

中药研究

高效液相色谱法测定灵芝提取物中尿苷和腺苷含量

席桂同

(中国中医科学院西苑医院药剂科,北京,100091)

摘要 目的:建立一种测定灵芝提取物中尿苷和腺苷含量的高效液相色谱法,测定不同产地灵芝提取物中的尿苷和腺苷的含量。方法:色谱柱:Diamonsil C₁₈(2)(5 μm,250 mm×4.6 mm);流动相:乙腈-0.04 M KH₂PO₄=9:91;流速:1 mL·min⁻¹,检测波长:260 nm,柱温:35 ℃。结果:尿苷和腺苷分别在0.2~50 μg·mL⁻¹和0.1~20 μg·mL⁻¹范围内,峰面积与浓度的线性关系良好;尿苷和腺苷的平均准确度均在99.91%~102.12%之间;日内、日间精密度RSD均小于1.76%,样品回收率均在94.42%~100.50%之间。6个不同产地的灵芝提取物中,以福建灵芝中尿苷含量和吉林灵芝中腺苷含量最高,其他5个产地灵芝中尿苷和腺苷含量差异无统计学意义。结论:该方法特异性强、准确度高、重复性好,可用于测定灵芝提取物中的尿苷和腺苷含量,为灵芝提取物的评价提供参考和依据。

关键词 高效液相色谱法;灵芝提取物;尿苷;腺苷;含量测定

Determination of Uridine and Adenosine Content of Ganoderma Lucidum Extract by HPLC

Xi Guitong

(Pharmacy Department of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC method to determine uridine and adenosine content of Ganoderma lucidum extract, and determine content of uridine and adenosine in Ganoderma lucidum extract in different habitats. **Methods:** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈(2) (5 μm, 250 × 4.6 mm); the mobile phase acetonitrile was 0.04 M KH₂PO₄ = 9:91; the flow rate was 1 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 260 nm; the column temperature was 35 ℃. **Results:** The range of uridine and adenosine was respectively in 0.2 ~ 50 μg·mL⁻¹ and 0.1 ~ 20 μg·mL⁻¹, and the linear relationship between concentration and peak area were good; the average accuracy of uridine and adenosine were both between 99.91 to 102.12%; day and inter day RSD were less than 1.76%, and sample recovery rate were within 94.42% to 100.50%. Among the extract of Ganoderma lucidum in the 6 different areas, the highest uridine content contained in Ganoderma lucidum in Fujian and highest adenosine content appeared in Jilin, and there were no statistical differences of uridine and adenosine content of Ganoderma lucidum in the other 5 places. **Conclusion:** The method is specific, accurate, reproducible, and can be used for determination of uridine and adenosine in ganoderma extract, which provides the reference and basis for evaluation of Ganoderma lucidum extract.

Key Words High performance liquid chromatography; Ganoderma lucidum; Uridine; Adenosine; Content determination

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.07.030

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种树生菌类,在中国作为一种治疗药草而具有超过2000年的使用历史^[1]。灵芝为紫芝或赤芝的干燥子实体^[2],主要含有三萜、生物碱、多糖、氨基酸和黄酮等多种成分^[3],具有较好地治疗某些癌症^[4]、抗衰老^[5]、抗炎、护肝、调节血脂、调节物质代谢^[6]、抗高血压等功效。近年来,其活性成分成为深入研究的主题,尿苷和腺苷为灵芝的主要有效成分^[7],由于灵芝提取物是灵芝类产品主要的来源^[8],因此对其质量进行监控是十分有必要的。笔者建立了一种测定灵芝提取物中尿苷和腺苷含量的高效液相色谱法,并测定不同产地灵芝提取物中的尿苷和腺苷含量,旨在为灵芝提取物中有效成分尿苷和腺

苷的测定提供参考和依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-2010A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),紫外检测器,LC-solution工作站;BS224S型电子天平(德国赛多利斯公司);KQ-300型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);KL-UP-II型超纯水机(台湾艾柯公司)。

1.2 试剂 尿苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:887-200202);腺苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110879-200202);灵芝提取物(全国不同产地购买的紫芝和赤芝实体,由西安康威生物工程有限公司采用统一的工艺提取,主要由水提、浓缩和干

燥获得);磷酸二氢钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 溶液的配制 尿苷贮备液:称取尿苷对照品 20 mg,于 100 mL 容量瓶中,加适量 10% 的甲醇溶液溶解后,继续用 10% 甲醇溶液定容至刻度,摇匀,即得 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的尿苷贮备液,于冰箱中冷藏,备用。

