

HPLC 法测定龙眼肉中的几种核苷类物质

肖维强¹, 黄炳雄¹, 王晓容^{1,*}, 张 慧^{1,2}, 戴宏芬¹

(1. 广东省农业科学院果树研究所 广东 广州 510640; 2. 华中农业大学植物科技学院 湖北 武汉 430070)

摘 要: 目的: 建立 HPLC 法测定龙眼肉中腺苷、尿苷和腺嘌呤的含量。方法: 采用 Nucleosil C₁₈ 反相柱(250mm × 4mm), 以 0.01mol/L 的 KH₂PO₄: 乙腈 = 92:8 为流动相, 流速为 1ml/min, 检测波长为 254nm, 柱温 40℃, 用外标法, 测定了龙眼肉中腺苷、尿苷和腺嘌呤的含量。结果与结论: 分析中选取腺苷的线性范围 0.1 ~ 20.0 μg/ml, 相关系数 $r=0.9999$, 回收率 94.59%, RSD 3.10%; 尿苷的线性范围 0.05 ~ 10.0 μg/ml, 相关系数 $r=1$, 回收率 97.49%, RSD 4.50%; 腺嘌呤线性范围 0.05 ~ 10.0 μg/ml, 相关系数 $r=1$, 回收率 103.11%, RSD 1.90%。该方法简便快速, 线性关系良好。

关键词: HPLC; 龙眼; 腺苷; 尿苷; 腺嘌呤

Quantitative Determination of Several Kinds of Nucleotides in *Dimocarpus longan* Lour by HPLC

XIAO Wei-qiang¹, HUANG Bing-xiong¹, WANG Xiao-rong^{1,*}, ZHANG Hui^{1,2}, DAI Hong-fen¹

(1. Institute of Pomology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective: To determine the content of adenosine, uridine and adenine in *Dimocarpus longan* Lour. Methods: The HPLC method was used to determine respectively the content of adenosine, uridine and adenine in *Dimocarpus longan* Lour. The analysis was carried out on Nucleosil C₁₈ column(250mm × 4mm). The mobile phase was 0.01mol/L KH₂PO₄-CH₃CN (92:8, V/V), flow-rate 1.0mL/min, wavelength 254nm and temperature 40℃. Results and conclusion: The method is simple and has a good linear relationship. The linear range of adenosine is 0.1 ~ 20.0 μg/ml and gives a correlation of 0.9999. The recovery of adenosine is 94.59% and RSD 3.10%. The linear range of uridine is 0.05 ~ 10.0 μg/ml and gives a correlation 1. The recovery of uridine is 97.49% and RSD 4.50%. The linear range of adenine is 0.05 ~ 10.0 μg/ml and gives a correlation of 1. The recovery of adenine is 103.11% and RSD 1.90%. The method is easy to determine the content of several kinds of nucleotide in *Dimocarpus longan* Lour by HPLC.

Key words: HPLC; *Dimocarpus longan* Lour; adenosine; uridine; adenine

中图分类号: S667.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0234-04

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour)是无患子科龙眼属常绿乔木果树, 为我国南方的特色大宗水果, 种植面积约 80 万公顷^[1], 主要分布于福建、广东、广西、四川和台湾省, 在我国已有千余年的栽培历史。龙眼俗名桂圆, 别名龙目、比目、益智、圆眼等, 是“果

中圣品”, 具有“南方人参”的美称, 人们常把它作为保健食品和滋补药品。成熟的龙眼肉营养丰富, 主要的营养成分有总糖、还原糖、蛋白质、VC 等^[2]。据有关报道, 龙眼肉还含有酒石酸、栲素、单宁, 近年又从中分离到五环三萜类物质^[3]。

收稿日期: 2005-11-15

*通讯作者

基金项目: 广东省科技厅农业攻关项目(2006B20201045)

作者简介: 肖维强(1968-), 男, 高级实验师, 主要从事果品加工及水果中保健成分的分析。

[5] 许国旺, 卢佩章. 气相色谱柱子和固定相的选择[J]. 色谱, 1991, 9(4): 217.

[6] 吉林化工研究院. 气相色谱实用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1983.

[7] 沈尧坤, 曾祖训. 白酒气相色谱分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1986:

67-71.

[8] 赵文元, 曾克慰, 俞惟乐. 一种新的色谱在线预柱浓缩分析白酒的方法[J]. 色谱, 1985, 2(6): 367.

[9] 蔡心尧, 严建军, 胡国栋. 毛细管柱直接进样法测定白酒香味组分的研究[J]. 色谱, 1997, 15(5): 367.

