

- [11] 陈丛瑾, 黄克瀛, 李德良, 等. 植物中黄酮类化合物的提取方法研究概况[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(3): 42-46.
- [12] 史 锐. 芸香科柑桔属植物的质量研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [13] 郭增喜, 李文庭, 李兆奎. 不同产地枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的测定[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1347-1348.

## RP-HPLC 法同时测定猴头菌片中 5 种核苷

唐海明<sup>1,2</sup>, 王德勤<sup>1</sup>, 张慧晔<sup>1\*</sup>

[1. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515; 2. 广州白云山和记黄埔中药(亳州)有限公司, 安徽 亳州 236800]

**摘要:** **目的** 建立 RP-HPLC 法同时测定猴头菌片(猴头菌菌丝体)中 5 种核苷的含有量。**方法** 该药物水提物的分析采用 Zorbax SB-Aq C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 26 ℃; 检测波长 260 nm。**结果** 胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷、鸟苷分别在 0.007 ~ 0.169、0.005 ~ 0.115、0.032 ~ 0.797、0.032 ~ 0.792、0.004 ~ 0.103 μg 范围内呈良好的线性关系, 平均加样回收率( $n=6$ )分别为 99.4% (RSD = 2.0%)、98.3% (RSD = 1.8%)、98.0% (RSD = 2.8%)、101.4% (RSD = 1.9%)、101.7% (RSD = 1.2%)。**结论** 不同厂家猴头菌片中 5 种核苷的含有量存在明显差异, 应加以关注。

**关键词:** 猴头菌片; 胞苷; 腺嘌呤; 尿苷; 腺苷; 鸟苷; RP-HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)05-0964-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.016

## Simultaneous determination of five nucleosides in Houtoujun Tablets by RP-HPLC

TANG Hai-ming<sup>1,2</sup>, WANG De-qin<sup>1</sup>, ZHANG Hui-ye<sup>1\*</sup>

[1. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China; 2. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine (Bozhou) Co., Ltd., Bozhou 236800, China]

**ABSTRACT:** **AIM** To establish an RP-HPLC method for the simultaneous content determination of five nucleosides in Houtoujun Tablets (mycelia of *Hericium erinaceum*). **METHODS** The analysis of aqueous extract of this drug was performed on a 26 ℃ thermostatic Zorbax SB-Aq C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.1% phosphoric acid flowing at 0.5 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 260 nm. **RESULTS** Cytidine, adenine, uridine, adenosine and guanosine showed good linear relationships within the ranges of 0.007 – 0.169, 0.005 – 0.115, 0.032 – 0.797, 0.032 – 0.792 and 0.004 – 0.103 μg, whose average recoveries ( $n=6$ ) were 99.4% (RSD = 2.0%), 98.3% (RSD = 1.8%), 98.0% (RSD = 2.8%), 101.4% (RSD = 1.9%) and 101.7% (RSD = 1.2%), respectively. **CONCLUSION** The contents of five nucleosides in Houtoujun Tablets from different manufacturers exhibit obvious differences, to which we should pay attention.

**KEY WORDS:** Houtoujun Tablets; cytidine; adenine; uridine; adenosine; guanosine; RP-HPLC

收稿日期: 2016-09-20  
基金项目: 广东省岭南药用植物资源保护与利用企业重点实验室(产学研)培育基地(2012A061600005); 南药资源综合开发国际合作重点研究室(国中医药科技函[2010]204)  
作者简介: 唐海明(1988—), 男, 硕士, 助理工程师, 从事中药质量标准研究。Tel: 15088068915, E-mail: thm1835@qq.com  
\* 通信作者: 张慧晔(1979—), 女, 博士, 高级工程师, 从事中药资源及质量标准研究。E-mail: zhanghuiye@813zy.com

猴头菌片是由猴头菌菌丝体提取加工制成的中药制剂，具有养胃护胃、益气补血、扶正培本的作用，对多种消化道疾病（如十二指肠溃疡、胃溃疡、慢性胃炎等）疗效较好<sup>[1]</sup>。猴头菌丝体含核苷酸、多肽、多糖、氨基酸等成分，具有免疫调节、保护胃肠道等作用，虽尚未单独作为一味中药收载于《中国药典》，但在 2015 版药典中以附注形式规定了其质量标准<sup>[2]</sup>。目前，国家食品药品监督管理局批准生产猴头菌片的企业有 49 家，批准生产猴头菌粉原料药的企业有 3 家，但不同厂家生产的制剂中所含核苷类成分有较大差异，故有必要提高猴头菌片的质量标准，以保证其安全性和有效性。

