

# HPLC 法测定怀山药零余子尿囊素的含量

滕井通, 薛涛, 薛建平\*, 张爱民, 盛玮 (淮北师范大学生命科学学院, 安徽淮北 235000)

**摘要** [目的]测定怀山药及零余子中尿囊素成分的含量。[方法]以尿囊素为标准对照品,采用 HPLC 法在波长 224 nm 处对怀山药及零余子的尿囊素成分进行含量测定。[结果]平均加标回收率为 98.35%, RSD 为 1.29%;怀山药中尿囊素含量为 0.533%, 怀山药零余子中尿囊素含量为 0.848%;零余子中尿囊素含量略高于怀山药。[结论]该方法简便、易行、准确度高,可用于怀山药零余子中尿囊素成分的含量测定。

**关键词** 怀山药;零余子;尿囊素;HPLC

中图分类号 S632.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)07-02912-01

## Determination of Allantoin Content in *Dioscorea opposita* Thunb. and Bulbil by HPLC

TENG Jing-tong et al (School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei, Anhui 235000)

**Abstract** [Objective] To determine the allantoin content in *Dioscorea opposita* Thunb. and bulbil. [Method] With allantoin as the control substance, the content of allantoin was measured using HPLC at the detection wavelength of 224 nm. [Result] The content of allantoin in *D. opposita* and bulbil was 0.533% and 0.848%, respectively. The average recovery rate of allantoin was 98.35% with relative standard deviations of 1.29%. [Conclusion] The method is simple, easy, accurate and suitable for content determination of allantoin in *D. opposita* and bulbil.

**Key words** *Dioscorea opposita* Thunb.; Bulbil; Allantoin; HPLC

怀山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)又名薯蕷,为我国著名“四大怀药”之一<sup>[1]</sup>,主产于河南焦作市的温县、武陟、博爱和沁阳等地。怀山药素有“怀参”之称,具有健脾、补肺和固肾等功效,主治脾虚泄泻、久痢、虚劳咳嗽和消渴等症。其产品不仅畅销国内各地,还远销港澳地区和东南亚以及欧美等地<sup>[2]</sup>。

怀山药含有淀粉、蛋白质、多糖、尿囊素、麦角甾醇和薯蕷皂苷元等成分。尿囊素作为山药含量较高的活性物质之一,具有促进细胞生长、加快伤口愈合和软化角质蛋白等生理功能,与山药传统上养胃的功能密切相关,常作为评价山药品质的活性成分<sup>[3-5]</sup>。

零余子是山药植株叶腋间形成的珠芽,俗称山药蛋,但因其体积小、商品价值不高,每年除少量作种用外,大部分都被白白扔掉<sup>[6]</sup>。目前,关于怀山药零余子中尿囊素成分的研究鲜有报道,致使大量怀山药零余子的营养价值没有得到充分的体现。笔者以怀山药和零余子为试验材料,对所含尿囊素成分进行提取,并采用高效液相色谱法对该成分进行定量分析,以期科学利用怀山药零余子提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 研究对象。**怀山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)及零余子,采集于河南省温县,经淮北师范大学生命科学学院薛建平教授鉴定为薯蕷科薯蕷属怀山药及其零余子。

**1.1.2 主要仪器。**Ultimate 3000 高效液相色谱仪,由美国 DIONEX 公司生产;CP213 电子分析天平,由上海奥豪斯仪器有限公司生产;GZX-9240MB 电热恒温鼓风干燥箱,由上海

博讯实业有限公司医疗设备厂生产;KQ-500 型超声波清洗器,由昆山市超声仪器有限公司生产;FDV 超微粉碎机,由北京环亚天元机械技术有限公司生产。

**1.1.3 主要试剂。**尿囊素对照品(批号:111501-200202),由中国食品药品检定研究院提供;甲醇为色谱纯,由国药集团化学试剂有限公司生产;水为超纯水,自制。

### 1.2 方法

**1.2.1 液相色谱条件。**色谱柱为 Acclaim C18(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相为无水甲醇-水(1:9, V/V);流速为 0.5 ml/min;柱温为 30 °C。

