

猴头菌丝固体培养物中3个核苷类成分含量测定及HPLC指纹图谱研究

毕春洋¹,程建明¹,李俊松^{1,2*},崔小兵^{1*},狄留庆^{1,2},陈坤³

(1.南京中医药大学药学院,南京210023;2.江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心,南京210023;
3.南京老山药业有限公司,南京211811)

摘要 目的:对猴头菌丝固体培养物中尿苷、鸟苷、腺苷3个核苷类成分进行含量测定,同时建立HPLC指纹图谱。方法:采用SunFireTM C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水,梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长260 nm,柱温30 ℃。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A)进行指纹图谱分析。结果:10批猴头菌丝固体培养物样品中尿苷、鸟苷、腺苷3个核苷类成分线性范围分别为2.4~38.9、1.9~29.6、1.7~26.9 μg·mL⁻¹,平均加样回收率分别为97.8%、98.4%、99.0%,含量分别在127.17~481.88,68.36~282.36,91.10~280.47 μg·g⁻¹范围内。建立了10个批次猴头菌丝固体培养物的共有图谱,提取了21个色谱峰作为指纹图谱共有峰,指纹图谱相似度在0.93以上。结论:建立的猴头菌丝固体培养物含量测定及指纹图谱方法简便可靠,重复性好,可为猴头菌丝固体培养物质量控制和评价提供依据。

关键词:猴头菌丝;固体培养物;尿苷;鸟苷;腺苷;指纹图谱;含量测定;高效液相色谱

中图分类号:R 917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2018)04-0657-08

doi:10.16155/j.0254-1793.2018.04.14

Content of 3 nucleosides and HPLC fingerprint of solid culture of Hericium mycelium

BI Chun-yang¹, CHENG Jian-ming¹, LI Jun-song^{1,2*},
CUI Xiao-bing^{1*}, DI Liu-qing^{1,2}, CHEN Kun³

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China; 3. Nanjing Laoshan Pharmaceutical Co. Ltd., Nanjing 211811, China)

Abstract **Objective:** To determine 3 nucleosides in solid culture of Hericium mycelium including uridine, guanosine and adenosine, and to establish the HPLC fingerprint. **Methods:** The separation was developed on a SunFireTM C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) by gradient elution with methanol and water at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 260 nm and the column temperature was set at 30 ℃. The data calculation was performed with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2004A). **Results:** Good linearities of uridine, guanosine and adenosine were observed in the

* 通信作者 李俊松 Tel:(025)86798281; E-mail:lijunsong1964@163.com

崔小兵 Tel:(025)86798281; E-mail:xiaobingcui@163.com

第一作者 Tel:(025)86798281; E-mail:bey08032328@163.com

ranges of 2.4–38.9, 1.9–29.6 and 1.7–26.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The average recoveries were 97.8%, 98.4% and 99.0%, respectively. The content ranges of uridine, guanosine and adenosine were 127.17–481.88, 68.36–282.36 and 91.10–280.47 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The common pattern was established based on fingerprints of 10 batches of solid culture of *Hericium* mycelium and 21 chromatographic peaks were designated as the common peaks. The similarities of samples were above 0.93. **Conclusion:** The established methods are simple, reliable and repeatable, which can provide the basis for the evaluation and control of the quality of solid culture of *Hericium* mycelium.

Keywords: *Hericium* mycelium; solid culture; uridine; guanosine; adenosine; fingerprint; content determination; HPLC

