

薄盖灵芝发酵菌丝体中主要核苷及其碱基 的反相高效液相色谱测定

章观德 刘洪月 梁意红*

(中国医学科学院药物研究所, 北京; *江西省药品检验所, 南昌)

提要 本文报道用反相高效液相色谱法测定薄盖灵芝发酵菌丝体中主要核苷及其碱基的含量。菌丝体用50%乙醇超声提取, 脱脂后通过十八烷基键合相柱, 用磷酸盐缓冲液(pH 6.98)—四氢呋喃(100:1)为流动相, 对甲基苯磺酸为内标, 峰面积内标法定量。方法灵敏、快速、重现性好, 与薄层紫外法比较结果一致。

关键词 灵芝; 薄盖灵芝; 腺苷; 尿苷; 高效液相色谱

灵芝为我国民间珍贵药材之一, 有滋补强壮、扶正固本功效。近年来不少学者对灵芝深层发酵菌丝体的化学、药理进行了研究^(1~3), 认为尿苷、腺苷及其碱基为活性成分之一, 用于临床治疗进行性肌营养不良、萎缩性肌强直等疾病。目前灵芝深层发酵培养方法已推广生产, 为了有利于改进工艺生产与控制产品质量, 本文就薄盖灵芝菌丝体中主要核苷及其碱基的分析方法进行了研究。采用反相高效液相色谱法将尿苷(I)、尿嘧啶(II)、腺嘌呤(III)、腺苷(IV)四成分分离, 内标法定量, 方法灵敏、快速、重现性好, 与薄层紫外分光法比较结果一致, 可用于灵芝发酵物与注射液的分析。

实 验 部 分

(一) 仪器药品

高效液相色谱仪 LC 3A 和紫外检测器 SPD 2A(日本岛津); 记录仪 XWT 型(上海自动化仪表厂); 数据处理机 CDMC-1(上海计算技术研究所); 超声波振荡器 CSFIA(上海超声波仪器厂); 微量注射器 10 μ l(上海注射器三厂)。

标准品 腺苷、腺嘌呤、尿苷、尿嘧啶为生化试剂(上海生化试剂厂), 经重结晶, 熔点与微量元素分析合格, 高效液相色谱分析与薄层层析证明为单一成分。对甲基苯磺酸(E. Merck)与四氢呋喃为分析纯, 其余试剂为化学纯; 重蒸水。

(二) 实验条件

色谱柱为 ϕ 4.0 \times 250 mm 不锈钢柱, 用高压匀浆充填; 紫外检测波长 260 nm; 灵敏度 0.04 AU, 流动相流速 1.5 ml/min。

1. 分离条件

筛选了多种流动相, 以 Michaelis 磷酸盐缓冲液(0.066 M KH_2PO_4 —0.066 M Na_2HPO_4)为底液分离效果较好。试验了不同 pH 的缓冲液, 结果表明, 缓冲液的 pH 值对组分分离有直接影响(图 1), 除 II 外, 其它成分的保留时间均随底液 pH 值增加而缩短, 其中腺苷最明显, pH 7.12 时保留时间最小, 但因偏碱, 故选用近中性(pH 6.98)的缓冲溶液为底液加入 1% 四氢呋喃, 在此条件下, 峰形对称, 各成分在 14 min 内完成满意分离。其保留时间(t_R)及分离度(R_s)见表 1、图 2。

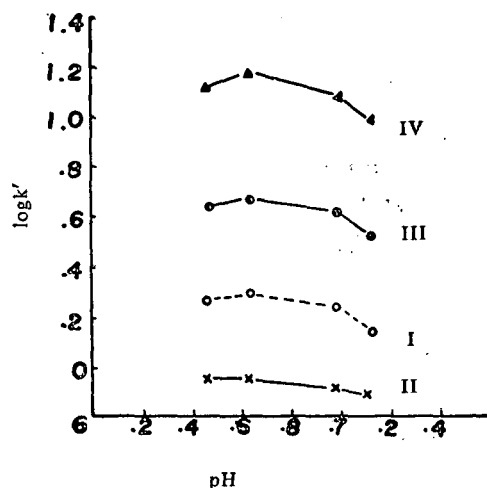


Fig 1. Effect of pH on $\log k'$
I. Uridine; II. Uracil; III. Adenine;
IV. Adenosine

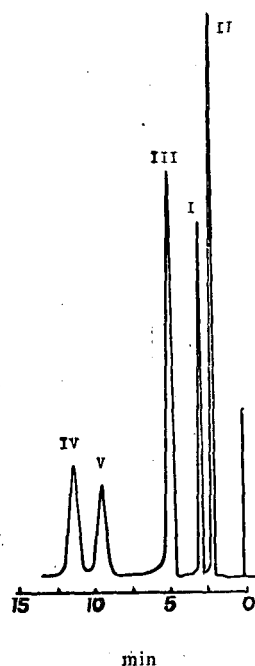


Fig 2. HPLC chromatogram
I. Uridine; II. Uracil; III. Adenine;
IV. Adenosine V. Internal standard

