

HPLC-DAD 测定人工北冬虫夏草中 虫草素含量

宋江峰^{1,2}, 刘春泉², 李大婧², 金邦荃^{1,*}

(1. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

2. 江苏省农业科学院原子能农业利用研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 建立了测定北冬虫夏草子实体中虫草素的高效液相色谱法。使用 Eclipse XDB C₁₈ (4.6mm × 150mm, 5μm) 色谱柱, 以水: 甲醇: 甲酸 (95:4:1) 为流动相, 流速为 0.8ml/min, 25℃ 下检测。检测波长为 260nm。结果表明: 虫草素的平均回收率为 100.8%, RSD 值 1.88%。此方法简单、可靠。

关键词: 北冬虫夏草; 虫草素; 高效液相色谱

Determination of Cordycepin from Cultured *Cordyceps sinensis* by HPLC-DAD

SONG Jiang-feng^{1,2}, LIU Chun-quan², LI Da-jing², JIN Bang-quan^{1,*}

(1. Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Institute of Atomic Energy in Application for Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Determination of cordycepin in cultured *Cordyceps sinensis* by HPLC-DAD was showed. Eclipse XDB C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used with water: ethanol: formic acid (95:4:1, V/V/V) as mobile phase and ultraviolet detection wavelength was 260 nm. The results showed that the average recovery of cordycepin is 100.8%, with RSD 1.88%. This method is simple and reliable.

Key words: *Cordyceps sinensis*; cordycepin; HPLC-DAD

中图分类号: TS207

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0352-03

北冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 菌, 是我国传统名贵中药, 具有广泛的药理作用, 国内外需求与日俱增。由于自然条件的限制和近年来过度的采挖, 天然虫草资源已日益匮乏, 现多用人工虫草来满足市场的需求。北冬虫夏草含有多种药用活性成分, 它们具有抗癌、抗病毒、增强免疫功能和预防心脑血管疾病等作用, 且毒性极低, 无副作用^[1-2]; 虫草素 (cordycepin), 即 3'-脱氧腺苷 (3'-deoxyadenosine), 是北冬虫夏草主要活性成分之一, 为含氮配糖体的核酸衍生物, 属嘌呤类生物碱, 是一种核苷类抗生素^[3]。对艾氏腹水癌、人体鼻咽癌有特殊疗效, 是高效、速效、低毒的天然抗癌药, 因此测定该药材中虫草素的量对于控制药材质量具有重要的意义。

中华人民共和国药典 (2005 版) 仅对腺苷的测定方法进行过叙述, 而虫草素的测定方法目前尚无标准^[4-5]。据

文献报道的测定北冬虫夏草中虫草素含量的方法主要有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和毛细管电泳法 (CE)^[6-8]。HPLC 法测定具有快速、简便、成本低的特点, 一般采用紫外检测器, 以保留时间定性。但由于色谱方法的定量能力强而定性能力弱, 对于成分复杂的样品来说, 往往可能有不同的物质在同一时间或极相近的时间出峰, 因而只用保留时间定性可能会造成分析错误。由于二极管阵列检测器 (DAD) 检测器可以同时设定波长区域内的各波长下进行立体数据采集, 因此, 在结果中既可以察看各波长下的色谱图又可以察看各个时间下的光谱图。不同的物质具有不同的光谱, 因而可以用于定性^[9]。

因此, 本研究应用高效液相色谱法结合 DAD 检测器建立北冬虫夏草中虫草素的定性、定量分析方法, 对用于分析的样品制备方法进行探讨。

收稿日期: 2006-12-20

基金项目: 江苏省经贸委科技三项项目 (5910317)

作者简介: 宋江峰 (1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养及功能因子。E-mail: songjiangfeng102@163.com

* 通讯作者: 金邦荃 (1956-), 女, 教授, 研究方向为食品营养。E-mail: angler56@sina.com

1 材料与方 法

1.1 样品与试剂

人工北冬虫夏草 江苏徐州淮海北虫草生产有限公司。

虫草素标准品(纯度97%) 美国Sigma公司; 乙腈(色谱纯) 美国TEDIA公司; 甲醇(色谱纯) 美国TEDIA公司; 超纯水(自制); 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

美国Agilent1200 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、在线真空脱气机、二极管阵列检测器(DAD)、HP1200 化学工作站) 美国安捷伦科技有限公司; FA2104 型电子分析天平 上海恒平科学仪器有限公司; TU-1810PC型紫外分光光度计 北京谱析通用仪器有限责任公司; KQ-100DE型超声波清洗仪 昆山市超声波仪器有限公司; RE-52C旋转蒸发仪 巩义市予华仪器有限责任公司。

