

液相色谱法测定人工虫草中 虫草素和腺苷的含量

LC-054

摘要：建立了液相色谱法测定人工虫草中的虫草素和腺苷的含量的方法。样品以50%的乙醇水溶液为萃取溶剂，经微波萃取后过滤进样分析，紫外检测器检测。方法简便快速，易操作。腺苷线性范围0.25~50.0 mg/L，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ分别为0.043和0.142 mg/L，回收率99.6~114.1%。虫草素线性范围0.5~100.0 mg/L，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ分别为0.080和0.268 mg/L，回收率97.0~104.7%。

关键词：虫草素 腺苷 人工虫草 含量 液相色谱法

腺苷(Adenosine)全称腺嘌呤核苷，是各种核苷中的一种，也是核酸的基本结构单位。腺苷广泛存在于动物的肝脏，以及冬虫夏草等生物体中，它具有参与人体代谢和生理调节的功能。虫草素(Cordycepin)又称虫草菌素、蛹虫草菌素、3-脱氧腺苷，它是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗菌素。在蛹虫草、虫草菌丝体等物质中均含有虫草素，虫草素具有抗菌、消炎、抗氧化、抗肿瘤、调节人体内分泌等作用。腺苷和虫草素的结构式见图1和图2。

近年来，市场上出现了各种品牌的人工虫草和不少以腺苷、虫草素为主要功能因子的保健品。目前，已有一些对腺苷和虫草素含量测定的报道。但采用《中华人民共和国药典》2005年版第一部中的提取方法，操作繁琐，费时较长。

本文采用岛津液相色谱LC-20A建立了一种同时准确测定样品中腺苷及虫草素的含量的方法，该方法简便、快捷，能满足相关样品中虫草素和腺苷的分析检测要求。

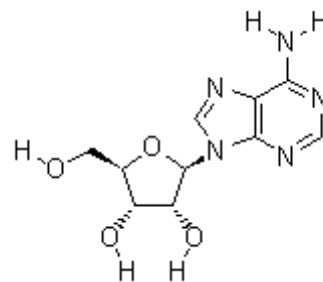


图1 腺苷的结构式

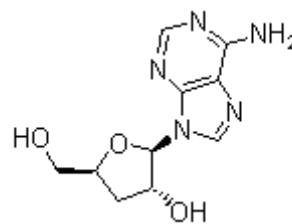


图2 虫草素的结构式

实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

Shimadzu LC-20A和二极阵列检测器。具体配置为：输液泵LC-20AD×2，在线脱气机DGU-20A3，自动进样器SIL-20AC，柱温箱CTO-20AC，控制器CBM-20A，紫外检测器SPD-20AV，色谱工作站LCsolution V1.26。

1.1.2 试剂

乙腈，HPLC级，Merck公司；纯水，Millipore纯水机制得；腺苷标准品和虫草素标准品购自Sigma(St. Louis, USA)公司。

1.2 标准品溶液的配制及样品前处理

1.2.1 储备液配制

称取腺苷固体12.5 mg，加入乙腈溶解，最后定容到25 mL，得到浓度为0.5 mg/mL的储备液。按照上述方法，配制浓度为1 mg/mL的虫草素储备液。

1.2.2 标准溶液配制

分别移取两种储备液各0.05 mL到同一个100 mL的容量瓶中，用流动相定容到刻度，摇匀后得到腺苷浓度为0.25 mg/L，和虫草素浓度为0.5 mg/L的混合标准溶液。依此法，配制虫草素浓度为1 mg/L，2 mg/L，5 mg/L，10 mg/L和100 mg/L混合标准溶液，对应溶液里面，腺苷的浓度为0.5 mg/L，1 mg/L，2.5 mg/L，5 mg/L和50 mg/L。

1.2.3 前处理步骤

取市售人工虫草粉末2.00 g，用20 mL 50%的乙醇溶液溶解，放置于微波炉中，选定功率40 W，提取3 min。提取完毕后，置于离心机中，转速400 r/min离心10 min，弃去残渣，取上清液并定容于100 mL容量瓶中。进样前用孔径为0.45 μm的滤膜进行过滤。

1.3 分析条件

流动相：乙腈/水 = 8/92(v/v)

流速：1.0 mL/min

进样体积：10 μL

色谱柱：GL Science inertsil ODS-SP，4.6 mm

I.D×150 mm L.，5 μm

柱温：35℃

检测波长：260 nm

结果与讨论

2.1 线性范围和检出限

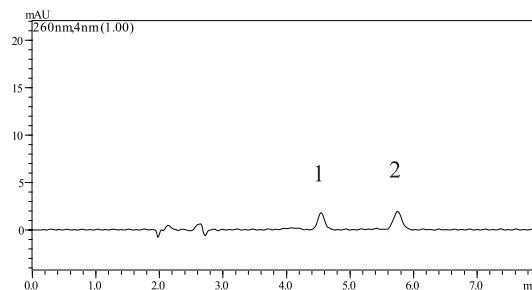


图3 混合标准溶液色谱图(1=腺苷0.25 mg/L, 2=虫草素0.5 mg/L)

