

协作中心报告的沙门菌血清型多达 2 501 个^[3]。目前国内外已有利用 PCR 方法对沙门菌进行检测的报道,但大多数选择的菌株血清型比较单一,选择的标本大多来源于食品,对人体菌株涉及很少,代表性较差。根据谢一俊等^[4] 1975—2003 年对人体(病人及健康带菌者)沙门菌监测结果,检出的 A~F 群血清型和菌株数分别占人体检出血清型和株数的 91.1% 和 99.3%,说明其具有较好的代表性,可用于验证 PCR 方法的敏感性和特异性。

本次研究选择沙门菌属特异基因 *hns* 及侵袭性基因 *invA* 作为扩增目的基因,所收集的 137 株沙门菌临床分离株都属于 A~F 群血清型,血清型别分布较广,代表性较好。通过优化 PCR 反应条件,得到 2 种基因的扩增条带,阳性率分别为 100% 和 99.3%,敏感性较好;而非沙门菌均未出现扩增条带,说明该方法的特异性高。

利用 PCR 方法检测人体标本中的沙门菌具有快速、灵敏

和特异的特点,适合沙门菌中等等突发事件的病人标本快速检测,有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Jones DD, Law R, Bej AK. Detection of Salmonella spp. in oysters using polymerase chain reaction (PCR) and gene probes[J]. Food Sci. 1993, 6: 1191-1197.
 [2] 焦豫良,张兴群,李振勇,等. 6 种食品致病菌的多重 PCR 检测[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(4): 256-258.
 [3] WHO. Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Antigenic Formulas of The Salmonella Serovars[R]. 8th ed. Paris: France, 2001.
 [4] 谢一俊,郑国魁,陈建辉,等. 福建省 1975—2003 年沙门菌监测结果分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2004, 10(6): 7-10.

收稿日期: 2008-11-19; 修回日期: 2009-01-15

(本文编辑: 李明芳)

文章编号: 1007-2705(2009)03-0057-03 中图分类号: R 284.1 文献标识码: B

【实验研究与检验技术】

HPLC-PDA 法测定不同系列灵芝产品中的腺苷含量

俞晓玲¹, 黄宏南^{1*}, 李晔², 张河溪²

摘要: [目的] 探索比较不同系列灵芝产品中腺苷的含量。[方法] 采用 HPLC-PDA 法测定灵芝中腺苷的含量,以 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液: 甲醇= 90: 10(V/V)为流动相, Ultimate AQ-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 260 nm 检测波长。[结果] 水提灵芝精粉中的腺苷含量达 0.2496%; 醇提灵芝精粉腺苷含量 0.1605%; 破壁灵芝孢子粉和未破壁灵芝孢子粉的腺苷含量相当,分别为 0.0139% 和 0.0134%; 灵芝菌粉中的腺苷含量为 0.0084%。[结论] 腺苷作为灵芝的重要功效成分之一,进行保健食品申报是可行的;把腺苷作为人工培植灵芝的质量控制标准之一也完全可行。

关键词: 灵芝; 腺苷; 高效液相色谱(HPLC); 二极管阵列检测器(PDA)

灵芝为担子菌纲多孔菌科(Polyporaceae)灵芝属(Ganoderma)真菌赤芝(Ganoderma lucidum Karst)、紫芝(Ganoderma sinense Zhou, Xu et Zhang)及松杉灵芝(Glitsugae Murrill)的干燥子实体。灵芝孢子含有大量的遗传物质;破壁后胞壁结构被破坏,胞内物质易被释放;灵芝菌粉是经现代生物工程(液体深层发酵)所得的干燥粉末,分为水提灵芝精粉和醇提灵芝精粉,均为灵芝子实体经提取、浓缩喷雾干燥制得。

灵芝的活性成分丰富,目前已分离的有数十种之多,主要有灵芝多糖、灵芝酸(三萜类)、腺苷、氨基酸、蛋白质、有机锗和微量元素等。腺苷是以核苷和嘌呤为基本构造的活性物质,是灵芝的主要有效成分之一^[1];药典中灵芝含量测定项下规定了灵芝多糖的质量控制指标^[2],但对腺苷的质控及含量未做规定,但在冬虫夏草中将腺苷作为其质量控制指标。本文采用 HPLC-PDA 法测定不同系列灵芝产品中腺苷的含量,现介绍如下。

