



图 1 对照品(A)、样品(B)和阴性溶液(C)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), sample (B), and negative sample solution (C)

份,制备供试品溶液,进样测定,计算蒙花苷的平均质量分数为 8.1 mg/g, RSD 为 0.94%。

2.8 回收率试验:取样品(批号 070702)约 0.075 g,共 6 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,每份精密加入 100.035 μ g/mL 蒙花苷对照品溶液 5 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算得蒙花苷平均回收率为 104%, RSD 为 1.4%。

2.9 样品测定:取 4 批样品制备供试品溶液,每批 2 份。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,采用外标法计算蒙花苷的质量分数,结果见表 1。

3 讨论

本品供试品溶液曾采用加热回流提取和超声提取两种提取方法进行试验,加热回流提取和超声提

表 1 菊明降压丸中蒙花苷的测定结果

Table 1 Determination of buddleoside in Juming Jiangya Pills

批号	蒙花苷/(mg $\cdot$ g ⁻¹)
051101	15.4
070601	12.2
070701	12.0
070702	8.1

取的结果基本一致,因此采用超声提取的方法来制备供试品溶液。

由于原标准中没有对野菊花进行控制,所以导致所测样品的结果差异较大。因此在标准中增加测定项,更好控制药品质量是非常必要的。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 付辉政,万凯化,刘兰祥. RP-HPLC 法测定复方柳菊片中蒙花苷[J]. 中草药, 2008, 39(2): 222-223

高效液相色谱法测定灵芝饮片中腺苷

徐颖,王斌

(杭州市红十字会医院,浙江 杭州 310003)

摘要:目的 建立灵芝饮片中腺苷的 HPLC 测定方法,用以控制该饮片的质量。方法 C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈 0.04 mol/L 磷酸二氢钾溶液(5:95,调节 pH 6.5);体积流量:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:260 nm。结果 腺苷在 0.634~3.170 μ g 线性关系良好;平均加样回收率为 101.45%。结论 该方法可用于灵芝饮片的质量控制。

关键词: 灵芝饮片;腺苷;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)12-2003-02

灵芝俗称灵芝草,属于担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌。该属约有 100 种^[1],常用中药灵芝为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 或紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体。灵芝作为中药使用始载于《神农本草经》,被认为能益心气、安魂魄、补肝益气、坚筋骨,列为上品。《本

草纲目》认为灵芝有滋补强壮、延年益寿、利关节、治耳聋等功效。灵芝化学成分复杂,具有多种药理作用^[2-5]。目前认为灵芝中具有生物活性的物质主要有多糖类、三萜类和核苷类以及生物碱、微量元素等。灵芝饮片的质量控制标准缺失,市场上灵芝的质量参差不齐,因此对灵芝饮片中的活性物质定量

收稿日期: 2010-05-09

作者简介: 徐颖(1964—),女,山东人,副主任药师,主要从事中药炮制研究。

Tel: (0571) 56109873 E-mail: xuying_lot@sina.com

分析,可为灵芝的质量控制提供参考。由于腺苷是灵芝中重要的活性物质,因此本实验采用 HPLC 法测定其中的腺苷,为灵芝饮片的质量控制提供快速、准确的定量测定方法。

1 仪器与试剂

HP1100 系列高效液相色谱仪,包括 1311A 四元泵,1313 自动进样器,1316A 柱温箱,1314 紫外可见检测器,1315BDAD; Agilent 化学工作站。乙腈为色谱纯,甲醇、磷酸二氢钾为分析纯,重蒸馏水。腺苷对照品(批号 879-200001)由中国药品生物制品检定所提供,尿嘧啶、腺嘌呤均为 Sigma 公司产品。灵芝饮片样品由浙江中医药大学中药饮片厂提供,经鉴定均为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6]: C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 0.04 mol/L 磷酸二氢钾溶液(5:95, 调节 pH 6.5); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 260 nm。理论板数按腺苷峰计算大于 10 000, 腺苷与杂质峰的分离度大于 2.0, 腺苷对称因子为 0.96~1.1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的配制: 精密称取用五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24 h 的腺苷对照品适量,加 15% 甲醇制成 1.158 5 mg/mL 对照品储备溶液,将此溶液稀释 10 倍,作为对照品溶液。

