

# 高效液相色谱法测定虫草胶囊中腺苷的含量

王桂英<sup>1\*</sup>, 孙伟红<sup>2</sup>, 庄燕<sup>1</sup>

(1. 济南市食品药品检验检测中心, 济南 250102; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 农业部水产品质量安全风险评估实验室(青岛), 青岛 266071)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定虫草胶囊中腺苷的含量。**方法** 样品经过研碎、超声处理、离心、过滤后上机待测。使用岛津 VP-ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以甲醇-0.04 mol/L 磷酸二氢钾(15: 85, V:V)为流动相; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长为 262 nm。**结果** 腺苷在 0.7~70 μg/mL 的范围内呈良好线性关系,  $r=0.9999$ , 回收率为 99.1%~99.5%, 相对标准偏差为 0.2%~0.6%。**结论** 本研究建立的方法简便、快捷、准确, 可准确测定虫草胶囊中腺苷的含量。

**关键词:** 高效液相色谱法; 虫草胶囊; 腺苷

## Determination of content of adenosine in cordyceps capsules by high performance liquid chromatography

WANG Gui-Ying<sup>1\*</sup>, SUN Wei-Hong<sup>2</sup>, ZHUANG Yan<sup>1</sup>

(1. Jinan Food and Drug Inspection Center, Jinan 250102, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Qingdao), Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determining the content of adenosine in cordyceps capsules by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** After crushing, ultrasonic treatment, centrifugation and filtration, samples were detected by HPLC. The C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used and methanol-0.04 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (15:85, V:V) was used as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and sampling amount was 10 μL. The detection wavelength was 262 nm. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.7-70 μg/mL for adenosine. The average recovery were 99.1%-99.5% and relative standard deviations (RSD) were 0.2%-0.6%. **Conclusion** The established method is simple, rapid and accurate, which can be used for the quality control of adenosine in cordyceps capsules.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography; cordyceps capsules; adenosine

## 1 引言

冬虫夏草是麦角菌科真菌冬虫夏草菌(*Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc.)寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座

和幼虫尸体的干燥复合体, 其性甘味平, 功能为补肾益肺, 止血化痰, 主治肾虚精亏, 阳痿遗精, 腰膝酸痛, 久咳虚喘, 劳嗽咯血<sup>[1]</sup>。由于冬虫夏草天然资源数量极少, 目前市场上多为蛹虫草。蛹虫草主要是寄生鳞翅目昆虫的蛹, 与

\*通讯作者: 王桂英, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为保健食品、化妆品与药品的质量控制与资源研究。E-mail: wanggy2011@126.com

\*Corresponding author: WANG Gui-Ying, Senior Engineer, Jinan Food and Drug Inspection Center, Jinan 250102, China. E-mail: wanggy2011@126.com

冬虫夏草菌相比, 生长较快, 容易人工培养产生子实体, 因此, 人们常把蛹虫草作为冬虫夏草的替代品进行开发利用。两者都具有重要的药用价值, 成为近年来研究的热点<sup>[2]</sup>。虫草胶囊是将蛹虫草萃取物与辅料经特定工艺制成的保健食品, 腺苷是虫草及其制品中重要的活性成分<sup>[3]</sup>。

腺苷(adenosine), 全称腺嘌呤核苷, 结构由腺嘌呤的 N-9 与 D-核糖的 C-1 通过  $\beta$  糖苷键连接而成<sup>[4]</sup>。腺苷具有改善心脑血管循环<sup>[5]</sup>、抑制神经系统<sup>[6]</sup>、抗辐射<sup>[7]</sup>、保护心脏<sup>[8]</sup>等生理功能。腺苷测定的常用方法为薄层色谱法<sup>[9]</sup>、毛细管电泳法<sup>[10]</sup>和液相色谱法<sup>[11]</sup>, 其中液相色谱法的分离度好, 杂质干扰少, 定量准确, 是公认的标准方法。众多学者对虫草制品中腺苷含量测定进行了探索和研究<sup>[12,13]</sup>, 《保健食品检验与评价技术规范》中腺苷含量的测定方法就是液相色谱法<sup>[14]</sup>, 但是以上方法专属性较差, 不适用于基质复杂的虫草胶囊的检测, 十分必要建立能够用于检测虫草制品中腺苷含量的方法。

本研究通过优化提取条件, 提高方法的提取效率, 并优化色谱条件, 建立一种能用于虫草胶囊中腺苷含量的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测方法, 为虫草胶囊质量控制方法提供科学依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

