

蛹虫草及其培养残基中腺苷和虫草素含量的快速测定

李 辰^{1,2*}, 闫爱国³, 蔡春燕⁴, 刘志平²

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006; 2. 五邑大学分析测试中心, 广东 江门 529020;

3. 江门市农产品质量监督检验测试中心, 广东 江门 529000; 4. 江门市农业环境监测站, 广东 江门 529000)

摘要: 建立了以氰基正相色谱柱反相条件下快速分析腺苷和虫草素的方法。以微波辅助提取蛹虫草及其培养残基样品, 每次提取 1.5 min, 共提取 2 次。采用 Eclipse XDB-CN 色谱柱测定提取液中腺苷和虫草素的含量, 以甲醇-水 (7:93, v/v) 为流动相进行等度洗脱, 检测波长 260 nm, 并考察和分析了影响分离性能的流动相组成和 pH 值。结果腺苷和虫草素在 4.5 min 内实现完全分离且无基质干扰。腺苷和虫草素在线性范围内线性关系良好, 线性相关系数 r^2 分别为 0.999 8 和 0.999 5, 定量限 (以 10 倍信噪比计) 分别为 0.21 mg/L (腺苷) 和 0.083 mg/L (虫草素)。该方法日内和日间精密度的相对标准偏差 (RSD) 小于 2%; 腺苷和虫草素的平均加标回收率为 93.8% ~ 102.9%, RSD 值不大于 3.62% ($n=5$)。本方法简便、快速、准确、成本低, 可用于冬虫夏草、蛹虫草子实体、虫草培养残基及虫草制剂中腺苷和虫草素含量的快速测定。

关键词: 正相色谱柱; 腺苷; 虫草素; 蛹虫草; 培养残基

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012) 07-0711-05

Fast determination of adenosine and cordycepin in *Cordyceps* and its deserted solid medium

LI Chen^{1,2*}, YAN Aiguo³, CAI Chunyan⁴, LIU Zhiping²

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Instrumental Analysis & Research Center, Wu Yi University, Jiangmen 529020, China;

3. Jiangmen Quality Supervision and Inspection Center for Agricultural Products, Jiangmen 529000, China;

4. Jiangmen Monitoring Center for Agricultural Environment, Jiangmen 529000, China)

Abstract: A fast analytical method for adenosine and cordycepin in *Cordyceps* and its deserted solid medium was developed by using a normal-phase cyan-group chromatographic column. The sample was extracted for 1.5 min using a microwave-assisted extraction system. The extraction was repeated twice. The analysis of adenosine and cordycepin was performed on an Eclipse XDB-CN column. The mobile phase was composed of methanol and water with a ratio of 7:93 (v/v) for isocratic elution. The detection wavelength was 260 nm. The composition and pH value of the mobile phase were investigated. The results showed that adenosine and cordycepin could be completely separated without matrix interference in 4.5 min. The linearity of the method was good with a linear correlation coefficient (r^2) of 0.999 8 for adenosine and 0.999 5 for cordycepin. The limits of quantification (LOQs, $S/N=10$) of adenosine and cordycepin were 0.21 and 0.083 mg/L, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of peak areas of six replicate injections were less than 2% both for intra-day and inter-day analysis. The average recoveries of adenosine and cordycepin ranged from 93.8% to 102.9% with the RSD not more than 3.62% ($n=5$). The developed method is simple, fast, accurate and low-cost, and it can be used in the fast detection of adenosine and cordycepin in *Cordyceps*, carphole, the deserted solid medium and its praeparatum.

Key words: normal-phase chromatographic column; adenosine; cordycepin; *Cordyceps*; deserted solid

* 通讯联系人: 李 辰, 博士, 讲师, 主要从事天然产物有效成分提取纯化工艺及质控方法的研究。Tel: (0750) 3296426, E-mail: simonlee@163.com.

