

HPLC 法测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量

范志华¹, 汤卫华², 林霖¹

(1. 天津农学院食品科学系, 天津 300384) (2. 天津现代职业技术学院, 天津 300222)

摘要: 研究高效液相色谱法测定虫草发酵菌丝粉中腺苷含量的方法, 对检测波长、流动相比例、图谱的特性、回收率及样品的超声波前处理等进行了讨论。实验表明: 在反相键合的 ODS Hypersil (5 μm , 125 \times 4 mm) 色谱柱上, 以 0.06 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇-四氢呋喃 (150:10:1.5, v/v/v) 为流动相, 检测波长 UV260 nm, 平均回收率为 99.11%。该方法灵敏度高、选择性好, 样品前处理方法简单快速, 回收率符合试验要求。

关键词: 腺苷; HPLC 法; 冬虫夏草发酵菌丝粉

中图分类号: R282; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)07-0094-04

Determination of Adenosine Content in Zymolytic Powder of Aweto by HPLC

FAN Zhi-hua¹, TANG Wei-hua², LIN Lin¹

(1. Department of Food Science, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

(2. Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300222, China)

Abstract: The method for determination of adenosine in zymolytic powder of aweto was studied. The detecting wavelength, proportion of mobile phase, chromatography mapping character, adenosine recovery ratio and the ultrasonic pretreatment were discussed. Results showed that, using a reverse-phase bonded ODS Hypersil column (5 μm , 125 \times 4 mm), the most suitable mobile phase and detecting wavelength were 0.06 mol/L KH_2PO_4 -methanol-tetrahydrofuran (150:10:1.5) and 260 nm, respectively, under which the average recovery was 99.11%. The method was very sensitive and selective and the pretreatment method was simple and fast.

Key words: adenosine; HPLC; zymolytic powder of aweto

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 为中国特有的虫生真菌, 因其具有调节免疫、抑制肿瘤、降血压血脂、平喘祛痰、治疗高血糖症、肝脏疾病及改善肾功能等多种作用而作为传统名贵药材^[1]。同时还有抗疲劳的保健功能, 并且不含任何激素和兴奋剂类物质, 腺苷作为冬虫夏草中的主要有效成分起着重要作用, 因此已逐渐被用作冬虫夏草的质控指标^[2]。由于自然生长的冬虫夏草来源紧缺, 为满足市场的需求, 现大多采用人工深层发酵培养虫草菌丝体, 采用反相 HPLC 分离技术快速、准确地测定腺苷的含量, 鉴定菌丝体质量, 避免食用低劣品或代用品具有重要意义, 本文为此研究 HPLC 测定腺苷含量的条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期: 2007-03-23

作者简介: 范志华 (1972-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事食品科学和生物工程方面的教学和科研工作

冬虫夏草发酵菌丝粉 (天津百奥生物工程研究所); 腺苷标准品 (中国药品生物制品检定所)。

无水甲醇、无水乙醇: 色谱纯级; 高纯水 (3 次重蒸馏), 使用前用 0.45 μm 膜过滤; 其它试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

600 型高效液相色谱仪; 996 型紫外/可见分光光度检测器; 717plus 型自动进样器; millinium32 工作站及 HP servers200 型计算机数据处理系统 (美国 Waters 公司)。

采用的色谱条件为固定相: 采用反相键合的 ODS 色谱柱 (液-液型), ODS Hypersil 5 μm , 125 \times 4 mm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.06 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇-四氢呋喃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL (自动进样)。

1.3 溶液制备

1.3.1 腺苷标准溶液制备

精密称取干燥至恒重的腺苷标准品 0.1370 g, 置

于 50 mL 容量瓶中,加 50%乙醇稀释液溶解定容,摇匀,再量取 1 mL 用 50%乙醇稀释液定容至 50 mL,摇匀后用 0.45 μm 有机相微孔滤膜过滤后作为对照样。

1.3.2 样品溶液制备

精确称取样品 1.0000 g,置于 50 mL 容量瓶中,加入 50%乙醇稀释液 20 mL,塞紧,室温下超声波处理后定容,摇匀,用 0.45 μm 有机相微孔滤膜过滤后供分析。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱系统测定腺苷含量的适用性