腺苷标准品(批号: 33620050, 纯度 99.9%, 上海安谱实验科技股份有限公司); 甲醇、乙醇、磷酸二氢钾(色谱纯, 德国默克公司); 超纯水(18.2 M $\Omega$ ·cm)。

虫草胶囊由光晟生物科技股份有限公司提供。

### 2.2 仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配紫外检测器, 美国安捷伦仪器有限公司); KQ-300 E 超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司); CR22G 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司); ME5 BT125D 电子天平(0.01 mg, 德国赛多利斯); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品前处理

取 20 粒供试品, 内容物研细, 精确称量 1.500 g, 用水定容到 25 mL 量瓶中, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz) 15 min, 放冷、摇匀, 10000 r/min 离心 2 min, 上清液以 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 上机测定。

#### 2.3.2 色谱条件

色谱柱: 岛津 VP-ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 甲醇-0.04 mol/L 磷酸二氢钾(15:85, V:V), 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 检测波长: 262 nm; 进样量: 10  $\mu$ L; 检测器为紫外 UV 检测器。

#### 2.3.3 标准品溶液的制备

取腺苷标准品适量, 精密称定, 加水制成每 1 mL 含 14  $\mu$ g 的溶液, 过滤即得。

#### 2.3.4 系统适应性试验

分别精密吸取标准品溶液、供试品溶液各 10  $\mu$ L 注入色谱仪进行分析, 记录色谱图。理论板数按腺苷峰计算大于 5000, 色谱分离度大于 2.0。

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱条件的选择

通过对腺苷水提取液在 200~300 nm 波长范围内进行紫外吸收扫描, 结果表明腺苷在 262 nm 处有最大吸收峰, 故本法选用 262 nm 为检测波长。在流动相的选择上, 考察甲醇分别与浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04 mol/L 的磷酸二氢钾溶液不同配比(5:95、10:90、15:85、20:80, V:V)作为流动相, 发现甲醇-0.04 mol/L 磷酸二氢钾(15:85, V:V)为流动相时腺苷色谱峰峰形良好, 且能够与共存组分实现基线分离(图 1), 最终选择甲醇-0.04 mol/L 磷酸二氢钾(15:85, V:V)为流动相。

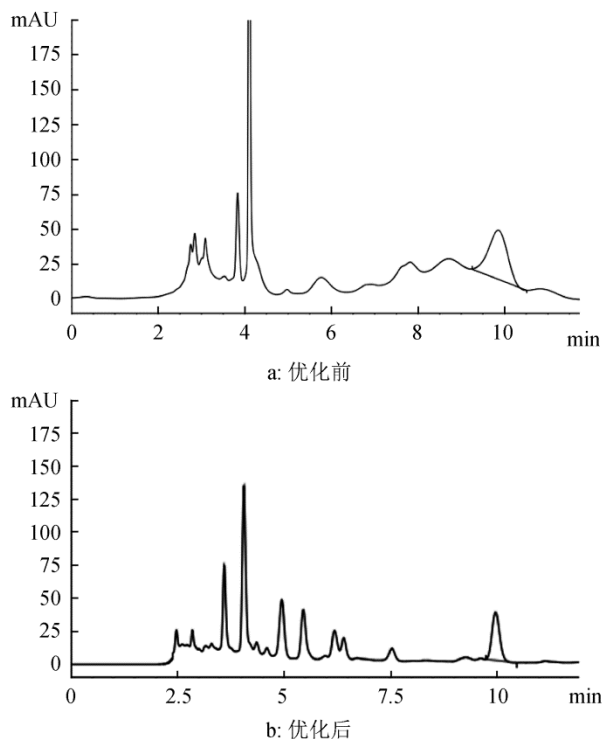


图 1 优化前和优化后的色谱图

Fig.1 Pre optimized and optimized chromatograms

### 3.2 提取方法的考察

#### 3.2.1 提取溶剂的考察

腺苷溶于甲醇、水、丙酮和乙醇等极性溶剂, 本研究分别考察了乙醇-水(3:2, V:V)、50%甲醇溶液、流动相、水

4种溶剂作为提取溶剂对虫草胶囊中腺苷提取效率的影响。乙醇-水(3:2, *V:V*)、50%甲醇溶液提取效果低于流动相、水;而流动相、水2种溶剂提取效率相当。考虑到实验的安全、无污染,最终选择水作为提取溶剂。

