

## HPLC 同时测定竹笋中核苷和氨基酸类成分的含量

高全<sup>1,2</sup>, 汤锋<sup>2</sup>, 孙赟<sup>2</sup>, 王进<sup>2</sup>, 姚曦<sup>2\*</sup><sup>1</sup>安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; <sup>2</sup>国际竹藤中心 国家林业局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102

**摘要:**建立了高效液相色谱法测定竹笋中 6 种核苷和 3 种氨基酸类成分的分析方法。采用 YMC-Pack ODS-AQ C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈 (A), 0.5% 乙酸缓冲液 (B), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 254 nm。结果表明: 在 10 ~ 1000 μg/mL 范围内, 9 种目标化合物的质量浓度与峰面积呈现良好的线性关系, 相关系数均在 0.999 以上, 加标回收率平均在 86.74% ~ 100.17% 之间, 相对标准偏差在 0.04% ~ 2.90% 之间, 表明在方法准确度和精密度良好, 能够满足竹笋样品中这 9 种目标化合物的检测要求。该方法方便, 快捷, 准确可靠, 易推广使用。

**关键词:** 竹笋; 氨基酸; 核苷酸; 定量分析

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.012

## Simultaneous Determination of Nucleosides and Amino acids in Bamboo Shoots by HPLC

GAO Quan<sup>1,2</sup>, TANG Feng<sup>2</sup>, SUN Jia<sup>2</sup>, WANG Jin<sup>2</sup>, YAO Xi<sup>2\*</sup><sup>1</sup>School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; <sup>2</sup>State Forestry Administration Key Open Laboratory, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China

**Abstract:** A HPLC method was established for the determination of 6 nucleotides and 3 amino acids in bamboo shoots. The detection condition was as follows: the column was YMC-Pack ODS-AQ C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile (A) and 0.5% acetic acid in water (B), the flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 30 °C and the detected wavelength was 254 nm. Good linear relationship was achieved for the 9 targeted compounds within the concentration of 10-1000 μg/mL, the correlation coefficients all exceeded 0.999; the average recovery rate were between 86.74% -100.17% and the relative standard deviations were between 0.04% -2.90%. Method validation results showed that the developed HPLC method had good accuracy and precision. It can be used for testing the 9 targeted compounds in the bamboo shoots.

**Key words:** bamboo shoots; amino acids; nucleotides; quantitative analysis

竹笋是中国传统佳肴, 味香质脆, 食用和栽培历史极为悠久, 享有“素食第一”的美称, 早在《本草纲目》中就阐述了竹笋的药用功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 竹笋中富含大量的蛋白质、氨基酸、多糖以及矿物质等多种营养成分<sup>[2-4]</sup>。近来又有研究从竹笋中分离鉴定出核苷类成分<sup>[5]</sup>。核苷类化合物具有重要的生理功能, 核苷及其碱类参与人体内多种生理活动的调节, 具有很多生理活性, 例如抗血小板聚集、抗心律失常、抗氧化剂、抗癫痫以及抗肿瘤等多种作用<sup>[6,7]</sup>。近年来, 越来越多研究证实了人体内某些氨基酸不仅作为蛋白质合成的底物原料, 还能

够通过自身及其代谢产物所具有的生物活性对动物机体内许多生命活动产生调节作用<sup>[8]</sup>。目前, 对于竹笋的营养成分的研究国内外已有报道, 对于游离氨基酸的测定比较局限, 大多经过衍生化处理, 过程繁琐, 损耗较大<sup>[9]</sup>, 对其核苷类的测定尚未见报道。本实验在参考有关文献<sup>[10-12]</sup>的基础上, 采用高效液相色谱法, 对市售的八种毛竹竹笋中的氨基酸和核苷酸的含量进行了定量分析。简化了其纯化流程, 建立了较为快速、准确的对竹笋品质进行质量评价的参考方法。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与设备

胞苷标准品 (&gt;99%) (批号: C4654, 美国 Sigma

收稿日期: 2016-05-19 接受日期: 2016-07-04

基金项目: 国际竹藤中心基本科研业务费重点项目 (1632014008)

