

高效液相色谱法同时测定虫草素和腺苷

尚红霞*, 梁 晨, 易 娟

(广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510090)

摘 要:本文用微波法提取蛹虫草培养基和子实体中的虫草素及腺苷,并利用高效液相色谱法同时测定虫草素和腺苷。选择 Inertsil ODS-SP 柱(150×4.6 mm, 5 μ m)为色谱柱,乙腈-水为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 35℃,二极管阵列检测器(DAD)检测,检测波长 260 nm,进样量 10 μ L。在 2~10 μ g/mL 浓度范围内,虫草素和腺苷线性关系良好,其相关系数分别为 0.9998 和 0.9992。虫草素和腺苷的回收率分别是 63.30%~67.11%和 63.97%~70.39%,相对标准偏差分别是 0.56%~1.97%和 0.94%~1.97%,检出限分别是 0.19 μ g/mL 和 0.02 μ g/mL。

关键词:高效液相色谱;微波提取;虫草素;腺苷

中图分类号:O657.7⁺2 **文献标识码:**A

虫草素和腺苷是虫草的主要活性成分,虫草素具有抗病毒和肿瘤等作用^[1],腺苷具有改善心脑血管血液循环、抑制中枢神经递质释放等多种活性^[2]。虫草素和腺苷的结构式见图 1。蛹虫草子实体已广泛用于虫草类保健品中,从蛹虫草培养基中提取虫草素和腺苷的应用也日益增多。目前,国内对于虫草类产品中有效成分测定方法的研究逐渐深入,常用的测定方法有高效液相色谱法(HPLC)^[3],薄层色谱法^[4]等,且大多数是单一组分分析,操作繁琐、费时,而用 HPLC 同时测定虫草素和腺苷的报道较少。随着市场中虫草类产品的日益增多,研究和开发快速测定虫草制品中多种有效成分的检测方法,显得尤为重要。

实验建立了微波提取 HPLC 同时测定虫草素和腺苷的方法,并将其应用于蛹虫草培养基和子实体等的样品分析,该法分离时间短,有机溶剂消耗少,分离效果好。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(日本,岛津公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);WG700CSL2011-K6 微波炉(格兰仕)。

虫草素及腺苷标准品均为美国 Sigma 公司产品,纯度均大于 99%。乙腈、甲醇均为色谱纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP 柱(150×4.6 mm, 5 μ m),柱温:35℃,流动相:乙腈:水=8:92(V/V),流速:1.0 mL/min,进样量:10 μ L,检测波长:260 nm。采用峰面积外标法定量。

1.3 样品的制备

把蛹虫草培养基(广东新会现代农业发展公司)或蛹虫草子实体(江门新康虫草有限公司)置于 60℃

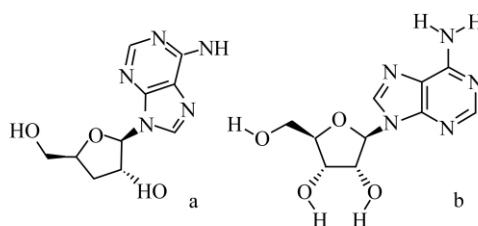


图 1 虫草素(a)腺苷(b)的结构式
Fig. 1 Structural formulas of cordycepin (a) and adenosine (b)

烘箱恒温 24 h 后,取出,粉碎,过 60 目筛,将过筛后的干粉放入试剂瓶中并置于干燥器中保存。准确称取干粉样品于 100 mL 具塞三角瓶中,加入适量纯水,放入微波炉中,微波数分钟,取提取液作 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理方法的选择

分别采用水浴法、超声波法和微波法用水或乙醇对样品进行提取,其中以微波法用水提取的时间最短、提取率最高。这是因为样品在吸收了微波能之后,细胞内部温度迅速上升,以致细胞破裂,细胞内部活性成分自由流出,从而达到在较短时间内提取有效物质的目的。当用乙醇微波提取时,由于乙醇沸点较低,样品容易溅射,提取效果较差。微波提取正交实验结果表明,当样品量:提取液=1:10(*m/V*),微波功率 40 W,提取时间 3 min 时,虫草素和腺苷的提取率均较高。

2.2 检测波长的选择

用紫外可见分光光度法分别测定虫草素和腺苷的紫外吸收,发现虫草素和腺苷分别在波长 260 nm 和 259 nm 处有较大吸收,因此确定检测波长为 260 nm。

2.3 流动相的选择

分别试验了甲醇-水、乙腈-水为流动相分离虫草素和腺苷。当用甲醇-水作流动相时,虫草素与腺苷的峰形较差,而用乙腈-水时虫草素和腺苷标准品的峰形窄且对称,分离效果较好。当乙腈和水的体积比为 10:90 时,虫草素和腺苷的出峰时间较快且太接近,彼此有干扰。随着流动相中乙腈比例的减少,虫草素和腺苷的保留时间逐渐增加。当流动相中乙腈和水的体积比为 8:92 时,虫草素和腺苷在 10 min 内洗脱出来,两者受杂峰干扰少。图 2 为腺苷、虫草素浓度均为 6 μg/mL 的混合标准溶液色谱图,图 3 为 2 g 蛹虫草培养基干粉样品微波提取液色谱图,其中虫草素的分离度为 5.145,腺苷的分离度为 5.884。

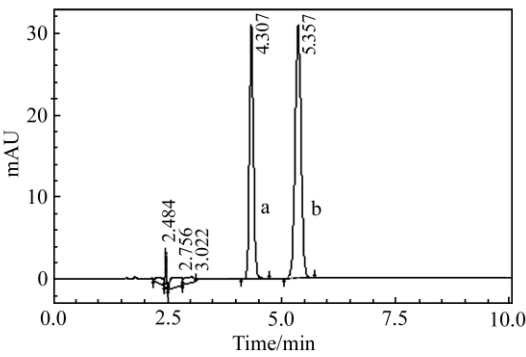


图 2 标准品的 HPLC 图
Fig. 2 Chromatogram of standard
a. Adenosine; b. Cordycepin.