### 3.2.2 提取方法的考察

研究比较了回流法、振荡法、热水浴法和超声法对腺苷的提取效率,结果见表1。由表1可以看出,在样品用量、提取时间、提取溶剂使用量都一致的情况下,超声法的提取效率高于其它3种方法,因此采用超声提取法来提取虫草胶囊中的腺苷。

表1 不同提取方法对提取效果的影响( $n=5$ )  
Table 1 Effects of different extraction methods on extraction efficiency ( $n=5$ )

提取方法	腺苷含量(mg/100 g)	相对标准偏差(%)
回流法	33.0	1.20
振荡提取法	32.6	1.04
热水浴法	37.0	0.82
超声提取法	38.1	0.46

### 3.2.3 提取时间的确定

本试验设定了5、10、15、20、25 min 5个不同的超声时间处理,每个处理重复3次,结果见图2。在0~15 min,腺苷的提取率随超声时间的增加而增加,15 min后提取率没有明显变化,确定15 min为腺苷最佳超声提取时间。

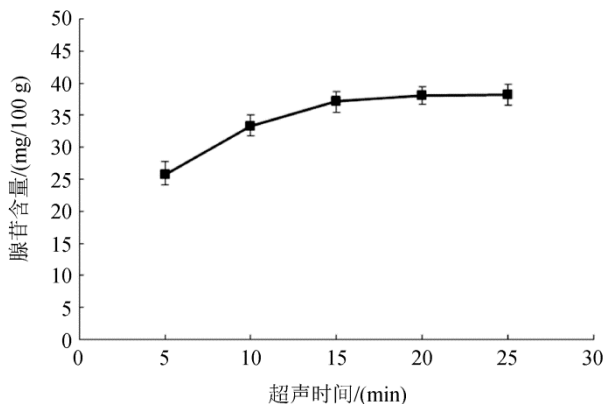


图2 超声时间对腺苷提取率的影响( $n=3$ )

Fig. 2 Effect of extraction time on the yield of adenosine ( $n=3$ )

### 3.3 线性关系和最低检出限考察

取腺苷标准品适量,精密称定,置25 mL量瓶中,加入水振荡使溶解并定容至刻度,制成浓度为350  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,作为标准储备液。准确吸取一定量的标准储备液用水稀释制成腺苷浓度分别为0.7、3.5、7.0、14、35、70  $\mu\text{g/mL}$ 的标准使用液。分别精密吸取10  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。以腺苷标准品峰面积和浓度进行线性回归,计

算腺苷回归方程  $Y=19.86352X-1.97423$ ,相关系数0.9999。实验结果表明,腺苷在0.7~70  $\mu\text{g/mL}$ 的进样量范围内,样品的浓度和峰面积间的线性关系良好。以3倍信噪比为最低检出限,腺苷的检出限为0.02 mg/100 g。图3为腺苷标准溶液和虫草胶囊样品的色谱图。

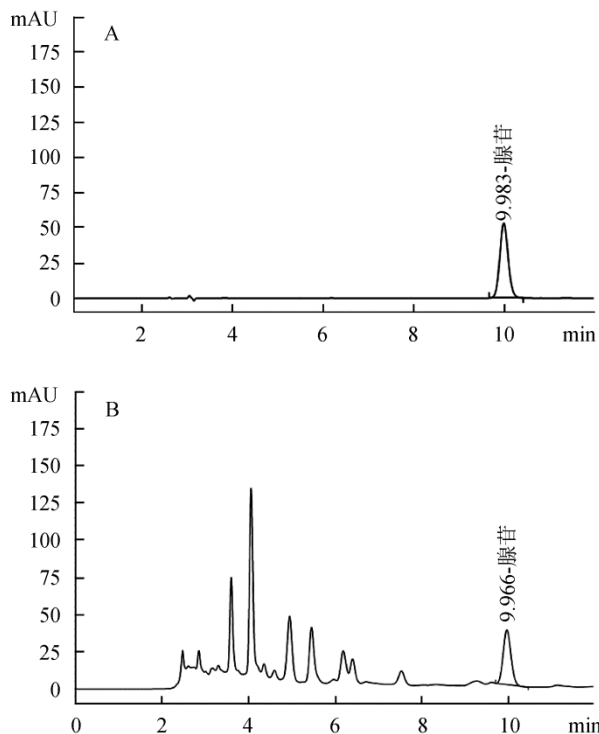


图3 腺苷标准溶液(A)和虫草胶囊样品(B)的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of adenosine standard solution (A) and cordyceps capsules (B)