Tab 1. HPLC data

Constituent	$t_R(\text{min})$	R_s
Uracil	2.1	1.70
Adenine	2.85	
Uridine	4.83	
Internal Standard	9.35	1.74
Adenosine	11.0	

2. 标准曲线

用内标法峰面积测定。

标准品溶液 精密称取标准品 II 6mg, I, III, IV 各 10 mg 置于同一 5 ml 容量瓶内, 加重蒸水微温溶解后定容。

内标准溶液 精密称取对甲基苯磺酸 10 mg 于 1 ml 容量瓶中, 加重蒸水溶解定容。

准确吸取标准品溶液 150, 200, 250, 300 μl , 分别加入内标溶液 250 μl 及重蒸水适量至总体积为 900 μl 。进样 1 μl , 测得峰面积, A_s 为标准品峰面积, A_{is} 为内标峰面积。以各成分重量为横坐标, 峰面积比 (A_s/A_{is}) 为纵坐标作图, 在 0.3~0.7 μg 间, 得到四条通过原点的直线(图 3)。

(三) 样品的提取与拟定方法

提取溶剂与提取方法的选择 化合物 I~IV 溶于水与乙醇, 难溶于其它常用溶剂, 而水提物杂质较多, 给分离带来困难, 故选用不同浓度的乙醇为提取溶剂进行比较。以灵芝菌丝体为样品, 称取 0.2 g 于具塞磨口三角瓶中(热提法用园底烧瓶), 加入不同浓度乙醇溶液(20%, 50%, 95%) 2.0 ml, 用下面两法提取比较, 结果见表 2。

1. 超声法 置超声振荡器内超声提取 1 小时。

2. 热提法 水浴回流 2 小时。

结果表明用超声法以 50% 乙醇为溶剂提取溶出效率最高。在此条件下采用不同时间(15, 30, 60 与 90 min) 提取结果相同。故采用 50% 乙醇为提取溶剂, 超声振荡 30 min。

根据以上实验结果, 拟定分析方法如下:

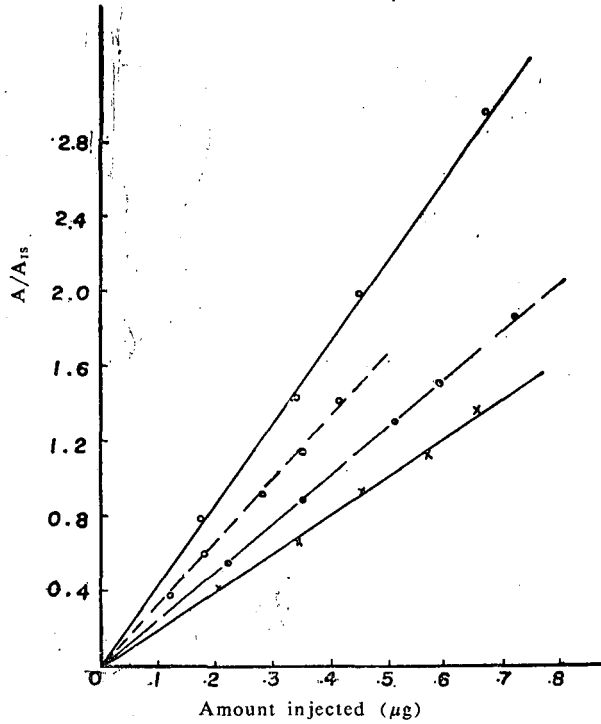


Fig 3. Calibration curves

○—○ Adrine; ····· Uracil; ·—· Adenosine; ×—× Uridine

Tab 2. Efficiency of two extraction methods

Constituent	Ethanol					
	20%		50%		95%	
	I	II	I	II	I	II
Uridine	0.70	0.65	0.78	0.64	0.59	0.59
Adenosine	0.40	0.39	0.44	0.34	0.35	0.34
Uracil	0.06	0.04	0.07	0.07	0.03	0.04

I. Extracted by ultrasonic method for 1 h; II. Refluxed on water bath for 2 h

菌丝体粉的分析 精密称取菌丝体粉 0.2 g 置 50 ml 具塞三角瓶内, 加 50% 乙醇溶液 15 ml, 于超声波振荡器内处理 0.5 h, 取出抽滤, 用 50% 乙醇洗滤渣三次, 抽干, 合并滤液, 挥去乙醇, 水层用乙醚 (2 × 15 ml) 脱脂, 分出水层, 乙醚层用少量水洗, 合并水层, 蒸干, 残渣用 50% 乙醇溶解后转移于 1 ml 容量瓶中, 定容, 为样品溶液备用。准确吸取样品液 300 μ l, 加内标溶液 250 μ l 与重蒸水 350 μ l 混匀, 进样 1 μ l, 按上述条件分析, 用内标法计算各成分含量。