2.1.1 检测波长的选择

加入配制好的腺苷标准品溶液,进行波长扫描,由其紫外吸收图谱可知,在 260 nm 腺苷有最大吸收,故选择腺苷的仪器检测波长为 260 nm。

2.1.2 流动相的选择

先超声脱气 30 min,由于停止脱气后,气体立即回到溶剂中(1~4 h 内溶剂又将被环境气体所饱和),因此实验时采用在线(系统内)脱气法,即在色谱操作前和进行时,设定氮气瓶压力在 50~90 MPa 之间,将惰性气体喷入溶剂中,初始值为 100 mL/min,通气满 15 min,再按流动相情况将氮气流量设定在 10~30 mL/min。

色谱纯试剂及混合流动相各组分在混合前分别用

真空抽滤泵使之滤过 0.45 μm 微孔滤膜,除去杂质微粒。配制不同比例 0.06 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇-四氢呋喃三元体系作为流动相,通过对腺苷标准品的分离效果进行比较,随着四氢呋喃浓度的降低,腺苷峰的保留时间缩短,但腺苷与样品中其它组分的分离度降低。为了避免样品中杂质的干扰,经反复试验,确定三者最佳配比为 150:10:1.5 (v/v/v),这时腺苷与相邻峰的分离度>1.5。

2.1.3 测定腺苷的图谱特性及标准曲线

2.1.3.1 图谱特性的研究

在上述选定的操作条件下,由自动进样器注入 0.441 mg/mL 腺苷标准品溶液,重复进样 5 次。测定腺苷含量的高效液相图谱特性主要包括色谱柱理论塔板数 n (应不低于 2400)、精密度(以峰面积测量值的相对标准偏差 RSD 来表示,应不大于 2.0%)、拖尾因子 T (应在 0.95~1.05 之间)以及分离度 R (必须大于 1.5) 等参数。按 $n=5.54(t_R/W_{1/2})^2$ 计算色谱柱的理论塔板数(t_R 为保留时间, $W_{1/2}$ 为半峰宽)^[3]。拖尾因子 T 也称为对称因子(symmetry factor)或不对称因子(symmetry factor),用以衡量色谱峰的对称性,由公式 $T=W_{0.05h}/2d_1$ 计算得出($W_{0.05h}$ 为 0.05 倍峰高处的峰宽, d_1 为极大峰至峰前沿间的距离), T 值偏离过大,也会影响小峰的检测和定量的准确度。分离度 R 是柱效能、选择性影响因素的总和,因此作为色谱柱总分离效能指标。记录和计算结果如表 1 所示。

表 1 腺苷标准样的色谱图特性

色谱图	保留时间 t_R /min	半峰宽 $W_{1/2}$	理论塔板数 n	$W_{0.05h}$	拖尾因子 T	峰面积 A	分离度 R	RSD/%
(1)	5.983	0.090	3280	0.180	0.960	1793604	2.3	
(2)	5.986	0.091	3316	0.182	0.953	1787606	2.2	
(3)	5.988	0.094	3426	0.188	0.955	1787200	2.1	0.60%
(4)	5.989	0.090	3280	0.180	0.962	1789040	2.2	
(5)	5.989	0.093	3389	0.186	1.045	1785800	2.0	

实验结果证明理论塔板数和 RSD 满足实验要求,色谱系统稳定,重复性较好。 T 在 0.95~1.05 之间,不会形成前沿陡峭,后延拖尾的不对称峰。分离度 R 均大于 1.5,相邻两峰完全分开。

2.1.3.2 测定腺苷浓度的标准曲线

准确移取 0.441 mg/mL 的腺苷标准溶液加 50% (v/v) 乙醇配制成含腺苷 5.05 $\mu\text{g/mL}$ 、10.05 $\mu\text{g/mL}$ 、15.08 $\mu\text{g/mL}$ 、20.10 $\mu\text{g/mL}$ 、30.15 $\mu\text{g/mL}$ 、40.20 $\mu\text{g/mL}$ 、55.25 $\mu\text{g/mL}$ 等 7 个不同浓度梯度的溶液,每个浓度进样 10 μL 重复 2 次,记录腺苷峰面积。以浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积为纵坐标,作出测定腺苷含量的标

