

RP-HPLC同时快速测定鹿茸中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷含量^{*}

周冉, 李淑芬^{**}

(天津大学化工学院 绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法同时快速测定鹿茸药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 3 种生物碱基成分含量。方法: RP-HPLC 外标法。采用 Agilent TC₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为含 0.07% 醋酸的 3% 甲醇溶液, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C。结果: 在上述色谱条件下, 尿嘧啶、次黄嘌呤和尿苷能够得到很好的分离; 浓度均在 1.7 ~ 33.3 mg·L⁻¹ 的范围内与其峰面积线性关系良好, 相关系数分别为 0.9995, 0.9999, 0.9996 最低检测限浓度 (S/N = 3) 分别为 9.375, 18.75, 75 μg·L⁻¹; 平均加样回收率 (n = 3) 在 98.4% ~ 103.4% 范围内。结论: 本方法分离度好, 简便快速, 重复性好, 可用于鹿茸药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 3 种生物碱基成分的同时快速测定, 具有很高的实用价值。

关键词: 鹿茸; 生物碱基; 尿嘧啶; 次黄嘌呤; 尿苷; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0575-04

RP-HPLC simultaneous determination of three biological base in antler velvet^{*}

ZHOU Ran, LI Shu-fen^{**}

(Key Laboratory for Green Chemical Technologies of the Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology,

Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for simultaneous and rapid determination of three main biological base components including uracil, hypoxanthine and uridine in antler velvet. **Methods** An external standard method with Agilent TC₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase was consisted of 3% methanol-water solution containing 0.07% acetic acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; The detection wavelength was 254 nm and the column was 25 °C. **Results** Uracil, hypoxanthine and uridine were well separated by this method. Linearities of uracil, hypoxanthine and uridine were good ($r = 0.9995, 0.9999, 0.9996$) in the range of 1.7–33.3 mg·L⁻¹. The detection limits (S/N = 3) were 9.375, 18.75 and 75 μg·L⁻¹ for uracil, hypoxanthine and uridine, respectively. The average recoveries of the three biological base components were found in the range of 98.4%–103.4%. **Conclusion** The method is not only simple, rapid and presents good resolution and reproducibility, but also shows a high utility value, which has been successfully applied to the simultaneous determination of uracil, hypoxanthine and uridine in antler velvet.

Key words antler velvet; biological base; uracil; hypoxanthine; uridine; RP-HPLC

鹿茸始载于《神农本草经》是传统的名贵中药, 来源于脊椎动物门哺乳纲鹿科动物梅花鹿或马鹿的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角, 前者称花鹿茸(黄毛茸), 后者习称马鹿茸(青毛茸)。鹿茸味甘咸而性温, 为大补肝肾、峻补元阳之品, 且能固精气、益精髓、强筋健骨, 故对肾阳不足、精血亏虚所致的各种症候皆有佳效。鹿茸中主要含有脂类、多糖、多

胺、蛋白质及多肽、激素样物质、生物碱基等多种化学成分。其中生物碱基是我们主要研究的抗衰老成分之一, 主要包括尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷等^[1, 2]。据报道^[3, 4], 这些成分对单胺氧化酶 (MAO) 均具有不同程度的抑制作用, 这也是鹿茸具有抗衰老作用的关键。

* 天津市应用基础研究计划项目 (06YFMJC10500)