2.2.2 阴性试液配制: 取尿嘧啶和腺嘌呤样品适量,加 15% 甲醇制成含 1.2312 mg/mL 尿嘧啶和 0.986 3 mg/mL 腺嘌呤的溶液,将此溶液稀释 10 倍,作为阴性溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备: 取灵芝饮片 150 g,加水煎煮 2 次,每次 3 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩成稠膏,(60±5) °C 烘干,得药粉约 5 g。取 2 g 药粉,研磨成细粉,精密称取细粉 0.124 g 于三角瓶,加入 15% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 30 min,冷却后再称定质量,用 15% 甲醇补足超声前质量,用微孔滤膜 0.45 μm 滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适应性试验: 取腺苷对照品溶液、阴性溶液和供试品溶液,在上述色谱条件下进样 20 μL。结果阴性样品在腺苷出峰时间区域没有干扰峰出现,对腺苷的测定无干扰作用,可以排除在 260 nm 波长下吸收较强的其他核苷类组分的影响。

2.4 线性关系研究: 精密吸取 158.5 μg/mL 腺苷对照品溶液 4、8、10、12、16、20 μL,注入液相色谱仪,按上述

条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标作回归方程,得 $Y = 3\,247.5X - 3\,720.9$, $r = 1.000\,0$ 。表明腺苷进样量在 0.634~3.170 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取 158.5 μg/mL 腺苷对照品溶液,重复进样 5 次,测定峰面积,结果 RSD 为 0.22%。

2.6 稳定性试验: 取供试品溶液,按以上色谱条件,分别在 0、0.5、1、2、4、8、16 h 进样 1 次,测定腺苷峰面积,结果 RSD 为 0.62%,表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 取同一批样品(批号 060401)6 份,分别精密称定,制备供试品溶液,并测定峰面积,计算腺苷质量分数,结果样品中腺苷平均质量分数为 113.3 μg/g, RSD 为 0.59%。

2.8 回收率试验: 采用加样回收法。取样品(批号 060401)6 份,每份约 1.8 g,精密加入腺苷对照品 0.21 mg,制备供试品溶液,测定腺苷峰面积,计算回收率,结果平均回收率为 101.91%, RSD 为 1.45%。

2.9 样品测定: 取 10 批灵芝饮片,制备供试品溶液,进样测定,结果见表 1。根据 10 批测定数据,可将样品中腺苷量限度暂定为“本品含腺苷不得少于 50.0 μg/g”。

表 1 灵芝饮片中腺苷的测定结果

Table 1 Determination of adenosine in *Ganoderma*

批号	产地	腺苷/ (μg · g ⁻¹)	批号	产地	腺苷/ (μg · g ⁻¹)
060201	安徽亳州	66.8	060401	贵州盘县	113.3
060202	安徽亳州	60.1	060402	贵州盘县	120.0
060301	安徽亳州	73.3	060403	贵州盘县	100.0
060302	安徽亳州	73.3	060404	贵州盘县	93.3
060303	吉林通化	12.6	060405	贵州盘县	93.3

3 讨论

腺苷是以核苷和嘌呤为基本构造的活性物质,灵芝含有多种腺苷衍生物,都有较强的药理活性,能降低血液黏度,抑制体内血小板聚集,能提高血红蛋白、2,3-二磷酸甘油的水平,能提高血液供氧能力和加快血液微循环,提高血液对心、脑的供氧能力。腺苷是一种活性很强的物质,是灵芝的主要有效成分之一^[7]。本实验采用高效液相色谱法测定灵芝饮片中腺苷,获得了较好的结果。

结合文献报道,实验对提取溶媒和超声时间做了对比研究。选取了水、15% 甲醇、50% 甲醇作为提

(下转第 2098 页)

参考文献:

