

## HPLC 测定姬松茸中谷胱甘肽的含量

陈芬<sup>1,2</sup>, 赵晓燕<sup>1\*</sup>, 饶钦雄<sup>1</sup>, 邢增涛<sup>1</sup>, 周昌艳<sup>1</sup><sup>1</sup>上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403; <sup>2</sup>上海海洋大学, 上海 201306

**摘要:** 本实验建立了 HPLC 法测定姬松茸中谷胱甘肽的方法, 在水提条件下, 用 Waters RP18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), 以 0.1% 三氟乙酸水溶液-甲醇(98:2, v/v) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 200 nm, 进样量 10 μL, 谷胱甘肽在 8 min 内出峰。该方法中谷胱甘肽标准品在 8 ~ 160 μg/mL 范围内线性良好,  $R^2 = 0.9997$ , 检出限为 0.125 μg/mL, 加标回收率在 94.18% ~ 95.80% 之间, RSD < 2%。本方法快速、简便、准确, 灵敏度高, 适合批量样品的检测与分析。

**关键词:** 谷胱甘肽; 高效液相色谱; 姬松茸; 提取

**中图分类号:** TS207.3

**文献标识码:** A

Determination of Glutathione in *Agaricus blazei* Murrii by HPLCCHEN Fen<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiao-yan<sup>1\*</sup>, RAO Qin-xiong<sup>1</sup>, XING Zeng-tao<sup>1</sup>, ZHOU Chang-yan<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Agro-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;<sup>2</sup>Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** A simple, quick and reliable method was established to determine the content of glutathione (GSH) in *Agaricus blazei* Murrii by HPLC. The sample was ultrasonically extracted by distilled water. The HPLC analysis conditions were developed and optimized as follows: 0.1% trifluoroacetic acid and methanol (98:2, v/v) were used as mobile phases with the flow rate of 1.0 mL/min, The column oven temperature was set at 35 °C. The detection wavelength was set at 200 nm. The presented method showed good linear relationship in the range of 8 μg/mL-160 μg/mL,  $R^2 = 0.9997$ , and the detection limit of GSH was 0.125 μg/mL, the recovery was between 94.18% -95.80% with the RSD less than 2% ( $n = 9$ ). The developed HPLC method was suitable for the analysis and determination of samples in large quantity.

**Key words:** GSH; HPLC; *Agaricus blazei* Murrii; extraction

谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 化学名为: N-(N-L-谷氨酰-L-半胱氨酰)甘氨酸, 其存在于所有的生物细胞中<sup>[1]</sup>, 在生物体内有着重要的作用, 具有抗氧化、清除自由基、解毒、增强免疫力、延缓衰老、抗癌等功效, 是重要的功能因子, 在食品工业、医药工业中应用非常广泛<sup>[2-5]</sup>。随着人们对 GSH 生物活性功能的进一步了解, 筛选富含 GSH 的药食两用植物或菌属类作为外源性 GSH 补充剂来防病、治病受到人们的极大关注。目前制备 GSH 的生产工艺是菌类生物合成法<sup>[6,7]</sup>, 这意味着天然生长的菌类可能富含 GSH 和具备最佳 GSH 生物合成的化学环境。姬松茸 (*Agaricus blazei* Murrii) 又名巴西蘑菇, 是一种珍贵的食(药)用菌, 具有抗癌、降血脂、降血压、

治疗糖尿病、维护肝功能及改善动脉硬化等功效, 目前是联合国粮农组织向全世界推荐发展的食用菌主要品种之一。关于姬松茸中活性肽 GSH 的含量测定及其相关生物活性功能的研究目前还未见报道。本文初步建立了利用溶剂提取法和高效液相色谱法来测定姬松茸中 GSH 含量的方法。

## 1 材料与方法

## 1.1 样品采集

姬松茸子实体, 采于云南省文山州丘北县姬松茸栽培基地, 经云南文山州丘北县金茸食用菌产销专业合作社侯自刚鉴定为姬松茸, 将样品烘干粉碎后储存于干燥器中备用。

## 1.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (Waters 2695 Separations Module, Waters); Waters 2487 紫外检测器 (Waters); 纯水仪 (PURELAB Ultra, ELGA); 涡旋仪 (MX-S,