第一作者简介:俞晓玲(1982-),女,2007 级硕士在读,药师,研究方向为保健食品分析。

作者单位: 1. 福建医科大学药学院药物分析系,福州 350004; 2. 福建仙芝楼生物科技有限公司,福州 350002。

* 通讯作者:黄宏南,博士,主任技师,福建医科大学药学院药物分析系,福州 350004。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪系统(Waters 2695 型),配全自动进样器,二极管阵列检测器(Waters 2996 型);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Beckman Coulter 离心机;MILLIPORE direct-Q 纯水系统;0.22 μm 微孔过滤膜(水系)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯);磷酸二氢钾(分析纯);超纯水;腺苷标准品(中国药品生物制品检定所);水提灵芝精粉,醇提灵芝精粉,破壁灵芝孢子粉,未破壁灵芝孢子粉,灵芝菌粉均为福建仙芝楼生物科技有限公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液: 甲醇= 90: 10(V/V);柱温 30 ℃;流速 1.5 ml/min;进样量 10 μl;检测波长 260 nm。

1.3.2 标准曲线的制备 精密称取腺苷标准品 10 mg,置 10 ml 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即为 1.0 mg/ml 的储备液。测定前用流动相分别稀释配成 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 mg/ml 的标准系列,过 0.22 μm 微孔滤膜后进样 10 μl 测定,以峰面积对腺苷标准溶液的浓度绘制标准曲线。

1.3.3 试样处理 精密称取试样 0.50 g,置于 25 ml 的容量瓶中,加入约 20 ml 的流动相为提取液,超声提取 20 min,取

出加入提取液定容至刻度,混匀后以 10 000 r/min 离心 3 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液放入进样瓶中,供 HPLC 测定。

1.3.4 测定及计算 取处理好的试样进样 10 μl,根据与标准溶液保留时间比较进行初步定性,以 PDA 光谱图比较做进一步定性,根据样品测定的色谱峰面积,在相应的标准曲线上计算出对应的含量,根据公式计算样品中腺苷的含量。

计算公式: $X = C \times V/m \times 10^{-3}$, 式中: X 为试样中腺苷的含量(mg/g); C 为根据标准曲线测得的腺苷的质量浓度(μg/ml); V 为试样定容体积(ml); m 为试样的质量(g)。

2 结果分析

2.1 样品测定结果 利用上述的条件方法测定了不同系列的灵芝产品中腺苷的含量,结果见表 1。

表 1 不同系列灵芝产品中腺苷的含量

样品名称	保留时间 (min)	含量 (%)
水提灵芝精粉	6.889	0.2496
醇提灵芝精粉	6.877	0.1605
破壁孢子粉	7.152	0.0139
未破壁孢子粉	7.085	0.0134
灵芝菌粉	6.910	0.0084

2.2 HPLC 色谱图 按照 1.3.1 项下的色谱条件进行测定,得到腺苷标准溶液和醇提灵芝精粉的 HPLC 色谱图,分别见图 1、2。由图可知,腺苷标准溶液的保留时间为 6.890 min,醇提灵芝精粉中腺苷的保留时间 6.877 min。