腺苷贮备液:称取腺苷对照品 10 mg,于 100 mL 容量瓶中,加适量 10% 的甲醇溶液溶解后,继续用 10% 甲醇溶液定容至刻度,摇匀,即得 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的腺苷贮备液,于冰箱中冷藏,备用。

样品溶液:取灵芝提取物 0.2 g,于 25 mL 容量瓶中,加入适量 10% 的甲醇溶液,超声 10 min 后,继续用 10% 甲醇溶液定容至刻度,摇匀,经 $0.22 \mu\text{m}$ 的有机系滤膜过滤,取续滤液作为样品溶液,备用。

2.1.2 色谱条件 色谱柱:Diamondsil C₁₈(2)($5 \mu\text{m}$, $250 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$);流动相:乙腈- $0.04 \text{M KH}_2\text{PO}_4 = 9:91$;流速: $1.0 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: $35 \text{ }^\circ\text{C}$;检测波长: 260nm ;进样体积: $20 \mu\text{L}$ 。

2.1.3 特异性 分别取腺苷、尿苷储备液稀释 20 倍后的溶液及灵芝提取物样品溶液按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,尿苷、腺苷分别于 7.0 min、8.9 min 左右出峰,峰形良好,且灵芝提取物中的内源性物质对腺苷和尿苷的测定无干扰。(见图 1)

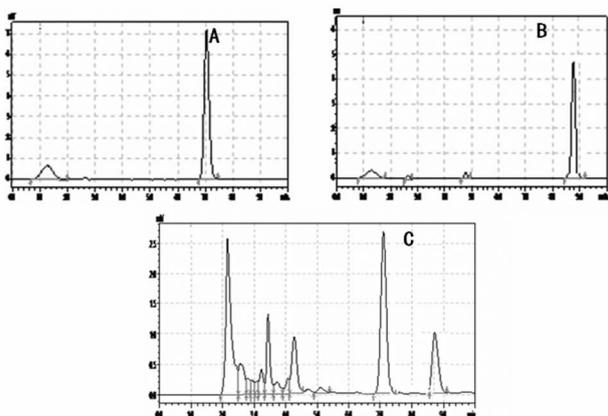


图 1 典型 HPLC 色谱图

A - 腺苷溶液;B - 尿苷溶液;C - 灵芝提取物样品溶液

2.1.4 标准曲线及线性范围 精密吸取尿苷和腺苷对照品贮备液适量混匀,用水逐级稀释成尿苷浓度为 $50, 20, 10, 5.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 腺苷浓度为 $20, 10, 5.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系

列混合标准溶液。按“2.1.2”项色谱条件进样,记录色谱图。以峰面积(X)为横坐标,以浓度(Y)为纵坐标进行线性回归,得尿苷线性回归方程为: $Y = 34\ 561X - 72.892\ 3$ ($R = 0.999\ 98$),腺苷线性回归方程为 $Y = 29\ 805X - 109.341\ 7$ ($R = 0.999\ 98$),结果表明,尿苷和腺苷分别在 $0.2 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,峰面积与浓度的线性关系良好。

2.1.5 定量下限 以标准曲线的最低浓度点为定量下限,则尿苷的定量下限(LLOQ)为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N > 10$),腺苷的定量下限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用 10% 的甲醇溶液配制浓度分别为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的尿苷溶液和 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的腺苷混合溶液 6 份,按“2.1.2”项下色谱条件,进样分析,记录峰面积。由标准曲线计算尿苷和腺苷的浓度,考察样品的准确度和 RSD。结果表明,尿苷样品平均准确度为 100.7%,RSD 为 0.95%,腺苷样品的平均准确度为 99.89%,RSD 为 1.03%,符合含量测定的要求。

2.1.6 准确度 用 10% 甲醇溶液配制低、中、高浓度的尿苷($0.5, 5.0, 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和腺苷($0.2, 2.0, 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)混合溶液 5 份,按“2.1.2”项下色谱条件,进样分析,记录峰面积。由标准曲线计算尿苷和腺苷的浓度,以测得值与理论值的比计算准确度,结果显示,低、中、高浓度的尿苷平均准确度在 99.91% ~ 101.01% 之间,RSD 均小于 1.48%;低、中、高浓度的腺苷平均准确度在 100.41% ~ 102.12% 之间,RSD 均小于 1.03%,满足含量测定要求。

