

冬虫夏草功能因子 HPLC-PDA 快速同时定性定量法研究

黄宏南¹, 华永有¹, 林宏琳¹, 宋弘², 罗慧²

摘要: [目的] 建立保健食品中腺苷和虫草素同时高效液相色谱(HPLC)法初步定性, 二极管矩阵检测器(PDA)进一步定性。[方法] 色谱条件: Ultimate AQ-C18 色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm), 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液: 甲醇(90:10, v/v), 检测波长 260 nm。[结果] 腺苷和虫草素在 1.0~100.0 μg/ml 范围内线性良好, 腺苷回收率为 93.6%, 虫草素回收率为 96.9%, 相对标准偏差分别为 1.10% 和 3.05%。[结论] 本方法简便, 重现性好, 灵敏度高, 定性准确, 定量精确。

关键词: 腺苷; 虫草素; 保健食品; 高效液相色谱(HPLC); 二极管矩阵检测器(PDA)

Research on Rapid and Simultaneous Determination of Functional Factor in Cordyceps by HPLC-PDA Method

HUANG Hong-Nan, HUA Yong-You, LIN Hong-Lin, et al. (Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

Abstract: [Objective] To establish a rapid and simultaneous determination method of functional factor in Cordyceps by HPLC-PDA. [Methods] Chromatographic Column: Ultimate AQ-C18 (4.6×250 mm, 5 μm); A mobile phase of solution of 0.01 mol/L KH₂PO₄: CH₃OH = 90:10, PDA detection at UV-260 nm. [Results] The fit of the linear regression function was good (1.0 - 100.0 μg/ml), and correlation coefficient for adenosine $r = 0.99993$; for cordycepin $r = 0.99993$. The average recovery rates were 93.6% and 96.9%. [Conclusion] HPLC-PDA method is sensitive, reliable and accurate for detection of functional factor in Cordyceps.

Key Words: Adenosine; Cordycepin; Health food; HPLC; PDA;

冬虫夏草为麦角菌科冬虫夏草菌 *Cordyceps Sinensis* (Berk) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及虫体的复合体, 是我国著名的滋补中药材。其主要功效为补虚损、益精气、补肺益肾。虫草主要产于青海、西藏、四川等海拔 3 500~5 000 m 的高山和草甸地带, 资源紧缺, 采集困难。

为了缓解供需矛盾, 国内外科研人员采取发酵培养法生产虫草菌丝体, 人工虫草菌丝体与天然虫草有相似的化学成分、药理作用和临床机制, 可替代天然虫草。腺苷和虫草素(3'-脱氧腺苷)是虫草的主要活性成分, 其中腺苷被中国药典(2005 版)^[1] 规定为冬虫夏草的质控指标。因此研究保健食品中腺苷和虫草素提取和测定方法具有实际价值。文献有报道用薄层-紫外分光光度法、高效液相色谱法、毛细管电泳法等测定一些虫草属真菌及其制品中腺苷或虫草素的含量^[2,3], 本研究建立了用流动相提取, 反相高效液

相色谱法二极管矩阵检测器同时快速测定活性成分含量的方法, 方法灵敏、快速、简便, 结果准确可靠。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器设备 腺苷、虫草素标准品(中国药品生物制品检定所), 磷酸二氢钾(分析纯)、甲醇(优级纯)、超纯水; 高效液相色谱仪(Waters 2695 型)、附光电二极管矩阵检测仪(PDA)、0.45 μm 微孔滤膜、Milli-Q 纯水系统、超声波清洗器 KQ-250DE(昆山市仪器有限公司)、离心机 Beckman coulter。

1.2 方法

1.2.1 试样处理 取 20 粒以上片剂或胶囊试样粉碎混匀, 准确称取适量试样于 25 ml 容量瓶中, 加入约 20 ml 提取液, 超声提取 10 min。取出后加入提取液定容至刻度, 混匀后以 10 000 r/min 离心 3 min。经由 0.45 μm 微孔滤膜过滤于进样瓶中, 供 HPLC 测定。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: Ultimate™ AQ-C18 色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm.); 流动相: 甲醇: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 = 10:90; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl; 检测波长: 260 nm。