DRAGON LAB); 高速粉碎机(DFT -100, 上海鼎广设备有限公司); 移液器(L2337GL, GILSON); 电子天平(AW 320, SHIMADZU CORPORATION; XS205DU, METTLED TOLZDO); 超声清洗仪(YCQ-300, 上海凯波超声设备有限公司), 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜(SCAA-105, 上海安普科学仪器有限公司)。

谷胱甘肽标准品(> 98%, 阿拉丁试剂); 甲醇(色谱纯, Merck KgaA, Germany); 乙酸(99.7%, 化学纯, 阿拉丁试剂); 乙醇(分析纯, 阿拉丁试剂); 乙腈(色谱纯, Biologic-Reagents Inc.); 盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸二氢钠(分析纯, 上海生工生物试剂有限公司); 辛烷磺酸钠(分析纯, 上海生工生物试剂有限公司)。

### 1.3 标准溶液的制备

准确称取 20.0 mg 谷胱甘肽标准品, 用高纯水溶解并定容至 50 mL, 制备成浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准溶液储备液。分别取谷胱甘肽标准品储备液 0.5、2.5、5.0、7.5、10 mL 于 25 mL 容量瓶中, 高纯水定容并混匀, 得到 8、40.0、80.0、120.0、160.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液待测。

### 1.4 液相色谱条件的优化

#### 1.4.1 检测波长的选择

将配制好的 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  谷胱甘肽标准溶液, 在 Waters 紫外检测器上进行波长扫描(190 ~ 800 nm), 确定检测波长。

#### 1.4.2 流动相的选择

分别采用 0.1% 甲酸-乙腈、0.1% 甲酸-甲醇、0.1% 三氟乙酸-乙腈、0.1% 三氟乙酸-甲醇、磷酸二氢钠和辛烷磺酸钠-乙腈、磷酸二氢钠和辛烷磺酸钠-甲醇对标准品溶液进行反复检测, 确定最优流动相及其配比。

### 1.5 样品前处理

#### 1.5.1 提取溶剂的筛选

称取已粉碎干燥的姬松茸子实体粉末 0.5 g, 分别加入 25 mL 的 0.1 mol/L HCl、蒸馏水、乙醇于 50 mL 离心管中, 35  $^{\circ}\text{C}$  超声提取 30 min, 超声后冷却至室温。用滤纸过滤, 滤液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤至进样瓶, 进行高效液相色谱测定。按优化后的色谱条件进行分析。

#### 1.5.2 提取时间的筛选

称取已粉碎干燥的姬松茸子实体粉末 0.1 g, 加入 10 mL 的蒸馏水于 50 mL 的离心管中, 35  $^{\circ}\text{C}$  分别超声提取 15、30、45 和 60 min, 超声后冷却至室温,

用滤纸过滤, 滤液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤至进样瓶, 进行高效液相色谱测定。按优化后的色谱条件进行分析。

#### 1.5.3 料液比的筛选

称取已粉碎干燥的姬松茸子实体粉末 0.1 g, 分别加入 5、10、15 和 20 mL 的蒸馏水于 50 mL 离心管中, 35  $^{\circ}\text{C}$  超声提取 30 min, 超声后冷却至室温。用滤纸过滤, 滤液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤至进样瓶, 进行高效液相色谱测定。按优化后的色谱条件进行分析。

### 1.6 方法学考察

#### 1.6.1 标准曲线的绘制

分别取浓度为 8、40、80、120 和 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液, 进行高效液相色谱分析, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ , 以标准品溶液浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。

#### 1.6.2 精密度试验

准确吸取谷胱甘肽标准溶液, 按优化后的色谱条件连续进样 5 次, 测定峰面积, 计算 RSD 值。

#### 1.6.3 重复性实验

取同一批姬松茸样品, 按优化后的提取方法, 平行制备 5 份样品液, 再按照优化后的色谱条件进样, 测定峰面积, 计算 RSD 值。

#### 1.6.4 稳定性试验

准确吸取谷胱甘肽标准溶液, 按优化后的色谱条件于 0、6、12、18、24 h 后分别进样, 测定峰面积, 计算 RSD 值。

#### 1.6.5 加标回收率试验

以姬松茸子实体粉末为基质, 添加不同水平的谷胱甘肽标准储备液, 按优化后的条件进行回收率试验。

### 1.7 姬松茸样品中 GSH 含量的测定

准确称取 3 份姬松茸粉末 0.1 g, 按优化后的条件测定样品中 GSH 的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化结果