猴菇菌 *Hericium erinaceus* (Rull ex F.) Pers. 隶属于担子菌纲红菇目猴头菌科, 是一种药食兼用的腐生菌, 本文所用的猴头菌为其固体培养物与菌丝发酵后的复合体。近年来的国内外研究表明^[1–6], 猴头菌中含有多糖、寡糖、蛋白质、腺苷、甾醇、猴头菌素、吡喃酮等多种活性成分。其中腺苷成分含量较高^[7–8], 具有镇静、扩血管、抗缺氧及抗炎、降胆固醇等生理活性^[9–10], Le 等^[11]研究发现, 腺苷通过人类单核细胞降低肿瘤坏死因子的释放, 刺激白细胞介素-10产生而发挥有效的抗炎作用。岳显可等^[12]采用 HPLC 法测定了猴头菇核苷类成分腺苷的含量, 李洁莉等^[13]通过 HPLC 法测得猴头菌丝体中腺苷含量为 4.790 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 同时水溶性的腺苷也有相当量存在于猴头菌药物制品中, 其复方制剂中腺苷成分的含量测定也屡见报道^[14–16]。相关质量控制研究报道还涉及猴头菌水溶性小分子提取物^[17]、低聚糖^[18]以及多糖部位^[19]其他的指纹图谱, 但未见对核苷部位指纹图谱的报道。本文建立了猴头菌丝固体培养物核苷类成分的 HPLC 指纹图谱, 并同时测定猴头菌丝固体培养物中的尿苷、鸟苷和腺苷含量, 为猴头菌丝固体培养物质量控制提供更加准确、有效、可靠的方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Alliance 2695 HPLC 仪 (Waters 公司), 配 Waters 2996 PDA 检测器, Empower 色谱工作站; SunFireTM C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm ; Waters 公司); CPA225D 电子天平 (Sartorius 公司); TGL-18C-C 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); KQ-500DE 超声机 (昆山市超声仪器有限公司); Synergy UV 超

纯水器 (默克密理博公司)。

1.2 试药

尿苷 (批号 110887–200202)、鸟苷 (批号 111977–201501)、腺苷 (批号 10879–200202) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯; S1~S10 号猴头菌丝固体培养物样品的批号分别为 140113、140316、141026–1、141104–2、20141108、141122–1、141122–2、141210–2、150603、150703, 均由南京老山药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

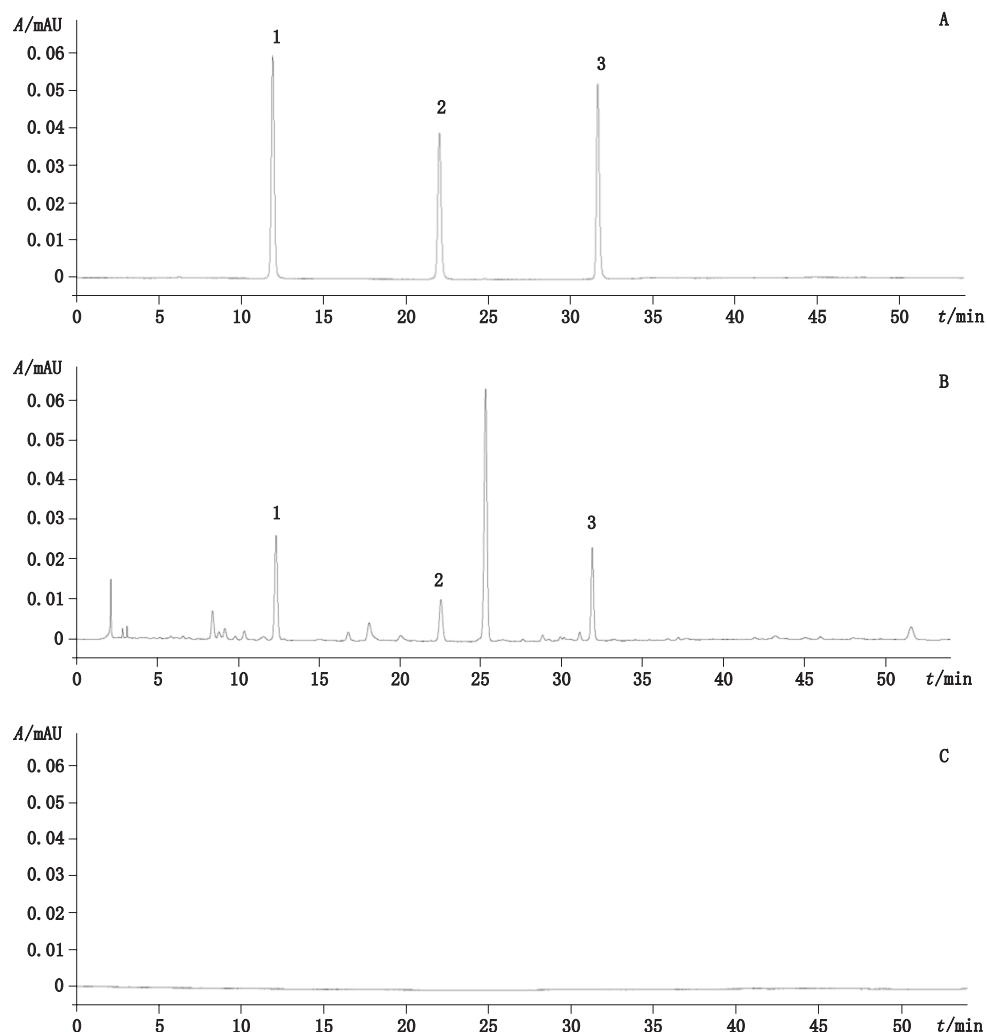
采用 SunFireTM C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A)–水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 0 → 2%A; 10~20 min, 2%A → 6%A; 20~30 min, 6%A → 15%A; 30~40 min, 15%A → 30%A; 40~55 min, 30%A), 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL 。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取尿苷、鸟苷、腺苷的对照品适量, 用 20% 甲醇水溶解并定容, 配成质量浓度分别为 38.9、29.6、26.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末 (过 4 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 20% 甲醇水 25 mL, 密塞, 称量, 超声 (工作频率 40 kHz, 功率 250 W) 处理 30 min, 放冷, 再称量, 用 20% 甲醇水补足减失的量, 摆匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 空白溶液 20% 甲醇水溶液。滤过, 进样, 记录色谱图。见图 1, 阴性无干扰。