基金项目: 广东高校优秀青年创新人才培育项目 (LYM09130) 和五邑大学博士启动项目 (30613016)。

收稿日期: 2012-02-27

medium

蛹虫草是一种国内外公认的药食两用真菌,具有显著的医疗保健功效。虫草的主要活性成分包括核苷、多糖、蛋白质、甾醇等^[1],其中核苷类化合物是近年国内外研究的热点。核苷类化合物包括虫草素、腺苷、鸟苷、肌苷等。虫草素(cordycepin),即3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine),又称虫草菌素,具有抗病毒^[2]、抑制肿瘤生长^[3]、抗炎^[4]等多种生理活性。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^[5],已被中国药典作为冬虫夏草及其制品的质控指标。因此,虫草素和腺苷含量的快速准确测定尤为重要。腺苷和虫草素的分子结构见图1。

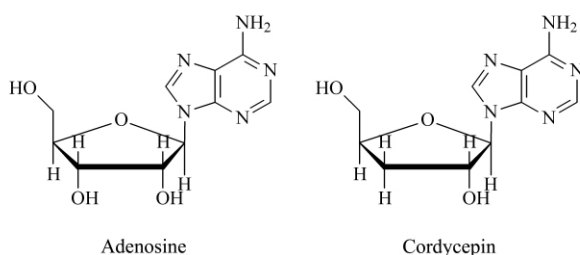


图1 腺苷和虫草素的分子结构

Fig. 1 Structures of adenosine and cordycepin

目前,文献报道和中国药典规定的虫草素和腺苷含量测定方法主要为高效液相色谱(HPLC)法^[6-12],大都采用C₁₈色谱柱在反相条件下进行分离,这些方法大多存在流动相组成较复杂(多数含有缓冲盐)、分离时间较长(多数用梯度洗脱)等问题。除HPLC法外,还有薄层扫描法^[13]、毛细管电泳法^[14,15]、高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法^[16]等,然而这些方法存在操作较复杂、仪器价格昂贵、对操作人员专业素质要求高等问题。截至目前,尚未见到以正相色谱柱分离测定虫草素和腺苷的文献报道。本研究建立了以普通正相色谱柱(氰基柱)在反相条件下快速分离测定腺苷和虫草素含量的方法,并应用于蛹虫草及其大米培养残基中腺苷和虫草素的含量检测。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

Finnigan Surveyor 高效液相色谱仪 配有自动进样器、四元泵、光电二极管阵列(PDA)检测器、色谱工作站等(美国 Thermo Scientific 公司); WBFY 201 型微波反应器(巩义市科瑞仪器有限公司); KQ-300VDV 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声波

仪器有限公司); BZF50 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); 旋转蒸发仪 RE-52A 型(巩义市英峪予华仪器厂); SHZ-D(III) 循环式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); XP205 电子天平(梅特勒-托利多公司); QE-200 万能粉碎机(浙江屹立工贸有限公司)。

宝农堂人工蛹虫草子实体及蛹虫草大米培养残基(广东新会农业基地有限公司), 正康春人工蛹虫草子实体(广东新会区会城正康生物科技中心)。

对照品: 腺苷(批号 110879-200202) 和虫草素(批号 858-200202) 购自中国药品生物制品检定所。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Burdick & Jackson 公司); 无水乙醇(分析纯,广州化学试剂二厂)、石油醚(60~90℃,汕头西陇化工)、醋酸(美国 Fluka 公司); 水为超纯水(美国 Millipore 公司)。

1.2 对照溶液配制

精密称取腺苷对照品 4.0 mg、虫草素对照品 2.2 mg, 分别置于 10 mL 容量瓶中,用纯水溶解并稀释至刻度,制成腺苷和虫草素质量浓度分别为 0.40 g/L 和 0.22 g/L 的对照品储备液,置于 4℃ 冰箱中备用。

使用前,分别量取一定体积的对照品储备液,以纯水逐级稀释至腺苷质量浓度分别为 0.40、0.080、0.040、0.008 0、0.001 6、0.000 32 g/L 和虫草素质量浓度分别为 0.22、0.044、0.022、0.004 4、0.000 88、0.000 18 g/L 的标准工作溶液。

1.3 样品前处理

1.3.1 蛹虫草子实体 精密称取经干燥、粉碎、过筛(选 60~100 目颗粒)后的蛹虫草子实体样品 2.0 g,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 40% (v/v) 乙醇水溶液浸泡 30 min 后,置于微波反应器中,在 400 W 功率下微波提取 1.5 min,减压抽滤,提取 2 次。合并两次滤液,滤液经减压蒸除乙醇后,以纯水定容至 50 mL。