1.3 标准曲线的制备 精密称取标准品腺苷、虫草

基金项目: 福建省科技重点项目(项目指南号: 2008I0102)。

第一作者简介: 黄宏南(1960—), 男, 博士, 主任技师, 主要从事保健食品研究。

作者单位: 1. 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001; 2. 福建中医药大学, 福州 350108。

素适量,用流动相溶解,使浓度均为 1.0 mg/ml,储存于 4 ℃ 冰箱。测定前用流动相稀释成混合标准系列溶液,使腺苷和虫草素浓度均为 1.0、5.0、25.0、50.0、75.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将混合标准系列溶液进样 10 μl 测定,用峰面积对浓度绘制标准曲线。

1.4 样品测定及计算 准确称取粉碎并混合均匀的试样 0.50 g(液体试样取 5.0 g),于 50 ml 容量瓶中,用流动相定容。超声提取 20 min,离心,取上清液,过 0.45 μm 微孔滤膜后进样 10 μl 。根据样品测定的色谱峰面积,在相应标准曲线中查出对应的含量,结合所取的样品质量和定容体积计算样品相当的含量,公式如下:

$$X_i = C_i \times V / m \times 1000 \quad (i=1, \text{代表腺苷}; i=2, \text{代表虫草素})$$

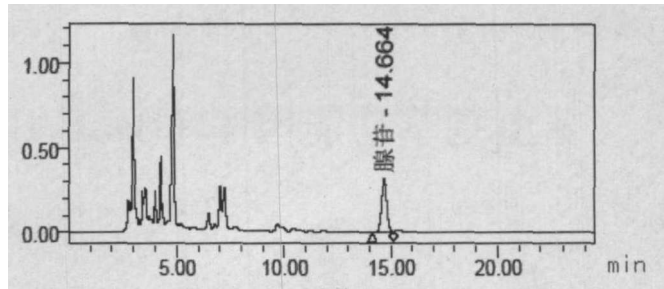
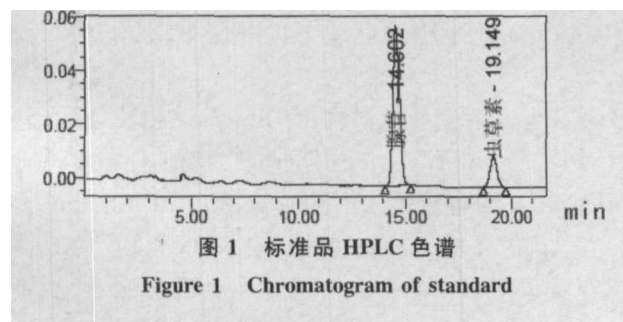
式中: X_i 为腺苷或虫草素的含量(mg/g); C_i 为腺苷或虫草素的质量标准浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$); V 为试样定容体积(ml); m 为试样的质量(g)。