** 通讯作者 Tel: (022) 27402720 E-mail: shlf@tju.edu.cn

国内外有采用 HPLC 对生物碱基分离的报道。例如,国内有对尿嘧啶、次黄嘌呤和尿苷 1 种或 2 种碱基成分的含量测定^[5~8];另外,李伟等^[9]运用 HPLC 法测定了地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷的含量,虽然混合对照品的分离效果较好,但是样品谱图中次黄嘌呤和尿苷却不能实现基线分离,而且由于提取液成分复杂,使得尿嘧啶成分和杂质峰间造成干扰;罗兰等^[10]进行了五灵脂中 4 种核苷、碱基类成分的 HPLC 法分析研究,但是色谱图中次黄嘌呤、尿苷、黄嘌呤并没有达到基线分离;刘丽芳等^[11]运用岛津 Shim-pack CLC-ODS 柱,以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵溶液为流动相分离 10 种动物药中尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤和腺苷 4 种碱基成分,但是由于杂质的干扰和黄嘌呤成分的干扰,使得尿嘧啶和黄嘌呤、次黄嘌呤和杂质峰之间并不能实现基线分离,从而会对定量的准确性产生较大的影响。国外对尿嘧啶、次黄嘌呤和尿苷这 3 种成分的分离主要有 Fan 等^[12]采用 HPLC-二极管阵列检测器结合梯度洗脱法对冬虫夏草中核酸水解后的嘌呤碱和嘧啶碱进行分离, Gao 等^[13]运用 HPLC-DAD-MS 结合梯度洗脱法进行灵芝中核苷和碱基的定量分析,但这些方法复杂,设备成本高,而且梯度洗脱对设备要求较高,操作复杂。另外,对于鹿茸中生物碱基成分分析的 HPLC 法仅仅限于梁志敏等^[14]对单一碱基成分次黄嘌呤的分析和杨秀伟等^[15]运用正相氨基柱以缓冲盐做流动相对上述 3 种生物碱基进行分离的报道。而同时测定鹿茸药材中上述 3 种生物碱基成分的 RP-HPLC 方法学研究,未见文献报道。本文采用 RP-HPLC 方法,能成功地对鹿茸生物碱基成分中的极性较为相近的尿嘧啶、次黄嘌呤以及尿苷同时进行定量分析,并达到满意的分离度。此方法的优点在于方法操作简单、快速,对设备要求低,既排除了样品中其他杂质的干扰,又避免了大量缓冲盐溶液的介入而对色谱柱寿命的影响,从而为鹿茸中抗衰老成分的分析提供了可靠的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LabAlliance series III 高效液相色谱泵, LabAlliance Model 500 紫外检测器, Anstar 色谱工作站, 北京赛德利斯有限公司 BP210S 电子天平。

1.2 试剂 对照品尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 (Sigma 纯度均 > 99%); 甲醇 (色谱纯)、乙醇 (分析纯)、冰醋酸 (分析纯) 均购于天津大学科威公司。

1.3 鹿茸药材 鹿茸样品为 2 个不同批次, 第 1 批由天津市神草医药动物养殖有限公司提供, 第 2 批

由吉林修正药业有限公司提供。2 批鹿茸均为头茬茸, 均经吉林修正药业有限公司鉴定为梅花鹿 *Cervus nippon Temminck*。

2 实验方法与结果

2.1 色谱分析条件及系统适应性 色谱柱: Agilent TC C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 含 0.07% 冰醋酸的 3% 甲醇溶液; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 254 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。在本色谱条件下尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷的保留时间分别为 6.06, 9.71, 10.84 min, 理论板数以次黄嘌呤计不低于 9807, 尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷与相邻未知色谱峰的分离度不小于 3.0。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 称取干燥的鹿茸细粉 (过 160 目筛) 约 1 g 精密称定后, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加 50% 乙醇 10 mL 振荡提取 45 min 后, 离心 10 min ($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 残渣再同法处理 3 次, 合并 4 次离心液, 置于 50 mL 量瓶中, 用 50% 乙醇定容, 再用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 即得。

2.2.2 混合对照品储备液 分别精密称取对照品尿嘧啶、次黄嘌呤和尿苷各 17 mg 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 然后各精密量取 1 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 即得。

2.3 线性关系与最低检测限的考察 精密量取“2.2.2”项下混合对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得不同浓度的系列混合对照品溶液。分别进样 20 μL, 色谱图见图 1-A。以对照品浓度对峰面积作图。结果经回归分析, 尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷回归方程分别为:

$$Y = 1 \times 10^7 X + 783.3 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 2 \times 10^7 X - 5.435 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 7 \times 10^6 X - 642.7 \quad r = 0.9996$$