1.3.2 蛹虫草大米培养残基 虫草大米培养残基样品经 60℃ 下真空干燥和粉碎后,选取 60~100 目样品颗粒,以石油醚回流脱脂,脱脂样品经过过滤和风干后,精密称取 2.0 g,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,以下同 1.3.1 节处理方法。

1.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-CN(150 mm × 4.6 mm, 5 μm; Agilent 公司); 柱温: 30℃; 流动相: 甲醇-水(7:93, v/v); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长:

260 nm; 进样量: 5 μ L。

2 结果与讨论

2.1 提取方法选择

超声波和微波对虫草素的提取率与回流和渗滤提取法相当^[17,18], 然而, 超声波和微波具有快速提取、省时省力等优点。故本实验分别考察了微波提

取两次、超声波提取两次、先微波提取再超声波提取以及先超声波提取再微波提取等组合提取方法(见表 1)。由提取物中腺苷和虫草素的含量可知, 各组合提取方式的提取率无显著差别, 微波提取两次的提取率略高, 且提取两次的总耗时仅 3 min, 故选择微波提取两次作为最佳提取方案, 以实现腺苷和虫草素的快速提取。

表 1 不同组合提取方法的提取结果

Table 1 Extraction results with different combined extraction methods

Combined extraction method	Average content of adenosine ¹⁾ / (mg/g)	Average content of cordycepin ¹⁾ / (mg/g)	Total extraction time ²⁾ / min
Twice microwave	0.392	0.295	3.0
Twice ultrasonic wave	0.370	0.286	80.0
Microwave-ultrasonic wave	0.375	0.285	41.5
Ultrasonic wave-microwave	0.366	0.254	41.5

1) $n = 3$; 2) only at the extraction time using microwave or ultrasonic wave.

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱选择 目前, 2010 版中国药典和文献报道的测定腺苷和虫草素的方法大都采用 C_{18} 色谱柱, 流动相中需要加入磷酸缓冲盐^[8-10], 梯度洗脱^[7,12], 分析时间相对较长(多数在 18 min 以上)。由图 1 中虫草素和腺苷的分子结构可知, 其分子中存在氨基和羟基, 极性相对较大, 故考虑选择正相色谱柱在反相条件下分析。通过比较 C_{18} 柱和氰基柱在反相条件下对实际样品的分离能力和分析时间, 最终确定选用氰基柱, 实现了腺苷和虫草素的快速良好分离。

2.2.2 流动相组成 在未添加任何缓冲盐的情况下, 比较了氰基柱上甲醇-水和乙腈-水两个常规反相体系对分离的影响。结果发现甲醇-水体系即可初步满足分离要求。腺苷、虫草素及其干扰组分的极性相对较大, 根据相似相溶原理, 氰基柱上的极性官能团($-\text{CN}$) 对待测组分的保留能力较大, 故适当减小流动相中甲醇的比例, 可降低流动相对腺苷和虫草素的洗脱能力, 从而增加分离度。考察流动相中水的体积分数分别为 85%、90% 和 93% 时待测组分峰的分离情况(见图 2), 当水的比例为 85% 时, 腺苷和干扰物分不开; 水比例增加至 90% 时, 分离度有所增加; 进一步增加至 93% 时, 腺苷、干扰物及虫草素可完全分离, 色谱分析时间少于 4.5 min。此外, 该流动相还具有有机溶剂含量低、成本低、毒性小的优点。

2.2.3 流动相 pH 值 腺苷和虫草素分子中有多个羟基和一个氨基(见图 1)。酸性条件下, 随流动相 pH 减小, 目标组分中羟基的解离被抑制, 同时氨基离子化程度增加, 整个分子存在对羟基解离的抑

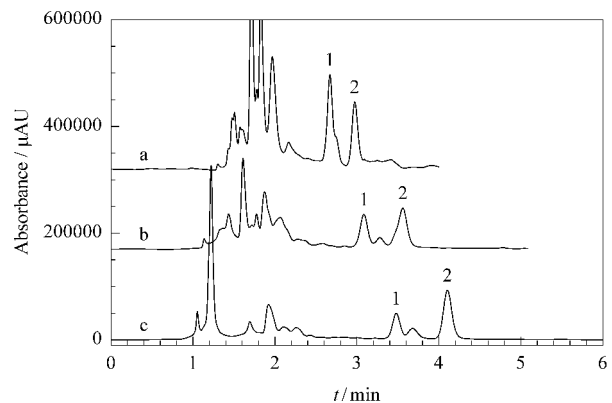


图 2 流动相中水含量对分离的影响

Fig. 2 Influences of water content in mobile phase on the separation

Column: Eclipse XDB-CN column (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); column temperature: 30 $^{\circ}\text{C}$; flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 260 nm; sampling size: 5 μ L; mobile phases: pH = 7, a. methanol-water (15:85, v/v), b. methanol-water (10:90, v/v), c. methanol-water (7:93, v/v); sample solvent: water.