1. 尿苷 (uridine) 2. 鸟苷 (guanosine) 3. 腺苷 (adenosine)

图 1 混合对照品 (A)、猴头菌丝固体培养物样品 (B) 和空白溶液 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), solid culture of *Hericium mycelium* (B) and blank (C)

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录所测各组分峰面积, 计算尿苷、鸟苷、腺苷色谱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.2%、0.44%、0.32%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 标准曲线的制备 精密量取混合对照品溶液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 20% 甲醇水稀释至刻度, 摆匀; 以此法再次 2 倍稀释后得系列溶液。精密吸取各浓度溶液 10 μ L, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积; 以质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线。尿苷、鸟苷、腺苷 3 个核苷成分的回归方程分别为:

$$Y=22\ 565X-454.17 \quad r=0.999\ 9$$

$$Y=20\ 509X+1\ 400.3 \quad r=1.000\ 0$$

$$Y=31\ 111X-1\ 441.5 \quad r=1.000\ 0$$

质量浓度依次在 2.4~38.9、1.9~29.6、1.7~26.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈现良好的线性关系。

2.3.3 重复性试验 取同一批 (批号 20141108) 猴头菌丝固体培养物样品 (S5 号样品) 6 份, 依法制备供试品溶液, 进样测定; 结果尿苷、鸟苷、腺苷平均含量 ($n=6$) 分别为 366.19、155.34、184.93 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 3.0%、1.0%、3.1%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一批 (批号 20141108) 猴头菌丝固体培养物样品 (S5 号样品) 6 份, 依法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12 h 进样, 测得尿苷、

鸟苷、腺苷峰面积的 RSD 分别为 1.4%、2.3%、2.9%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 取“2.3.3”项下已测知核苷含量的样品 6 份，每份约 0.5 g，精密称定，精密加入

尿苷、鸟苷、腺苷对照品适量，依法制备供试溶液，进样测定。尿苷、鸟苷、腺苷 3 个成分的回收率($n=6$)分别为 97.8%、98.4%、99.0%，RSD 分别为 1.8%、1.4%、2.4%。见表 1。

