

HPLC 测定人工蛹虫草中虫草素含量

丁杰*, 刘君

四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000

摘要: 本文采用超声波法提取蛹虫草子实体中的虫草素, 并利用高效液相色谱法测定虫草素。选择 ZORBAX Extend-C₁₈ 为色谱柱, 水-甲醇 (95:5) 为流动相, 流速 1.00 mL/min, 检测波长 260 nm, 进样量 10 μL 作为色谱条件时, 虫草素在 10 ~ 1000 μg/mL 范围内有良好的线性关系 ($S = 33054C - 41890$, $R^2 = 0.999$), 平均回收率 103.37%, RSD = 2.26%。

关键词: 蛹虫草子实体; 虫草素; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; Q946.91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.021

Determination of Cordycepin in Cultured Cordyceps Militaris by HPLC

DING Jie* LIU Jiun

Sichuan University of Science & Engineering (ZiGong 643000, Sichuan)

Abstract: This article uses the ultrasonic extraction of Cordycepin in cultured Cordyceps militaris, and adopting the high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of cordycepin. When chromatographic column was ZORBAXExtend-C₁₈, water and methanol (95:5) as mobile phase, flow rate of 1.00 mL/min, detection wavelength of 260 nm, sample quantity 10 μL as a condition of chromatography, cordycepin in 10 ~ 1000 μg/mL has good linear relationship ($S = 3.3 \times 10^4 C - 41890$, $R^2 = 0.9999$), the recovery rate: 103.37%, and RSD: 2.26%.

Key words: Cordyceps militaris fruiting body; Cordycepin; High performance liquid chromatography

蛹虫草又称蛹草、北虫草、北冬虫夏草, 与冬虫夏草同属异种, 主要来源于人工培养^[1,2]。Yoo、Chor 等人发现蛹虫草中的活性成分对人黑色素瘤 B16 细胞、人白血病 HL-60 细胞、人体红血病 K562 细胞及喉癌细胞具有较好抑制效果, 且部分作用优于冬虫夏草^[3-4]。蛹虫草子实体已广泛用于虫草类保健品中, 从蛹虫草子实体中提取虫草素的应用也日益增多。目前检测虫草素的方法主要有薄层色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6]、紫外分光光度法及高效液相色谱法^[7-10]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

蛹虫草子实体 (四川理工学院汇北实验室); 日立 L-2000 高效液相色谱仪; GBC Cintra-4040 紫外-可见分光光度计; AS-5150B 超声波清洗器; 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 乙醇、甲苯为分析纯; 虫草素、

腺苷标准品 (中国药品生物制品鉴定所)。

1.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend-C₁₈ 柱 (Analytical 4.6 × 250 nm 5-Micron 80A); 柱温: 35 °C; 流速: 1.00 mL/min; 流动相: 水: 甲醇 (95:5); 进样量: 10 μL; 检测波长: 260 nm。采用峰面积外标法定量。

1.3 样品处理

取低温冷藏蛹虫草子实体置冰箱急冻室 30 min, 取出粉碎, 过筛, 分批石油醚脱脂, 恒温干燥后置于干燥器中保存备用。准确称取干粉样品 10 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入适量甲苯-乙醇混合液, 放入超声振荡器中, 震荡 1 h。提取液除去多糖、蛋白质等杂质后, 浓缩成浸膏, 配成 50% 的甲醇溶液, 定容至 10 mL, 过 0.45 μL 有机系微孔滤膜后供色谱分析用。

2 结果与讨论

2.1 流动相的确定

在实验过程先后选用了水-乙腈、水-甲醇、磷酸盐缓冲溶液-甲醇不同 pH 作为流动相, 实验结果表

明:中性条件下分离效果较佳且色谱纯有机溶剂用量少、操作简便,有利于节约成本。当水:甲醇体积比为95:5作流动相,保留时间出在可信度较高区域、峰形对称尖锐、检测灵敏度高,见图1(A)。当

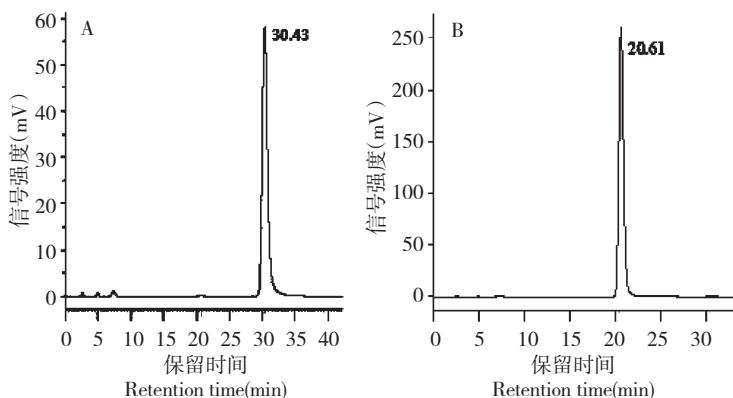


图1 虫草素标准品(A)及腺苷标准品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of cordycepin standard (A) and adenosine (B)