Peaks: 1. adenosine; 2. cordycepin.

制作用与氨基离子化的竞争作用, 因此, 有必要对体系的 pH 值进行优化。向流动相中加入醋酸, 使流动相 pH 分别为 2、3、4、5、7, 考察虫草素和腺苷的分离情况(见图 3)。由图 3 可知, 腺苷和虫草素的分离度随 pH 值的增加而增加。推测原因可能是目标分子中的羟基在酸性和中性条件下均以分子形式存在(即 $-\text{OH}$), 目标分子的氨基($-\text{NH}_2$) 与色谱柱固定相上的氰基($-\text{CN}$) 在酸性条件下均以配合阳离子形式存在(即 $-\text{NH}_3^+$ 和 $-\text{C}\equiv\text{N}^+$), 二者之间未形成范德华吸附力或氢键作用力, 腺苷和虫草素不被色谱柱保留, 峰分离度较低。当流动相 pH 值逐渐增加时, $-\text{NH}_3^+$ 和 $-\text{C}\equiv\text{N}^+$ 分别由离子形式向分子形式转化(形成 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{C}\equiv\text{N}$), 此时 $-\text{NH}_2$ 和

-C≡N中的N原子外层均具有未共用电子对,目标分子中氨基与色谱柱固定相羧基之间的范德华吸附力和氢键作用力显著提高,组分保留能力增加,色谱峰分离度亦增加。故最终选定pH 7.0,即不向体系内加入醋酸为优化后的流动相。

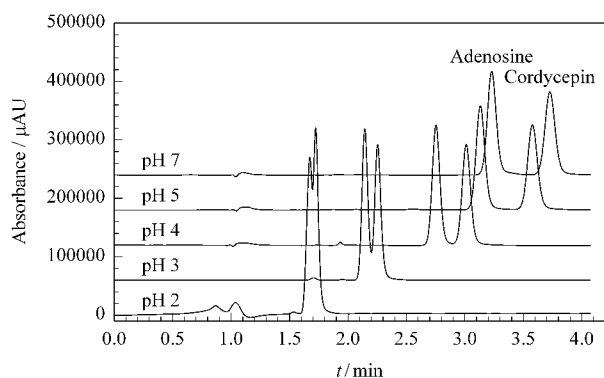


图3 不同pH条件下腺苷和虫草素的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of adenosine and cordycepin at different pH values

Mobile phase: methanol-water (7:93, v/v) with different pH (2-7). Other conditions were the same as in Fig. 2.

2.2.4 供试品溶剂 实验发现,供试品经40%乙醇提取后直接进行色谱分析导致色谱峰形变差,与对照品的保留时间也有偏差(见图4)。其原因可能是流动相极性相对较大(含水体积93%),与样品提取液(40%乙醇)的极性差别较大,直接进样导致样品中部分溶质析出,造成腺苷和虫草素分析重现性下降,出峰时间提前,峰形展宽,导致色谱峰分离度下降,不利于目标化合物的准确定性和定量。因此,后续实验中将提取液中的乙醇减压蒸除,以纯水定容,以消除供试品溶剂的影响。

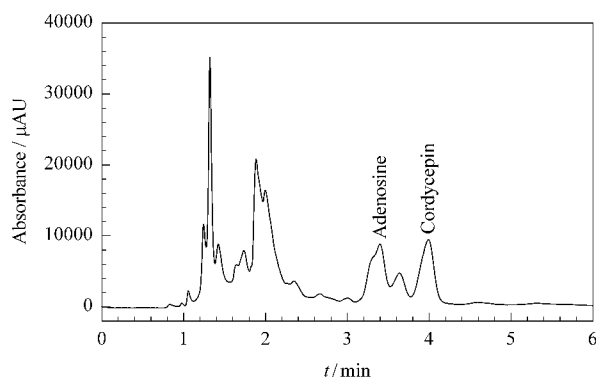


图4 供试品溶剂为40%乙醇时的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of the test sample dissolved with 40% ethanol

Mobile phase: pH = 7, methanol-water (7:93, v/v); sample solvent: ethanol-water (40:60, v/v). Other conditions were the same as in Fig. 2.