**1.2.2 对照品溶液的制备。**精密称取 25.0 mg 在 50 °C 减压干燥至恒重的尿囊素对照品,置 250 ml 容量瓶中,加 50 °C 的超纯水超声溶解,冷却后用超纯水定容至刻度,摇匀备用。

**1.2.3 试验材料的预处理。**选取无腐烂、无霉变斑点的新鲜怀山药及零余子,用流动水冲洗干净其外部的泥土和沙粒等,将山药(切成丁状)和零余子在 60 °C 烘干至恒重,并粉碎放入干燥器中,备用。

**1.2.4 供试品溶液的制备**<sup>[7-9]</sup>。精密称取已粉碎的怀山药及零余子各 50.00 mg,置 25 ml 干燥的容量瓶中,加 2.5 ml 超纯水湿润,在 30 °C 超声处理 15 min;再加入 17.5 ml 无水甲醇溶液,在 30 °C 温度下超声处理 20 min,最后添加无水甲醇溶液稀释至刻度,振荡摇匀,静置 1.5 h,使蛋白质、糖类等大分子物质沉淀。以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 5 ml 过 0.22 μm 微孔滤膜,收集并标记,备用。

**1.2.5 尿囊素吸收波长的确定。**取尿囊素对照品溶液于 190~300 nm 波长范围内扫描,选定最大吸收波长为测定波长<sup>[10]</sup>。

**1.2.6 方法学考察。**(1)线性关系的考察。取尿囊素对照品溶液分别进样 0.5、10、15 和 20 μl,照上述色谱条件分析。以峰面积积分值 A 为纵坐标,尿囊素含量 C(μg)为横坐标,

**基金项目** 资源植物生物学安徽省重点实验室项目。

**作者简介** 滕井通(1975-),男,江苏徐州人,硕士,从事植物资源开发与利用研究, E-mail: tt7510@163.com。\* 通讯作者, E-mail: xuejp2000@yahoo.com.cn。

**收稿日期** 2013-03-07

(下转第 2928 页)

### 3 结论与讨论

棉花不育系雄性不育花药、花粉形态观察与选育技术方面研究,过去未被人重视,相关报道也较少。通过笔者观察及几年选育实践,证明其较眼观、手感选择准确到位。利用此项技术,笔者曾相继选育了丰81A、丰88A,现在已进入测配、筛选杂交棉花新品阶段。该研究中,染败、圆败、典败之间区分标准是借助水稻不育系,花粉碘酞剂染色的经验标准划分的。染败是花粉圆形,遇碘边缘着色或部分染色。圆败是花粉圆形,遇碘不染色。典败是花粉呈不规则形状,菱形或圆形凸凹,遇碘完全不着色。需要说明的是,花粉母细胞败育程度完全依据镜检花粉母细胞镜检形态特征人为划分的。整个棉花花粉发育过程与败育型关系有待于进一步研

(上接第2912页)

绘制标准曲线,计算回归方程。(2)精密度试验。精密吸取尿囊素对照品溶液10 μl,连续进样5次,记录峰面积并计算RSD。(3)稳定性试验。精密吸取尿囊素对照品溶液5 μl,每隔2 h进样1次,共进样5次,记录峰面积并计算RSD。(4)加标回收试验。精密吸取已知山药尿囊素浓度为1 mg/ml的样品溶液5份,每份取0.1 ml,分别精密加入30.0、60.0、90.0、120.0和150.0 μg尿囊素对照品溶液,计算尿囊素的平均回收率和RSD。

**1.2.7 怀山药和零余子尿囊素的含量测定。**准确吸取怀山药样品溶液20 μl,连续进样3次,根据标准曲线回归方程计算怀山药中尿囊素的含量。准确吸取怀山药零余子样品溶液20 μl,连续进样3次,根据标准曲线回归方程计算怀山药零余子中尿囊素的含量。

## 2 结果与分析

**2.1 吸收波长的选择** 图1表明,在190~300 nm波长范围内,最大吸收峰在224 nm处,因此选择224 nm作为测定波长。

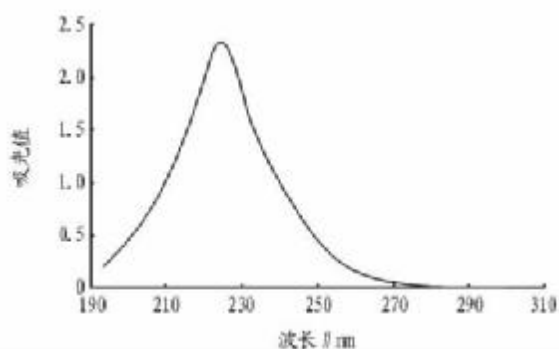


图1 测定波长的选择

**2.2 方法学考察** (1)线性关系的考察。通过计算得尿囊素对照品含量对以峰面积积分值的线性回归方程为 $Y = 10.9190X + 0.1768$ ,  $R^2 = 0.999$ 。试验结果表明,尿囊素在0~0.002 mg/ml浓度范围内与峰面积积分值的线性关系良好。(2)精密度试验。经测定得峰面积平均值为10.935, RSD为1.32% ( $n=5$ ),表明精密度良好。(3)稳定性试验。经测定峰面积平均值为5.572, RSD为0.62 ( $n=5$ ),表明尿囊素溶液在