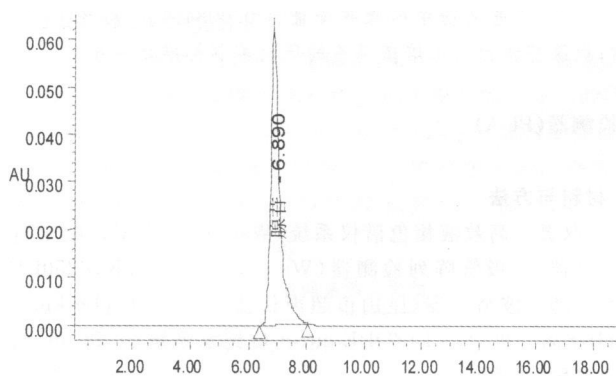


图 1 腺苷标准品 HPLC 色谱图

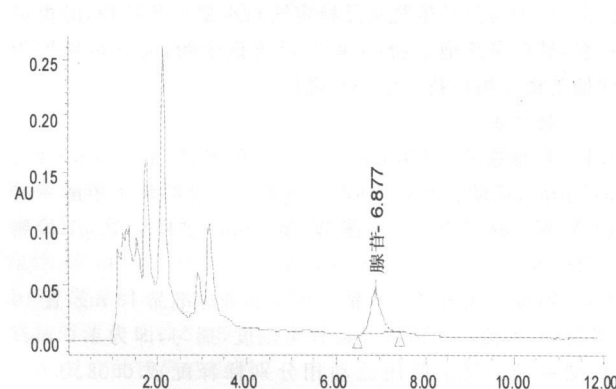


图 2 醇提灵芝精粉 HPLC 色谱图

2.3 PDA 光谱图 将腺苷标准溶液和醇提灵芝精粉样品在 200~500 nm 波长范围内扫描,测得腺苷在 259.8 nm 处有最大吸收,分别见图 3、4,确定腺苷的检测波长为 260 nm。

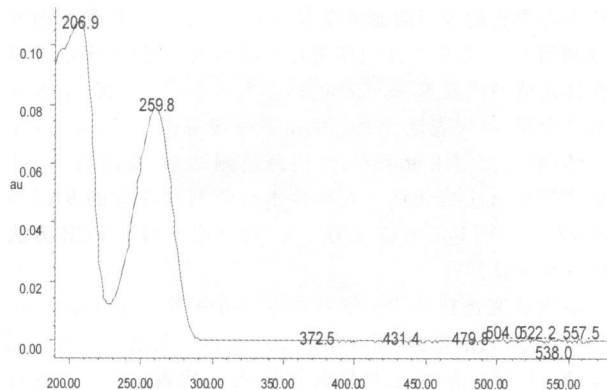


图 3 腺苷标准溶液 PDA 光谱图

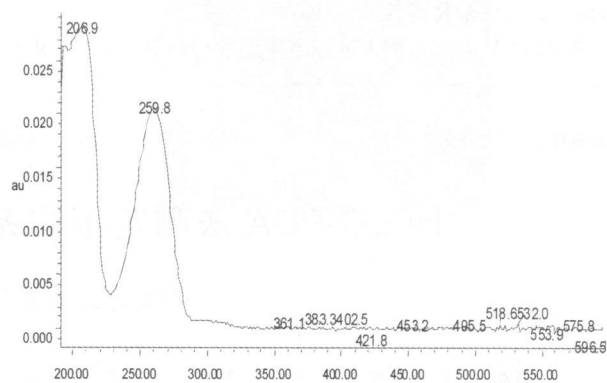


图 4 醇提灵芝精粉中腺苷 PDA 光谱图

2.4 方法性能指标的考察

2.4.1 标准曲线的线性 and 检测限 以 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 mg/ml 为标准系列,以峰面积对腺苷标准溶液的浓度绘制标准曲线,计算得回归方程 $Y = 2.05e + 0.07X - 1.66e + 0.04$, $r = 0.9997$ 。结果表明:腺苷溶液在 20.0~100.0 μg/ml 范围内具有良好的线性关系,当信噪比为 3:1 时,腺苷的检测限为 1.0 μg/ml。

2.4.2 精密度试验 为考察方法的精密度,在 5 个样品中选取了高中低 3 个含量的样品分别进行 6 次测定,腺苷含量测定结果见表 2。

表 2 精密度试验测定结果 (%)

编号	水提灵芝精粉	破壁孢子粉	灵芝菌粉
1	0.2496	0.0139	0.009
2	0.2547	0.0146	0.0082
3	0.2543	0.0148	0.0087
4	0.2455	0.0167	0.008
5	0.2468	0.0169	0.0086
6	0.2489	0.0155	0.0081
均值	0.2500	0.0154	0.0085
RSD (%)	1.52	7.79	4.25

2.4.3 回收率试验 取已测知含量的同一样品做高中低 3 个浓度的加标回收试验,每个浓度各做 3 份平行,本实验选取醇提灵芝精粉。结果:腺苷的平均回收率 99.91%,可满足分析要求,见表 3。

2.4.4 溶液稳定性试验 在本法的实验条件下,取腺苷标准溶液和同一份样品溶液各 10 μl,分别在 0、2、4、6、8、10、12、

14、16、18 和 24 h 进行测定, 结果表明腺苷标准溶液和样品溶液在室温 12 h 内基本稳定。若放置时间过长, 腺苷标准溶液 PDA 的光谱图上出现未分离的双峰现象, 且紫外扫描双峰波长均为 260 nm, 可能是降解所致, 故腺苷标准溶液和样品溶液均不宜久贮。

表 3 醇提灵芝精粉加标回收试验结果

本底值(mg)	加标量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	平均值
0.219	0.1	0.315	96.0	98.7
		0.317	98.0	
		0.321	102.0	
	0.2	0.425	103.1	102.7
		0.420	100.5	
		0.428	104.5	
	0.4	0.610	97.5	98.4
		0.613	97.8	
		0.618	99.8	

3 讨论

3.1 分析条件的选择 通过对提取腺苷的样品预处理研究, 提取方法、溶剂种类、甲醇体积分数, 以及提取时间对腺苷含量的测定结果都有一定的影响, 考虑到快速、简便以及经济环保等因素, 样品的最佳预处理方法为超声波提取法, 提取溶剂体积分数为 10% 的甲醇, 温度为室温, 处理时间 20 min。实验曾采用甲醇-水-乙腈体系作为流动相, 峰形不好; 采用甲醇-磷酸盐缓冲液= 3: 17^[2], 甲醇: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液= 10: 90^[3]体系作为流动相, 高比例磷酸盐的存在可能对泵和色谱柱造成损害, 故适当调整磷酸二氢钾的浓度, 使流动

