

# 高效液相色谱法同时测定蛹虫草子实体中腺苷和虫草素含量

袁 蜜, 乐 昕, 徐鲁荣, 支月娥, 周 培\*  
(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘 要:** 采用高效液相色谱法建立同时测定蛹虫草子实体中腺苷和虫草素含量的方法, 并对样品提取条件进行优化。以超纯水-甲醇(84:16, *V/V*)为流动相, 流速1.0mL/min, 经色谱柱XBridgeTM C<sub>18</sub> (4.6mm×250mm, 5μm)分离, 柱温30℃, 进样量10μL, 紫外检测波长254nm。腺苷和虫草素的空白回收率分别为99.13%和99.18%, 加标回收率分别为95.78%和94.35%。经单因素及正交试验, 最终确定的优化提取条件为提取液为水、提取时间40min、提取温度30℃、超声功率700W、提取次数1次。样品前处理及分析方法操作简便、回收率高、重复性好。

**关键词:** 高效液相色谱法; 蛹虫草; 腺苷; 虫草素

## Simultaneous Determination of Adenosine and Cordycepin in *Cordyceps militaris* (L.) by High Performance Liquid Chromatography

YUAN Mi, LE Xin, XU Lu-rong, ZHI Yue-e, ZHOU Pei\*  
(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** In this paper, an HPLC method for determining the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris* (L.) is described. The optimum conditions for extraction of adenosine and cordycepin were determined as pure water, 40 min, 30 °C, 700 W and 1 for extraction solvent, time, temperature, ultrasonic power and extraction number, respectively. The separation column was an XBridgeTM C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), and the column temperature was 30 °C. The mobile phase was composed of pure water and methanol (84:16, *V/V*) at a flow rate of 1.0 mL/min. The sample loading volume was 10 μL. UV detection was performed at 254 nm. The average recoveries from spiked blank and real samples were 99.13% and 95.78% for adenosine, and 99.18% and 94.35% for cordycepin, respectively. This method is characteristics of simplicity, and high sensitivity and accuracy.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); *Cordyceps militaris* (L.); adenosine; cordycepin

中图分类号: O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0306-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314064

蛹虫草(又名北虫草、北冬虫夏草)子实体为麦角菌科虫草属真菌蛹虫草菌(*Cordyceps militaris* (L.) link)的干燥子座<sup>[1]</sup>, 是我国特有的名贵药用真菌, 具有扩张器官、镇静、抗心律失常、降血压、抗病原微生物、抗恶性肿瘤等多种药理活性<sup>[2]</sup>。腺苷、虫草素等核苷类成分被作为虫草质量的主要参考指标<sup>[3]</sup>。腺苷(C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>)全称腺嘌呤核苷, 是核酸的基本结构单位, 它具有参与人体代谢和生理调节的功能<sup>[4]</sup>。虫草素(C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)又称虫草菌素、3'-脱氧腺苷, 具有抗菌<sup>[5-8]</sup>、消炎、抗氧化、抗肿瘤、调节人体内分泌等作用<sup>[9]</sup>, 具体结构见图1。

蛹虫草中腺苷和虫草素含量的测定是虫草产品质量控制及代谢途径研究的前提。目前, 蛹虫草中腺苷和虫

草素的含量测定以高效液相色谱法最为普遍<sup>[10-12]</sup>, 但多以磷酸盐溶液与有机相的混合体系作为流动相<sup>[4,9,13-14]</sup>, 而长期使用盐相对液相系统伤害较大。近年来, 刘小芳等<sup>[15]</sup>提出了一种新的测定蛹虫草中腺苷和虫草素的方法, 但其流动相由柠檬酸、醋酸、三乙胺混合溶液及乙腈组成, 较为复杂。李祥玲<sup>[16]</sup>、毛新亮<sup>[17]</sup>等虽用甲醇和水作为流动相, 但却采用梯度洗脱的方式, 过程繁琐。另外, 如果采用《保健食品检验与评价技术规范》2003年版中腺苷的提取条件对北虫草子实体进行提取, 则提取率偏低。本实验以人工栽培的蛹虫草子实体为材料, 水为提取液, 采用超纯水和甲醇为流动相等梯度洗脱, 建立一种一次进样同时测定蛹虫草子实体中腺苷和虫草

收稿日期: 2012-07-18

作者简介: 袁蜜(1987—), 女, 硕士, 研究方向为北冬虫夏草培植技术与有效成分分析。E-mail: yuanmi605@163.com

\*通信作者: 周培(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为环境毒理和污染物分析。E-mail: peizhoujtu@163.com