表 1 加样回收率试验($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery tests

| 成分 (component) | 称样量 (sample mass) /g | 测得量 (detected amount) / μ g | 样品含量 (sample content) / μ g | 加入量 (added amount) / μ g | 回收率 (recovery) /% | 平均回收率 (average recovery) / % | RSD/% |
|---------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------|
| 尿苷 (uridine) | 0.500 6 | 342.17 | 183.87 | 155.60 | 101.7 | 97.8 | 1.8 |
| | 0.499 1 | 339.12 | 183.31 | 155.60 | 100.1 | | |
| | 0.502 3 | 337.22 | 184.49 | 155.60 | 98.2 | | |
| | 0.498 8 | 336.13 | 183.20 | 155.60 | 98.3 | | |
| | 0.500 0 | 332.21 | 183.65 | 155.60 | 95.5 | | |
| | 0.501 4 | 334.87 | 184.16 | 155.60 | 96.9 | | |
| 鸟苷 (guanosine) | 0.500 6 | 169.54 | 75.41 | 98.00 | 96.1 | 98.4 | 1.4 |
| | 0.499 1 | 173.31 | 75.18 | 98.00 | 100.1 | | |
| | 0.502 3 | 171.36 | 75.67 | 98.00 | 97.6 | | |
| | 0.498 8 | 171.67 | 75.14 | 98.00 | 98.5 | | |
| | 0.500 0 | 172.41 | 75.32 | 98.00 | 99.1 | | |
| | 0.501 4 | 172.44 | 75.53 | 98.00 | 98.9 | | |
| 腺苷 (adenosine) | 0.500 6 | 197.40 | 92.22 | 107.60 | 97.8 | 99.0 | 2.4 |
| | 0.499 1 | 201.97 | 91.94 | 107.60 | 102.3 | | |
| | 0.502 3 | 199.87 | 92.53 | 107.60 | 99.8 | | |
| | 0.498 8 | 200.21 | 91.88 | 107.60 | 100.7 | | |
| | 0.500 0 | 195.45 | 92.11 | 107.60 | 96.1 | | |
| | 0.501 4 | 197.09 | 92.36 | 107.60 | 97.3 | | |

2.4 样品含量测定

取 10 批猴头菌丝固体培养物样品各 3 份，分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进行测定，将峰面积带入标准曲线回归方程计算各样品中 3 个成分的含量，结果见表 2。

2.5 HPLC 指纹图谱研究结果

2.5.1 指纹图谱共有模式的建立 取 10 批样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样 10 μ L，记录 HPLC 色谱图，色谱图导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 版)，生成共有模式指纹图谱，见图 2。在 10 批次样品的色谱图中 16 号色谱峰(鸟苷)的分离度良好，所有样品共有且为猴头菌丝培养物的主要成分之一，因此将其确定为参照峰(S)。各共有峰的相对保留时间与相对峰面积分别见表 3、4。

表 2 样品含量测定(μ g·g⁻¹, $n=3$)

Tab. 2 Determination of the content of samples

| 样品编号 (sample No.) | 尿苷 (uridine) | 鸟苷 (guanosine) | 腺苷 (adenosine) |
|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| S1 | 181.13 | 115.80 | 92.36 |
| S2 | 481.88 | 282.36 | 280.47 |
| S3 | 173.39 | 91.84 | 155.07 |
| S4 | 127.17 | 75.78 | 152.41 |
| S5 | 372.82 | 149.12 | 181.06 |
| S6 | 215.28 | 153.50 | 224.23 |
| S7 | 185.75 | 84.08 | 144.05 |
| S8 | 164.81 | 98.99 | 152.88 |
| S9 | 130.94 | 68.36 | 91.10 |
| S10 | 132.73 | 91.94 | 148.22 |