2.1.7 精密度 用 10% 甲醇溶液配制低、中、高浓度的尿苷($0.5, 5.0, 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和腺苷($0.2, 2.0, 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)混合溶液 5 份,按“2.1.2”项下色谱条件,进样分析,记录峰面积。1 日内连续测定 5 次,连续测定 3 d。结果尿苷的日内、日间精密度 RSD 均小于 1.76%,腺苷的日内、日间精密度 RSD 均小于 1.82%。

2.1.8 加样回收率 取已知含量的灵芝提取物(尿苷 1.103mg/g 、腺苷 0.769mg/g) 0.2g ,分别按照其含量的 80%、100%、120% 精密加入尿苷和腺苷贮备液适量,各平行 3 份,按“2.1.1”项下方法配制样品溶液,进样分析,以(测得量 - 样品中的量)/加入量,计算加样回收率,结果尿苷低、中、高浓度的加样回收率均在 96.24% ~ 100.50% 之间,RSD 值均小于 1.78%,腺苷低、中、高浓度的加样回收率均在 94.42% ~ 99.86% 之间,RSD 值均小于 1.69%。(见表 1、表 2)

2.1.9 稳定性 用 10% 的甲醇溶液分别配制低、中、高浓度的尿苷($0.5, 5.0, 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和腺苷($0.2, 2.0, 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)混合溶液各 5 份,于 4°C 冰箱中放

置,并分别于0、12、24、48 h 取样,按“2.1.2”项下色谱条件分析。记录不同放置时间点尿苷和腺苷的峰面积,并与0小时的峰面积相比较,观察放置过程中样品的变化情况。结果3个浓度的尿苷和腺苷在不同时间的含量RSD均小于1.76%,表明尿苷和腺苷溶液4℃放置48 h基本稳定,提示尿苷和腺苷样品于4℃条件下放置48 h内测定完即可。

表1 HPLC-UV法测定灵芝提取液中尿苷含量的回收率(n=3)

NO	80%		100%		120%	
	测定值 (mg)	回收率 (%)	测定值 (mg)	回收率 (%)	测定值 (mg)	回收率 (%)
1	0.3931	97.76	0.4401	99.50	0.4832	99.20
2	0.3979	100.50	0.4389	98.96	0.4799	97.98
3	0.3951	98.89	0.4329	96.24	0.4802	98.07
Mean	0.3954	99.05	0.4373	98.23	0.4811	98.42
RSD(%)	0.62	1.39	0.88	1.78	0.37	0.69

表2 HPLC-UV法测定灵芝提取液中腺苷含量的回收率(n=3)

NO	80%		100%		120%	
	测定值 (mg)	回收率 (%)	测定值 (mg)	回收率 (%)	测定值 (mg)	回收率 (%)
1	0.2721	96.16	0.3045	97.98	0.3381	99.86
2	0.2739	97.67	0.3021	96.42	0.3374	99.50
3	0.2699	94.42	0.3007	95.51	0.3338	97.56
Mean	0.2720	96.08	0.3024	96.64	0.3364	98.98
RSD(%)	0.74	1.69	0.63	1.29	0.67	1.25

2.2 数据处理 采用SPSS19.0统计学软件对数据结果进行处理。计量资料采用“均值±SD”表示,组间差异采用t检验。 $P>0.05$,代表差异无统计学意义; $P<0.05$,代表差异具有统计学意义; $P<0.01$,代表差异具有统计学意义。

表3 不同产地灵芝提取物中尿苷和腺苷的含量测定(n=3, mean±SD)

编号	来源	尿苷(mg/g)	腺苷(mg/g)	总量(mg/g)
1	福建	12.23±3.43*	1.92±0.78	14.15±4.76*
2	安徽	3.96±0.98	1.76±0.93	5.72±1.74
3	山东	3.93±1.02	1.58±0.91	5.51±1.81
4	吉林	4.09±1.87	3.01±1.16*	7.10±1.99
5	河北	4.23±1.21	1.86±0.82	6.09±1.93
6	沈阳	4.78±1.14	1.78±1.04	6.56±1.67

注:与其他产地相比,* $P<0.05$ 。

2.3 样品含量测定 取来自6个不同来源地的灵芝提取物各3批,按照“2.1.1”项下方法制备样品溶液,经“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。按照标准曲线计算灵芝提取物中尿苷和腺苷的含量。结果表明,产自福建的灵芝中尿苷含量较其他5个产地的均高,差异具有统计学意义($P<0.05$,但其他5个产地之间灵芝中尿苷含量差异无统计学意义。同时,产自

