混合对照品(A)及暗紫贝母多种核苷成分(B)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of ten nucleosides and nucleobases reference substances(A) and several nucleotides of *Fritillaria unibracteata*(B) 1 ~ 10. 同表 2( same as Tab 2)

表 4 样品中 10 个化合物成分的含量(  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  )  
Tab 4 Contents of ten compounds in samples

来源 ( area )	胞嘧啶 ( cytosine )	尿嘧啶 ( uracil )	尿苷 ( uridine )	鸟嘌呤 ( guanine )	胸腺嘧啶 ( thymine )	腺嘌呤 ( adenin )	肌苷 ( inosine )	鸟苷 ( guanosin )	胸苷 ( thymidine )	腺苷 ( adenosine )
四川松潘( Songpan ,Sichuan)	2. 21	9. 13	89. 58	3. 10	—	9. 50	8. 42	37. 60	21. 54	92. 12
四川松潘( Songpan ,Sichuan)	3. 12	7. 35	92. 14	2. 78	—	1. 05	7. 89	42. 12	20. 65	91. 32
青海久治( Jiuzhi ,Qinghai)	2. 21	11. 18	104. 27	4. 04	—	5. 61	6. 18	48. 50	30. 11	114. 71
青海久治( Jiuzhi ,Qinghai)	1. 89	9. 98	100. 10	3. 99	—	6. 27	6. 34	50. 77	28. 46	120. 12
青海大通( Datong ,Qinghai)	11. 74	29. 96	435. 03	22. 33	—	37. 56	41. 60	216. 5	63. 44	287. 11
青海大通( Datong ,Qinghai)	10. 37	10. 45	444. 23	20. 16	—	39. 61	38. 17	209. 9	65. 94	290. 48

### 3 讨论

3.1 本实验考察了提取溶剂纯水、甲醇和不同 pH 缓冲液对核苷及碱基类成分提取的影响,实验数据表明,三者的提取效果相当,为使所建立的方法简便、有效,本研究中采用纯水为提取溶剂。另外,本实验还对提取时间和提取溶剂的用量分别进行了考察,最终确定用纯水 10 mL 超声 45 min 为最佳提取条件。

3.2 本研究比较了 Agilent Zorbax Bonus - RP C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm 5 μm) 和 Agilent BaseLine - C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm 5 μm) 色谱柱对暗紫贝母中核苷及碱基的分离效果,结果显示各种成分在 Agilent Zorbax Bonus - RP C<sub>18</sub> 色谱柱上能达到良好的分离,所以选择了该色谱柱。

3.3 实验结果表明,暗紫贝母药材中均含有 9 个核苷及碱基类成分,鸟苷、尿苷、胸苷、腺苷为其主要成分,其含量较高。不同产地的暗紫贝母样品中核苷及碱基类成分的含量具有明显差异;青海久治、青海大通产暗紫贝母药材中 9 个核苷及碱基类成分含量均高于四川松潘;青海 2 个产地比较,大通产暗紫贝

母药材中核苷及碱基类成分含量又明显高于久治。

### 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I : 35
- 2 XIAO Pei - geng(肖培根). The botanical origin and pharmacophylogenetic treatment of Chinese materia medica Beimu. *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类学报) 2007 45(4) : 473
- 3 HUANG Li - jing(黄丽晶), GAO Wen - yuan(高文远), LI Xia(李霞). Anti - inflammatory effects of aqueous extract of Bulbus Fritillariae Ussuriensis(平贝母水提取物抗炎作用研究). *Tianjin J Tradit Chin Med*(天津中医药) 2009 26(6) : 495
- 4 Kang DG, Sohn EJ, Lee YM, et al. Effects of bulbis Fritillaria water extract on blood pressure and renal functions in the L - NAME - induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2004 91(1) : 51
- 5 ZOU Gang(邹冈). *Neuropharmacology*(神经药理学). Beijing(北京) : Science Press(科学出版社), 1988
- 6 ZHU Dan - ni(朱丹妮), TAN Feng - ping(谭丰萍), GAO Shan - lin(高山林). Peptide mapping of recombinant human granulocyte colony stimulating factor by RP - HPLC or CZE( HPLC - ELSD 分析测定贝母类药材中生物碱成分). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2000 20(2) : 87

( 本文于 2011 年 8 月 4 日收到 )

( 上接第 1005 页 )

- 9 Yurika M, Kenji H, Yosuke T, et al. Determination of d - serine and d - alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various d - amino - acid oxidase activities using two - dimensional high - performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2009 877: 2506
- 10 Li ZW, Xing ZZ. Serine racemase expression in mouse cerebral cortex

after permanent focal cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin* 2004, 25: 436

- 11 Ran I, Kenji H, Tomomi H, et al. NMDA - and β - amyloid - 42 - induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock - out mice. *J Neurosci* 2008 28: 14486

( 本文于 2011 年 8 月 7 日收到 )