腺苷(adenosine)是广泛存在于一些滋补药品如冬虫夏草、灵芝、贝母等中的重要成分,药用作用显著,具有抗凝血、扩张冠状动脉、镇静中枢神经和抗心率不齐等作用^[4],常作为虫草主要有效活性成分之一^[5],是冬虫夏草及代用品的质控指标。龙眼作为滋补品,与上述滋补药品相比,未见其中含有核苷类物质腺苷、腺嘌呤(adenine)、尿苷(uridine)等组分的报道。本文采用高效液相色谱法,建立了龙眼肉中3种核苷类物质的分离测定方法。

1 材料与方法

1.1 标准品、仪器及试剂

1.1.1 标准品

腺苷(国内分装,含量99%) 美国Sigma公司;尿苷(批号为887-200001,含量为100%) 中国药品生物制品检定所;腺嘌呤(批号050302,进口分装,含量≥98%) 上海伯奥生物科技有限公司。为便于计算,以上3种标准品在试验中均按含量100%计算。

1.1.2 主要仪器及试剂

Lambda 35型紫外/可见分光光度计 美国PE公司。
1100型高效液相色谱仪 美国Agilent公司;带Agilent化学工作站和VWD检测器,手动进样器,20μl定量管。

分离柱 德国MACHEREY-NAGEL公司,填料为Nucleosil C₁₈反相柱,250mm×4mm卡套柱。

甲醇、乙腈(色谱纯) 美国Fisher公司;实验用水为蒸馏水经Millipore纯水器过滤而得;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 分离条件的确定

1.2.1 标准品吸收波长的确定

分别称取适量的腺苷、尿苷和腺嘌呤标准品,用水溶解并稀释至100μg/ml左右,在分光光度计上全波段扫描(波长范围为190~1100nm),根据吸收波长并参照王光亚的方法确定以上几种核苷类物质的分离波长^[4]。

1.2.2 几种核苷类物质液相色谱条件的确定

根据参考文献中的测定方法^[4,6]略作改进。将标准品配制成含量1μg/ml的水溶液,根据紫外扫描结果,选定检测波长和配比不同的流动相,根据分离出的峰形、峰面积、保留时间等结果及待测品中几种核苷物质与杂质的分离度,改变流动相的配比,以期得到最佳峰形、合适的保留时间和廉价的流动相配比。试验中采用外标法,每个样品连续进两针,两针相对的响应值变化应小于1.5%。

1.3 线性关系试验

在分析天平上准确称取1mg的标准品,精确至

0.00001g,用水溶解并定容至10ml,浓度为100μg/ml,作为母液。将腺苷稀释成0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0μg/ml系列水溶液;将尿苷和腺嘌呤稀释成0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0μg/ml系列混合水溶液。按确定好的分离条件分别进样,根据标准品的浓度和峰面积,经化学工作站或用Excel软件计算,得线性回归方程和相关系数。

1.4 样品的处理方法

将新采的龙眼去皮和核,称取2g左右(精确到0.01g),放入25ml容量瓶中,加入15ml左右的纯水超声波处理10~15min,用纯水定容至刻度。进样前用0.45μm的微孔膜过滤。根据峰面积计算龙眼肉中几种核苷类物质的含量。

1.5 精密度实验

选择标准品的一个浓度,分不同时间共10次进样测定,根据测定结果计算相对标准偏差和变异系数。

1.6 精确度实验

选择任一龙眼品种,称2.00g新鲜龙眼肉,放入25ml容量瓶中,并加入已知浓度的标准品,以不加标准品的作参照。用上述同样的方法处理和测定,计算回收率和回收率的变异系数。

1.7 最低检出限测定。根据标样分析图谱,经化学工作站计算出仪器最低检出限。

本实验中样品的处理重复3次以上。

2 结果与分析

2.1 3种核苷物质扫描结果

3种核苷物质在紫外区都有两个吸收峰,腺苷的吸收峰在260和210nm附近;尿苷在262和203nm附近;腺嘌呤在260和207nm附近。最后选定上述物质的分离波长为254nm^[4]。

2.2 3种核苷物质的色谱条件

流动相为0.01mol/L的KH₂PO₄:乙腈=92:8;流速为1ml/min;分离波长为254nm;柱温40℃;进样量20μl。按所选定的色谱条件,3种核苷的分离结果如色谱图1、2所示。

2.3 3种核苷类物质的线性关系

根据仪器分析结果,3种核苷类物质的峰面积(Y)对浓度(X)作图,并得到相应的回归方程分别为:腺苷 $Y=61.5790X+1.3829$,相关系数均为0.9999;尿苷 $Y=42.8090X-0.3808$;腺嘌呤 $Y=95.9330X-1.0966$,2个回归方程的相关系数均为1,说明上述三种物质在所选的浓度范围内有极好的线性关系。

