

HPLC 法测定黑木耳中腺苷及尿苷含量

郑雪^{1,2}, 郑春英^{1,2*}, 吴桐^{1,3*}

(1. 黑龙江大学, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150500; 2. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080; 3. 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校分子生物学重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要 [目的]建立简单、快速同时分析黑木耳中腺苷及尿苷含量的 HPLC 法。[方法]采用 Venusil XBP C₁₈ 色谱柱, 流动相为甲醇-水 (15:85), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为室温。[结果]腺苷及尿苷的线性范围分别为 0.02~0.10 mg/mL ($r=0.999\ 9$) 和 0.04~0.20 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率分别为 99.58% (RSD=0.78%)、98.99% (RSD=1.21%)。[结论]该方法简单、快速、准确、重现性好、回收率高, 可用于黑木耳中腺苷及尿苷含量的测定, 其结果可为其质量控制提供参考。

关键词 HPLC; 黑木耳; 腺苷; 尿苷

中图分类号 TS207; R931 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)32-0173-02

Determination of Adenosine and Uridine in *Auricularia auricular* by HPLC

ZHENG Xue^{1,2}, ZHENG Chun-ying^{1,2}, WU Tong^{1,3} (1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150500; 2. Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080; 3. Key Laboratory of Molecular Biology, College of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080)

Abstract [Objective] To develop a HPLC method for simultaneous determination of adenosine and uridine in *Auricularia auricular*. [Method] The HPLC system consisted of a Venusil XBP C₁₈ column with the mobile phase of methanol-water (15:85) at a flow rate of 1.0 mL/min. UV detector was used, and the detection wavelength was 260 nm. The column temperature was room temperature. [Result] The liner range of adenosine and uridine were 0.02-0.10 mg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.04-0.20 mg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries were 99.58% (RSD=0.78%) and 98.99% (RSD=1.21%), respectively. [Conclusion] The method is accurate, simple, rapid and reproducible for determination of adenosine and uridine in *Auricularia auricular*. The determination results can be used as a reference for the quality control for *Auricularia auricular*.

Key words HPLC; *Auricularia auricular*; Adenosine; Uridine

黑木耳 (*Auricularia auricular*) 是我国珍贵的食药两用真菌, 具有抗肿瘤^[1]、抗凝血^[2]、抗氧化^[3]、降血脂^[4]、免疫调节^[5]等作用。黑木耳中含有多糖^[6]、腺苷、尿苷^[7]、黄酮^[8]等多种活性成分, 深受消费者喜爱。关于黑木耳的质量控制方法目前主要有 2 种, 一是针对黑木耳活性成分黑木耳多糖, 采用分光光度法^[9]进行黑木耳中总多糖的含量测定; 此方法操作复杂, 需要用到浓硫酸等腐蚀性较大的试剂, 且多糖不易长时间存放, 测定结果容易受到温度、时间等多种因素的影响。二是针对黑木耳中的总黄酮成分, 采用比色法进行测定^[10], 此法简单粗糙、干扰因素多、结果不可靠。HPLC 法具有快速、高效、准确度高、应用范围广等优点, 笔者采用 HPLC 法, 以黑木耳中主要活性成分尿苷及腺苷为指标, 建立黑木耳中尿苷及腺苷的含量测定方法, 为黑木耳的质量控制研究提供新方法。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 不同产地黑木耳样品均购于哈尔滨市家乐福超市, 样品现存于黑龙江大学生命科学学院生物制药专业实验室。腺苷对照品 (中国药品生物制品检定所); 尿苷对照品 (中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯。

1.2 仪器与设备 FL2200 高效液相色谱仪 (浙江温岭福立分析仪器有限公司); KQ100-DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电子天平 (METTLER TOLEDO, 美国)。

作者简介 郑雪 (1994—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物制药。* 通讯作者, 郑春英, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物制药研究; 吴桐, 讲师, 从事寒区植物基因与生物发酵研究。

收稿日期 2018-09-06**1.3 方法**

1.3.1 色谱条件。 仪器为 FL2200, 色谱柱为 Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (15:85), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为室温, 进样量为 10 μL。

1.3.2 供试品溶液的制备。 精密称取黑木耳粉 (40 目) 10 g, 加入 400 mL 50% 甲醇 (V/V) 溶液, 超声提取 2 次, 每次 60 min, 离心、过滤, 取上清减压蒸发至近干, 再以 50% 甲醇 (V/V) 定容至 25 mL, 0.45 μm 的微孔滤膜滤过后作为供试品溶液。