2 结果与讨论

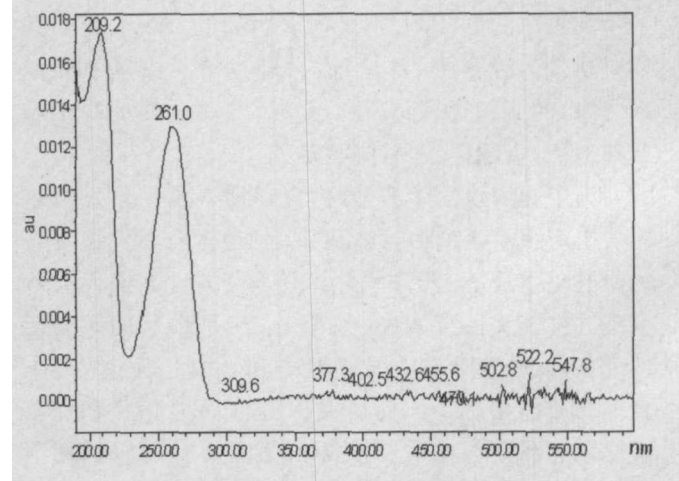
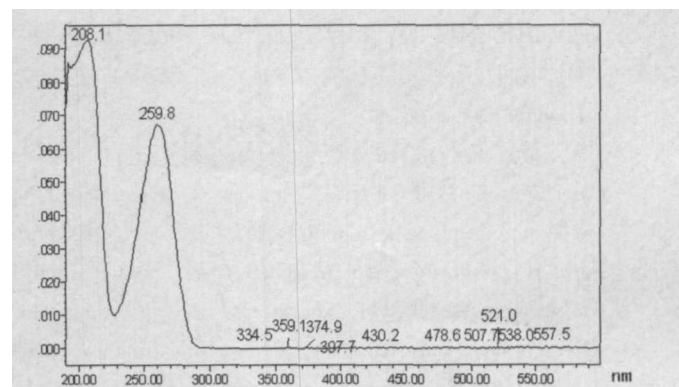
2.1 样品提取和方法的选择 本法与水煮法、热回流提取法和超声波提取法比较差异无显著性。由于超声波法方便、快捷,为本研究的首选方法,在样品溶液制备过程中,曾采用不同浓度的甲醇-水或乙醇-水作为提取溶剂,测定结果均比甲醇:0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相(10:90, v/v)提取低。对几种样品分别试验不同的超声时间,最终结果:胶囊、口服液等制成品超声 20 min 即提取完全,与超声 2 h 测定结果一致,故该类样品超声时间定为 20 min 可保证提取完全。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 流动相对测定的影响 本实验采用甲醇:0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相(10:90, v/v)与采用中国药典 2005 年版“冬虫夏草”项下磷酸盐缓冲液(pH 6.5)-甲醇(17:3)为流动相进行洗脱,腺苷、虫草素检测结果基本一致。但本实验的检测方法产生的色谱峰形尖锐,腺苷和虫草素的混合标准溶液以及样品含量测定的 HPLC 分离检测图谱(图 1、2),结果表明虫草素和腺苷的色谱峰能够达到很好的分离,样品中其他杂质峰对两个主峰测定无干扰。



2.2.2 检测波长的确定 将腺苷、虫草素对照品溶液分别在 200~500 nm 波长范围内扫描,测得腺苷在 259.8 nm 处,虫草素在 261.0 nm 处有最大吸收(图 3、4),确定液相色谱法的检测波长为 260 nm。



2.3 方法性能指标的考察

2.3.1 标准曲线的线性范围和最低检出限 将混合标准系列溶液各进样 10 μl 进行测定。用峰面积比对浓度分别绘制标准曲线。结果表明腺苷和虫草素在 1.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内具有良好的线性关系,相关系数 r 均为 0.99993。当信噪比为 3:1 时,腺苷和虫

草素的检测限均为 1.0 μg/ml,见表 1。

表 1 方法的线性范围测试结果
Table 1 Linear range of test results

| 成分 | 回归方程 | 相关系数 r | 线性范围(μg/ml) |
|-----|----------------------|---------|-------------|
| 腺苷 | y=0.163104x+0.019217 | 0.99993 | 1.0~100.0 |
| 虫草素 | y=0.153674x-0.22129 | 0.99993 | 1.0~100.0 |

2.3.2 加标回收率试验 取已测知含量的同一试样作高、低 2 个浓度的加标回收试验,每个浓度各做 3 个平行样。从测定结果可知,腺苷和虫草素加标回收结果较好,回收率分别为:腺苷 93.6%、虫草素 96.9%,可满足分析要求,见表 2。

表 2 腺苷、虫草素加标回收试验结果
Table 2 Test result of adenosine and cordycepin recovery

| 成分 | 本底值(mg) | 加标量(mg) | 测得值(mg) | 回收率(%) |
|-----|---------|---------|---------|--------|
| 腺苷 | 0.566 | 0.50 | 1.046 | 96.1 |
| | | | 1.034 | 93.6 |
| | | | 1.018 | 90.3 |
| | | 1.00 | 1.518 | 95.2 |
| | | | 1.494 | 92.8 |
| | | | 1.505 | 93.9 |
| 虫草素 | 0.316 | 0.30 | 0.608 | 97.6 |
| | | | 0.610 | 98.1 |
| | | | 0.606 | 96.9 |
| | | 0.60 | 0.893 | 96.2 |
| | | | 0.888 | 95.3 |
| | | | 0.899 | 97.3 |