2.4 样品中几种核苷类物质分离结果

本试验选择广东龙眼品种“凤梨朵”为试验材

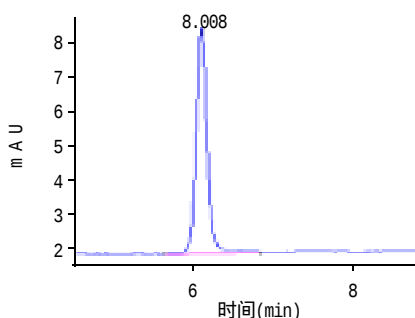


图1 腺苷标准品色谱图(1µg/ml)
Fig.1 Adenosine standard(1µg/ml)

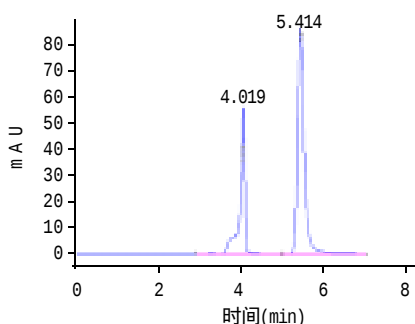
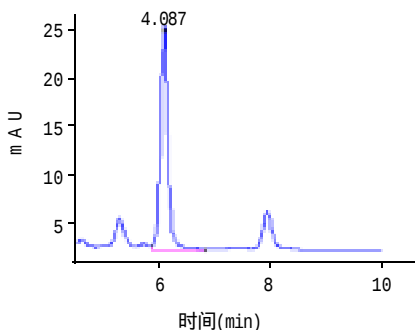


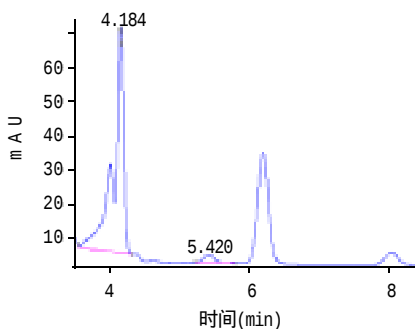
图2 尿苷和腺嘌呤标准品色谱图(10µg/ml)
Fig.2 Uridine and adenine standard(10µg/ml)

料,对其中的3种核苷物质进行了提取分离,结果见色谱图3、4所示。



平均含量为40.51µg/g鲜样。

图3 凤梨朵中腺苷色谱图
Fig.3 Content of adenosine for Feng li duo



平均含量分别为127.10和2.61µg/g鲜样。

图4 凤梨朵中尿苷和腺嘌呤色谱图
Fig.4 Content of uridine and adenine for Feng li duo

由图3、4可知,龙眼凤梨朵品种中的几种核苷物质均能得到良好的分离,其保留时间与对照品相对应;结果是根据峰面积换算而得,均为3次的平均数。

2.5 精密度实验

取1µg/ml的腺苷标准品,3d内不同时间多次进样,峰面积分别为:64.23、63.32、62.69、61.49、62.68、62.26、62.62、63.71、63.14、64.68,经统计分析,以上10组数据的变异系数为1.50%。

取2.5µg/ml尿苷和腺嘌呤标准品,3d内不同时间多次进样,尿苷峰面积为:107.0、107.0、107.2、106.7、106.9、107.0、106.9、104.5、107.3、106.9,经统计分析,以上10组数据的变异系数为0.7541%;腺嘌呤峰面积为240.1、239.3、238.8、238.9、238.2、238.7、238.6、237.62、220.8、221.7,经统计分析,以上10组数据的变异系数为3.1544%。

以上结果说明:腺苷、尿苷和腺嘌呤样品稳定,供试仪器稳定且精密度高。

2.6 精确度实验(标准品回收实验)

腺苷回收率分别为:91.00%、93.24%、97.80%、97.90%、92.10%和95.48%。其平均回收率为94.59%,回收范围为91.00%~97.90%,回收率变异系数为3.10%。

尿苷回收率分别为:99.71%、105.08%、93.87%、95.82%、93.29%、94.22%、100.41%。其平均回收率为97.4857%,回收范围为93.29%~100.41%,回收率变异系数为4.4965%;腺嘌呤回收率分别为:106.34%、102.90%、101.99%、104.67%、102.48%、100.19%、103.21%。其平均回收率为103.1114%,回收范围为100.19%~106.34%,回收率变异系数为1.9029%。

根据以上回收结果,得到了理想的回收效果。

2.7 仪器最低检出限测定

取本次分析的任一标准品色谱图,经化学工作站分析,在上述分离条件下,3种核苷类物质的最低检出限为0.00516µg/ml,其结果说明,本实验所选择的分离条件完全能满足3种核苷类物质的分离。