- [1] 李凌艳, 李认书, 孙 鹤. 数据挖掘技术在中药研究中的应用 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 16-附 18
- [2] 董江萍. 美国 FDA 医疗产品紧急使用授权管理简介及启示 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 1-5
- [3] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Innovation of stagnation? Challenge and opportunity on the critical path to new medical products [S/OL]. <http://www.fda.gov/Science/Research/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/ucm077262.htm>, 2010-04-10
- [4] Lalonde R L. Model-based drug development [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(1): 21-34
- [5] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Pharmacometrics at FDA [S/OL]. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm167032.htm>, 2010-04-10
- [6] Ette E I, Williams P J. *Pharmacometrics: The Science of Quantitative Pharmacology* [M]. New York: Wiley-Interscience, 2007.
- [7] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. CDER Offices and Divisions [S/OL]. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm075128.htm>, 2010-04-10.
- [8] Powell J R, Gobburu J V. Pharmacometrics at FDA: evolution and impact on decisions [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(1): 97-102
- [9] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guidance for Industry End-of-Phase 2A Meetings* [S]. 2009
- [10] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guideline for Industry: Dose-Response Information to Support Drug Registration* [S]. 1994
- [11] Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Population Pharmacokinetics* [S]. 1999
- [12] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guidance for Industry Exposure-Response Regulatory Applications* [S]. 2003
- [13] International Conference on Harmonization. *Guidance for Industry: E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs* [S]. 2005
- [14] Bhattaram V A, Bonapace C, Chilukuri D M, *et al*. Impact of pharmacokinetic review on new drug approval and labeling decisions—a survey of 31 new drug applications submitted between 2005 and 2006 [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81: 213-221
- [15] Bhattaram V A, Booth B P, Ramchandani R P, *et al*. Impact of pharmacometrics on drug approval and labeling decisions: a survey of 42 new drug applications [J]. *AAPS J*, 2005, 7(3): 503-512
- [16] Wang Y N, Venkatesh Bhattaram A, Jadhav P R, *et al*. Leveraging prior quantitative knowledge to guide drug development decisions and regulatory science recommendations: impact of FDA pharmacometrics during 2004-2006 [J]. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48B: 146-156
- [17] Wang Y N. Pharmacometrics in regulatory decision: FDA practice [A]. 第三届全国定量药理研究方法学研讨会论文集 [C]. 北京: 第三届全国定量药理研究方法学研讨会, 2010
- [18] 夏媛媛, 司端远, 刘昌孝. FDA 生物分析方法确证的发展与动态 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 123-129

(上接第 2004 页)

取溶媒, 结果所得样品中腺苷的质量分数分别为 94.8、111.2、108.9 $\mu\text{g/g}$, 因此实验采用了 15% 甲醇作为提取溶媒; 超声处理 10、20、30、45、60 min 时, 所得样品中腺苷的质量分数分别为 95.35、96.47、111.80、112.3、111.9 $\mu\text{g/g}$, 经比较 30、45、60 min 处理后的样品无统计学差异, 因此选择 30 min 为超声提取时间。

由于腺苷亲水性较强, 在甲醇中溶解度小, 在纯甲醇溶液的色谱图中, 无腺苷峰出现, 故以水为溶剂提取, 腺苷的提取量高。由于灵芝中含有大量多糖成分, 在实验中发现其影响腺苷与杂质峰的分度, 在使用甲醇处理时多糖和其他大分子物质沉淀后, 情况得到改善。

不同产地的灵芝中的腺苷有很大区别, 最大相差 8.5 倍, 提示不同产地的灵芝可能在腺苷量上存

在明显差异。目前人工接种灵芝和天然灵芝在饮片鉴别上有困难, 形态和薄层色谱基本一致, 可见建立可行的灵芝中活性物质的质量标准, 进行活性物质定量测定可以成为鉴别饮片一个重要手段。

参考文献:

- [1] 邓叔群. 中国的真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 1963
- [2] 张晓云, 杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2006(4): 152-155
- [3] 韩玉复. 灵芝的研究进展 [J]. 中药材, 1995, 18(5): 226-227
- [4] 邓海林, 吴佩颖, 王建新. 灵芝的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 141-143
- [5] 黄鸣清, 谢友良, 蒋东旭, 等. 灵芝孢子油体内抗 Friend 鼠白血病病毒的实验研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 423-426
- [6] 吴 敏. HPLC 法测定五灵胶囊中腺苷 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 862
- [7] 楼丽君, 周静安. 反相高效液相色谱法测定灵芝及其制剂中腺苷的含量 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(12): 2332-2334