素的高效液相色谱分析法, 并对提取条件进行全面的优化, 以期为蛹虫草的综合利用提供实验依据。

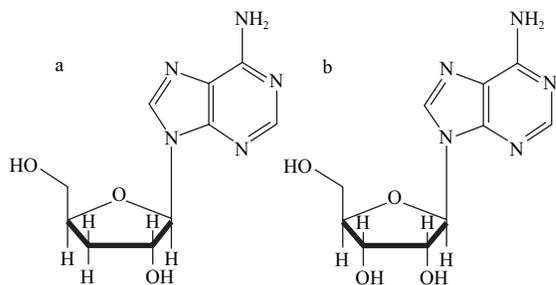


图1 虫草素(a)、腺苷(b)的结构式

Fig.1 Structural formula of cordycepin (a) and adenosine (b)

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蛹虫草子实体由上海南光生物科技发展有限公司提供并鉴定。

腺苷标准品(批号: 110879-200202, 纯度>98%) 上海源叶生物科技有限公司; 虫草素标准品(批号: 100730, 纯度>98%) 上海融禾医药科技有限公司; 无水甲醇(色谱纯) JTBaker化工产品贸易有限公司; 无水乙醇(分析纯) 中九科技有限公司; 超纯水经Milli-Q超纯水制备及分配仪制备; 0.45μm水相微孔滤膜; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

e2695型高效液相色谱仪、2489紫外-可见光检测器、Millinium工作站、Empower 3数据处理系统 美国Waters公司; KH-700E型超声波清洗器 北京金科利达电子科技有限公司; Milli-Q超纯水制备及分配仪 美国Millipore公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 标准溶液制备

精确称取干燥至质量恒定的腺苷及虫草素标准品各4mg(准确到0.0001g)于50mL容量瓶中, 用水溶解并定容作为标准储备液, 质量浓度为80μg/mL。用超纯水分别稀释成2、5、10、20、40、80μg/mL的腺苷和虫草素标准溶液。

#### 1.3.2 样品前处理

将蛹虫草子实体置于40℃烘干箱中烘干, 经粉碎机粉碎后过200目筛, 精确称取干燥至质量恒定的样品0.50g于50mL离心管中, 加入25mL提取液后超声提取, 提取结束后将离心管置于20℃、5000r/min的离心机中离心10min, 吸取上清液1mL, 经0.45μm水相微孔滤膜过滤后直接注入进样瓶以供分析。

#### 1.3.3 色谱条件

色谱柱: XBridgeTM C<sub>18</sub>(4.6mm×250mm, 5μm);

流动相: 超纯水-甲醇; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 10μL; 进样方式: 自动进样; 柱温: 30℃; 检测波长: 254nm。

### 1.3.4 提取条件优化

提取条件单因素水平为: 乙醇体积分数为0%、20%、40%、60%、80%、100%; 提取时间为10、20、30、40、50、60min; 提取温度为30、40、50、60、70、80℃; 提取功率为200、300、400、500、600、700W; 提取次数为1、2次。

## 2 结果与分析

### 2.1 腺苷和虫草素标准曲线的绘制

取6个不同质量浓度的标准溶液涡旋振荡充分混匀, 用0.45μm水相微孔滤膜过滤后直接注入进样瓶。每个进样重复3次, 以腺苷、虫草素的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。结果显示, 腺苷和虫草素均在2~80μg/mL范围内, 质量浓度与峰面积呈现良好的线性关系, 其中腺苷的回归方程为 $y=34449x-7258.3$ ,  $r=0.9999$ ; 虫草素的回归方程为 $y=38505x+8952.2$ ,  $r=0.9993$ 。

### 2.2 流动相的选择

采用不同比例的甲醇-水作为流动相, 对样品中腺苷和虫草素的分离效果进行比较, 经反复实验, 最终确定甲醇-水(16:84, V/V), 流速为1.0mL/min。这与刘小莉等<sup>[8]</sup>对虫草发酵菌丝体中腺苷和虫草素含量的检测中甲醇-水(16:84, V/V)相近。

### 2.3 提取条件的优化

#### 2.3.1 提取溶剂的优化

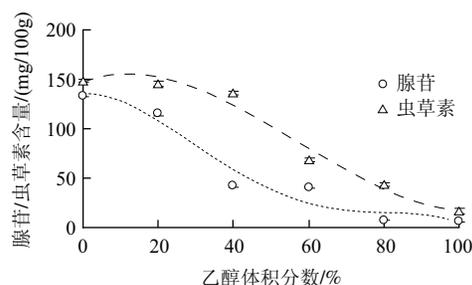


图2 乙醇体积分数对腺苷和虫草素含量的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the contents of adenosine and cordycepin