\* 通讯作者 E-mail: yaoxi@icbr.ac.cn

公司),腺苷标准品(>99%)(批号:A9251,美国Sigma公司),尿苷标准品(>99%)(批号:U3750,美国Sigma公司),鸟苷标准品(>98%)(批号:G6752,美国Sigma公司),胸苷标准品(>99%)(批号:T9250,美国Sigma公司),腺嘌呤标准品(>99%)(批号:A8626,美国Sigma公司),色氨酸标准品(>98%)(批号:T8941,美国Sigma公司),苯丙氨酸标准品(>99%)(批号:P5482,美国Sigma公司),酪氨酸标准品(>99%)(批号:T8566,美国Sigma公司);从超市购买浙江、安徽等地生产的八种毛竹竹笋样品,分别编号F1、F2、F3、F4(鲜笋)以及D1、D2、D3、D4(笋干);色谱乙腈、甲醇,美国Fisher公司;分析纯乙醇,北京化玻站。

Waters 2996 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(PAD),美国Waters公司;PURELAB Plus型超纯水系统,美国PALL-GELMAN公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 标准储备液的配制

准确称取胞苷、腺苷、尿苷、鸟苷、胸苷、腺嘌呤、色氨酸、苯丙氨酸以及酪氨酸标准品各10 mg,分别置于10 mL容量瓶中,超纯水定容,该储备液的浓度即为1 mg/mL,放置在4 °C冰箱中保存。

### 1.2.2 工作曲线溶液的配制

精确吸取配制好的标准储备液置于10 mL容量瓶中,超纯水定容,分别配制成500、200、100、50、20、10  $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列,并配制相同浓度梯度的混标,置于样品瓶中,4 °C冰箱保存备用。

### 1.2.3 液相色谱分析条件

考察色谱柱、流动相以及检测条件等因素,最终

确定的检测方法如下:色谱柱:YMC-Pack ODS-AQ  $\text{C}_{18}$ (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈(A),0.5%乙酸缓冲液(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 3% A; 10 ~ 11 min, 10% A; 11 ~ 19 min, 12% A; 19 ~ 20 min, 3% A)。流速为1 mL/min;紫外检测器: $\lambda = 254$  nm;柱温:30 °C;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

### 1.2.4 加标回收率实验

按照文献方法<sup>[13]</sup>进行添加回收实验,计算回收率及其相对标准偏差。

### 1.2.5 样品的提取

根据参考文献<sup>[14]</sup>,准确称取10.0 g经过粉碎处理的鲜笋样品,置于500 mL具塞锥形瓶中,加入100 mL 60%的乙醇溶液,浸提24 h,共提取3次,合并提取液,抽滤后减压浓缩,并定容至10 mL容量瓶中,进样前过0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜。另称取同样质量的鲜笋样品置于垫有滤纸的培养皿中,60 °C烘干后粉碎待用。将购买的笋干使用粉碎机磨成粉后,分别称取1.0 g样品置于100 mL具塞锥形瓶中,加入50 mL 60%的乙醇溶液,浸提24 h,浸提3次,合并提取液,抽滤后减压浓缩,并定容至10 mL容量瓶中,进样前经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜。

### 1.2.6 含量计算

通过建立的液相检测方法,对配制的混合标准品梯度溶液进行检测,并绘制这九种化合物的标准曲线,得到线性方程;将样品检测之后通过标准品的保留时间对这九种化合物进行定性,并通过线性方程进行计算,最终通过换算之后即可得到不同样品中这九种化合物的含量。

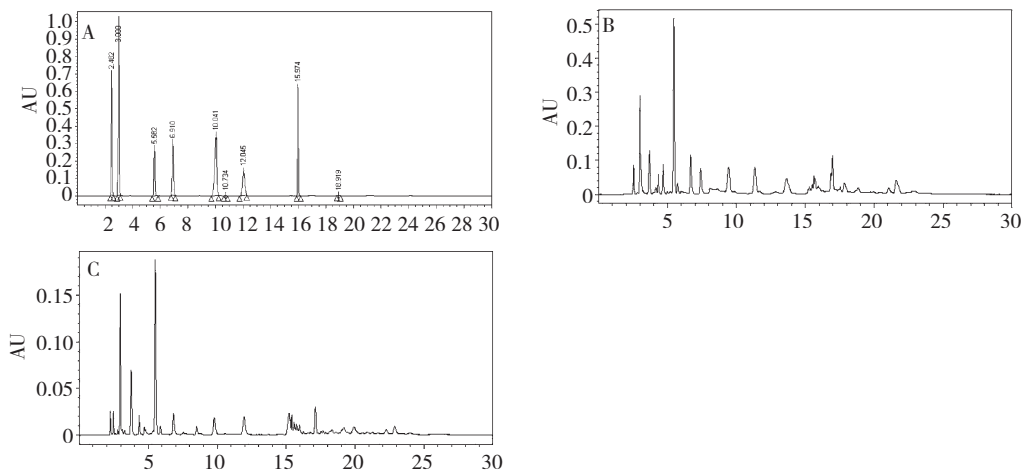


图1 9种目标化合物标准样品(A)、笋干样品(B)以及鲜笋样品(C)的液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of 9 mixed standards (A), dry (B) and fresh (C) bamboo shoots samples