2.3 腺苷和虫草素含量测定

2.3.1 线性关系、检出限和定量限 将配制好的腺苷和虫草素标准工作溶液,按1.4节色谱条件进样分析,以质量浓度值(g/L)为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。结果显示:腺苷线性方程为 $y = 5.4 \times 10^7 x + 65\,237$,在0.00032~0.40 g/L范围内线性关系良好,相关系数 r^2 为0.9998;虫草素线性方程为 $y = 6.1 \times 10^7 x + 84\,509$,在0.00018~0.22 g/L范围内线性关系良好, r^2 为0.9995。按信噪比(S/N)为3计,本方法腺苷和虫草素的检出限(LOD)分别为0.064 mg/L和0.025 mg/L。按信噪比(S/N)为10计,本方法腺苷和虫草素的定量限(LOQ)分别为0.21 mg/L和0.083 mg/L。

2.3.2 精密度 准确吸取1.2节标准工作溶液5 μL,按1.4节色谱条件连续进样分析6次,计算得知腺苷和虫草素峰面积的日内精密度分别为0.58%和0.67%。标准工作溶液每天进样2次,连续测定3天,计算得知腺苷和虫草素峰面积的日间精密度分别为1.25%和1.57%。

2.3.3 重复性 分别以蛹虫草子实体和培养残基为考察对象,按1.3节方法进行重复性试验,平行提取6份样品,HPLC测定结果显示腺苷测定值的相对标准偏差(RSD)为2.4%,虫草素测定值的RSD为1.7%,表明样品前处理和分析方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性 按1.3节方法分别进行蛹虫草子实体和培养残基样品的提取试验,每隔2 h测定1次提取溶液,共测定6次,计算得知提取液中腺苷测定值的RSD小于0.73%,虫草素测定值的RSD小于0.57%,表明样品在12 h内的稳定性良好。

2.3.5 回收率 向已知含量的蛹虫草子实体样品中添加一定质量的腺苷和虫草素对照品,按1.3节方法进行提取,测定结果见表2。由表2结果可知方法的准确度良好,腺苷和虫草素的加标回收率为93.8%~102.9%,RSD不大于3.62%。

2.3.6 含量测定结果 对供试的两种蛹虫草子实体和培养残基样品分别进行提取和含量测定,每种

表2 回收率试验结果(n=5)

Table 2 Results of the recovery test (n=5)

Compound	Original/ mg	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %	RSD/ %
Adenosine	0.56	1.52	2.14	102.9	2.71
		0.66	1.17	95.9	3.28
		0.13	0.65	94.2	3.62
Cordycepin	0.52	1.85	2.34	98.7	1.65
		0.53	1.01	97.1	2.82
		0.12	0.60	93.8	3.15

样品重复测定 3 次,结果见表 3。由表 3 数据可知子实体中腺苷和虫草素的含量显著高于培养残基中

的含量,不同厂家的子实体中腺苷和虫草素的含量不同。图 5 为对照品和培养残基供试品的色谱图。

表 3 3 个样品的测定结果($n=3$)

Table 3 Determination results of three samples ($n=3$)

Compound	Carpohole of Baonong Tang		Carpohole of Zhengkang Chun		Deserted solid medium	
	Content/(mg/g)	RSD/%	Content/(mg/g)	RSD/%	Content/(mg/g)	RSD/%
Adenosine	1.50	2.20	1.30	2.45	0.39	2.97
Cordycepin	2.49	1.78	1.24	3.24	0.31	2.54

