



# HPLC 不同流动相测定蛹虫草中虫草素和腺苷的比较

张鑫喆<sup>1</sup>, 赵琳琳<sup>1</sup>, 徐方旭<sup>2</sup>, 柳叶飞<sup>2</sup>, 王升厚<sup>2</sup>

(1. 沈阳师范大学 生命科学学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 沈阳师范大学 实验教学中心, 辽宁 沈阳 110034)

**摘要:**为评价两种不同流动相的可行性,通过测定 3 种蛹虫草中的虫草素与腺苷的含量,对比高效液相色谱(HPLC)的甲醇-水和乙腈-水两种不同流动相。结果表明:HPLC 法的两种不同流动相测定虫草素含量的保留时间分别为 6.6 和 15.0 min;测定腺苷含量的保留时间分别为 5.7 和 11.9 min。其中,以甲醇-水为流动相所测得的虫草素含量更高,在检测时更为便捷,保留时间也较适合。

**关键词:**高效液相色谱;流动相;虫草素;腺苷

蛹虫草又名北冬虫夏草、北虫草等,为子囊菌亚门、麦角菌目、麦角菌科、虫草属的模式种,2009 年被批准为新资源食品<sup>[1]</sup>。虫草素和腺苷是蛹虫草的主要活性成分,其中虫草素具有抗病毒和肿瘤等作用,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<sup>[2]</sup>。因此,对这两种成分的检测尤为重要。近年来,国内采用高效液相色谱法测定蛹虫草中腺苷和虫草素含量的报道较多<sup>[3]</sup>,其中农业部标准 NY/T2116-2012<sup>[4]</sup>可同时检测虫草中腺苷和虫草素。本研究采用甲醇-水作为 HPLC 的流动相,与农业部标准以乙腈-水作为 HPLC 的流动相的检测结果相比较。采用 HPLC 法检测蛹虫草的虫草素与腺苷含量,以评价两种流动相在虫草素检测中的可行性<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 由沈阳师范大学特种菌业研究所提供的蛹虫草样品。

1.1.2 试剂 虫草素及腺苷标准品均购自美国 Sigma 公司(产品纯度均大于 99%),乙腈、甲醇均为色谱纯,试验用水为自制双蒸水。

1.1.3 仪器 高效液相色谱仪(安捷伦科技(中国)有限公司);超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 甲醇-水 采用水提法,首先将蛹虫草样品 60 ℃烘干至恒重,粉碎后过 60 目筛。准确称取待测样品粉末 0.50 g,置于广口瓶中,加入蒸馏水 80 mL,85 ℃环境下提取 3.5 h。冷却到室温,过滤,定容,离心,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液作为虫草素检测样品溶液。

①色谱柱:C<sub>18</sub>液相柱(150.0 mm×4.6 mm, 5 μm),载碳量 10%,双封端,在 pH2.0~9.0 稳定性良好。柱温 25 ℃;流动相,25%甲醇,75%水;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测时长 8 min;紫外检测波长 260 nm;进样量 20 μL。

②标准品配制:称取虫草素标准品 2.5 mg,去离子水溶解,定容至 25 mL,配成浓度为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>虫草标准品储备液,4 ℃储存备用。

③峰面积计算:取上述标准品储备液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,分别用去离子水稀释定容至 10 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤。每个浓度的标准品溶液重复进样 3 次,得到相应峰面积,计算平均值。

④回归方程:以峰面积 Y 对其质量浓度 X 进行线性回归分析,绘制标准曲线,得到其回归方程。

1.2.2 乙腈-水 采用超声波提取法,首先将蛹虫草样品 60 ℃烘干至恒重,粉碎后过 60 目筛。准确称取待测样品粉末 0.50 g,置于 100 mL 容量瓶中,加入蒸馏水 80 mL,置于超声波仪中超声提取 3 h,取出后用水定容,摇匀。取 1 mL 样液离心后,将上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,滤液供

收稿日期:2018-01-27

第一作者简介:张鑫喆(1992-),女,在读硕士,从事微生物制药研究。E-mail:1013932822@qq.com。

通讯作者:王升厚(1963-),男,学士,教授,从事微生物制药研究。E-mail:wshhwq2009@163.com。

高效液相色谱法分析<sup>[4]</sup>。

①色谱柱:  $C_{18}$  柱, (150.0 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 载碳量 10%, 双封端, 在 pH2.0~9.0 稳定性良好。柱温 35  $^{\circ}$ C; 流动相, 5% 乙腈, 95% 水; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测时长 17 min; 紫外检测波长 260 nm; 进样量 10  $\mu$ L。