相为甲醇: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液= 10: 90^[4], 腺苷保留时间适中, 不但得到良好的峰形, 腺苷吸收峰与样品其他峰分离效果较好, 色谱重现性也好, 且腺苷色谱峰无拖尾现象出现。

3.2 实验结论 根据腺苷的性质, 采用适当的提取分离方法, 用 HPLC-PDA 法测定不同形态系列灵芝产品中腺苷的含量获得了满意结果。对同一厂家不同系列灵芝产品中腺苷成分的分析, 其含量差别很大, 高的达 0.2496%, 低的仅 0.0084%。本研究显示腺苷是灵芝的重要功效成分之一, 进行保健食品申报是可行的。腺苷是虫草的主要活性成分, 是评价天然和人工虫草质量的主要指标之一, 有广泛的药用价值, 药典规定冬虫夏草中含腺苷 (C₁₀H₁₃N₅O₄) 不得少于 0.010%^[2], 而在灵芝含量测定项下规定了灵芝多糖的质量控制指标^[1], 对腺苷的质控及含量未做规定。本实验结果可知, 除灵芝菌粉未达到该标准外, 其他成分均超过该标准, 可见把腺苷作为人工培植灵芝的质量控制标准之一是可行的。

参考文献:

- [1] 张晓云, 杨春清. 灵芝的化学成分及药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21(4): 152-155.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 130, 75.
- [3] 唐勇, 周春菊. 高效液相色谱法测定灵芝口服液腺苷含量[J]. 中国药业, 2008, 17(10): 31-32.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价规范[S]. 2003: 300.

收稿日期: 2008-12-24; 修回日期: 2009-02-16

(本文编辑: 黄春燕)

(上接第 17 页) ② 维修车间未设置机械通风装置, 且存在通风不良、无专用化学品存放间等情况, 致使劳动者普遍存在交错接触不同的职业病危害因素, 也增加了接触的机会和时间; ③ 绝大部分维修车间的烤漆房未在醒目位置设置警示标识和中文警示说明; ④ 44 家企业中只有 13 家企业能提供本单位使用的化学品的化学成份; ⑤ 接触职业病危害因素的劳动者未作上岗前、在岗期间和离岗时的职业性健康检查。

调查结果表明, 福田辖区汽车维修企业存在的职业病危害因素中, 超过国家卫生标准的项目和作业点不多, 但仍存在着较多的职业卫生问题, 最重要的是职业病尚无专人负责, 未对职业病危害因素给予足够关注。随着近年汽修企业的发展, 从业工人的队伍将不断扩大, 其中苯、甲苯、二甲苯、溶剂汽油、电焊尘、噪声、高温及电焊弧光等职业病危害因素将对该职业人群的健康造成潜在危害。据有关文献报道, 汽修行业从事喷漆等工种的接触苯系物工人, 随作业工龄的增加, 发生白细胞总数减少、血小板减少、血红蛋白减少, 并且出现临床症状的工人数逐年增加^[6]。

针对福田辖区汽车维修行业的职业卫生现状, 笔者建议采取预防对策和措施: ① 卫生行政部门加

快制定汽车维修行业职业卫生管理规定, 将辖区汽车维修企业职业卫生工作纳入规范管理; ② 卫生行政部门应加强职业病防治宣传力度, 对企业负责人必须进行专门的职业卫生管理等理论知识的培训和指导, 提高认识, 从而加强行业自律, 切实保护劳动者的健康权益; ③ 企业根据自身特点, 建立、健全企业内的职业卫生管理机构, 充实职业卫生管理人员, 具体落实职业卫生工作。

参考文献:

- [1] GBZ 2.1-2007. 工作场所有害因素职业接触限值第 1 部分: 化学有害因素[S].
- [2] GBZ 2.2-2007. 工作场所有害因素职业接触限值第 2 部分: 物理因素[S].
- [3] 李秋荣, 魏云芳, 聂玲. 4S 店汽修车间职业卫生现状分析[J]. 中国卫生监督杂志, 2008, 15(3): 207-210.
- [4] 李明. 某汽修厂汽油接触人员神经衰弱症状的调查[J]. 内蒙古预防医学, 2000, 25(3): 113.
- [5] 阎革彬, 钱旭东. 机油、润滑油对 109 名汽车维修工健康的影响[J]. 职业与健康, 2008, 24(9): 839-840.
- [6] 李盛, 王金玉, 韩振剂, 等. 兰州市某汽车维修厂苯作业职工 10 年健康检查情况分析[J]. 卫生职业教育, 2005, 23(16): 119-120.

收稿日期: 2008-11-18; 修回日期: 2009-02-14

(本文中文编辑: 方林; 英文编辑: 范新宇)