取各浓度的混合标准溶液分别进样分析，得到标准曲线如下图4和图5，标准曲线方程如表1。

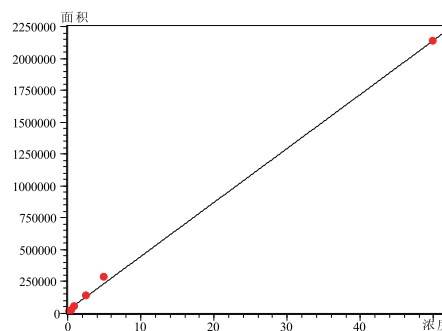


图4 腺苷的校准曲线

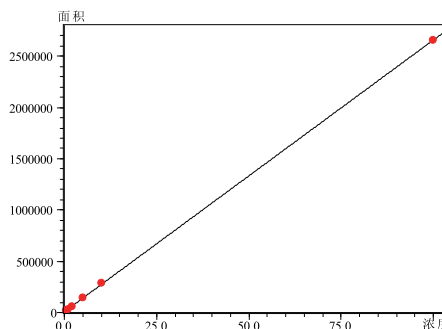


图5 虫草素的校准曲线

表1 标准曲线方程

组分	Y=aX+b		R
	a	b	
腺苷	42372.59	24254.73	0.9995
虫草素	26516.45	7824.448	1.0000

各组分的检出限和定量限，见表2。

表2 各组分的检出限和定量限

组分	LOD(mg/L)	LOQ(mg/L)
腺苷	0.043	0.142
虫草素	0.080	0.268

2.2 精密度考察试验

同一日内连续进样分析，溶液中腺苷浓度分别为0.5、5.0和50.0 mg/L，虫草素浓度分别为1.0、10.0和100.0 mg/L，考察各化合物的保留时间和峰面积日内精密度，分析结果见表3。保留时间RSD%<0.5%，峰面积RSD%<2.0%。

表2 各组表3 日内精密度考察结果(n=6)

组分	浓度(mg/L)	保留时间RSD%	峰面积RSD%
腺苷	0.5	0.105	1.787
	5.0	0.220	1.668
	50.0	0.255	1.731
虫草素	1.0	0.161	1.927
	10.0	0.232	1.530
	100.0	0.243	0.468

连续三天进样分析，溶液中腺苷浓度分别为0.5、5.0和50.0 mg/L，虫草素浓度分别为1.0、10.0和100.0 mg/L，考察各化合物的保留时间和峰面积日间精密度，分析结果见表4，保留时间RSD%<1.0%，峰面积RSD%<3.4%。

表4 日间精密度考察结果(n=3)

组分	浓度(mg/L)	保留时间RSD%	峰面积RSD%
腺苷	0.5	0.143	3.376
	5.0	0.622	1.655
	50.0	0.860	1.189
虫草素	1.0	0.487	2.009
	10.0	0.681	1.517
	100.0	0.918	0.761

2.3 加标回收率试验

取同一阳性样品两份，按照上述方法处理，其中一份为基准，另一份加入腺苷和虫草素标准品，样品加标色谱图见图6，回收率结果见表5。

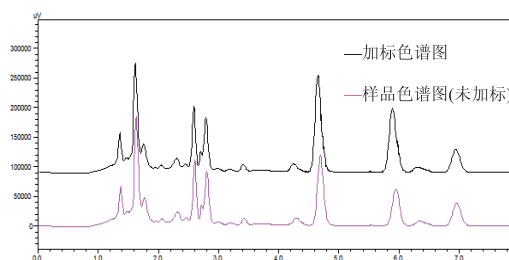


图6 样品加标色谱图

表5 样品加标回收率考察结果

组分	加标浓度(mg/L)	回收率(%)
腺苷	0.25	114.1
	5.0	99.7
	25.0	99.6
虫草素	0.5	104.7
	10.0	97.0
	50.0	98.8

2.4 样品分析

购买三种市售人工蛹虫草(分别记为样品1、样品2和样品3),按照上述方法处理。测定各样品中腺苷和虫草素的含量,样品色谱图见图7,测定结果见表6。

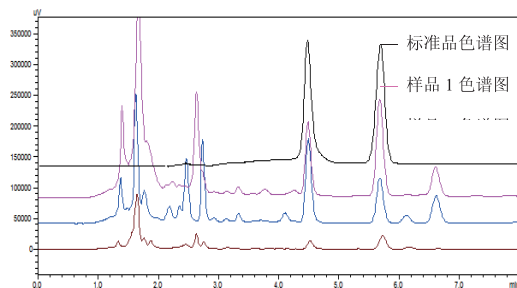


图7 标样和样品色谱图

表6 实际样品测定结果

组分	腺苷	虫草素
样品 1(mg/g)	0.917	2.397
样品 2(mg/g)	1.061	1.073
样品 3(mg/g)	0.083	0.324

结论

本文使用岛津高效液相色谱LC-20A建立了一种同时准确测定样品中腺苷及虫草素的含量的方法。该方法的标准曲线线性关系良好,重现性好,可用于人工蛹虫草和含有腺苷、虫草素的保健品中腺苷和虫草素的分析检测。与2005年版药典所规定的提取方法相比,本方法的前处理时间大大缩短。此外,该方法仅使用了乙腈和水作为流动相,方便直接将该方法转化为LC-MS联用方法,进一步改善该方法的灵敏度和选择性,并提供有效的定性手段,为人工虫草和含有虫草成分的保健品提供有效的质量控制保障。