究。该研究中呈现的照片属碘型照片。实际镜检中,大多数同一株不同部位所开的花存在差异。同一朵花常以圆、染混生型居多,碘、圆混生型居少,单独典败型难找,需要进行大量的花检,才能作出正确判断,取得良好的效果。

### 参考文献

- [1] 刘金兰,徐征秀,聂以春. 棉花花粉不同发育时期的扫描电镜观察[J]. 华中农业大学学报,1994,13(1):15-18.
- [2] 聂志华. 对典败和圆败的认识和讨论[J]. 江西农业科技,1980(4):10-12.
- [3] 梅正鼎,贺云新,张志刚,等. 浅析国内棉花不育系的研究与应用[J]. 江西棉花,2011,33(4):3-5.
- [4] 张志刚,周世象,李育强. 湖南棉花不育系研究进展与发展思路[J]. 湖南农业科学,2007(1):19-21.
- [5] 王斌,费德友,杨洪理. 棉花不育系与恢复系配合力分析[J]. 中国棉花,1998,25(8):8-9.

4 h内基本稳定。(4)加标回收试验。由表1可知,平均回收率为98.35%, RSD为1.29%,表明该方法简便、易行、准确度高,可用于怀山药零余子中尿囊素成分的含量测定。

表1 加标回收率实验结果( $n=5$ )

序号	对照品含量	测得量	回收率	平均回	RSD
	μg	μg	%	收率//%	%
1	30	125.75	96.73	98.35	1.29
2	60	156.54	97.84		
3	90	190.51	100.27		
4	120	216.98	98.63		
5	150	245.71	98.28		

**2.3 怀山药和零余子尿囊素的含量测定** 测得怀山药供试液峰面积平均值为2.505,根据标准曲线回归方程计算出怀山药中尿囊素含量为0.533%。测得怀山药零余子供试液峰面积平均值为3.876,根据标准曲线回归方程计算出怀山药零余子中尿囊素的含量为0.848%。

### 3 结论与讨论

试验采用高效液相色谱方法测定尿囊素,方法简单、易行、准确,且精密度高,稳定性好。试验结果表明,怀山药尿囊素含量为0.533%,零余子中尿囊素含量为0.848%;怀山药零余子中尿囊素的含量高于怀山药中尿囊素的含量,可以进行深入开发研究。但该试验未对怀山药零余子中尿囊素的提取工艺进行优化,仍有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 谢宗万. 中药材品种论. 中册[M]. 上海:上海科技出版社,1984:193.
- [2] 聂桂华,周可范,董秀华,等. 山药的研究概况[J]. 中草药,1993,24(3):158-160.
- [3] DOMSCH K H, GAMS W, ANDERSON T H. Compendium of the soil fungi [M]. London: New York: Academic Press, 1980:1580-1593.
- [4] 周文静,范鸿雁,何凡,等. 海南省西瓜炭疽病菌生物学特性及药剂毒力测定[J]. 安徽农业科学,2012,40(4):2070-2073.
- [5] 范鸿雁,罗霓,陶挺燕,等. 番木瓜弯孢霉叶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2010,39(2):45-47.
- [6] 薛建平,祝红蕾,尧俊英. 铁棍山药及其零余子营养成分的比较研究[J]. 食品工业科技,2008(8):268-269.
- [7] 凌育赵. 高效液相色谱法检测淮山米粉尿囊素的研究[J]. 粮油食品科技,2006,14(1):52-59.
- [8] 王玲,王东. 不同产地山药中尿囊素含量的HPLC测定[J]. 河南中医学院学报,2006,21(5):20-22.
- [9] 王宝华,江佩芬,杜海燕,等. HPLC法测定山药中尿囊素的含量[J]. 北京中医药大学学报,1995,18(1):67-68.
- [10] 毛维伦,夏险峰,田连起,等. 茯苓饮片的紫外光谱分析[J]. 湖北中医学院学报,2006,8(1):37-38.