1.3 色谱条件

色谱柱为Eclipse XDB C₁₈色谱柱(150mm×4.6 mm i.d, 5μm); 流动相为水:甲醇:甲酸=95:4:1(V/V/V); 流速0.8ml/min; 柱温25℃; 检测波长: 260nm; 进样量20μl。

1.4 对照品溶液的配制

分别准确称取虫草素标准品10.0mg, 用甲醇定容至50ml, 摇匀。分别准确吸取标准品母液1、2、4、8ml和10ml, 用甲醇稀释至10ml, 摇匀, 备用。

1.5 分析样品的制备

人工北冬虫夏草经过预处理后以水为溶剂进行超声提取, 提取条件: 固液比40:1, 提取时间120min, 提取温度40℃, 超声频率40kHz。提取液冷却, 粗滤, 滤液经浓缩至干, 用甲醇定容, 过0.45μm微孔滤膜, 用于高效液相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定及虫草素的定性分析

为了确定检测波长, 以甲醇为空白, 在200~450nm处分别对含有一定量虫草素的甲醇溶液进行紫外吸收扫描, 结果表明, 虫草素在260±0.8nm处有强吸收, 从二极管阵列检测器的紫外吸收光谱图也证实了这个结果, 为保证测定的灵敏度和准确度, 实际测定时采用测定波长为260nm。

液相色谱的保留时间是一项重要的定性依据, 在相同的色谱条件下, 比较样品峰的保留时间与虫草素标准品的保留时间, 结果表明样品中主峰的保留时间与虫草素标准品的保留时间一致(平均保留时间均为3.51min)。如图1所示为样品中虫草素色谱图。结合色谱保留时间与紫外吸收光谱可以对样品中的虫草素较好地定性分析。

应用DAD检测器可以在线扫描样品的光谱图, 通

过样品峰的光谱图与标准品光谱图比较, 可以判断它们是否为同一物质。一般情况下, 相似度在990以上即可认为是光谱相似。人工北冬虫夏草样品的光谱图与虫草

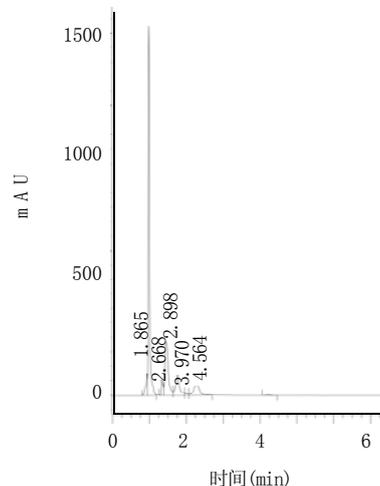


图1 北冬虫夏草样品色谱图

Fig.1 Chromatograms of *Cordyceps sinensis* sample

素标准品光谱图的匹配情况, 样品色谱图与标准样品色谱图的相似度为990.371。

2.2 流动相的组成对分离效果的影响

在已确定的色谱模式及色谱柱条件下, 需要选择流动相。流动相组成的改变, 既可以调节保留时间, 也可以调节选择性。实验比较了几种流动相, 分别为甲醇:水(10:90)、甲醇:水(5:95)、甲醇:乙腈:水(9:1:90)、乙腈:水(7:93)、甲醇:甲酸:水(4:1:95), 发现甲醇:甲酸:水(4:1:95)条件下虫草素和样品中干扰物能达到较好的基线分离, 而且出峰时间合适, 峰形较好, 干扰少, 测定结果令人满意。为了缩短分析时间、提高灵敏度, 本实验选择流动相为甲醇:甲酸:水(V/V/V)为4:1:95。

2.3 标准曲线的绘制

按照前述的色谱条件, 分别取稀释后的标准样品溶液进样分析, 每样作3次重复, 取平均值。对虫草素浓度(X, μg/ml)与峰面积(Y)进行线性回归, 得到虫草素浓度与峰面积的回归方程为: $Y=22.556X-4.8283$, 回归系数 $r=0.9993$ 。结果表明: 虫草素浓度在20~200μg/ml范围内均与峰面积线性关系良好。

2.4 样品的制备方法

影响北冬虫夏草子实体中有效成分提取的因素很多, 主要有提取溶剂、样品粒度、提取温度、提取时间、溶剂用量、提取方法等。超声波由于其具有独特的机械粉碎作用以及在通过液体时可形成空化效应, 当其用于浸提时, 可以增大物料分子运动频率和速度, 提高物料分子的浸出速度和浸出数量^[10]。因此, 本研究

选择了乙醇浓度、料液比和提取时间进行三因素十水平的均匀设计试验(表1)。以虫草素的提取率为评价指标,探讨了超声波提取北冬虫夏草子实体中虫草素的最佳萃取条件。

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels of uniform design

因素	水平									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X ₁ :乙醇浓度(%)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
X ₂ :萃取时间(min)	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
X ₃ :液固比(ml/g)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50