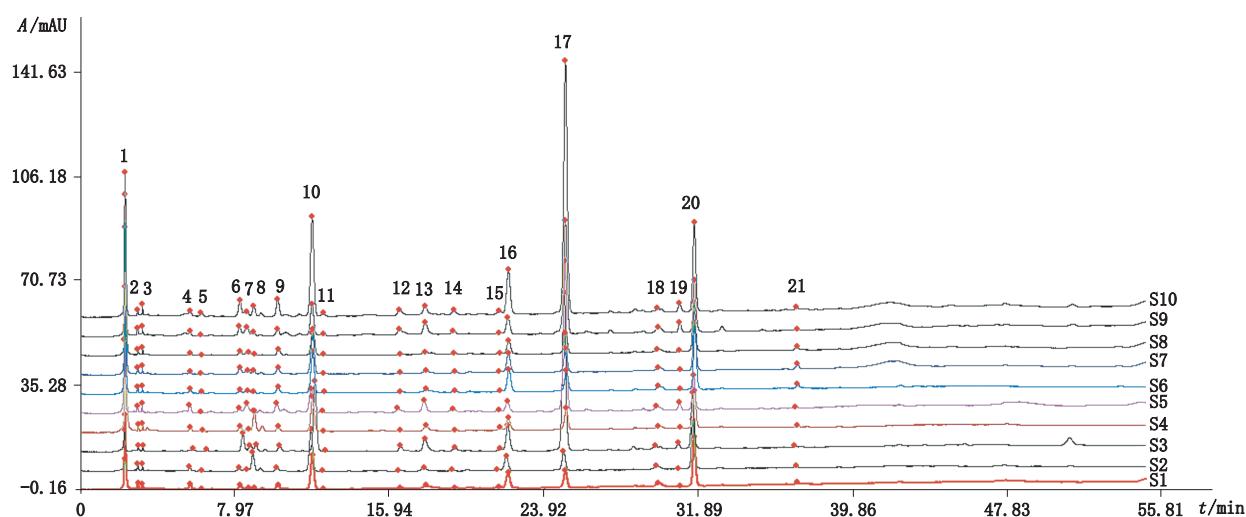


图 2 10 批猴头菌丝体培养物指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of solid culture of Hericium mycelium

表 3 10 批样品各共有峰的相对保留时间

Tab. 3 The relative retention time of common peaks of 10 samples

| 峰号 (peak No.) | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 2 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| 3 | 0.15 | 0.15 | 0.14 | 0.14 | 0.15 | 0.15 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 |
| 4 | 0.27 | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 0.27 | 0.26 |
| 5 | 0.28 | 0.29 | 0.29 | 0.29 | 0.30 | 0.29 | 0.29 | 0.28 | 0.28 | 0.29 |
| 6 | 0.38 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 0.38 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 0.36 | 0.37 |
| 7 | 0.40 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.40 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 |
| 8 | 0.41 | 0.41 | 0.41 | 0.41 | 0.41 | 0.41 | 0.40 | 0.40 | 0.41 | 0.41 |
| 9 | 0.46 | 0.46 | 0.46 | 0.46 | 0.47 | 0.46 | 0.46 | 0.46 | 0.46 | 0.46 |
| 10 | 0.55 | 0.54 | 0.54 | 0.54 | 0.55 | 0.54 | 0.54 | 0.54 | 0.55 | 0.54 |
| 11 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.58 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 |
| 12 | 0.75 | 0.75 | 0.74 | 0.74 | 0.75 | 0.74 | 0.74 | 0.74 | 0.74 | 0.75 |
| 13 | 0.81 | 0.80 | 0.80 | 0.82 | 0.81 | 0.81 | 0.81 | 0.80 | 0.80 | 0.81 |
| 14 | 0.90 | 0.93 | 0.90 | 0.90 | 0.89 | 0.90 | 0.90 | 0.90 | 0.90 | 0.90 |
| 15 | 0.96 | 0.97 | 0.97 | 0.97 | 0.96 | 0.97 | 0.97 | 0.97 | 0.95 | 0.97 |
| 16 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 17 | 1.12 | 1.13 | 1.13 | 1.13 | 1.12 | 1.13 | 1.12 | 1.12 | 1.12 | 1.12 |
| 18 | 1.22 | 1.23 | 1.23 | 1.23 | 1.22 | 1.23 | 1.23 | 1.23 | 1.22 | 1.23 |
| 19 | 1.29 | 1.30 | 1.30 | 1.30 | 1.28 | 1.28 | 1.30 | 1.30 | 1.29 | 1.30 |
| 20 | 1.42 | 1.42 | 1.42 | 1.42 | 1.41 | 1.42 | 1.42 | 1.42 | 1.41 | 1.42 |
| 21 | 1.65 | 1.66 | 1.66 | 1.66 | 1.64 | 1.66 | 1.65 | 1.65 | 1.64 | 1.66 |