1.3.3 线性关系考察。 分别精密称取腺苷和尿苷对照品适量, 以 50% 甲醇 (V/V) 配制成腺苷、尿苷质量浓度分别为 0.1、0.2 mg/mL 的混合对照品储备液; 精密吸取混合对照品储备液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 分别置于 2 mL 容量瓶中, 以 50% 甲醇 (V/V) 定容, 摇匀, 得到系列腺苷、尿苷混合对照品溶液。分别吸取此系列混合对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱峰面积。以各物质质量浓度 (mg/mL) 为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。

1.3.4 方法学考察。 在黑木耳样品中选一个样品, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测定仪器进样精密度; 所选取的样品溶液分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样 10 μL 测定其峰面积, 考察样品的日内稳定性, 同时, 取上述样品溶液在配制 6 d 内每日进样, 测定各组分的峰面积积分值, 考察样品的日间稳定性; 取同一黑木耳样品 6 份, 平行制备样品溶液并测定该方法的重现性; 精密称取同一已知含量的黑木耳样品, 共 6 份, 精密加入一定量的尿苷、腺苷对照品, 按“1.3.2”供试液制备方法制备样品, 在“1.3.1”色谱条件下进样 10 μL, 计算的回收率。

1.3.5 颗粒度对提取率的影响。 分别准确称取 20、40、60、

80目黑木耳粉各10g,以料液比1:40的50%甲醇超声提取2次,每次60min,测定腺苷、尿苷含量。

1.3.6 料液比对提取率的影响。准确称取黑木耳粉(40目)10g,以50%甲醇超声提取2次,每次60min,分别在料液比为1:20、1:30、1:40、1:50的条件下提取黑木耳样品,检测腺苷、尿苷含量。

1.3.7 样品测定。分别取不同产地黑木耳样品粉末,按“1.3.2”项下平行制备3份供试品液,按“1.3.1”项下条件测定。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察 从表1可以看出,腺苷、尿苷对对照品分别在0.02~0.10和0.04~0.20mg/mL表现出良好的线性关系。

表1 腺苷及尿苷线性关系考察结果

Table 1 Linear ranges of adenosine and uridine

对照品 Reference substance	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	线性范围 Linear range mg/mL	最低检 测限 LOD μg/mL
腺苷 Adenosine	$Y=18\ 423\ 000X-7\ 407.21$	0.999 9	0.02~0.10	0.20
尿苷 Uridine	$Y=25\ 239\ 000X+304\ 757.3$	0.999 9	0.04~0.20	0.40

2.2 方法学考察 从表2可以看出,采用HPLC法测定黑木耳中腺苷及尿苷含量方法可行,能够满足定量分析要求。

表2 方法学考察结果

Table 2 The results of method validation %

成分 Ingredient	精密 度 RSD Precision RSD	日内稳 定性 RSD Intraday stability RSD	日间稳 定性 RSD Daytime stability RSD	重现 性 RSD Repro- ducibility RSD	平均回 收率 Average recovery rate
腺苷 Adenosine	0.88	0.96	1.05	1.92	99.58
尿苷 Uridine	1.02	1.29	1.38	0.93	98.99

2.3 颗粒度对提取率的影响 黑木耳具有胶质含量高、黏度大、吸水性强等特点,因此该研究比较了黑木耳样品颗粒度对提取率的影响,其结果见图1。从图1可以看出,随黑木耳样品颗粒度的减小,黑木耳中腺苷及尿苷的提取率先增大再

降低。当颗粒度过小时,可能是由于黑木耳样品颗粒太细,部分样品漂附在提取溶剂表面,导致提取率出现波动现象。当黑木耳颗粒度为40目时(n=6),腺苷和尿苷均有最大提取率。

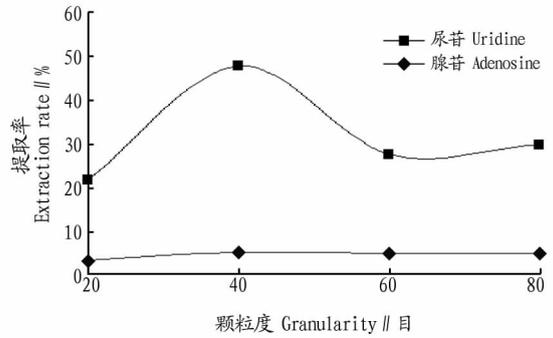


图1 颗粒度对提取率的影响

Fig.1 Effect of granularity on extraction rate

2.4 料液比对提取率的影响 黑木耳样品的强吸水性导致提取溶剂消耗量较大,为保证提取完全,在此考察了料液比对提取率的影响,结果见图2。从图2可以看出,料液比由1:20扩大到1:40时,腺苷和尿苷的提取率都有所上升,当料液比继续扩大时,提取率变化不大。因此从节约成本考虑,料液比以1:40为宜。