由于子实体中含有的腺苷和虫草素的结构相似,在相同色谱条件下进样腺苷标准品,得到图1(B)。比较可见,腺苷和虫草素的分离度理想。

在此流动相条件下,对蛹虫草子实体提取液进行测定,虫草素与样品中其他杂质能够有效的分开,无干扰,出峰时间适宜,分析稳定,分离效果见图2。

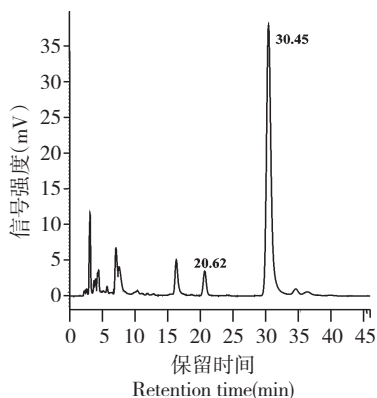


图2 样品的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of ample solution

2.2 检测波长的选择

对虫草素标准品200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,虫草素在260 nm有最大吸收,故选择260 nm作为检测波长,此时其他物质的干扰小(腺苷在此也有吸收响应),方法有较高的灵敏度。

2.3 标准曲线及线性范围

准确称取虫草素标准品5.0 mg,用50%色谱纯甲醇溶解定容于5 mL比色管中,得到1.0 mg/mL

降低水的比例时虫草素有明显的拖尾,而再加大水的比例虽然分离度稍好但保留时间延后很多,浪费时间、试剂,故选择水:甲醇体积比为95:5作为流动相。

标准品储备液。取储备液分别稀释成0.2、0.15、0.10、0.05、0.01 mg/mL的虫草素标准溶液。按照1.2的色谱条件得到峰面积S,以峰面积S对浓度C($\mu\text{g/mL}$)作标准曲线。通过线性回归得到回归方程: $S = 33054C - 41890$ ($R^2 = 0.999$)。实验表明:当虫草素浓度在10~1000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

取0.15 mg/mL的虫草素标准品溶液,在一天内间隔进样7次,每次10 μL 。所得峰面积依次为:4917658、4898024、5093863、4866636、5053892、5009562、4959896, $RSD = 1.696\%$ 。

2.5 加标回收试验

准确吸取已知含量的蛹虫草子实体提取液3份,分别加入对照品适量,每份各进样3次,测定虫草素的平均回收率是:103.37%, RSD 为:2.26%。实验结果见表1。

2.6 样品测定

在选定色谱条件下,以标样的保留时间定性,外标法定量,测定5批子实体中虫草素的含量,结果见表2。

3 结论

本文采用超声波法提取蛹虫草子实体中的虫草素,建立了高效液相色谱测定样品中虫草素含量的方法,样品预处理简单,结果准确,重现性好,精密度

表1 回收实验结果

Table 1 Recovery of cordycepin in samples

样品虫草素含量 Content of cordycepin in sample (mg/mL)	加入标准量 Added amount (mg/mL)	测定平均值 Detected amount (mg/mL)	回收率 Recovery (%)	RSD (%) _s
344	310	670	102.45	0.90
262	207	491	104.69	3.73
197	207	416	102.97	2.14

表2 供试样品测定结果

Table 2 Determination results of cordycepin in sample

样品批号 Sample Lot. No.	1	2	3	4	5
虫草素含量 Content of cordycepin (%)	0.0344	0.0197	0.0262	0.0389	0.0222

高,效果令人满意。本方法对于虫草素的提取生产和质量检测都具有现实指导意义。

参考文献

- 1 Wen L(温鲁), Xia M(夏敏), Song HW(宋虎卫), *et al.* The metabolism yield of cordycepin and adenosine in *Cordyceps militaris* by liquid culture. *Microbiol China* (微生物学通报), 2005, 32(3): 91-94.
- 2 Zhang XZ(张绪璋). The artificial culture and its nutrition composition of *Cordyceps militaris* (L. Fr) Link. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 2003, 22(2): 19-21.
- 3 Chor SY, Hui AY, To KF, *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100: 180-186.
- 4 Chu HL, Chien JC, Duh PD. Protective effect of *Cordyceps militaris* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Food Chem*, 2011, 129: 871-876.
- 5 Yuan YS(袁永生), Zhang L(张莉), Xu XF(许效枫), *et al.* Determination of nucleosides in *Cordyceps* by RP-HPLC.

Chin J Pharm (中国药学杂志), 2002, 37: 776-778.

- 6 Li SP(李绍平), Li P(李萍), Ji H(季晖) *et al.* Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps Mycelia* by capillary electrophoresis. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(2): 77-79.
- 7 Yang FQ, Li SP. Effects of sample preparation methods on the quantification of nucleosides in natural and cultured *Cordyceps*. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48: 231-235.
- 8 Ni H, Zhou XH, Li HH, *et al.* Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waster medium. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 2135-2141.
- 9 Ling JY, Zhang GY, Lin JQ, *et al.* Supercritical fluid extraction of cordycepin and adenosine from *Cordyceps kyushuensis* and purification by high-speed counter-current chromatography. *Sep Purific Technol*, 2009, 66: 625-629.
- 10 Masuda M, Urabe E, Sakurai A, *et al.* Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbial Technol*, 2007, 40: 1199-1205.