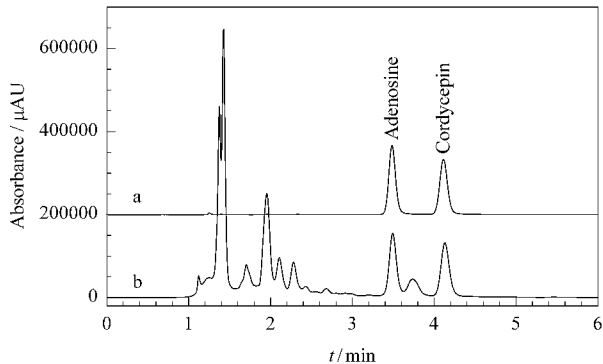


图 5 (a) 对照品和(b) 蛹虫草培养残基样品的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of (a) the standards and (b) a sample of deserted solid medium of *Cordyceps*

Column: Eclipse XDB-CN column; column temperature: 30 °C; flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 260 nm; sampling size: 5 μL; mobile phase: pH 7, methanol-water (7:93, v/v); sample solvent: water.

3 结语

本文建立了甙基固定相、反相流动相条件下快速分离检测腺苷和虫草素的方法,并对影响分离的流动相组成和 pH 值进行了优化和讨论。样品微波提取时间 3 min,色谱分析时间仅 4.5 min,较中国药典和文献报道的色谱分析时间(约 12~38 min)大为缩短,具有简便、快速、流动相低毒、有机溶剂含量低等优点,适用于冬虫夏草、蛹虫草及其培养残基中腺苷和虫草素的快速检测,可作为虫草系列产品研发和生产质控参考方法。

致谢 感谢合作导师广东工业大学轻工化工学院张焜教授对本文工作的帮助和指导。

参考文献:

- [1] Liu G Q, Wang X L, Yang Q, et al. Food Science and Technology (刘高强, 王晓玲, 杨青, 等. 食品科技), 2007(1): 202
- [2] Russell R, Paterson M. Phytochemistry, 2008, 69(7): 1469

- [3] Chen Y, Chen Y C, Lin Y T, et al. J Agric Food Chem, 2010, 58(22): 11645
- [4] Kim H G, Shrestha B, Lim S Y, et al. Eur J Pharmacol, 2006, 545(2/3): 192
- [5] Zhang X H, Shi W F, Hu J H. Journal of Chinese Medicinal Materials (张兴辉, 石为夫, 胡晋红. 中药材), 2000, 23(11): 722
- [6] Gu Z Y, Wu X M, Zhang H. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (顾振宇, 吴雪美, 张虹. 中国食品学报), 2007, 7(3): 144
- [7] Li X L, Hu J S, Chen Z H. Journal of Natural Science of Hunan Normal University (李祥玲, 胡劲松, 陈作红. 湖南师范大学自然科学学报), 2010, 33(2): 107
- [8] Wang L, Chen W D. Research and Practice on Chinese Medicines (王利, 陈卫东. 现代中药研究与实践), 2010, 24(5): 72
- [9] Ding X R, Ti G L, Yang L, et al. Food and Fermentation Industries (丁献荣, 提高兰, 杨琳, 等. 食品与发酵工业), 2010, 36(9): 143
- [10] Xia M, Yin Q F, Wen L, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (夏敏, 尹起范, 温鲁, 等. 理化检验: 化学分册), 2007, 43(5): 386
- [11] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1. Beijing: China Medical Science Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010: 106
- [12] Lu D, Luo F, Chi Y M, et al. Chinese Journal of Chromatography (陆丹, 罗芬, 池玉梅, 等. 色谱), 2011, 29(1): 83
- [13] Weng L, Wen L. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences (翁梁, 温鲁. 江苏农业学报), 2008, 24(4): 539
- [14] Wang T C, Zhang H Y, Li R X. China Sericulture (汪泰初, 张和禹, 李瑞雪. 中国蚕业), 2010(3): 10
- [15] Shi Q, Chen J H, Li X, et al. Chinese Journal of Chromatography (史倩, 陈军辉, 李鑫, 等. 色谱), 2011, 29(6): 481
- [16] Yang Z, Chi S Y, Zhang C H, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (杨钊, 迟少云, 张春辉, 等. 中国中药杂志), 2007, 32(19): 2018
- [17] Han J H, Yang S F, Sun J H, et al. North Sericulture (韩建华, 杨淑芳, 孙继红, 等. 北方蚕业), 2011, 32(4): 24
- [18] Wu Y, Chen W D, Wang L, et al. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal (吴勇, 陈卫东, 王利, 等. 安徽医药), 2010, 14(3): 284