3 种生物碱基成分进样浓度均在 $1.7 \sim 33.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。以信噪比为 3 确定本方法中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 3 种生物碱基成分的最低检测限分别为 9.375, 18.75, $75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 精密度试验 在上述色谱条件下, 精密量取混合对照品溶液 20 μL, 连续进样 5 次, 以峰面积计算尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 RSD ($n = 5$) 分别为 1.3%, 1.4%, 1.6%。

2.5 重复性试验 取鹿茸样品细粉 1 g 精密称定, 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 平行 5 份, 各取 20 μL 进样测定。结果尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷含

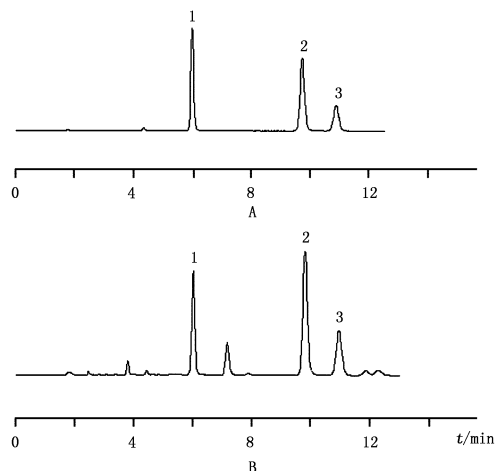


图 1 鹿茸生物碱基对照品 (A) 和第 1 批样品 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance of biological bases in antler velvet (A) and first batch sample (B)

1 尿嘧啶 (uracil) 2 次黄嘌呤 (hypoxanthine) 3 尿苷 (uridine)

量平均值 ($n=5$) 分别为 0.3981, 0.4983, 0.4812 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.4%, 1.1%, 1.9%。

2.6 稳定性试验 取鹿茸样品细粉 1 g 精密称定, 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 每隔 2 h 取 20 μL 进样, 以峰面积计算尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 RSD ($n=7$) 分别为 1.3%, 1.1%, 2.0%, 测得峰面积变化趋势不明显, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 取已知尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷含量分别为 0.4050, 0.5049, 0.4818 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的鹿茸药材 0.5 g 共 9 份, 平均分为 3 组, 每组分别加入尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷浓度分别为 0.405, 0.505, 0.481 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品混合溶液 0.4, 0.5 mL, 0.6 mL, 按“2.2.1”项下方法制成所需溶液, 进样测定, 计算尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷的测得值和平均回收率见表 1。结果表明, 各浓度下加样回收率的稳定性均较好, 该测定方法测定结果较准确。

表 1 3 种生物碱基成分回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 1 Results of recovery experiments for three biological base

组分 (component)	样品中含量 (content of sample) /mg	加入对照品量 (addition amount of reference substance) /mg	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
尿嘧啶 (uracil)	0.2025	0.1620	100.4	2.4
	0.2025	0.2025	102.4	1.5
	0.2025	0.2430	98.6	2.4
次黄嘌呤 (hypoxanthine)	0.2525	0.2020	98.9	0.6
	0.2525	0.2525	98.4	1.3
	0.2525	0.3029	100.5	1.4
尿苷 (uridine)	0.2409	0.1927	103.4	3.4
	0.2409	0.2409	102.9	4.3
	0.2409	0.2891	100.4	1.5

2.8 样品含量的测定 取 2 个批次的鹿茸药材细粉 (160 目), 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 进样测定峰面积 ($n=3$), 由线性方程计算得尿嘧啶、次黄嘌呤和尿苷的含量, 见表 2。结果表明第 2 批鹿茸药材中尿嘧啶、次黄嘌呤 2 种成分的含量明显低于第 1 批鹿茸药材, 而尿苷的含量则 2 批相差不多。

表 2 不同批次鹿茸药材中 3 种生物碱基成分的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab 2 Contents of three biological base in antler velvet samples for different batches

