

HPLC 法测定天麻蜜环菌片中腺苷

赵保华, 贺秀霞, 徐丽珍, 杨世林

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

天麻蜜环菌片是由与天麻共生的蜜环菌 *Armillariella mellea* (Vahl ex F) Karst. 经培养发酵加工的产物直接加工压制而成, 具有定惊、熄风的功效, 主要用于眩晕头痛、惊风癫痫、肢体麻木、腰膝酸痛等症。其质量标准无定量指标。本实验选择腺苷作为测定对象, 建立了测定天麻蜜环菌片中腺苷的 HPLC 法^[1~3]。

1 仪器、试剂和样品

Waters 高效液相色谱仪, Waters 996 紫外检测器, Waters 600 型泵, 2010 色谱工作站。

乙腈(色谱纯)、磷酸二氢钾、无水乙醇、甲醇均为分析纯; 水为重蒸水; 天麻蜜环菌片由江西汇仁药业有限公司提供; 腺苷(批号 879-200001, 质量分数为 99.83%)对照品由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.010 mol/L 磷酸二氢钾(7.5 : 92.5); 检测波长 254 nm;

体积流量: 1 mL/min; 柱温: 20 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 取腺苷对照品适量, 精密称定, 用 60% 乙醇溶解, 制成质量浓度为 200 μg/mL 的对照品储备溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备: 除去糖衣的天麻蜜环菌片压碎粉, 混匀, 取 480 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入 60% 乙醇约 15 mL, 超声处理 10 min, 放冷, 定容, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备: 本实验室自制不含蜜环菌发酵物的阴性样品, 照供试品溶液的制备项下操作制备成阴性样品溶液。

2.3 方法可行性考察: 分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL 注入 HPLC 仪, 测定, 绘制色谱图。结果腺苷理论塔板数为 4 000, 样品中腺苷与相近峰分离度为 1.7, 且阴性样品在相同位置无干扰, 见图 1。

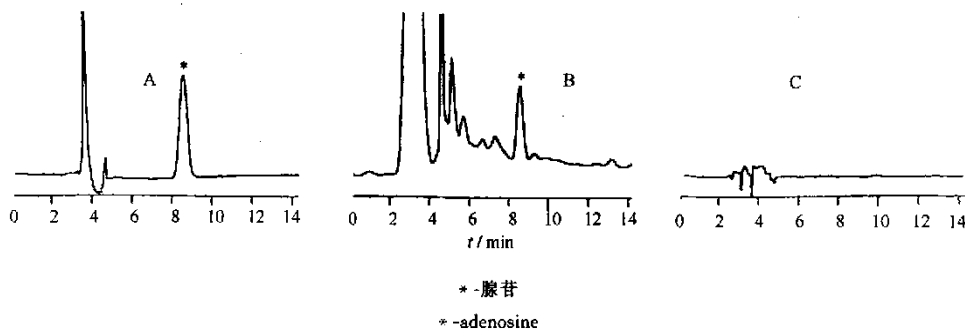


图1 腺苷对照品(A)、天麻蜜环菌片(B)和缺天麻的阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of adenosine reference substance (A), Tianma Mihuanjun Tablets (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察: 取腺苷对照品储备液 0.3 mL, 定容于 10 mL 量瓶中, 制成 6.06 μg/mL 的对照品溶液。分别取样 2、6、10、14、18、22 μL 注入液相色谱仪。以腺苷的质量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 2.14 \times 10^6 X + 1.25 \times 10^4$, $r = 0.999\ 93$, 表明腺苷在 0.012~0.133 μg 与

峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取腺苷对照品溶液 10 μL, 注入 HPLC 仪, 重复进样 6 次, 测定对照品溶液峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 0.98%。

2.6 稳定性试验: 取同一供试品溶液 10 μL, 每隔 1 h 进样, 共进样 6 次, 测定峰面积积分值, 结果腺苷

峰面积的 RSD 为 1.079%。表明供试品溶液在 5 h 内稳定。

2.7 重现性试验:取同一批样品 5 份,精密称定,制备供试品溶液。进样 10 μ L,测定腺苷的质量分数,其平均值为 0.076 mg/片,RSD 为 2.41%。