②标准品配制: 称取虫草素标准品 2.5 mg, 去离子水溶解, 定容至 25 mL, 配成浓度为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 虫草标准品储备液, 4  $^{\circ}$ C 储存备用。

③峰面积计算: 取上述标准品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 混合标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 用水定容, 摇匀, 该标准曲线浓度为 1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。每个浓度的标准品溶液重复进样 3 次, 得到相应峰面积, 计算平均值。

④回归方程: 按参考色谱条件测定, 以虫草素浓度为横坐标, 相应峰面积为纵坐标, 计算标准曲线, 求线性回归方程。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线比较

HPLC 以甲醇-水作为流动相通过线性关系得到的虫草素回归方程为:  $y = 60\,233x - 44.241$  ( $R^2 = 0.998$ ); HPLC 以乙腈-水作为流动相通过线性关系得到的虫草素回归方程为:  $y = 45\,830x + 62.148$  ( $R^2 = 0.999\,6$ ) (图 1)。由图 1 可知, HPLC 以甲醇-水为流动相所测出的样品浓度为 0.01~0.10 mg·mL<sup>-1</sup> 的范围内与峰面积的线性关系良好; HPLC 以乙腈-水为流动相所测出的样品浓度为 0.001~0.050 mg·mL<sup>-1</sup> 的范围内与峰面积的线性关系良好。其中, HPLC 以甲醇-水为流动相所测出的线性范围要比 HPLC 以乙腈-水为流动相所测出的线性范围宽即可测范围较大。

HPLC 以甲醇-水作为流动相通过线性关系得到的腺苷回归方程为:  $y = 57\,084x + 40.052$  ( $R^2 = 0.996\,9$ ); HPLC 以乙腈-水作为流动相通过线性关系得到的腺苷回归方程为:  $y = 64\,236x - 8.629\,6$  ( $R^2 = 0.999\,4$ ) (图 2)。由图 2 可知, HPLC 以甲醇-水为流动相所测出的样品浓度为 0.01~0.10 mg·mL<sup>-1</sup> 的范围内与峰面积的线性关系良好; HPLC 以乙腈-水为流动相所测出

的样品浓度为 0.001~0.050 mg·mL<sup>-1</sup> 的范围内与峰面积的线性关系良好。其中, HPLC 以甲醇-水为流动相所测出的线性范围要比 HPLC 以乙腈-水为流动相所测出的线性范围宽即可测范围较大。