#### 2.1.1 检测波长的选择

将配制好的谷胱甘肽标准溶液, 在 Waters 紫外检测器上进行波长扫描(190 ~ 800 nm), 发现谷胱甘肽在 200 nm 处有最大吸收, 因此选择 200 nm 作为检测波长。

### 2.1.2 流动相的选择

0.1% 甲酸-乙腈、0.1% 甲酸-甲醇流动相体系中, GSH 的保留值很小, 容易与样品中低保留组分的色谱峰重叠。采用磷酸二氢钠和辛烷磺酸钠-乙腈、磷酸二氢钠和辛烷磺酸钠-甲醇为流动相时, 检测的灵敏度低, 峰型不好。当采用 0.1% 三氟乙酸-甲醇 = 98:2 (体积比) 为流动相时, GSH 的保留时间有效提高, 并且灵敏度高, 保留时间和峰型都比较好, GSH 标准品色谱图如图 1 所示。

### 2.2 样品处理方法的优化

不同的提取液对姬松茸子实体中谷胱甘肽的溶出效果不同。用醇提取时, 谷胱甘肽的提取效果不好, 受到杂质的干扰大, 峰形和保留时间都受到了很大的影响, 基本不出峰。而水提和酸提相比, 如图 1 所示, 水提条件下, 谷胱甘肽溶出多, 受到溶剂和杂质的干扰小, 峰高和峰面积是盐酸提取条件下的 2 倍左右。因此选择提取剂为蒸馏水。

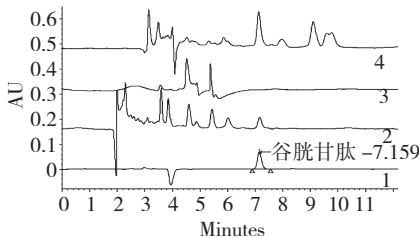


图 1 标准品和样品的 HPLC 色谱图 (1: GSH 标准品; 2: 盐酸提; 3: 醇提; 4: 水提)

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard and sample (1: GSH standard; 2: HCl extract; 3: Alcohol extract; 4: distilled water extract)

不同的料液比对姬松茸子实体中谷胱甘肽的提取量有影响, 结果如图 2, 当料液比为 1:150 时, 谷胱甘肽的提取量明显比其他比例的要多, 而提取时间对谷胱甘肽的提取量也有明显的影响, 如图 3, 谷胱甘肽的含量在 15~45 min 内随提取时间的增加而升高, 但是当提取时间为 60 min 时, 提取量基本不变, 因此提取时间选为 45 min。

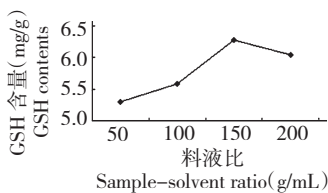


图 2 料液比对谷胱甘肽含量的影响

Fig. 2 Effect of sample-solvent ratio on extraction yield of GSH

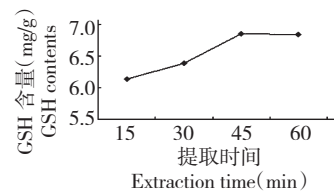


图 3 提取时间对谷胱甘肽含量的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on extraction yield of GSH

### 2.3 方法学考察

#### 2.3.1 标准曲线

按优化的色谱条件, 将配制好的标准溶液进行分析, 进样量 10  $\mu$ L, 每个浓度重复 3 次, 以浓度为横坐标, 峰面积平均值为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 通过回归计算求得回归方程  $Y = 12700X + 51000$ , 相关系数  $R^2 = 0.9997$ , 表明其浓度在 8 ~ 160  $\mu$ g/mL 范围内与峰面积呈良好线性关系。