由图2可知, 所测蛹虫草子实体中腺苷和虫草素的含量均随着提取液中乙醇体积分数的增大而明显降低。当乙醇体积分数为100%时, 腺苷和虫草素含量极低。而当提取液为纯水时, 两者的提取含量均为最高, 这与甘宾宾等<sup>[4]</sup>对保健食品中腺苷和虫草素的提取结果相符。实验表明, 对于北虫草子实体, 用水作为提取液有更高的提取效率, 这与腺苷和虫草素具有较强的水溶性有关。

## 2.3.2 提取时间及温度的优化

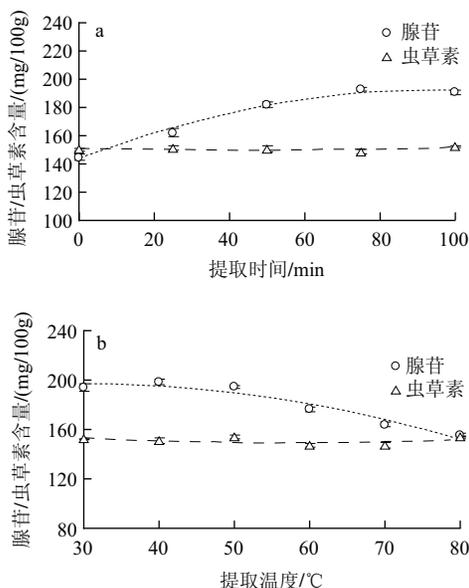


图3 提取时间(a)、提取温度(b)对腺苷和虫草素含量的影响

Fig.3 Effect of extraction time (a) and extraction temperature (b) on the contents of adenosine and cordycepin

由图3a可知,提取时间少于30min时,所测腺苷含量随提取时间的延长有较明显的提高,当提取时间为40min时,所测腺苷含量达到最大,为192.87mg/100g;由图3b可知,随温度升高,所测腺苷含量呈下降趋势,这可能是由于腺苷分子中羟基较多,在温度较高的条件下,腺苷分子内或分子间易形成氢键,导致分子结构发生变化所致;提取时间及温度对所测虫草素的影响均不大。最终确定40min为最佳提取时间,30°C为最佳提取温度。

## 2.3.3 超声功率及提取次数的优化

超声功率对虫草素的含量影响较小,但随超声功率的增大,腺苷含量略有提高。因此,选择实验仪器所能达到的最大超声功率700W;提取次数对虫草素和腺苷的影响较小,实验结果表明:用水提取1次,提取40min即可将腺苷和虫草素提取完全,提取2次仅使腺苷和虫草素的提取率分别增加0.044%和2.32%,因此1次提取即可满足分析要求。

## 2.3.4 正交试验及验证

在单因素试验的基础上,选取水的体积分数、提取温度及提取时间3个因素,每个因素设置3个水平,设计了 $L_9(3^3)$ 正交试验,见表1。

由表1可知,影响腺苷提取率的主次因素为 $A > C > B$ ,即水的体积分数对腺苷提取率的影响最大,提取时间次之,提取温度影响最小。考察 $A$ 、 $B$ 、 $C$ 3因素在3个水平上的变化,得出最佳提取条件为 $A_3B_3C_3$ ,即提取液为水、提取温度30°C、提取时间40min;影响虫草素提取率

的主次因素为: $A > B > C$ ,即水的体积分数对虫草素提取率的影响最大,提取温度次之,提取时间影响最小。考察 $A$ 、 $B$ 、 $C$ 3因素在3个水平上的变化,得出最佳提取条件为 $A_3B_3C_3$ ,即提取液为水、提取温度30°C、提取时间40min。因条件变化对两者提取率的影响一致,所以选择 $A_3B_3C_3$ 作为最终提取条件。因正交试验中9号实验恰好是此条件组合,故无需再次验证。所以最终提取条件选择水为提取液,提取温度30°C,提取时间40min。

表1  $L_9(3^3)$ 正交试验设计及结果Table 1 Results of  $L_9(3^3)$  orthogonal tests

试验号	A水的体积分数/%	B提取温度/°C	C提取时间/min	腺苷含量/(mg/100g)	虫草素含量/(mg/100g)
1	1(80)	1(25)	1(30)	115.68	145.31
2	1	2(35)	2(50)	119.64	146.98
3	1	3(30)	3(40)	120.13	146.92
4	2(90)	1	3	124.63	146.99
5	2	2	1	120.14	147.58
6	2	3	2	124.98	147.63
7	3(100)	1	2	131.65	149.99
8	3	2	1	130.21	150.26
9	3	3	3	130.99	151.21
$k_1$	118.48	123.99	122.01		
$k_2$	123.25	123.33	124.94		
$k_3$	130.95	125.37	125.25		
R	12.47	2.04	3.24		
$k_1$	146.40	147.43	147.72		
$k_2$	147.40	148.27	148.20		
$k_3$	150.49	148.59	148.37		
R	4.09	1.16	0.65		