样品 (sample)	尿嘧啶 (uracil)	次黄嘌呤 (hypoxanthine)	尿苷 (uridine)
第 1 批 (No. 1)	0.4055	0.5049	0.4818
第 2 批 (No. 2)	0.2911	0.3010	0.5474

3 讨论

3.1 样品提取条件的选择 为了尽可能地完全提取药材中的目标成分, 分别考察了 6 种浓度 (0%, 20%, 50%, 70%, 85%, 100%) 的乙醇溶液以及 4 种提取方法 (超声提取、热回流提取、振荡提取、索氏提取), 结果表明以 50% 乙醇振荡提取的提取率最高。在此基础上, 又对提取溶剂用量、提取时间和提取次数分别进行了考察, 结果表明采用 10 倍量的溶剂提取 4 次, 每次 45 min 便可将目标成分基本提取完全; 再增加溶剂用量和提取次数, 提取率均不再变化。故最终确定用 10 倍量的 50% 乙醇溶液振荡提取 4 次, 每次 45 min 为最适宜的提取方法。

3.2 流动相的选择 比较了不同比例甲醇-水、加入一定缓冲盐的甲醇-水、加入不同比例醋酸的甲醇-水流动相系统, 结果表明在甲醇-水比例为 3:97 的系统中, 色谱峰的峰形较好, 基线平稳, 但是尿苷成分出峰太快, 次黄嘌呤与尿苷不能得到很好的分离; 只有在加入 0.07% 的醋酸后的系统中, 不仅峰形得到改善, 而且实现了 3 种生物碱基成分基线较好的分离, 故选用含 0.07% 醋酸的 3% 甲醇溶液系统为流动相。在此条件下, 尿嘧啶、次黄嘌呤、与尿苷均得到了较好的分离 (见图 1)。

3.3 流动相流速的选择 在流速小于 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 254 nm, 柱温为室温的条件下, 尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 3 种生物碱基成分不仅出峰时间晚, 而且次黄嘌呤和尿苷不能得到分离。而在选择流动相流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 3 种成分能够在 14 min 内快速同时得到分离。因此选择流动相的适

宜流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

3.4 色谱柱的选择 对 2 种色谱柱 [Agilent TC C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱、Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱] 进行了比较, 结果表明, 当使用 Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱后, 尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷的保留时间分别为 6.396、11.003、12.086 min, 理论板数以次黄嘌呤计为 6403 而应用 Agilent TC C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱得到的尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷的保留时间分别为 6.060、9.709、10.839 min, 理论板数以次黄嘌呤计为 9807。另外, 当使用 Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱后, 次黄嘌呤与相邻未知色谱峰的分离度约为 0.8 小于 1, 说明 2 峰有部分重叠; 而应用 Agilent TC C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱得到的次黄嘌呤与相邻未知色谱峰的分离度约为 3.2 大于 2 说明两峰得到了完全分离。最后确定“2.1”项下的色谱条件能取得较好的分离效果, 峰形对称, 既能达到基线分离的要求, 又有适宜的保留时间。

综上所述, 不同品牌的 C_{18} 柱、流动相中甲醇和水或缓冲溶液的比例、流动相的 pH 对 3 种生物碱基的色谱行为均有很大影响, 要建立满意的 HPLC 方法, 必须考虑这些因素。

4 结论

实验结果表明, 采用本文建立的同时测定鹿茸中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 3 种生物碱基含量的方法, 仅仅应用简单的等度洗脱就能达到满意的分离效果。3 种成分的分离度均大于 3.0 峰形对称。该方法分离度好, 具有良好的精密度和重现性, 而且简便快速, 对设备要求低, 既排除了样品中其他杂质的干扰, 又避免了大量缓冲盐溶液的介入而对色谱柱寿命的影响, 可用于鹿茸药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷 3 种生物碱基成分的同时测定, 具有很高的实用价值。