表 4 10 批样品各共有峰的相对峰面积

Tab. 4 The relative areas of common peaks of 10 samples

| 峰号 (peak No.) | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 3.34 | 1.99 | 1.98 | 4.97 | 2.42 | 4.69 | 4.43 | 4.06 | 3.62 | 3.20 |
| 2 | 0.09 | 0.03 | 0.08 | 0.10 | 0.08 | 0.05 | 0.08 | 0.07 | 0.11 | 0.08 |
| 3 | 0.02 | 0.03 | 0.08 | 0.09 | 0.07 | 0.03 | 0.05 | 0.04 | 0.08 | 0.07 |
| 4 | 0.13 | 0.05 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.12 | 0.14 | 0.43 | 0.14 |
| 5 | 0.03 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.09 | 0.04 | 0.05 | 0.04 | 0.01 | 0.03 |
| 6 | 0.38 | 0.26 | 0.22 | 0.19 | 0.73 | 0.18 | 0.22 | 0.22 | 0.21 | 0.32 |
| 7 | 0.02 | 0.03 | 0.12 | 0.14 | 0.10 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.24 | 0.27 |
| 8 | 0.56 | 0.17 | 0.10 | 0.05 | 0.50 | 0.02 | 0.68 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| 9 | 0.23 | 0.29 | 0.27 | 0.34 | 0.28 | 0.18 | 0.18 | 0.17 | 0.56 | 0.27 |
| 10 | 1.83 | 1.89 | 1.92 | 1.69 | 3.48 | 1.40 | 2.02 | 1.51 | 2.05 | 1.48 |
| 11 | 0.02 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.09 | 0.05 |
| 12 | 0.06 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.31 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.20 | 0.20 |
| 13 | 0.54 | 0.23 | 0.11 | 0.04 | 1.41 | 0.21 | 0.26 | 0.40 | 1.07 | 0.62 |
| 14 | 0.04 | 0.02 | 0.07 | 0.06 | 0.03 | 0.03 | 0.08 | 0.04 | 0.19 | 0.03 |
| 15 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 16 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 17 | 1.06 | 4.94 | 1.13 | 1.32 | 8.45 | 0.61 | 0.90 | 0.71 | 9.46 | 5.32 |
| 18 | 0.06 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.07 | 0.03 | 0.05 | 0.05 | 0.14 | 0.13 |
| 19 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.15 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.13 | 0.06 |
| 20 | 0.57 | 1.35 | 2.40 | 2.87 | 1.89 | 1.93 | 2.29 | 1.79 | 1.95 | 2.23 |
| 21 | 0.06 | 0.04 | 0.22 | 0.21 | 0.07 | 0.10 | 0.10 | 0.08 | 0.10 | 0.05 |

2.5.2 共有峰的确定 10 批样品生成的对照指纹图谱,共标记了 21 个共有峰,经与对照品对照,指认其中 3 个色谱峰,10、16、20 号峰依次为尿苷、鸟苷、腺苷。

2.5.3 相似度计算与评价 将 10 批样品 HPLC 图与共有模式图比较,通过多点校正法对色谱峰进行自动匹配,生成猴头菌丝培养物的色谱指纹图谱共有模式,并在分析检验模式下,以批号为 150603 的样品 (S9 号样品) 图谱作为参照图谱,时间窗为 0.10,以平均数法进行相似度计算。与生成的对照图谱相比,10 批样品指纹图谱相似度在 0.932~0.992,分别为 0.969、0.985、0.968、0.974、0.961、0.992、0.939、0.947、0.932、0.986。10 批猴头菌丝固体培养物共有模式指纹图谱可以作为其指纹图谱,说明猴头菌丝固体培养物的核苷类成分比较稳定。

3 讨论

3.1 样品提取条件的优化

考察了不同提取溶剂 (水、20% 甲醇水、40% 甲醇水、60% 甲醇水),不同提取时间 (30、45、60 min),不同提取方法 (超声、回流),以及不同样品用量 (0.2、0.5、1.0、2 g) 对提取效率的影响,结果发现,采用 25 mL 20% 甲醇水超声处理 30 min 时,猴头菌丝固体培养物色谱峰个数最多,且该条件下尿苷、鸟苷、腺苷 3 个成分的提取效果最佳。