灵芝注射液的分析 精密吸取注射液 300 μ l, 加内标溶液 250 μ l 与重蒸水 350 μ l, 混匀, 进样 1~2 μ l, 按上述分析条件测定, 如尿嘧啶峰前杂质对测定有干扰, 可适当调节流量。

重现性 以菌丝体粉 121 批为样品, 分析 8 次, 其重现性以 CV% 表示, 分别为 I 2.5; II 1.6; IV 1.5。

(四) 样品分析

用本法分析了不同批号的灵芝菌丝体灵芝注射液, 结果见表 3。

Tab 3. Results of sample analysis

Sample	Constituent (%)				
	Uracil	Uridine	Adenosine	Adenine	
<i>Ganoderma capense</i>	120	0.1	0.66	0.40	—
	121	0.12	0.78	0.44	—
	113	0.08	0.42	0.24	—
	106	0.08	0.62	0.36	—
Ganoderma injection	401	0.07	0.54	0.31	—
	502	0.08	0.34	0.16	—
	430	0.04	0.34	0.20	—

— Not detected

(五) 高效液相色谱法与薄层紫外分光法比较

本法与薄层紫外分光法比较, 测得结果基本一致, 见表 4。

Tab 4. Comparison of results determined by HPLC and TLC-UV method

Sample		Constituent (%)					
		Uracil		Uridine		Adenosine	
		HPLC	UV	HPLC	UV	HPLC	UV
<i>Ganoderma capense</i>	120	0.1	0.1	0.66	0.67	0.40	0.39
	121	0.12	0.09	0.78	0.79	0.44	0.44
Ganoderma injection	502	0.08	0.07	0.34	0.33	0.16	0.17
	430	0.04	0.03	0.34	0.33	0.20	0.19

讨 论

1. 薄盖灵芝发酵菌丝体中杂质较多, 用热提法提取时, 为了除去杂质, 曾采用多种净化手段, 如用各种吸附剂、离子交换树脂、大孔树脂、正丁醇提取等均未能奏效, 后发现用超声波法提取 15 min 比热提 2 h 溶出有效物的量高且完全, 说明超声法在此有显著优点, 不仅提取时间缩短, 而且杂质大为减少, 脱脂后可不经其它净化手续直接进样, 大大简化了操作, 加快了样品分析速度。

2. 选用 Michaelis 磷酸盐缓冲液 (pH 6.98) 为流动相, 四成分可达基线分离, 唯腺苷峰较宽、保留时间也较长 (~18 min)。为了改善这一状况, 曾加入适量乙醇、异丙醇或四氢呋喃, 三者均可使四成分保留时间缩短, 峰形变窄。但乙醇与异丙醇可使尿嘧啶、尿苷与前面杂质峰过分靠近影响测定。而四氢呋喃对腺苷保留时间的减小明显大于其它成分, 故在磷酸缓冲溶液中加入 1% 四氢呋喃作为流动相较满意。磷酸盐缓冲溶液的浓度对成分的保留也有影响, 浓度减小时, 保留时间增大。

3. 考察了 25, 35 与 45°C 温度对成分分离的影响。柱温升高能减小四成分的保留, 其中对腺苷最为明显, 但柱温升至 45°C 时腺苷与内标峰不能达基线分离, 因此实验时应注意

保持温度的相对稳定。

4. 灵芝注射液安瓿开封后, 须立即测定, 实验证明, 开封后室温放置一天或冰箱保存 2 天以上, 腺苷含量均明显下降。

参 考 文 献

1. 余竞光等. 薄盖灵芝化学成分的研究. 药学报 1979; 14:374.
2. 湖南医药工业研究所. 灵芝有效成分的研究. 中草药通讯 1979; 10:1.
3. 中国医学科学院药物所药理新药组. 赤芝孢子粉和发酵培养的薄树芝菌丝体的一些药理作用. 中华医学杂志 1977; 57:607.

REVERSE PHASE HPLC DETERMINATION OF NUCLEOSIDES AND THEIR BASES IN THE SUBMERGED CULTURE OF *GANODERMA CAPENSE*

ZHANG Guan-De, LIU Hong-Yue and LIANG Yi-Hong*

(*Institiuent of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing; *Jiangxi Provincial Institute for Drug Control, Nanchang*)

ABSTRACT This paper deals with the HPLC determination of four constituents (uridine I; uracil II; adenosine III; adenine IV) in the mycelia of *Ganoderma capense* by submerged cultivation. The sample was extracted with 50% aqueous ethyl alcohol by ultrasonic method, defatted with ether and then analysed by HPLC method.

Inject. 2 μ l of the sample solution onto an ODS column (25 cm \times 4.0 mm, i d) Run the chromatogram with Michaelis phosphate buffer solution (pH 6.98)—tetrahydrofuran (100:1) as mobile phase using UV 260 nm detector. The four constituents were fairly well separated. p-Toluenesulfonic acid was chosen as the internal standard. Peak area was used for quantitative determination. Analytical results obtained by both HPLC and TLC-UV method are in good agreement.

Key words *Ganoderma*; *Ganoderma capense*; Uridine; Adenosine; HPLC