参考文献

- 1 LI He-ping (李和平). The velvet chemical compositions of velvet - deer breeds or strains in China (中国茸鹿品种 (品系) 的鹿茸化学成分). *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 2003, 31 (4): 26
- 2 FAN Yu-lin (范玉林). Advances in studies on chemical constituents of antler velvet (鹿茸化学成分研究的进展). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1980 6(1): 23

- 3 WANG Ben-xiang (王本祥), CHEN Xiao-guang (陈晓光). Inhibitory effect of hypoxanthine on monoamine oxidase activity (次黄嘌呤对单胺氧化酶的抑制作用). *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989 24(8): 573
- 4 Wang BX, Zhao XH, Kaneko S *et al*. Identification of the inhibitor for monoamine oxidase B in the extract from deer antler. *J Med Pharm Soc WAKAN - YAKU*, 1988, 5: 116
- 5 Czauderna M, Kowalczyk J. Quantification of alkanoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J Chromatogr B*, 2000 744: 129
- 6 Pieiro-Sotelo M, Rodriguez-Bernaldo de Quirós A, Lopez-Hernández J *et al*. Determination of purine bases in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) gonads by high-performance liquid chromatography. *Food Chem*, 2002, 79: 113
- 7 LIU Rui (刘瑞), YUAN Bo (袁波), LIU Zhi-gang (刘志刚), *et al*. Identification of 5 constituents of the aqueous extract of *Isatis indigotica* by HPLC-MS² (HPLC-MS² 鉴定大青叶水提液中的 5 种化学成分). *J Chin Med Mater* (中药材), 2005 28(9): 772
- 8 CHU Xi-ning (褚西宁), ZHANG Qiang (张强), CHEN Qiao-mei (陈巧梅), *et al*. HPLC Determination of uridine, adenine and adenosine in the mycelia of *Isaria sp.* (棒束孢属菌 *Isaria sp.* 中游离尿苷、腺嘌呤、腺苷的 HPLC 测定). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996 16(4): 249
- 9 LI Wei (李伟), WEN Hong-mei (文红梅), ZHONG Jin (钟进), *et al*. HPLC Determination of xanthine, hypoxanthine, uracil and uridine in *Ambrinus* (HPLC 测定地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷的含量). *J Chin Med Mater* (中药材), 1996 19(12): 625
- 10 LUO Lan (罗兰), WEN Hong-mei (文红梅), LI Dan (李丹), *et al*. Analysis of four nucleosides and bases in *Faeces Troglodyteri* by HPLC (五灵脂中四种核苷、碱基类成分的 HPLC 法分析研究). *Primary J Chin Med Mater* (基层中药杂志), 1998, 12(2): 45
- 11 LIU Li-fang (刘丽芳), JIN Rong-huan (金蓉鸾), XU Guo-jun (徐国钧). HPLC determination of uracil, xanthine, hypoxanthine and uridine in ten species of animal drugs (HPLC 法测定 10 种动物药中尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、腺苷的含量). *China J Chin Med Mater* (中国中药杂志), 1999, 24(2): 73
- 12 Fan H, Yang FQ, Li SP. Determination of purine and pyrimidine bases in natural and cultured *Cordyceps* using optimum acid hydrolysis followed by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(1): 141
- 13 Gao J, Leung KSY, Wang YT, *et al*. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC-DAD-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(3): 807
- 14 LIANG Zhi-min (梁志敏), LI Jian-ping (李建平), LIN Zhe (林喆), *et al*. Determination of the contents of hypoxanthine in antler velvet from different regions by HPLC (不同产地鹿茸中次黄嘌呤的 HPLC 含量测定). *J Chin Med Mater* (中药材), 2005 28(8): 670
- 15 YANG Xi-wei (杨秀伟). Quantitative analysis of biological bases in antler velvet by HPLC and the inhibitory effect on MAO (花鹿茸、马鹿茸碱基成分的 HPLC 定量分析和其 MAO 活性抑制作用). *J Chin Med Mater* (中草药), 1995 26(1): 17

(本文于 2008 年 9 月 9 日修改回)