## 2.4 精密度实验

表2 精密度实验结果

Table 2 RSDs of precision for adenosine and cordycepin

样品	峰面积(AU·s)						RSD/%	
腺苷	748608	747444	750595	753165	744101	743318	747871.833	0.504
虫草素	799941	798786	802083	804776	795191	796562	799556.500	0.442

由表2可知,取质量浓度为20 $\mu$ g/mL的腺苷和虫草素混标溶液,过0.45 $\mu$ m微孔滤膜后注入进样瓶并编号。连续进样6次,腺苷和虫草素的RSD值分别为0.504%、0.442%,均小于2.0%,证明采用本实验方法对腺苷和虫草素进行1次性定量分析时,重复性好,结果可靠。

## 2.5 重复性实验

精密称取6份0.50g的虫草子实体干燥粉末,按1.3.2节方法制备供试品溶液,进样。测得腺苷的平均含量为127.51mg/100g, RSD为3.311%( $n=6$ );虫草素的平均含量为148.771mg/100g, RSD为3.313%( $n=6$ ),表明采用本实验方法对蛹虫草子实体中腺苷和虫草素进行1次性定量分析时重复性良好。

## 2.6 稳定性实验

采用优化后的提取方法对某一样品进行前处理,分别在室温条件下放置不同时间(0、4、8、12、16、20、24h),测定其腺苷和虫草素的含量。结果表明:在24h

内, 采用本实验提取条件提取的溶液, 其腺苷和虫草素的含量保持相对稳定, 腺苷和虫草素6次实验的平均RSD值分别为4.11%和0.50%。

2.7 回收率实验

2.7.1 空白回收实验

取质量浓度20 $\mu\text{g/mL}$ 的腺苷和虫草素混标溶液, 过0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜后注入进样瓶中, 连续进样3次, 以标准曲线定量。测得腺苷和虫草素的空白回收率平均值分别为99.13%、99.18%, 说明色谱系统检测灵敏度高, 稳定性好。

2.7.2 加标回收实验

称取蛹虫草子实体干燥粉末0.50g至50mL具塞离心管中, 加入15mL超纯水, 塞紧, 超声提取40min, 过滤至25mL容量瓶中, 加入1.0mL 0.5mg/mL腺苷和虫草素混标溶液, 定容, 过0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜后分别注入进样瓶中, 编号, 进样分析。

表3 回收率实验结果

Table 3 Recovery rates of adenosine and cordycepin in spiked samples

样品	添加量( $\mu\text{g/mL}$ )	检测值( $\mu\text{g/mL}$ )	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
腺苷	20	19.45	97.25	95.78	1.54
	20	19.16	95.80		
	20	18.86	94.30		
虫草素	20	18.93	94.65	94.35	1.25
	20	18.61	93.05		
	20	19.07	95.35		

由表3可知, 腺苷回收率为94.30%~97.25%, 平均回收率为95.78%, RSD为1.54%; 虫草素回收率为93.05%~95.35%, 平均回收率为94.35%, RSD为1.25%。说明该实验方法加标回收效果较好, 可用于蛹虫草子实体中腺苷和虫草素的含量测定。

2.8 供试样品测定

采用优化后的提取条件对某一人工培养的蛹虫草样品进行前处理, 具体处理步骤及液相条件参照1.3节。吸取处理好的样品溶液1mL, 经0.45 $\mu\text{m}$ 水相微孔滤膜过滤后注入进样瓶中。所得液相色谱图如图4所示, 其中标准溶液的质量浓度均为20 $\mu\text{g/mL}$ 。其中腺苷和虫草素的含量分别为162.81mg/100g和148.03mg/100g, 平行处理3次, RSD分别为2.125%、1.876%。