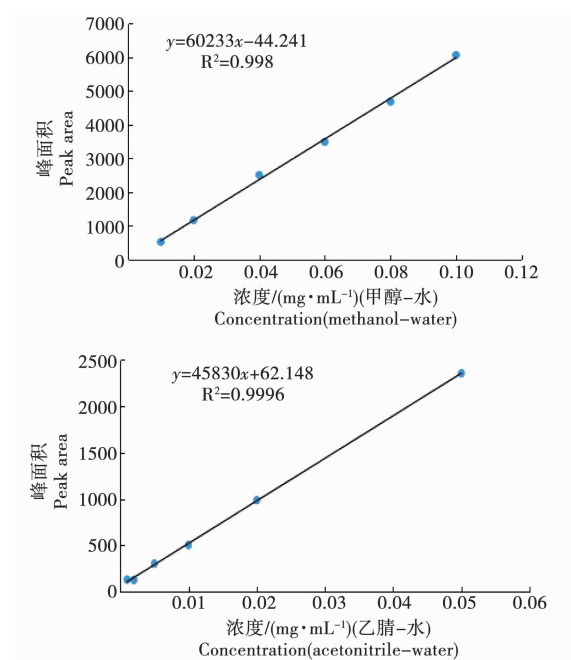


图 1 虫草素标准值曲线对比

Fig. 1 Comparison of cordycepin standard value curves

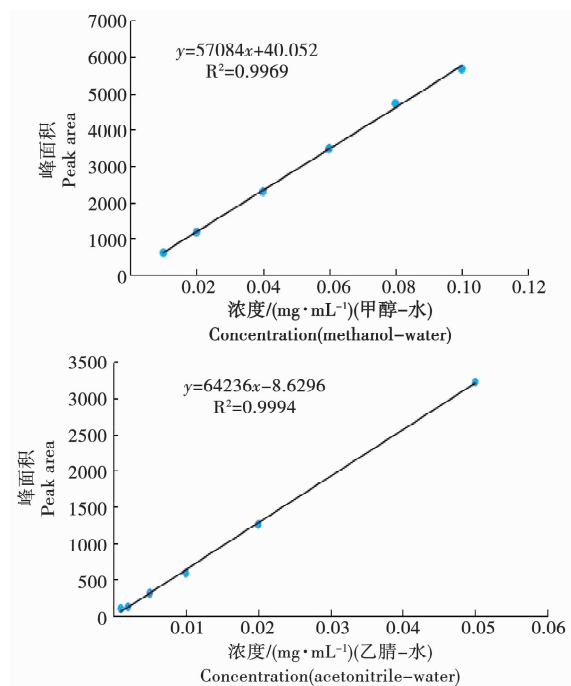


图 2 腺苷标准值曲线对比

Fig. 2 Comparison of adenosine standard value curves

2.2 样品检测结果比较

不同的虫草素提取样品溶液经高效液相色谱仪测定均在与虫草素、腺苷标准品溶液测定时出峰的时间一致,说明在样品溶液中出现的峰即为虫草素与腺苷的峰。由表 1 可知,HPLC 法以甲醇-水为流动相所测虫草样品的虫草素含量较高、

腺苷含量也相对较高。以甲醇-水为流动相时,虫草素在 6.6 min 出现峰面积、腺苷在 5.7 min 出现峰面积,而以乙腈-水为流动相时,虫草素在 15.0 min 出现峰面积、腺苷在 11.9 min 出现峰面积。

表 1 HPLC 法检测虫草素与腺苷含量

Table 1 Determination of cordycepin and adenosine content by HPLC method (mg·kg <sup>-1</sup> )						
项目 Items	甲醇-水 Methanol-water			乙腈-水 Acetonitrile-water		
	虫草 1	虫草 2	虫草 3	虫草 1	虫草 2	虫草 3
虫草素 Cordycepin	7958.27	5439.52	920.00	4684.06	2838.98	139.87
腺苷 Adenosine	2378.38	990.67	453.64	1472.16	823.00	688.80

3 结论

本研究通过对 HPLC 法的两种不同流动相进行比较,其结果表明其线性范围、稳定性、重复性等无明显差异,均稳定可靠,可作为蛹虫草中虫草素和腺苷含量的测定方法。其中,以甲醇-水作为 HPLC 法的流动相所检测出的虫草素含量均要高于以乙腈-水作为流动相所检测的含量,以甲醇-水作为 HPLC 法的流动相所检测出的腺苷含量大部分要高于以乙腈-水作为流动相所检测的含量;以甲醇-水为流动相,虫草素在 6.6 min 出现峰面积、腺苷在 5.7 min 出现峰面积,而以乙腈-水为流动相,虫草素在 15.0 min 出现峰面积、腺苷在 11.9 min 出现峰面积。由此可见,以甲醇-水作为 HPLC 法的流动相在检测时更为便

捷,保留时间也较适合。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于批准蛹虫草为新资源食品的公告(2009 年第 3 号)[Z]. 2015-05-03.

[2] 尚红霞,梁晨,易娟. 高效液相色谱法同时测定虫草素和腺苷[J]. 分析科学学报,2011,27(6):776-778.

[3] 黄丽俊,李利东,宓晓黎. 高效液相色谱法同时检测虫草制品中腺苷和虫草素含量的研究[J]. 农学学报,2015,5(5):25-28.

[4] NY/T2116-2012. 虫草制品中虫草素和腺苷的测定-高效液相色谱法[S]. 中华人民共和国农业部,2012.

[5] 简利茹,杜双田. HPLC 与 LC-MS/MS 测定蛹虫草发酵液中虫草素的方法比较[J]. 食品科学,2013,34(14):276-279.

Comparison of Cordycepin and Adenosine in Cordyceps Militaris with Different Mobile Phases by HPLC

ZHANG Xin-zhe<sup>1</sup>, ZHAO Lin-lin<sup>1</sup>, XU Fang-xu<sup>2</sup>, LIU Ye-fei<sup>2</sup>, WANG Sheng-hou<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; 2. Experimental Teaching Center of Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China)

**Abstract:** In order to evaluate the feasibility of two different mobile phases, the content of cordycepin and adenosine in 3 species cordyceps militaris was determined by comparing 2 different mobile phases of methanol water and acetonitrile water of high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the retention time of cordycepin under the 2 different mobile phases in the HPLC method was 6.6 and 15 min, respectively; the retention time for the determination of adenosine content was 5.7 and 11.9 min, respectively. Among them, the content of cordycepin with methanol-water as the mobile phase was higher, and it was more convenient in the detection and the retention time was more suitable.

**Keywords:** high performance liquid chromatography(HPLC); mobile phase; cordycepin; adenosine