表 1 9 种目标化合物的线性方程

Table 1 Linear relationships between peak area and concentration of 9 analytes

化合物 Compounds	保留时间 Retention time (min)	线性方程 <sup>a</sup> Linear equations	R <sup>2</sup>
胞苷 Cytidine	2.482	Y = 37574X + 6632.2	0.9999
腺嘌呤 Adenine	3.000	Y = 60815X + 2837.3	0.9999
腺苷 Adenosine	10.041	Y = 41059X - 879.95	0.9999
尿苷 Uridine	6.910	Y = 28093X + 2762.6	0.9999
鸟苷 Guanosine	10.734	Y = 32471X + 2626.1	0.9999
胸苷 Thymidine	15.974	Y = 40313X + 8733.6	0.9999
色氨酸 Tryptophan	18.919	Y = 28807X + 3999.5	0.9999
苯丙氨酸 Phenylalanine	12.045	Y = 493.3X - 895.0	0.9998
酪氨酸 Tyrosine	5.585	Y = 3830.8X - 5931.6	0.9995

<sup>a</sup> Y = 峰面积; X = 质量浓度。

<sup>a</sup> Y = Peak area; X = concentration.

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制备

在设定的色谱条件下,标准品与样品图谱见图 1。各标准品的保留时间先后顺序为:胞苷、腺嘌呤、酪氨酸、尿苷、腺苷、鸟苷、苯丙氨酸、胸苷、色氨酸。

按 1.2 节确定的色谱条件进行测定,每个浓度进行平行测定三次,得出峰面积的平均值,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得到相应的回归方程及相关系数。由表 1 可知,9 种标准品在所选定的

色谱条件下和质量浓度范围内,分离较好,线性关系良好。

### 2.2 精密度及标准品稳定性实验

取对照标准品的一个质量浓度连续进样 5 次,在 3 d 内不同时间共 8 次进样,对其峰面积进行统计分析,并计算相对标准偏差(见表 2)。用来表示精密度及日内稳定性的 9 种标准品峰面积 RSD 最高值为 1.97%,说明仪器条件稳定且精密度高。各种标准品在 3 d 内稳定,RSD 在 1.47% ~ 2.81% 之间。

表 2 9 种标准品的不同进样时间峰面积的相对标准偏差

Table 2 RSD and precision of 9 samples

标准品 Standards	精确度 Accuracy (RSD/% , n = 5)	日内稳定性 Intra-day (RSD/% , n = 5)	日间稳定性 Inter-day (RSD/% , n = 3)
胞苷 Cytidine	1.58	1.13	2.35
腺嘌呤 Adenine	0.74	1.21	1.74
腺苷 Adenosine	0.99	0.87	2.72
尿苷 Uridine	1.13	1.30	2.43
鸟苷 Guanosine	1.05	0.66	1.47
胸苷 Thymidine	1.97	1.24	2.09
色氨酸 Tryptophan	0.72	1.26	2.81
苯丙氨酸 Phenylalanine	0.86	0.72	1.86
酪氨酸 Tyrosine	0.76	1.39	1.89

### 2.3 样品的加标回收率实验

准确称取实验样品,加入一定量的各标准溶液,按照 1.2.5 节确定的样品处理方法对实验样品进行提取,并按照 1.2.3 节确定的色谱检测条件进行检

测,测定结果如表 3 所示。结果表明,加标回收率平均在 86.74% ~ 100.17% 之间,相对标准偏差在 0.04% ~ 2.90% 之间,满足实验要求,方法稳定,结果可靠。