核苷类化合物普遍存在于真菌类中药中，具有调节机体免疫功能、参与代谢、抗菌、抗病毒等多种生物活性<sup>[3-8]</sup>，与猴头菌的生物活性具有一定关联性，可作为其评价指标。其中，腺苷具有镇静、扩血管、抗缺氧等作用<sup>[9]</sup>；尿苷是一种天然核苷，具有嘧啶环结构，它参与了糖原合成，有助于提高细胞的耐缺氧能力<sup>[10]</sup>。汤俊等<sup>[11]</sup>对猴头菌、乌灵参菌粉及虫草类菌粉中的核苷类成分进行了研究，发现猴头菌粉中含有腺苷、尿苷、鸟苷等。

猴头菌片现有质量控制方法有分光光度法测定蛋白多糖含量、HPLC 法测定腺苷含量，但尚无能全面表征其质量的方法；还有一些文献报道了采用 HPLC 法对猴头菌剂中腺苷含量进行检测的方法，或者对猴头菌本身某些成分进行鉴定和检测<sup>[12-13]</sup>，但也未能全面准确地控制其量，其中的一些方法甚至不能检测到猴头菌通常含有的有效成分。因此，本实验采用 RP-HPLC 法，以猴头菌片中胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷和鸟苷为指标成分进行定量测定，该方法准确可靠，重复性好，对于其质量控制建立与提升均具有重要意义。

### 1 仪器与试剂

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；UE03SFD 超声波清洗器（500 W，40 kHz）；ENTRIS224-1S 电子天平（万分之一，德国赛多利斯公司）。胞苷（批号 100914316）、鸟苷（批号 106K1848）对照品（美国 Sigma 公司）；腺嘌呤（批号 110886-200001）、尿苷（批号 1001157075）、腺苷（批号 110879-201202）对照品（中国食品药品检定研究院）。猴头菌片共 10 批，具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	来源	批号
1	广州市花城制药厂	140401
2	长春迪瑞制药有限公司	141001
3	江西青峰药业有限公司	140701
4	上海雷允上药业有限公司	140213
5	湖北襄阳隆中药业集团有限公司	140501
6	上海华源安徽仁济制药有限公司	140528
7	广西玉林制药集团有限责任公司	140325
8	云南植物药业有限公司	140408
9	广州白云山和记黄埔中药有限公司	140522
10	广州白云山和记黄埔中药有限公司	140828

## 2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制 精密称取上述对照品适量，加水配制成分别含胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷、鸟苷 168.8、57.5、199.2、198.0、51.6 μg/mL 的对照品贮备液。各取适量，配制成每 1 mL 分别含胞苷 6.75 μg、腺嘌呤 4.60 μg、尿苷 31.87 μg、腺苷 31.68 μg、鸟苷 4.13 μg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液配制 取猴头菌片 10 片，除去包衣，研细，过 5 号筛，精密称取 0.5 g，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加 20 mL 水，称定质量，超声（500 W、40 kHz）提取 30 min，冷却至室温，加水补足减失的质量，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3 阴性样品溶液制备 按猴头菌片的处方工艺，制备缺猴头菌菌丝体的阴性样品，再按“2.2”项下方法制备，即得。

2.4 色谱条件 Zorbax SB-Aq C<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0 ~ 25 min，0 ~ 0.2% A；25 ~ 30 min，0.2% ~ 0.5% A；30 ~ 35 min，0.5% ~ 3.5% A；35 ~ 45 min，3.5% ~ 3.8% A；45 ~ 60 min，3.8% ~ 4.2% A）；体积流量 0.5 mL/min；柱温 26 ℃；检测波长 260 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下对照品溶液 1、5、10、15、20、25 μL，进样分析，以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，进样 6 次，测得胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷和鸟苷峰面积 RSD 分别为 1.7%、0.8%、0.6%、1.1%、1.9%，表明仪器精密度良好。