2.3.3 精密度试验 为考察方法的精密度,对试样同时进行 6 次实际前处理和仪器分析检测,结果虫草鸡精腺苷含量分别为 0.16、0.17、0.17、0.16、0.15 和 0.15,均值 0.16 (mg/ml),RSD 1.10%~3.05%,精密度较好。

2.3.4 溶液稳定性试验 在本法选定的测定条件下,取腺苷和虫草素标准品溶液及同一份样品溶液各 10 μl,分别与 0、2、4、8、12、24 h 测定其峰面积。结果表明,腺苷和虫草素标准品溶液和样品溶液在室温 24 h 内基本稳定。但腺苷标准品溶液色谱峰面积有逐渐降低的趋势,可能是降解所致。故标准溶液和样品溶液均不宜久贮。

3 结论

动物实验表明,冬虫夏草具有多种保健功能效应,其中功效成分腺苷、虫草素是重要关键物质,中国药典规定腺苷含量不得少于 0.01%。因此,准确测定其含量,对于保健食品功效实验具有重要指导和参考价值,同时,对于真伪的鉴别和质量评定,保护消费者的权益,以及选定优质冬虫夏草菌丝体都具有重要意义。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. [M]. 北京:化学工业出版社,2005:75.
- [2] 毛丽珍,阙沛红. 虫草—中华束孢中腺苷的含量测定[J]. 中草药,1993,24(9):467-468.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价规范[S]. 2003.

收稿日期:2008-02-27;修回日期:2008-04-02

【研究信息】

台湾港埠地区鼠类媒介汉他病毒流行病学调查

从 2004 年 11 月至 2006 年 12 月止,调查台湾地区国际及国内港埠鼠类分布及汉他病毒抗体阳性率,共捕获 1 446 只老鼠,可分为 2 目、2 科、4 属、7 种。以沟鼠(*Rattus norvegicus*)占大多数(58.44%),其他种类百分比依序为钱鼠(*Suncus murinus*)24.97%、鬼鼠(*Bandicota indica*)6.92%、黄胸鼠(*Rattus flavipectus*)6.36%、小黄腹鼠(*Rattus losrea*)2.14%、屋顶鼠(*Rattus rattus*)1.04%及家鼠(*Mus musculus*)0.14%,其中除桃园机场以鬼鼠和小黄腹鼠,金门地区以黄胸鼠和钱鼠,及苏澳港以沟鼠为主要族群外,其他均以沟鼠及钱鼠为各港区之最大族群,全部捕获鼠数未因季节别有明显差异。依鼠种区分,沟鼠之汉他病毒抗体阳性率最高(18.82%),其他为屋顶鼠(6.67%)、钱鼠(6.37%)及黄胸鼠(5.43%),汉他病毒抗体阳性率平均为 13.00%,略高于历年之调查结果,显示台湾港埠

地区鼠类感染汉他病毒之情形仍维持一定之比例,不容忽视。本次调查结果,国内港埠阳性率平均为 20.48%,虽高于国际港埠之阳性率(11.45%),并不表示整体国内港埠之阳性率普遍均高于国际港埠,因各国际港埠间阳性率差异颇大,除桃园机场及花莲港为 0%外,其他国际港埠阳性率介于 3.16%~25.64%,依次为苏澳港(25.64%)、高雄港(22.16%)、台中港(19.28%)、基隆港(15.24%)、高雄机场(11.54%)、麦寮港(6.38%)、马祖(5.19%)及金门(3.16%);国内港埠除梧棲渔港高达 56.25%为相当特殊之情况外,其他港埠间阳性率介于 11.86%~23.81%,水底寮渔港(23.81%)、枋寮渔港(15.71%)、东港渔港(14.93%)及八斗子渔港(11.86%)。

摘自:疫情报导,2008,(24)1:51-59. 作者:谢瑞炜,王仁德,黄子玫,等.