3.2 色谱条件的优化

通过 DAD 检测器对样品色谱于 190~400 nm 波长范围内进行检测,结果显示在 260 nm 波长下供试品溶液中色谱峰个数最多且基线平稳,色谱信息量大,待测色谱峰分离度良好。对比了不同的流动相 (甲醇 - 水、甲醇 - 0.1% 乙酸水、乙腈 - 水),流

速($0.8, 1, 1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$),柱温($25, 30, 35^\circ\text{C}$),进样量($5, 10, 15, 20 \mu\text{L}$)时色谱峰的数目及分离效果,结果发现流动相为甲醇-水,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 30°C ,进样量 $10 \mu\text{L}$ 时效果最优。

3.3 相似度结果分析

不同批次猴头菌丝固体培养物样品相似度计算结果均大于0.93,表明其原药材各批次的指纹图谱相似度较高,各批次间成分总体差异较小,提取方法稳定,重复性好。但含量测定结果显示不同批次各成分含量存在一定差异,这种差异可能是由菌丝来源、培养基的不同等因素所造成的。研究表明,该方法操作性强,稳定易行,为控制和评价猴头菌丝固体培养物的内在质量提供了科学依据。

3.4 核苷类成分检测与LC-MS分析

本次实验中,在相同的色谱条件下,分别用黄嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、2-脱氧尿苷、肌苷、鸟苷、2-脱氧肌苷、2-脱氧鸟苷、腺苷、胸苷共11个核苷类的对照品对照本组试验中所出现的峰,分别对应出尿苷、鸟苷、腺苷这3个峰。同时将样品进行LC-MS分析,发现17号峰分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}$,相对分子质量为273,但经检索未能确知为何种化合物。

参考文献

- [1] HAN ZH, YE JM, WANG GF. Evaluation of *in vivo* antioxidant activity of *Hericium erinaceus* polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 52: 66.
- [2] 李巧珍, 刘朝贵, 于海龙, 等. 猴头菌不同生长发育期粗蛋白、粗多糖含量及水溶性粗多糖体外免疫活性[J]. 食用菌学报, 2011, 18(4): 73.
- LI QZ, LIU CG, YU HL, et al. Protein, polysaccharide and β -glucan levels in *Hericium erinaceus* fruit bodies harvested at different development stages and the effect of extracted polysaccharide on NO production by RAW264.7 cells [J]. Acta Edulis Fungi, 2011, 18(4): 73.
- [3] 周帅, 薛俊杰, 刘艳芳, 等. 高效阴离子色谱-脉冲安培检测法分析食用菌中海藻糖、甘露醇和阿糖醇[J]. 食用菌学报, 2011, 18(1): 49.
- ZHOU S, XUE JJ, LIU YF, et al. Determination of arabinose, trehalose and mannitol in the fruit bodies of edible fungi using high performance anion chromatography-pulsed amperometric detection (HAPEC-PAD) [J]. Acta Edulis Fungi, 2011, 18(1): 49.
- [4] LI W, ZHOU W, CHA JY, et al. Sterols from *Hericium erinaceum* and their inhibition of TNF-alpha and NO production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells [J]. Phytochemistry, 2015, 115: 231.
- [5] WANG K, BAO L, QI Q, et al. Erinacerins C-L, isoindolin-1-ones with α -glucosidase inhibitory activity from cultures of the medicinal mushroom *Hericium erinaceus* [J]. J Nat Prod, 2015, 78(1): 146.
- [6] LU QQ, TIAN JM, WEI J, et al. Bioactive metabolites from the mycelia of the basidiomycete *Hericium erinaceum* [J]. Nat Prod Res, 2014, 28(16): 1288.
- [7] 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年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集. 石家庄: 中国药学会学术会务部, 2008: 474.
- TANG J, CHENG M, LU J, et al. Profiling and determination of nucleosides in several medicinal fungi by HPLC method [C]//The Proceedings of 2008 Academic Annual Conference of Chinese Pharmaceutical Association and the Eighth China Pharmacists Week. Shijiazhuang: Academic Meeting Affairs Department of Chinese Pharmaceutical Association, 2008: 474.
- [8] 毕春洋, 李国源, 陈婷, 等. 猴头菌丝固体培养物质量标准研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(6): 724.
- BI CY, LI GY, CHEN T, et al. Study on quality standard for *Hericium erinaceus* with solid culture [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2016, 32(6): 724.
- [9] 郭艳艳, 李华, 刘钟栋. 猴头菌属化学成分及药理活性研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2010, 4(8): 77.
- GUO YY, LI H, LIU ZD. Phytochemical components and their pharmacological action of *Hericium* [J]. Acad Period Farm Prod Proce, 2010, 4(8): 77.
- [10] 王晓玉, 蒋秋燕, 凌沛学, 等. 猴头菌活性成分及药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 70.
- WANG XY, JIANG QY, LING PX, et al. Research progress in the effective components of *Hericium erinaceus* and its pharmacological actions [J]. Chin J Biochem Pharm, 2010, 31(1): 70.
- [11] LE MOINE O, QUERTINMONT E, GULBIS B, et al. Blunted anti-inflammatory response to adenosine in alcoholic cirrhosis [J]. J Hepatol, 1999, 31(3): 457.
- [12] 岳显可, 曹岗, 吴瑶, 等. HPLC 法测定猴头菇核苷类成分腺苷的含量[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(4): 432.
- YUE XK, CAO G, WU Y, et al. Determination of nucleosides of adenosine in *Hericium erinaceus* by HPLC [J]. Pract Pharm Clin Remed, 2015, 18(4): 432.
- [13] 李洁莉, 陆玲, 陈坤, 等. 猴头菌及其药物制品腺苷等药效成分分析[J]. 中国食用菌, 2002, 21(3): 32.
- LI JL, LU L, CHEN K, et al. Studies on adenosine etc. composition with medicinal effects of *Hericium erinaceus* and its pharmaceutical products [J]. Edible Fungi China, 2002, 21(3): 32.
- [14] 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.
- GU HF, ZHUANG YL, ZHANG ML. Determination of adenosine in Houtoujun tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 34(7): 1405.