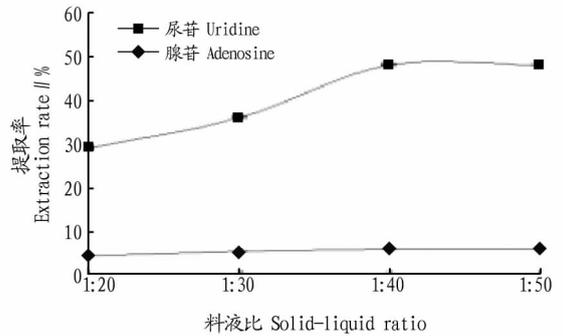
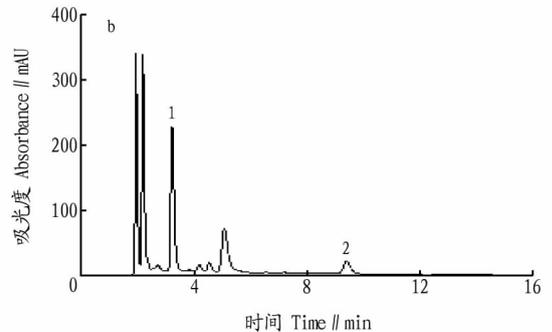
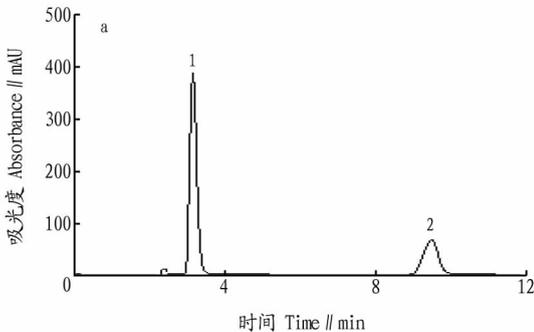


图2 料液比对提取率的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate

2.5 样品测定结果 采用HPLC法测定黑龙江省不同产地黑木耳样品中腺苷及尿苷含量,其结果见图3及表3。从表



注:1.尿苷;2.腺苷
Note: 1. Uridine; 2. Adenosine

图3 黑木耳混合对照品(a)和供试品(b)HPLC色谱图

Fig.3 The HPLC chromatogram of mixed reference (a) and test (b) in *Auricularia auricula*

装置可以直接对老式粪道鸡舍进行改造,利用原有刮粪机实现牵引功能,翻耙机可根据现有粪道进行定制,从而实现发酵床养鸡,仅需增加 2 条轨道和 1 台翻耙主机即可,且费用不高,适用于新建养鸡场和具有环保压力的老鸡场升级改造。

4 推广应用前景

保护环境,发展绿色养殖业是我国社会转型必然的发展趋势。养殖业产生的粪污的收集利用是落实环保法、环保税的前提,事关农村养殖户的生存。农村中小型养殖户的养殖生产主要是维持正常生活,基本无过多的资金进行环保设备的建设,所以发酵床这种将污染在源头解决的生产方式是解决此类问题的最佳方式。该研究设计的养鸡发酵床配套装备解决了笼养鸡生产中日常管理的技术和操作问题,是发酵床养鸡技术推广重要的技术装备保障。

应用前景之一:迫于环保压力生产方式亟需升级改造的老式养鸡户。该装备开发初衷即是老式养鸡粪道升级改造,所以老式的养鸡户只需在粪道上安装轨道、定制宽度合适的翻耙机、抬高鸡笼高度 20 cm 即可将该技术应用,全量收集处理养鸡的粪污,且不外排。