表3 竹笋中9种目标化合物的添加回收率  
Table 3 Recovery of 9 components of bamboo shoots

化合物 Compounds	1			2			3		
	添加质量 Adding quality (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	添加质量 Adding quality (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	添加质量 Adding quality (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
胞苷 Cytidine	32	99.89 ± 0.04	0.04	20	88.20 ± 0.80	0.68	12	89.83 ± 0.77	0.47
腺嘌呤 Adenine	48	94.41 ± 0.42	0.38	30	94.12 ± 1.50	1.12	18	86.74 ± 0.92	0.5
腺苷 Adenosine	8	97.25 ± 0.88	0.94	5	92.73 ± 1.44	1.42	3	93.67 ± 2.80	2.08
尿苷 Uridine	80	96.88 ± 0.56	0.56	50	92.98 ± 1.42	1.15	36	92.68 ± 2.35	1.55
鸟苷 Guanosine	32	89.74 ± 1.68	1.88	20	93.07 ± 2.18	1.91	12	89.72 ± 1.09	0.72
胸苷 Thymidine	48	100.17 ± 2.01	1.98	30	90.16 ± 0.73	0.6	18	91.24 ± 1.13	0.67
色氨酸 Tryptophan	16	88.29 ± 1.28	1.43	10	87.60 ± 0.95	0.84	6	93.28 ± 2.37	2.76
苯丙氨酸 Phenylalanine	2400	95.43 ± 0.80	0.92	1500	94.94 ± 2.04	0.96	900	91.18 ± 1.55	1.12
酪氨酸 Tyrosine	800	97.07 ± 0.57	0.57	500	90.10 ± 2.46	2.01	360	87.03 ± 2.07	1.4

## 2.4 样品含量测定

从超市中购买了8份不同的毛竹竹笋样品,包括两种鲜春笋、两种鲜冬笋以及四种笋干。按照1.2.5节的方法进行提取,按照1.2.3节的色谱条件

进行测定,其中笋干D1和鲜笋F1的检测图谱分别见图1,根据得到的9种化合物的线性方程进行计算,最终得到结果如表4所示。

表4 八种竹笋样品中9种目标化合物的含量(mg/kg)

Table 4 The contents of 9 compounds in eight different bamboo shoots (mg/kg)

样品 Samples	胞苷 Cytidine	腺嘌呤 Adenine	腺苷 Adenosine	尿苷 Uridine	鸟苷 Guanosine	胸苷 Thymidine	色氨酸 Tryptophan	苯丙氨酸 Phenylalanine	酪氨酸 Tyrosine
F1	56.46	221.54	126.00	141.08	47.69	58.46	82.46	840.62	876.77
F2	10.86	18.00	19.71	-	27.86	-	42.86	338.71	679.71
F3	74.88	146.50	128.88	140.13	316.50	50.25	152.63	536.88	1731.63
F4	183.54	16.77	20.31	162.62	-	121.38	45.23	99.08	452.00
D1	81.46	149.72	190.77	326.48	464.70	21.56	171.55	606.53	2170.20
D2	359.85	104.26	489.59	537.40	-	38.42	253.07	697.38	1757.34
D3	196.00	134.06	408.09	645.49	952.96	54.41	363.37	785.78	1986.46
D4	146.43	36.60	237.29	156.25	149.54	22.58	5.32	987.21	1189.13

由表4可知,胞苷、腺苷含量最高的是样品D2,其含量分别是359.85、489.59 mg/kg;腺嘌呤含量最高的是F1,含量是221.54 mg/kg;尿苷、鸟苷含量最高的是D3,分别含有645.49、952.96 mg/kg;胸苷含量最多的是F4,其含量为121.38 mg/kg;色氨酸、苯丙氨酸以及酪氨酸含量最高的分别是D3、D4、以及D1,其含量分别是363.37、987.21 mg/kg以及2170.20 mg/kg。另可能由于加工工艺的差异,笋干样品D4中各成分普遍较其他样品中水平低。

## 3 讨论与结论

核苷类组分多偏碱性,溶于水,所以流动相的条件着重考虑了甲醇-水、甲醇-酸、乙腈-酸等不同系

统,最后试验发现选用乙腈-0.5%的乙酸为流动相时的峰形较好,分离度高。对样品进行全波长扫描发现,在254 nm和267 nm处有最大吸收,且在254 nm处,样品中核苷和氨基酸2类成分均有很好响应,峰形好,分离度高,故选择254 nm作为检测波长值。

本研究采用梯度洗脱将6种核苷及3种氨基酸类成分进行了较好的分离,并且对市售竹笋样品进行了定量分析。结果表明,该方法准确、可靠、重现性较好,可为优质竹笋品种的筛选、培育及加工利用提供科学参考。

苯丙氨酸是重要的呈味氨基酸之一,腺嘌呤核苷也是呈鲜味核苷酸的组成部分,这一点可以解释

竹笋味道鲜美之原因<sup>[15]</sup>。核苷类化合物具有重要的生理功能,对神经系统也有作用,腺苷可以抑制中枢神经系统神经元的兴奋性,鸟苷能够保护喹啉酸诱导的癫痫发作<sup>[16]</sup>。根据检测结果,竹笋中核苷的总含量达到了 5 g/kg,具有开发作为补充核苷的功能性食品的潜力。