吉林的灵芝中腺苷含量显著高于另外其他5个产地的灵芝,差异具有统计学意义($P<0.05$,但其他5个产地间灵芝中腺苷含量的差异均无统计学意义。另外,从结果中可以看出,同一产地的不同批灵芝提取物中,尿苷和腺苷的含量以及含量的总量均存在一定的差异。(见表3)。

3 讨论

3.1 样品溶液的制备 参考常用的中药有效成分样品溶液的制备方法^[9],并结合尿苷和腺苷的基本理化性质,本文预实验中分别对溶剂(10%、20%和50%的甲醇溶液)和超声时间(10、20、40 min)进行了考察。结果发现以10%甲醇为溶剂时,制备的样品中尿苷和腺苷含量最高,且样品中杂质对有效成分的测定无干扰。同时,超声处理发现不同超声时间下样品中尿苷和腺苷的含量基本一致,无显著性差异,因此,最终样品制备时选择了10%的甲醇超声10 min。

3.2 检测波长 采用高效液相色谱-紫外分光光度法测定尿苷和腺苷时,选用的波长多为254 nm^[10-11]和260 nm^[12]。为进行进一步的验证,本研究在200~400 nm的波长范围内对尿苷、腺苷溶液以及样品溶液进行紫外吸光度的扫描,结果发现在262 nm处尿苷有最大的吸收值,而在260 nm处腺苷有最大的吸收值,考虑到样品中尿苷的含量大于腺苷的含量,最终以260 nm为检测波长。

3.3 流动相 据文献报道^[13],采用甲醇和水的梯度洗脱能将尿苷、腺苷及提取物中的其他成分有效分离,但梯度洗脱的时间较长,通常在约40 min^[14],且色谱柱的平衡本身需要一定的时间。因此,为寻找一种更加快速、简便的分析条件,本研究分别考察了甲醇-0.5%磷酸溶液(10:90)、乙腈-0.5%磷酸水溶液(10:90)、甲醇-0.04 M KH_2PO_4 (9:91)、乙腈-0.04 M KH_2PO_4 (9:91)4种流动相。结果表明,以乙腈-0.04 M KH_2PO_4 (9:91)为流动相时,所得的色谱图峰形良好,且分离效果佳,所以最终确定流动相为乙腈-0.04 M KH_2PO_4 =9:91。

3.4 提取物中的尿苷和腺苷含量 从表3中的样品测定结果可以看出,同一产地不同批次的灵芝提取物中尿苷及腺苷含量均存在一定程度的差异,这可能是和药材的质量、投料是否足量以及提取工艺稳定性相关。因此,制定量化的指标是控制灵芝提取物内在质量和保证其临床疗效的有效途径。

综上所述,本文采用高效液相色谱法测定不同产地的灵芝提取物中尿苷和腺苷的含量,该方法不但操
(下接第940页)

合比例大(1:100),为保证取样的代表性及与溴化钾混合的均匀性,注意将药材粉末与溴化钾在玛瑙研钵充分研磨混合均匀。并且每个样品测定3次,然后将各次测得的光谱图曲线加和取平均作为该样品数据曲线。

2)12批小驳骨的红外光谱图大体一致,用 Matlab7.0软件计算其相似度,12批小驳骨样品红外光谱图与共有模式图谱的相关系数(中位数)均大于0.97,说明了各批次与共有模式图谱之间的相关性很高,从而表明共有模式图谱可以作为小驳骨红外光谱鉴别特征之一。

3)小驳骨其所含化学成分及其组分由于受到各种因素(地域环境、土壤、气候、采摘等)的影响会在一些微量组分上存在一定差异。将12批小驳骨样品红外光谱数据应用SPSS 17.0数据统计分析软件做聚类分析,将小驳骨分为5大类,3、8、1、7、4、5、9号样品为一类;11、12号样品为一类;2号样品为一类;10号样品为一类;6号样品为一类。