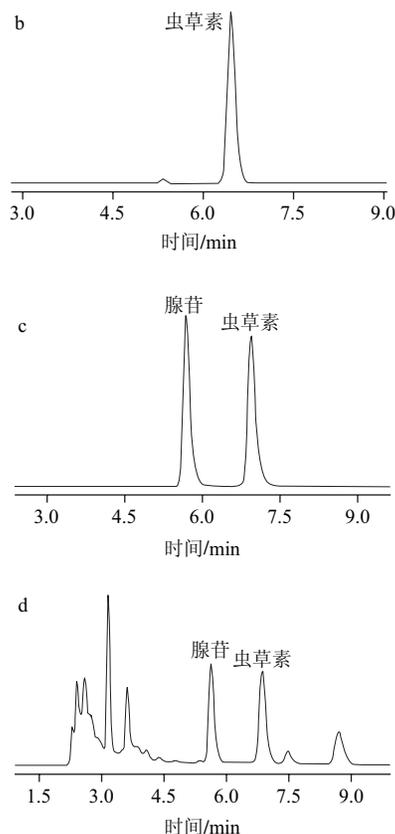
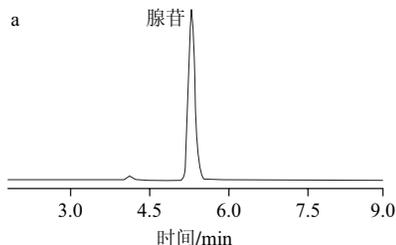


图4 腺苷单标(a)、虫草素单标(b)、混标(c)及供试样品(d) 高效液相分离图谱

Fig.4 HPLC profiles of individual and mixed standards and sample

3 结论

本实验建立了一种高效液相色谱法1次进样同时测定蛹虫草子实体中腺苷和虫草素的方法, 并通过单因素试验及正交试验对样品提取条件进行了较全面的优化, 最终选择提取条件为提取液为水、提取时间40min、提取温度30 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率700W、提取次数1次。该方法主要有以下优点: 1)样品前处理简单, 经水超声, 一次性提取即可; 2)回收率高、稳定性好。腺苷和虫草素的加标回收率分别为95.78%、94.35%, 重复测定的RSD分别为3.311%、3.313%( $n=6$ ); 3)较已报道的分析方法, 简化了流动相的组成, 尤其避免了缓冲盐的使用对仪器的损伤, 以甲醇-水为流动相等梯度洗脱, 分析过程简便。

参考文献:

- [1] 邵力平. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984: 109.
- [2] 梁宗琦. 中国真菌志第三十二卷虫草属[M]. 北京: 科技出版社, 2007.
- [3] 张兴辉, 石力夫, 胡晋红. 冬虫夏草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(11): 722-724.
- [4] 甘宾宾, 潘艳坤. HPLC法测定保健食品中虫草素和腺苷含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1310-1312.

- [5] SUGAR A M, McCAFFREY R P. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin)[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(6): 1424-1427.
- [6] AHN Y J, PARK S J, LEE S G, et al. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48(3): 2744-2748.
- [7] CHANG Huiling, CHAO Gueirung, CHEN Chinchu, et al. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia[J]. *Food Chemistry*, 2001, 74(8): 203-207.
- [8] XU C P, KIM S W, HWANG H J, et al. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240[J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(9): 1025-1030.
- [9] 范志华, 汤卫华, 林霖. HPLC法测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(7): 94-97.
- [10] 张永康, 胡江宇, 欧阳辉, 等. 高效液相色谱法测定虫草酒中的虫草素[J]. *食品科学*, 2006, 27(7): 199-201.
- [11] THOMAS H, STEEN H H. Separation of nucleosides using capillary electrochromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1999, 836(2): 315-324.
- [12] 杨昕, 王瑞华, 涂秩平, 等. 高效液相色谱法同时测定人工蛹虫草子实体中核苷类成分的含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(8): 1097-1099.
- [13] 夏敏. 反相高效液相色谱法测定蛹虫草中虫草素的含量[J]. *淮阴工学院学报*, 2004, 13(3): 22-24.
- [14] 国锦琳, 陈璐, 范华玲, 等. HPLC测定凉山虫草中的腺苷[J]. *华西药理学杂志*, 2010, 25(1): 59-60.
- [15] 刘小芳, 薛长湖, 常耀光. 反相高效液相色谱法测定蛹虫草中腺苷和虫草素的含量[J]. *食品科学*, 2010, 31(16): 172-175.
- [16] 李祥玲, 胡劲松, 陈作红. HPLC测定人工蛹虫草及其培养基中虫草素和腺苷含量[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2010, 33(2): 107-110.
- [17] 毛新亮, 郑国栋, 张晨, 等. 反相高效液相色谱法同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素、肌肝含量方法的研究[J]. *中南药学*, 2009, 7(12): 895-897.
- [18] 刘小莉, 周剑忠, 王英, 等. 虫草发酵菌丝体中腺苷和虫草素含量的检测[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(12): 2507-2508.