- [15] 周静安. RP-HPLC 测定复方猴头颗粒剂中腺苷的含量[J]. 中成药, 2005, 27(2): 213
ZHOU JA. Determination of adenosine in compound Houtou granules by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2005, 27(2): 213
- [16] 戚雁飞. HPLC 测定复方猴头胶囊中腺苷的含量[J]. 中成药, 2002, 24(3): 181
QI YF. Determination of adenosine in compound Houtou capsules by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2002, 24(3): 181
- [17] 熹天华, 丁石博, 王再林, 等. 小刺猴头菌水溶性小分子提取物 HPLC 指纹图谱探讨[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(1): 8
QI TH, DING SB, WANG ZL, et al. Discussion on HPLC fingerprint of water-soluble small molecule extract of *Hericium caput-medusae* [J]. Chin J Biochem Pharm, 2012, 33(1): 8
- [18] 陈婷, 杨军辉, 李俊松, 等. 猴头菌丝固体培养物及胃乐宁片低聚糖部位的 HPLC-ELSD 指纹图谱[J]. 中成药, 2017, 39(6): 1211
CHEN T, YANG JH, LI JS, et al. HPLC-ELSD fingerprints of oligosaccharide sites from mycelia of *Hericium erinaceum* solid culture and Weilening tablets[J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(6): 1211
- [19] 石博, 李雨亭, 熹天华, 等. 小刺猴头菌发酵液小分子指纹图谱与多糖含量相关性研究[J]. 菌物研究, 2012, 10(4): 244
SHI B, LI YT, QI TH, et al. Study on the correlation of small molecule fingerprints and polysaccharide content of *Hericium caput-medusae* fermented liquid[J]. J Fungal Res, 2012, 10(4): 244

(本文于 2017 年 4 月 19 日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统, 作者稿件一经本刊审核通过, 确定录用, 可优先数字出版, 同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录, 进入因特网提供信息服务, 并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件, 所有稿件须登录本刊网站 (<http://www.ywfxzz.cn>) 在线投稿, 并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用, 所有收费按本刊缴费通知办理。