3 讨论

HPLC法具有分离效能高、分析速度快等优点,近年来已普遍应用于中药成分的定性定量分析,尤其在补益中药的活性成分研究中起着重要的作用^[7]。HPLC法是分析腺苷等核苷类物质的重要手段,目前在虫草核苷类物质的分析检测中应用较多^[5]。

龙眼营养丰富,食用价值及保健作用都很高,是国家卫生部第一批公布既是保健食品又是滋补药品的特殊水果^[8],但人们至今并不确切地知道龙眼肉中是哪些活性成分在起主要作用。对龙眼肉中腺苷、尿苷和腺

黑甜玉米油脂肪酸的气相色谱分析

王丽新, 高 云, 高伟佳
(辽宁科技大学化学工程学院 辽宁 鞍山 114051)

摘 要:应用气相色谱法测定黑甜玉米油中脂肪酸。实验结果表明, 分离出的 10 个峰中确认了主要组分、所鉴定的组分占总峰面积的 98.65%。其中主要不饱和脂肪酸成分含量: $C_{18:2} \geq 55.17\%$ 、 $C_{18:1} \geq 30.29\%$ 、 $C_{16:0} \geq 11.51\%$ 、 $C_{18:3} \geq 0.50\%$ 、 $C_{20:0} \geq 0.30\%$ 。

关键词:黑甜玉米油; 脂肪酸; 化学组成; 气相色谱

GC Analysis of Fatty Acids in Black Sweet Corn Oils of Jilin, China

WANG Li-xin, GAO Yun, GAO Wei-jia
(College of Chemical Engineering, Anshan University of Science and Technology, Anshan 114051, China)

Abstract: To study GC determination of fatty acid in black sweet corn oils of Jilin, China. The results showed that more than 10 peaks are separated and ten compounds representing 98.65% of the oil are identified. $C_{18:2}$, $C_{18:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:3}$ and $C_{20:0}$ are the chief components and their relative contents exceed 55.17%, 30.29%, 11.51%, 0.50% and 0.30% respectively.

Key words: black sweet corn oils; fatty acid; chemical constituents; GC (gas chromatography)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0237-02

黑甜玉米是 1992 年在吉林长白山地区首次被发现, 由辽宁鞍山和吉林磐石两地的引种和精心培育, 经过八年培育产量已初具规模, 经检测发现黑甜玉米营养价值很高^[1], 是很有开发价值的黑色谷物。本实验所采用的黑甜玉米油是鞍山市黑玉米公司提供的“靠山一号”系

列产品之一, 是受国家保护的珍稀品种。由于食用脂肪对健康的影响及食品标签的要求, 迫使食品科学家不但要能够检测出食品原料中的总脂肪含量, 而且需要对其具体组分作定性分析, 考虑到健康因素, 有时还需要测定各种脂肪酸的类型和含量^[2]。人体需要的必需脂肪

收稿日期: 2005-11-14

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究计划资助项目(2004D231); 辽宁省“十一五”教育科学规划立项课题(2-14-10)

作者简介: 王丽新(1967-), 女, 工程师, 主要从事有机化学实验教学工作和精细合成。

嘌呤的具体含量及测定方法也未见报道。本研究采用 HPLC 法及采用水作为提取溶剂, 通过超声提取, 成功地分离检测了龙眼肉中几种核苷类物质的含量, 分离方法简便、成本低、杂质干扰少, 且稳定性和重现性好, 是一种理想的分离测定方法。采用这种分离测定方法, 对龙眼的主要栽培品种进行核苷类物质的分析, 能更好地评价龙眼果肉的药用价值和保健作用, 对龙眼的鲜食、深加工及栽培品种的选择, 均能起到一定的指导作用。作者将进一步对多个龙眼品种的核苷类物质含量进行提取分离研究。

参考文献:

- [1] 蔡长河, 唐小浪, 张爱玉, 等. 龙眼肉的营养价值及其开发利用前景[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 328-330.
- [2] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食品成分表[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 1394-1404.
- [4] 王光亚. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 143.
- [5] 张洛璋. 北冬虫夏草的人工培植及其营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2003, 22(2): 19-21.
- [6] 王晓容, 李建光, 潘学文, 等. 比久和多效唑混合物的高效液相色谱分析[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(6): 523-525.
- [7] 郭朝晖, 蒋生祥. 高效液相色谱法在补益中药活性成分测定中的应用[J]. 中医药学刊, 2004, 22(11): 2136.
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典: 一部[M]. 2000年版. 北京: 化学工业出版社, 2000.