应用前景之二:满足现代农业园区养殖区配置的需求。现代农业园区发展需要养殖业作为循环农业的重要环节,机

械化发酵床养鸡技术满足了环保、无污染、全量收集的要求,同时腐熟的垫料是很好的有机肥,可以降低园区的生产资料成本,增加副产品收入。

参考文献

- [1] 应诗家,杨智青,朱冰,等.发酵床垫料翻耙结合网床养殖改善鸭舍空气质量与鸭生产性能[J].农业工程学报,2016,32(3):188-194.
- [2] 何仁财,程国华,吴兆胜,等.发酵床翻耙机的研究[J].南方农机,2011(6):36-38.
- [3] 王海洲.一种自走式网床发酵床垫料翻耙机[J].当代畜禽养殖业,2015(5):7-8.
- [4] 施振旦,张甜,肖文权,等.发酵床网上养殖鸭舍的设计建造和应用效果介绍[C]//第六届(2015)中国水禽发展大会论文集汇编.济南:《水禽世界》编辑部,2015:58-62.
- [5] 戴子淳,尉传坤,杨智青,等.发酵床网养在肉鹅完全舍内饲养的应用研究[J].中国家禽,2017,39(18):40-44.
- [6] 张曼,杨书会,高洁,等.发酵床养鸡技术的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2017(13):69-72.
- [7] 苏循志,贺照森.活动式发酵床产床的设计与建造[J].中国猪业,2014(6):66-67.
- [8] 蒋岩.肉鸭发酵床建造和饲养防疫配套技术[J].中国畜牧兽医文摘,2016,32(10):108-109.
- [9] 刘波,蓝江林,余文权,等.低位微生物发酵床养猪舍的设计与应用[J].氨基酸和生物资源,2016,38(3):68-72.
- [10] 刘迪.利用非接触式发酵床治理蛋鸡粪污的调研报告[J].新农业,2016(9):54-55.

(上接第 174 页)

3 可以看出,不同产地黑木耳样品中腺苷及尿苷含量不同,其中哈尔滨生产的黑木耳样品中腺苷含量最高(0.153 6 mg/g),海林生产的黑木耳样品中尿苷含量最高(0.817 4 mg/g)。

表 3 黑木耳中腺苷及尿苷含量测定结果

Table 3 Contents of adenosine and uridine in different *Auricularia auricula* mg/g

序号 No.	不同产地样品 Different origin samples	腺苷 Adenosine	尿苷 Uridine
1	黑木耳(哈尔滨)	0.153 6	0.348 6
2	黑木耳(海林)	0.072 6	0.817 4
3	黑木耳(绥芬河)	0.078 3	0.343 9
4	黑木耳(大兴安岭)	0.151 9	0.203 0
5	黑木耳(尚志)	0.029 2	0.264 0
6	黑木耳(牡丹江)	0.057 1	0.284 1

3 结论

HPLC 法具有分离效能高、分析速度快等优点,近年来已普遍应用于食品、药品中活性成分的定量分析。该研究首次采用 HPLC 法测定黑木耳中腺苷和尿苷的含量,并对 6 种不同生产产地的黑木耳样品进行分析,试验结果表明,该方法操作简便、结果可靠、重现性好,可以准确测定黑木耳中腺苷

及尿苷的含量,能够为黑木耳的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] MA Z C, WANG J G, ZHANG L A, et al. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent[J]. Carbohydrate polymers, 2010, 80(3): 977-983.
- [2] NGUYEN T L, CHE J, HU Y L, et al. *In vitro* antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides[J]. Carbohydrate polymers, 2012, 90(3): 1254-1258.
- [3] YANG L Q, ZHAO T, WEI H, et al. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro*[J]. International journal of biological macromolecules, 2011, 49(5): 1124-1130.
- [4] LUO Y C, CHEN G, LI B, et al. Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn[J]. Innovative food science and emerging technologies, 2009, 10: 215-221.
- [5] NGUYEN T L, WANG D Y, HU Y L, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides[J]. Carbohydrate polymers, 2012, 89(4): 1117-1122.
- [6] ZENG F, ZHAO C, PANG J, et al. Chemical properties of a polysaccharide purified from solid-state fermentation of *Auricularia auricular* and its biological activity as a hypolipidemic agent[J]. Journal of food science, 2013, 78(9): 1470-1475.
- [7] 刘雅静,袁延强,刘秀河,等.黑木耳化学成分的研究[J].中国食物与营养,2011,17(4):69-71.
- [8] 韩秋菊,马宏飞,李薇.微波法提取黑木耳黄酮类化合物的研究[J].化学与生物工程,2011,28(11):54-56.
- [9] 徐秀忠,宋广磊.黑木耳多糖提取及多糖冲剂制备工艺研究[J].食品科技,2012,37(1):186-190.
- [10] 张不奇,孔祥辉,刘佳宁,等.黑木耳中总黄酮提取及含量测定[J].食用菌,2010,32(4):71-72.

科技论文写作规范——结果

利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据,只需强调或阐述其重要发现及趋势。