### 参考文献

- 1 Wu LR(吴良如),Gao BG(高贵宾),Bai RH(白瑞华),*et al.* Research and application of dietary fiber from bamboo shoots. *J Bamboo Res* (竹子研究汇刊),2010,29(2):1-5.
  - 2 Xu SY(徐圣友),Cao WY(曹万友),Song RQ(宋曰钦),*et al.* Analysis and evaluation of protein and amino acid nutritional components of different species of bamboo shoots. *Food Sci* (食品科学),2005,26:222-227.
  - 3 Wu J,Zheng J,Xia X,*et al.* Purification and structural identification of polysaccharides from bamboo shoots (*Dendrocalamus latiflorus*). *Int J Molec Sci*,2015,16:15560-15577.
  - 4 Zheng Y,Zhang S,Wang Q,*et al.* Characterization and hypoglycemic activity of a  $\beta$ -pyran polysaccharides from bamboo shoot (*Leleba oldhami* Nakal) shells. *Carbohydr Polym*,2016,144:438-446.
  - 5 Feleke S. Site factor on nutritional content of *Arundinaria alpina* and *Oxytenanthera abyssinica* bamboo shoots in Ethiopia. *J Horticult Forest*,2013,5:115-121.
  - 6 Sun J,Ding ZQ,Gao Q,*et al.* Major chemical constituents of bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*): Qualitative and quantitative research. *J Agric Food Chem*,2016,64:2498-2505.
  - 7 Singh S. Nucleosides with modified sugar ring: Synthesis and biological activities. *Current Organ Chem*,2016,20:856-897
  - 8 Jiang J,Kanabar V,Padilla B,*et al.* Uncharged nucleoside inhibitors of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase with activity in cells. *Chem Commun*,2016,52:3955-3958.
  - 9 Wang HR(王洪荣),Ji Y(季昀). Advanced research in biological activities and functions of nutritional regulation of amino acids. *Chin J Animal Nutr* (动物营养学报),2013,25:447-457.
  - 10 Yang XS(杨校生),Xie JZ(谢锦忠),Ma ZX(马占兴),*et al.* Seventeen kinds of sensory and nutritional quality evaluation of cluster bamboo shoots. *China Forest Sci Technol*(林业科技开发),2001,15(5):16-18.
  - 11 Ding M(丁明),Zhong DL(钟冬莲),Tang FB(汤富彬),*et al.* Determination of seven pesticide residues in bamboo shoots by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction. *Chin J Chromatogr* (色谱),2013,31:117-121.
  - 12 Gao XJ(高雪娟). Study on the components and biological activity of bamboo shoot shell extractions. Beijing: Beijing Forestry University(北京林业大学),MSc. 2011.
  - 13 Zheng Z(郑重),Sun Q(孙琦),Shi YW(石永伟),*et al.* Direct quantitative analysis of amino acids in fermented beverage of plant extract using High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chin J Chromatogr* (色谱),2015,33:309-313.
  - 14 Du WP(杜文鹏),Xu P(徐彭),Liu B(刘波),*et al.* Chemical constituents from shoots of *Phyllostachys edulis* (I). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2015,46:334-338.
  - 15 Xu XB(徐小博). Chemical components of bamboo leaves and bamboo shoots from *Phyllostachys prominens*. Chinese Academy of Forestry(中国林业科学研究院),PhD. 2015.
  - 16 Jacobson KA,Jarvis MF,Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *Med Chem*,2002,45:4057-4093.
- (上接第 1396 页)
- 18 Wang DJ(王岱杰). Study of leaves from *Lonicera japonica* Thunb. on chemical constituents and anti-H5 subtype AIV activity. Taian: Shandong Agricultural University(山东农业大学),PhD. 2013.
  - 19 Zhao JJ(赵金娟),Guan RW(管仁伟),Lu JX(路俊仙),*et al.* Determination of content of galuteolin in different varieties of *Lonicerae japonicae Flos* and *L. japonicae Folium* by HPLC. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志),2014,20:103-105.
  - 20 Li M(李淼),Wang YX(王永香),Meng J(孟谨),*et al.* Determination of eight components in *Lonicerae japonicae flos* by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2014,45:1006-1010.
  - 21 Han YC(韩永成),Liu W(刘伟),Chen N(陈宁),*et al.* Simultaneous determination of six compounds in *Lonicera japonica Thunb* by UHPLC. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27:89-93.