精密称取0.5000g北冬虫夏草子实体干粉于50ml三角瓶中,按照设计的实验条件,分别加入不同浓度不同用量的乙醇(每个试验重复3次)。在相应的温度下超声波提取相应的时间,而后冷却至室温,提取液冷却,粗滤,滤液经浓缩至干,再用甲醇定容至刻度,用0.45 μm微孔滤膜过滤。取滤液20 μl用于高效液相色谱分析。

均匀设计试验结果见表2。分别以乙醇浓度(X₁)、提取温度(X₂)、提取时间(X₃)为自变量,以虫草素提取率(Y)为因变量,用DPS数据处理系统(Data Processing System)3.01对设计结果进行回归分析,得回归方程如下:

$$Y = 0.787856771 + 0.013051163204X_2 + 0.012368423576X_3 - 0.0006867869895X_1^2 - 0.00008218950753X_2^2 - 0.0003475467035X_3^2 + 0.00014334891128X_1X_2 + 0.0003961641085X_1X_3 + 0.000023409756401X_2X_3 \quad (R^2 = 0.9943)$$

表2 均匀设计试验结果分析
Table 2 Analytical results of uniform design

试验号	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (ml/g)	Y(mg/g)
1	8	2	8	0.772
2	1	6	7	1.502
3	2	3	3	1.343
4	9	5	2	0.660
5	6	4	10	1.315
6	3	9	9	1.456
7	5	7	1	1.356
8	4	1	5	1.070
9	10	8	6	1.080
10	7	10	4	1.228

根据回归方程分别计算出在选定的实验条件范围内超声波提取北冬虫夏草子实体中的虫草素的最佳条件为: X₁=19.995%, X₂=101.47743min, X₃=32.60754ml/g。通径分析表明,影响北冬虫夏草子实体中的虫草素超声波提取效果的三个因素中,作用大小顺序为:萃取时间>液固比>乙醇浓度。

2.5 方法重现性

取同一批次的北冬虫夏草子实体5份,按所确定的样品制备方法和色谱条件进行虫草素的含量分析,结果表明,虫草素提取率的RSD值为0.76%,方法重现性好,所得实验结果可靠。

2.6 回收率测定

取制备好的样品溶液,按确定的HPLC条件测定3次,取平均值,求得该批子实体提取液中虫草素的含量为39.086 μg/ml。以标准加入法进行虫草素回收率测定,结果见表3。

表3 回收率测定结果(n=3)
Table 3 Result of recovery determination (n=3)

样品	标准加入量(μg/ml)	测得值(μg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
虫草素	19.40	59.48	101.7	100.8	1.88
	29.10	67.23	98.6		
	38.88	77.34	99.2		
	48.50	90.39	103.2		
	58.20	98.65	101.4		

由表3可见,虫草素回收率在98.6%~103.2%之间,RSD值为1.88%,表明实验所确定的HPLC方法进行虫草素的含量分析,准确度较高。

3 结论

本实验所建立的方法,可以用于测定北冬虫夏草子实体中的虫草素含量,提高了分析的准确度,为中药北冬虫夏草的质量控制提供了简单、有效的检测手段。

参考文献:

- [1] 张平,朱述均,钱大顺,等.北冬虫夏草功能成分及保健作用分析[J].江西农业科学,2003(6):105-107.
- [2] 连云岚,杨中林.北虫草化学成分及药理作用研究进展[J].山西医药杂志,2006,35(1):43-45.
- [3] 刘东泽,陈伟,高新华,等.虫草菌素(3'-脱氧腺苷)研究进展(综述)[J].上海农业学报,2004,20(2):89-93.
- [4] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典(2005版一部)[M].北京:化学工业出版社,2005:75.
- [5] 张红霞,吴畏,陈伟,等.北冬虫夏草发酵液中虫草素和腺苷含量的HPLC分析[J].上海农业学报,2005,21(4):53-56.
- [6] 米莉莉,张素文,孙家进,等.冬虫夏草及人工虫草核苷类成分的TLCs研究[J].中成药,2003,25(5):402-405.
- [7] 陈千良,甘志杰,孙文基.HPLC法测定人工蛹虫草子实体中虫草素[J].西北大学学报,2003,10(5):569-571.
- [8] 凌建亚,孙迎节,吕鹏,等.虫草属真菌中虫草素的超声波提取及其毛细管电泳测定[J].菌物系统,2002,21(3):394-399.
- [9] 黄宏南,黄健文.HPLC-PDA法快速测定保健食品中的葛根素[J].中国卫生检验杂志,2002,12(6):692-693.
- [10] 朱国辉,丘泰球.超声波在萃取中的应用[J].声学技术,2001,20(4):188-190.