### 3.4 精密度与稳定性试验

精密吸取线性试验中的标准品溶液10  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。连续进样6次,腺苷峰面积的相对标准偏差为0.46%,实验结果表明,仪器精密度良好。按照上述实验方法制备供试品溶液在室温下放置,于0、2、4、6、8、10、12 h分别进样,计算不同时间腺苷峰面积的相对标准偏差为0.40%,实验结果表明,样品溶液12 h稳定。

### 3.5 重复性试验

取同一批号虫草胶囊(批号:20160114)样品6份,每份1.500 g,按本方法操作制成供试品溶液,精密吸取供试品溶液10  $\mu\text{L}$ ,按2.3.2项下的色谱条件测定,计算腺苷的含量,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.25%,说明本方法的重复性良好。

### 3.6 加标回收率试验

取已知含量的同一批号供试品6份,每份约1.5 g,精密称定,至25 mL容量瓶中,分别精密加入一定量的腺苷

标准品, 按本方法操作制备成供试品溶液, 按 2.3.2 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 2, 回收率为 99.1%~99.5%, RSD 为 0.2%~0.6%, 结果表明该方法可靠、易行, 具有良好的回收率。

表 2 虫草胶囊中腺苷加标回收率及精密度测定( $n=6$ )  
Table 2 Recoveries and relative standard deviations of adenosine in cordyceps capsules ( $n=6$ )

样品号	样品中的量( $\mu\text{g}$ )	理论加标量( $\mu\text{g}$ )	实际测得标准品量( $\mu\text{g}$ )	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
1	573.1	420	417.4	99.4		
2	573.4	420	415.1	98.8	99.1	0.3
3	573.8	420	415.8	99.0		
4	573.1	525	523.1	99.6		
5	573.4	525	525.2	100.0	99.5	0.6
6	573.5	525	519.3	98.9		
7	573.4	700	696.4	99.5		
8	573.4	700	694.1	99.2	99.4	0.2
9	573.5	700	695.6	99.4		

### 3.7 样品含量测定

取 3 批虫草胶囊, 按本方法操作制备供试品溶液, 照 2.3.2 项下色谱条件进样实验, 测定结果见表 3。结果表明, 检测值与产品的标示值的相对偏差范围为 0.3%~0.6%, 结果准确度高, 说明本方法适合虫草胶囊中腺苷的定量分析。

表 3 腺苷含量测定结果( $n=3$ )  
Table 3 Determination of adenosine content ( $n=3$ )

批号	腺苷含量( $\text{mg}/100\text{g}$ )	产品中腺苷标示含量( $\text{mg}/100\text{g}$ )	检测值与标示值的相对偏差(%)
20160114	38.13		0.3
20160115	38.21	38.0	0.6
20160116	38.14		0.4

## 4 结论

本研究对虫草胶囊中腺苷的提取条件进行了优化, 即: 水作溶剂, 超声提取 15 min。采用 HPLC 测定腺苷的含量, 以甲醇-0.04 mol/L 磷酸二氢钾(15:85,  $V:V$ )为流动相, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 10  $\mu\text{L}$ , 检测波长为 262 nm。腺苷在 0.7~70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内呈良好线性关系,  $r=0.9999$ , 平均回收率为 99.1%~99.5%, 精密度与稳定性试验相对标准偏差分别为 0.46%、0.40%, 重复性试验相对标准偏差为 0.25%。该方法的优点是样品前处理简单、回收率高、稳