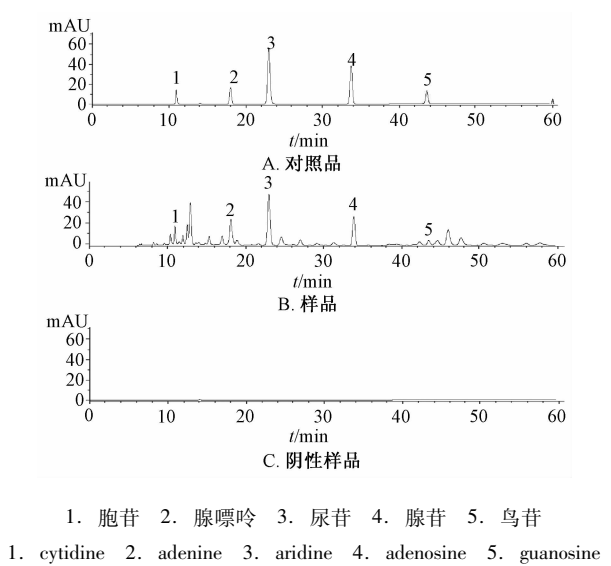


图1 5种核苷HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of five nucleosides

表2 5种核苷线性关系				
Tab.2 Linear relationships of five nucleosides				
成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$	
胞苷	$Y=3\ 621.9X+0.609\ 2$	0.999 9	0.007~0.169	
腺嘌呤	$Y=11\ 776X-2.381\ 4$	0.999 9	0.005~0.115	
尿苷	$Y=5\ 862.9X+5.366\ 8$	0.999 9	0.032~0.797	
腺苷	$Y=6\ 191.1X+6.291\ 1$	0.999 9	0.032~0.792	
鸟苷	$Y=4\ 327.6X+0.788\ 6$	0.999 9	0.004~0.103	

2.7 重复性试验 称取同一批样品（批号140528）6份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，测得胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷、鸟苷含有量RSD分别为1.0%、0.3%、1.2%、0.4%、1.5%，表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一批供试品（批号140528）溶液，于样品制备后24 h内每间隔4 h进样分析，测得胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷、鸟苷峰面积RSD分别为0.9%、1.5%、0.8%、0.3%、1.8%，表明该方法稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取猴头菌片（批号140528）粉末6份，每份约0.25 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入含胞苷168.8  $\mu\text{g/mL}$ 、腺嘌呤57.5  $\mu\text{g/mL}$ 、尿苷199.2  $\mu\text{g/mL}$ 、腺苷198.0  $\mu\text{g/mL}$ 、鸟苷51.6  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样10  $\mu\text{L}$ ，计算回收率，结果见表3。

2.10 样品含有量测定 取各批次样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样10  $\mu\text{L}$ 分析，测定含有量，结果见表4。

表3 5种核苷加样回收率试验结果（n=6）						
Tab.3 Results of recovery tests for five nucleosides（n=6）						
成分	取样量/ g	原有量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	平均回收 率/% （RSD/%）
胞苷	0.252 3	42.84	50.64	94.54	102.1	99.4 （2.0）
	0.250 2	42.48	50.64	92.84	99.4	
	0.252 0	42.79	50.64	93.88	100.9	
	0.251 1	42.64	50.64	92.80	99.1	
	0.251 9	42.77	50.64	92.85	98.9	
腺嘌呤	0.250 3	42.50	50.64	91.25	96.3	98.3 （1.8）
	0.252 3	35.57	34.50	69.51	98.4	
	0.250 2	35.28	34.50	69.46	99.1	
	0.252 0	35.53	34.50	68.65	96.0	
	0.251 1	35.41	34.50	70.33	101.2	
尿苷	0.251 9	35.52	34.50	69.22	97.7	98.0 （2.8）
	0.250 3	35.29	34.50	68.90	97.4	
	0.252 3	143.48	129.48	270.11	97.8	
	0.250 2	142.29	129.48	268.64	97.6	
	0.252 0	143.31	129.48	271.85	99.3	
腺苷	0.251 1	142.80	129.48	275.37	102.4	101.4 （1.9）
	0.251 9	143.26	129.48	265.62	94.5	
	0.250 3	142.35	129.48	267.04	96.3	
	0.252 3	111.72	128.70	238.93	98.8	
	0.250 2	110.79	128.70	239.11	99.7	
鸟苷	0.252 0	111.59	128.70	242.65	101.8	101.7 （1.2）
	0.251 1	111.19	128.70	244.12	103.3	
	0.251 9	111.54	128.70	245.18	103.8	
	0.250 3	110.83	128.70	241.00	101.1	
	0.252 3	17.94	20.64	38.62	100.2	
	0.250 2	17.79	20.64	38.91	102.3	
	0.252 0	17.92	20.64	39.17	103.0	
	0.251 1	17.85	20.64	38.75	101.3	
	0.251 9	17.91	20.64	38.63	100.4	
	0.250 3	17.80	20.64	39.07	103.1	