4)小驳骨有非常相似的化学成分组成,虽然其所含化学成分及组分相关报道较为少见,但从10个共有峰的归属推断,小驳骨所含主要成分可能为黄酮类、有机酸类等。

参考文献

[1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草(第七册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999,459-460.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2010:44.
 [3] 苏玲,蔡毅,朱华,等. 小驳骨挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 广西中医学院院报,2009,12(2):56.
 [4] 刘文案,黄爱东,熊飞. 小驳骨丹无机元素的含量测定[J]. 广东微量元素科学,2002,9(8):57.
 [5] 卢胜明. 五枫藤、小驳骨和川西茶藨的化学成分研究[M]. 四川:中国科学院成都生物研究所,2008:13-18.
 [6] 汤丽华,刘敦华. 基于近红外光谱技术的枸杞产地溯源研究[J]. 食品科学,2011,32(22):175-178.
 [7] 杰尔,沃克曼,洛伊斯·文依. 近红外光谱解析实用指南[M]. 北京:化学工业出版社,2009:13.
 [8] 常淑贞,赵二劳,武宇芳. 红外光谱法分析复方丹参片品质的研究[J]. 广东化工,2013,40(21):154-154.
 [9] 刘飞,杨春艳,刘刚. 油菜籽品种的红外光谱鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2013,33(11):3036-3040.
 [10] 张荣香,张玮,张艳伟,等. 基于茶叶红外光谱的特征识别方法[J]. 红外技术,2013,35(5):304-308.
 [11] 张锐,尹利辉,金少鸿. 红外光谱成像在药品质量控制中的应用[J]. 中国药事,2013,27(6):635-638.
 [12] 刘素丽,陈建波,周群,等. 黄芩采收季节的红外光谱三级鉴别与主成分分析[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(10):2669-2673.
 [13] 金立弟,蔡卫家,韩宇. 黄连药材的红外鉴别[J]. 中国中医药现代远程教育,2012,10(5):162-162.
 [14] 储德初,周群,郁露,等. 红外光谱阵列相关系数法在丹参鉴别中的应用[J]. 光谱学与光谱分析,2007,27(9):1706-1709.
 [15] 袁玉峰,陶站华,田昌海,等. 红外光谱结合化学计量学评价不同产地何首乌[J]. 时珍国医国药,2011,22(8):1835-1837.

(2014-02-11 收稿 责任编辑:曹柏)

(上接第936页)

作简便、可行,且专属性强、精密度及准确度高,重复性好,分析时间短,可作为尿苷和腺苷定量分析的一种手段,为尿苷和腺苷的测定提供了参考和依据。

参考文献

[1] 李鹏,魏晓霞,许建华. 灵芝提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学,2011,28(9):789-792.
 [2] 付翔,陈薇,段小群. 雪灵芝提取物清除羟自由基和抑制脂质过氧化作用[J]. Chinese Journal of Information on TCM Jul,2010,17(7):237-238.
 [3] 卢端萍,蒋婷婷,陈硕. 高效液相色谱法测定灵芝提取物中尿苷和腺苷含量[J]. 中国药业,2013,22(14):17-19.
 [4] 郑伟达,郑东海,郑伟鸿. 卵巢癌中医治疗体会[J]. 世界中医药,2011,6(4):316-317.
 [5] 周子懿,唐宇平,金惠铭. 灵芝提取物对神经元缺氧复氧损伤的保护作用及其机制的离体研究[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(11):2229-2234.
 [6] 吴军,陈晨,王晶晶. 灵芝提取物的雌激素样作用研究[J]. 中国中

药科技,2013,20(6):609-610.

[7] 宋细忠,习梅兰. HPLC法同时测定灵芝浸膏片中尿苷和腺苷的含量[J]. 江西中医学院学报,2011,23(1):62-63.
 [8] 孙巍巍,包海鹰. 松杉灵芝提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 中国食用菌,2010,29(6):39-41.
 [9] 梁新丽,王光发,廖正根. 中药提取物的微波真空干燥工艺研究[J]. 中成药,2010,32(6):946-949.
 [10] 任国萍,李铮,傅欣彤. HPLC法同时测定板蓝根药材中尿苷,鸟苷,(R,S)-告依春和腺苷[J]. 中国新药杂志,2012,21(19):25.
 [11] 姜翠翠,高家荣,储昭兴. RP-HPLC法测定地黄及其复方制剂中尿苷和腺苷的含量[J]. 安徽医药,2013,17(9):1493-1495.
 [12] 郑永彪,汪晓娟,韩晓萍. HPLC法同时测定冷冻保鲜冬虫夏草中尿苷和腺苷[J]. 中成药,2012,34(10):2043-2045.
 [13] 吴柳春,蒋秋香,齐兆林. HPLC法测定板蓝根片中尿苷和腺苷的含量[J]. 中国药品标准,2011,12(4):291-294.
 [14] 张元杰,钱正明,陈肖家. HPLC法同时测定补益中药中尿苷,腺嘌呤,鸟苷和腺苷的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(1):33-36.

(2014-01-23 收稿 责任编辑:曹柏)