2.8 回收率试验:精密称取含腺苷约 0.16 mg/g 的样品 5 份,约 0.24 g/份,分别精密加入 0.039 2 mg 腺苷对照品,制备供试品溶液,进样测定,结果腺苷的平均回收率为 101.79%,RSD 为 2.77% ($n=5$)。

2.9 样品测定:取样品制备供试品溶液,精密吸取供试品 10 μ L,按上述色谱条件测定,用外标法计算天麻蜜环菌片中腺苷的质量分数,结果见表 1。

表 1 天麻蜜环菌片中腺苷的测定结果 ($n=5$)

Table 1 Determination of adenosine in Tianma Mihuanjun Tablets ($n=5$)

批号	腺苷/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%	批号	腺苷/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%
20020421	0.076	1.7	20020609	0.076	1.7
20020422	0.075	1.7	1	0.079	1.6
20020423	0.078	1.7	2	0.076	1.7
20020607	0.077	1.1	3	0.074	1.8
20020608	0.074	1.8	4	0.075	1.7

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择:供试品溶液的制备中,考察了 90% 甲醇、60% 乙醇、50% 甲醇和水作为提取溶剂,各超声提取 30 min,结果腺苷的质量分数分别为 0.052、0.081、0.071、0.076 mg/片,表明 60% 乙醇提取效果最好。

3.2 提取时间的选择:以 60% 乙醇为提取溶剂,采用超声方法进行提取,选择提取时间 10、20、30 min,结果腺苷的质量分数分别为 0.076、0.076、0.076 mg/片,表明 10 min 即可提取完全。

3.3 本方法准确灵敏,可作为天麻蜜环菌片中腺苷的定量分析方法,为进一步制定天麻蜜环菌片质量标准提供了依据,并对含有腺苷的其他产品的检测也具有一定的参考价值。

References

- [1] Yang D H. Determination of adenosine in Dongchongxiacao (*Cordyceps sinensis*) and fruit body of *Ganoderma lucidum* (Leyss et Fr.) Karst. by HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 21 (2): 45-46.
- [2] Pan X Q, Zhang S M, Chen X H. Determination of adenosine in Dongfangshencao Granules by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1994, 16 (10): 12.
- [3] Wu C M, Ye R P. Determination of adenosine in Dongchongxiacao (*Cordyceps sinensis*) by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (9): 658.

欧亚旋覆花中多糖的苯酚-硫酸法测定

付 焱¹, 郭 毅², 张婧群^{1*}, 杨双革¹, 徐力昆¹, 吴一兵¹

(1. 河北医科大学 新药开发研究室, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

旋覆花为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 或欧亚旋覆花 *I. britannica* L., 具有降气、消痰, 行水, 止呕的功效, 主治风寒咳嗽, 痰饮蓄结, 胸膈痞满, 喘咳痰多, 呕吐噎气, 心下痞硬等症^[1]。旋覆花含有旋覆花素、大花旋覆花宁、蒲公英甾醇、槲皮素、异槲皮素、绿原酸、咖啡酸等成分^[2]。欧亚旋覆花地上部分的水提物可影响小鼠辅助性 T 细胞 (Helper T cell) Th1 和 Th2 之间平衡, 显示出抑制小鼠肝损伤的免疫学作用^[3]。笔者在进行欧亚旋覆花化学成分研究中, 从中提取出水溶性多糖。初步药理试验表明, 欧亚旋覆花多糖有一定的免疫增强作用。参考文献报道^[4~6], 本实验对欧亚旋覆花多糖的提取

方法及测定进行了研究。

1 仪器与药品

TU—1901 双光束紫外分光光度计 (北京谱析通用仪器有限公司), DHX—9243B 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海福马实验设备有限公司), Laborata 4000 旋转薄膜蒸发器 (德国 Heidolph 集团)。

(+) 葡萄糖、浓硫酸、苯酚、乙醚、丙酮、无水乙醇均为分析纯试剂。试验药材采自山西运城, 经本院药用植物教研室聂凤提教授鉴定为欧亚旋覆花 *I. britannica* L.。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取与精制: 欧亚旋覆花地上部分粉碎,

收稿日期: 2005-06-07

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (303470)

作者简介: 付 焱 (1965—), 女, 山东烟台人, 副教授, 博士研究生, 从事药物有效成分的分离制备研究与教学。

Tel: (0311) 86266335 E-mail: hbsypjys@hotmail.com

* 通讯作者 张婧群