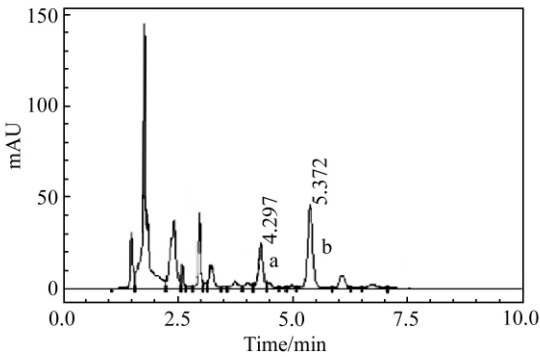


图 3 样品的 HPLC 图
Fig. 3 Chromatogram of sample
a. Adenosine; b. Cordycepin.

2.4 标准曲线

配制浓度分别为 2、4、6、8、10 μg/mL 的虫草素和腺苷的混合标准溶液,按上述实验方法进行测定,以峰面积对各组分浓度作标准曲线,其线性范围为 2.9~10.0 μg/mL,回归方程分别为: $y=25776x+3383.2$ 和 $y=23359x-2235.7$,相关系数分别为 0.9998 和 0.9992。以 3 倍信噪比计算虫草素和腺苷的检出限 (LOD)分别为 0.19 μg/mL 和 0.02 μg/mL。

2.5 回收率实验

取蛹虫草培养基样品,按实验方法测定,计算标准回收率和相对标准偏差,结果见表 1。表 1 中的回收率较低,其原因可能是提取过程中虫草素及腺苷发生部分降解。

表 1 样品的回收率(*n*=3)
Table 1 Recovery of sample (*n*=3)

Component	Sample content (μg/mL)	Added (μg/mL)	Found (μg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Cordycepin	150.61	75	198.34	63.64	1.97
Cordycepin	150.61	150	245.57	63.3	0.56

(续表 1)

Component	Sample content ($\mu\text{g/mL}$)	Added ($\mu\text{g/mL}$)	Found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Cordycepin	150.61	225	301.61	67.11	0.99
Adenosine	121.05	60	160.49	65.74	1.29
Adenosine	121.05	120	197.82	63.97	1.97
Adenosine	121.05	180	247.75	70.39	0.94

2.6 样品分析

取蛹虫草培养基和蛹虫草子实体(不同批次)样品,按实验方法测定,结果见表 2。

表 2 样品分析结果 (n=3)
Table 2 Analytical results of samples (n=3)

Sample	Component	Content ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	Sample	Component	Content ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)
Culture medium of cordyceps militaris	Cordycepin	150.61	1.36	Cordyceps 2	Cordycepin	1 803.51	0.44
	Adenosine	121.05	1.65		Adenosine	1 923.18	1.97
Cordyceps 1	Cordycepin	748.43	1.34				
	Adenosine	1 362.45	1.35				

3 结论

本文采用微波法提取蛹虫草培养基及子实体中的虫草素及腺苷,建立了高效液相色谱同时测定样品中腺苷及虫草素含量的方法。与之前所报道的检测方法相比,采用微波法前处理使得提取时间大大缩短,并可同时检测两种成分,可用于虫草类产品的质量分析。

参考文献:

[1] ZHANG Yong-kang(张永康), HU Jiang-yu(胡江宇), OUYANG Hui(欧阳辉), YIN Yong-zhong(银永忠), ZHAO Jian-wen(赵建文). Journal of Food Science(食品科学)[J], 2006, 27(7):199.

[2] MAO Xin-liang(毛新亮), ZHENG Guo-dong(郑国栋), ZHANG Chen(张晨), GUO Xiao-lei(郭晓蕾). Central South Pharmacy(中南药学)[J], 2009, 7(12):895.

[3] Ni He, Zhou Xiao-Hong, Li Hai-Hang, Huang Wen-Fang. Journal of Chromatography B[J], 2009, (887):2135.

[4] WENG Liang(翁梁), WEN Lu(温鲁). Jiangsu Journal of Agriculture Science(江苏农业学报)[J], 2008, 24(4):539.

Simultaneous Determination of Cordycepin and Adenosine
by High Performance Liquid Chromatography

SHANG Hong-xia*, LIANG Chen, YI Juan

(Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University
of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract: Cordycepin and adenosine from the culture medium of cordyceps militaris and cordyceps were separated by microwave extraction. Their concentrations were determined by high performance liquid chromatography. The chromatographic separation was achieved on a Inertsil ODS-SP column (150×4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile-water as the mobile phase with a flow rate of 1 mL/min at 35℃, a diode array detector (DAD) with 260 nm and a injection volume of 10 μL . The calibration curves of cordycepin and adenosine were linear over the concentration range of 2~10 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficients were 0.9998 and 0.9992. The standard recoveries were 63.30%~67.11% and 63.97%~70.39% with the RSDs of 0.56%~1.97% and 0.94%~1.97%, and the LODs were 0.19 $\mu\text{g/mL}$ and 0.02 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Keywords: High performance liquid chromatography; Microwave extraction; Cordycepin; Adenosine