定性好, 实现了对腺苷的准确测定, 方法高效、经济、准确、灵敏, 适用于虫草制品中腺苷的质量控制。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.  
State Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1<sup>st</sup> Edition) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [2] 张姝, 张永杰, Shrestha B, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 577-597.  
Zhang S, Zhang YJ, Shrestha B, et al. Research status, problems and prospects of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2013, 32(4): 577-597.
- [3] 王征, 刘建利. 冬虫夏草化学成分研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1157-1160.  
Wang Z, Liu JL. Research progress on the chemical constituents of *Cordyceps sinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2009, 40(7): 1157-1160.
- [4] 张开慧. 腺苷的生物学功能及测定方法[J]. 甘肃畜牧兽医, 2017, 47(8): 27-29.  
Zhang KH. Biological function and determination method of adenosine [J]. Gansu Anim Vet Sci, 2017, 47(8): 27-29.
- [5] Zang WJ, Sun L, Yu XJ. Cardioprotection of ischemic postconditioning and pharmacological posttreatment with adenosine or acetylcholine [J]. Acta Phys Sin, 2007, 59(5): 593-600.
- [6] 李斌, 陈金波, 宋晓文, 等. 侧脑室注射腺苷  $A_1$  受体激动剂对硝酸甘油偏头痛模型大鼠的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(12): 1091-1094.  
Li B, Chen JB, Song XW, et al. Analgesic effect of adenosine  $A_1$  receptor agonist into lateral ventricles in rat models of migraine [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2016, 33(12): 1091-1094.
- [7] 黄建忠, 梁宗琦, 刘爱英. 粉被虫草无性型对苏云金芽孢杆菌抗紫外辐射的保护效应[J]. 西南农业学报, 1992, 5(2): 63.  
Huang JZ, Liang ZQ, Liu AY. The protective effect of *Cordyceps militaris* clones on UV radiation of *Bacillus thuringiensis* is protected by ultraviolet radiation from *Bacillus Cordyceps* asexual type [J]. Southwest China J Agric Sci, 1992, 5(2): 63.
- [8] Tsim KWK. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41: 1571.
- [9] 郝美玲. 薄层扫描法测定复方虫草止咳颗粒中腺苷的含量[J]. 中国药品标准, 2003, 4(6): 20-21.  
Hao ML. TLC scanning method for determination of adenosine in compound *Cordyceps sinensis* Zhike granules [J]. Drug Stand China, 2003, 4(6): 20-21.
- [10] 胡月芳, 黄志强, 李金芳. 毛细管电泳-电化学检测法测定淮山中薯蓣皂苷和腺苷含量[J]. 分析科学学报, 2016, 32(6): 795-799.  
Hu YF, Huang ZQ, Li JF. Capillary electrophoresis with electrochemical detection for determination of diosgenin and adenosine in Huaishan [J]. J Anal Sci, 2016, 32(6): 795-799.
- [11] 艾则孜·莫合买提, 沙丽娜, 单莲莲, 等. HPLC 法同时测定新疆贝母中 3 种核苷类成分[J]. 中成药, 2017, 39(5): 1097-1099.  
Azizi M, Salina, Dan LL, et al. Simultaneous determination of three nucleosides contents using high performance liquid chromatography in

- Fritillaria Liliaceae* [J]. Chin Tradit Patent Med, 2017, 39(5): 1097-1099.
- [12] 沈萍, 汪军, 李忠贵. HPLC 测定大豆磷脂虫草头孢菌粉溶液中腺苷的含量[J]. 江西中医药大学学报, 2016, 28(02): 65-67.
- Shen P, Wang J, Li ZG. HPLC determination of adenosine content in soybean phosphatide cephalosporin solution [J]. J Jiangxi Coll Tradit Chin, 2016, 28(2): 65-67.
- [13] 袁蜜, 乐昕, 徐鲁荣, 等. 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[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 306-310.
- Yuan M, Le X, Xu LR, et al. Simultaneous determination of adenosine and Cordycepin in *Cordyceps militaris* fruiting body by HPLC [J]. Food Sci, 2013, 34(14): 306-310.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与技术评价规范 2003 年版[Z].

Ministry of Health, people's Republic of China. Standard version of health food inspection and technical evaluation (2003 Edition) [Z].

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介

王桂英, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为保健食品、化妆品与药品的质量控制与资源研究。

E-mail: wanggy2011@126.com

## “食品的化学性风险”专题征稿函

化学性有害因素是近年来引起食品安全问题的主要因素之一, 化学性危害物存在于从农田到餐桌的整个食品供应链, 包括原料种养环节引入的农兽药、除草剂、生长调节剂及抗生素, 食品加工过程中新形成的有害物, 如丙烯酰胺、杂环胺、三氯丙醇等, 以及以铅、砷、汞等有害矿质元素为代表的环境污染物。随着全球对食品安全问题的关注, 食品的化学安全问题已成为同行关注的热点领域。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品的化学性风险”专题, 由中国农业大学 食品科学与营养工程学院 陈芳教授担任专题主编, 主要围绕食品中化学性危害物的分析检测方法、安全性评价、产生途径、形成机理、控制方法、毒性干预等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁研究员和专题主编 陈芳教授 特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 **2018 年 7 月** 出版, 请在 **2018 年 5 月 10 日** 前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com) (注明专题)

E-mail: [jfoodsqa@126.com](mailto:jfoodsqa@126.com) (注明专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部