表4 5种核苷含有量测定结果（mg/g，n=3）					
Tab.4 Results of content determination of five nucleosides（mg/g，n=3）					
批号	胞苷	腺嘌呤	尿苷	腺苷	鸟苷
140401	0.180	0.144	0.573	0.445	0.080
141001	0.113	0.116	0.441	0.320	0.071
140701	0.162	0.154	0.590	0.453	0.078
140213	—	0.061	0.010	—	0.018
140501	0.079	0.029	0.067	0.031	—
140528	0.170	0.141	0.569	0.443	0.071
140325	0.102	0.167	1.426	0.594	0.394
140408	0.098	0.169	1.425	0.594	0.393
140522	0.103	0.210	1.778	0.738	0.479
140828	0.104	0.188	1.664	0.706	0.476

注：—表示未检测出该成分

3 讨论

本实验发现，胞苷、腺嘌呤、尿苷、腺苷、鸟苷的最大吸收波长均为260 nm，该波长下各成分峰形对称，基线平整，杂质峰干扰少，故选择其作

为检测波长。再根据文献资料选择普通 C<sub>18</sub> 反相柱进行试验,发现不同品牌色谱柱下各成分出峰时间较短,分离效果不理想,最后选用水系柱,其分离效果均符合要求。

然后,对乙腈-水、乙腈-磷酸、甲醇-水、甲醇-磷酸等常用流动相体系进行了考察,发现在等度洗脱下各成分的分离效果较差,均未达到基线分离;以乙腈为有机相时,由于其洗脱能力强,各待测成分聚集成堆,无法被分离开,最终采用甲醇-0.1% 磷酸系统,可使各成分分离度达要求,峰形对称,不受其他峰干扰。

本实验所测成分均为核苷酸类,根据其溶解性,对水、甲醇、10%、30%、50%、70%、80%、95% 乙醇等提取溶剂进行了考察,发现甲醇和乙醇的提取率极低,而以水为提取溶剂时,提取率高,其他成分干扰小。再对 10 批样品进行检测,发现除批号 4 样品未能检测出胞苷、腺苷,批号 5 样品未能检测出鸟苷外,其他各厂家样品均能检测出以上 5 种成分。另外,各批样品其含有量均存在一定差异,可能与各厂家的原料来源、制剂工艺等因素有关,故有必要对猴头菌片中的核苷酸类成分进行质量控制。

参考文献:

[ 1 ] 中华人民共和国卫生部. 中药成方制剂: 第 17 册[ S ].

1998: 264.

[ 2 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[ S ]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1614-1615.

[ 3 ] 张雪梅, 杨丰庆, 夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[ J ]. 食品科学, 2012, 33(9): 277-282.

[ 4 ] 张元杰, 钱正明, 陈肖家, 等. 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.

[ 5 ] 潘兴娇, 张 杰, 沈昱翔, 等. HPLC 法同时测定云南重楼根茎中 9 种核苷类成分的含量[ J ]. 2016, 39(4): 813-818.

[ 6 ] 周芬霞, 黄宏南, 张占蓬, 等. HPLC 法测字孢子灵芝粉剂中 5 种核苷类成分含量[ J ]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(4): 44-47.

[ 7 ] 顾慧芬, 庄意丽, 张梦玲. HPLC 法测定猴头菌片中腺苷[ J ]. 中成药, 2012, 34(7): 1405-1406.

[ 8 ] 艾 中, 钱正明, 李文佳, 等. 冬虫夏草核苷类成分分析研究进展[ J ]. 菌物学报, 2016, 35(4): 388-403.

[ 9 ] 王 锐. 嘧啶核苷的研究进展[ J ]. 生物技术通讯, 2007, 118(3): 539-542.

[ 10 ] 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.

[ 11 ] 汤 俊, 程 敏, 鲁 静, 等. 三种药用真菌核苷类成分的分析及含量比较[ C ] //2008 年药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集. 北京: 中国药学会, 2008: 474-482.

[ 12 ] 王蓓蓓. 对 9 厂家 103 批猴头菌片的质量评价[ J ]. 药学与临床研究, 2016, 24(1): 29-32.

[ 13 ] 钟倩霞. 高效液相色谱法测定猴头菇中 4 种核苷含量[ J ]. 中国食品工业, 2015(8): 76-78.