#### 2.3.2 精密度、稳定性、重复性试验

准确吸取谷胱甘肽标准溶液, 按优化后的色谱条件连续进样 5 针, 根据峰面积计算 RSD 值为 0.24, 说明本实验的精密度很好。谷胱甘肽标准品溶液按上述色谱条件于 0、6、12、18、24 h 后进样, 测定峰面积, RSD 值为 0.64%, 结果表明标准工作溶液在 24 h 内基本稳定。取同一批姬松茸样品, 按优化后的提取方法, 制备 5 份样品液进样, 结果表明本实验重复性良好, RSD 值为 0.5%。

#### 2.3.3 加标回收率试验

采用基质加标法进行添加回收试验, 测定回收率和方法的准确性。每一样品添加 3 个浓度, 每个浓度各做 3 个平行样, 同时测定对照样品中谷胱甘肽的含量, 利用差减法确定加入谷胱甘肽的测定量, 与加入量比较计算谷胱甘肽的添加回收率。谷胱甘肽的平均添加回收率为 95.10%。

### 2.4 样品含量测定

按照优化后的提取方法 (2.2 项) 和色谱条件 (2.1 项) 测定姬松茸子实体中 GSH 的含量为  $6.706 \pm 0.04$  mg/g。

## 3 讨论

姬松茸子实体中的 GSH 和其他基质在不同的提取溶剂里溶出效果不同, 本方法确立了姬松茸中 GSH 含量测定的前处理条件: 以高效、生态的纯水为提取液, 提取时间 45 min, 料液比 1:150; 色谱条件: Waters RP18 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5.0

表 1 加标回收实验 ( $n=9$ )  
Table 1 Results of GSH recovery tests ( $n=9$ )

样品含量 Original amount (mg/g)	加入标样量 Added amount (mg/g)	测定含量 Detected amount (mg/g)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average Recovery (%)	RSD (%)
6.706	5.00	11.572	95.32	95.10	1.43
		11.426			
		11.178			
6.706	10.00	16.52	94.18	95.10	0.92
		16.265			
		16.163			
6.706	15.00	21.292	95.80	95.10	0.65
		21.585			
		21.398			

$\mu\text{m}$ ),以 0.1% 三氟乙酸为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 200 nm,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,谷胱甘肽在 8 min 内出峰。本方法简单、快速,其精密性、准确度和重复性均符合要求。利用本方法测得姬松茸子实体中 GSH 的含量为  $6.706 \pm 0.04$  mg/g,远高于麦胚中 GSH 的含量 1.8071 mg/g(刘千等)<sup>[8]</sup>、黄瓜中 GSH 的含量 150.10  $\mu\text{g/g}$ (曹新志等)<sup>[9]</sup>,这表明姬松茸可作为一种重要的外源性 GSH 来源的食用菌,本方法的建立为姬松茸的深度开发和应用提供了技术支持。

#### 参考文献

- Vina J. Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- Zhai WH(翟文慧), Wang AY(王爱月). Determination of glutathione in healthy food by UV spectrophotometry. *Prev Med Trib* (预防医学论坛), 2005, 11: 134.
- Zhang SF(张书芳), Li Y(李泱). The health and development of food nutrition(食品的营养保健与开发). Zhengzhou: Henan Medical University Publishing House, 2000. 361-370.
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct*, 2000, 1: 343-352.
- Liu C(刘超), Yuan JG(袁建国), Li F(李峰). Glutathione research progress at home and abroad. *Shandong Food Ferment* (山东食品发酵), 2010, 4: 7-10.
- Adams JD, Klaidman JLK, Zhang MI, et al. Brian oxidative stress-analytical chemistry and ther-modynamics of glutathione and DADPH. *Curr Top Med Chem*, 2001, 1: 473-482.
- Shi LP(时丽萍), Guo XW(郭学武), Qi YM(祁业明), et al. Increasing the intracellular glutathione content of yeast by optimizing culture medium. *Food Sci Technol* (食品科技), 2008, 3: 37-40.
- Liu Q(刘千), Chen L(陈黎), Hu YJ(胡用军), et al. Study on extraction and determination method of glutathione from wheat germ. *J Chin Cereal Oils Assoc* (中国粮油学报), 2012, 27: 104-111.
- Cao ZX(曹志新), Chen Y(陈彦). Measurement of glutathione in cucumber by fluorophotometer. *Res Dev Market* (资源开发与市场), 2000, 16: 272-273.