准曲线。

由图 1 可看出腺苷浓度在 5.05~55.25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。求得线性回归方程为 $y=44710x-6700.4$, $R^2=0.9998$ (y 为峰面积, x 为腺苷浓度),线性范围为 0.0505~0.5525 μg ,最低检出限为 0.01 $\mu\text{g/g}$ 。

2.1.3.3 回收率的测定

准确吸取腺苷标准品溶液 2.0 mL、2.4 mL、2.6 mL、2.8 mL、3.0 mL,分别加入 50 mL 容量瓶中,用体积分数为 50%乙醇稀释至刻度,按选定色谱条件进样,测定回收率,结果如表 2 所示。

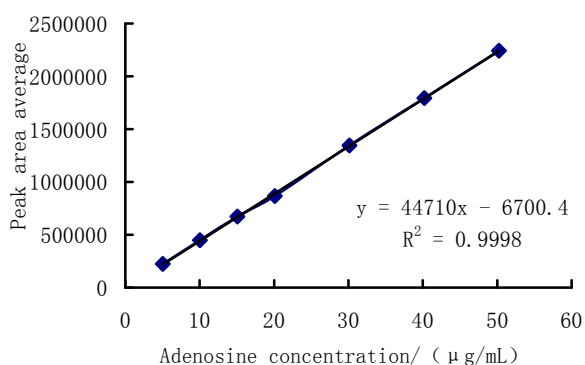


图 1 HPLC 法测定腺苷浓度的标准曲线

表 2 腺苷标准品的回收率测定

加入量 /($\mu\text{g/mL}$)	检出量 /($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	平均值 /%	相对标准偏差%
35.28	34.76	98.53		
42.34	42.12	99.48		
45.86	45.32	98.82	99.11	1.77
49.39	48.99	99.19		
52.92	52.68	99.55		

由实验结果可知相对标准偏差为 1.77%，小于样品要求的 $\pm 5\%$ 。

2.2 测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量

2.2.1 样品前处理时间

乔坤云等人报道在相同的时间内 50%乙醇溶液溶解腺苷的效率比 50%甲醇溶液大很多，故采用 50%乙醇溶液来溶解冬虫夏草发酵菌丝粉，作为腺苷的溶剂^[4]。称取冬虫夏草发酵菌丝粉 0.500 g 左右，置于具塞三角瓶中，加入 20 mL 50%的乙醇溶液，再分别选择 0 min、10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 等不同的超声波处理时间提取，而后转移到离心管中，3000 r/min 离心 10 min，取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，待 HPLC 检测并对比腺苷溶出量。如图 2 所示，不经过超声波处理的菌丝粉几乎测不出腺苷，随处理时间的增加，腺苷含量明显增加，超过 30 min 虽有所增加但增加趋势迅速减缓。综合考虑，处理时间以 30 min 为宜，腺苷含量达到 0.237%。

2.2.2 测定样品中腺苷含量

吸取处理好的菌丝粉样品溶液转移至 50 mL 容量瓶中，定容摇匀。用微量进样器精密吸取 10 μL 样品注入液相色谱仪，经过 20 min 的色谱分离，测出相对应的峰面积 A_x 。再由腺苷含量的标准曲线计算出样品中腺苷的浓度 C_x 。然后按照以上的进样条件重复测定 4 种供试样品，所得液相色谱如图 3~6 所示：

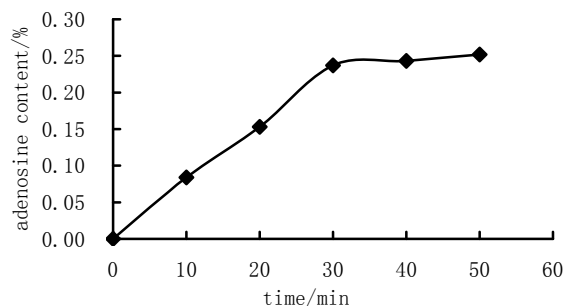


图 2 超声波处理时间对虫草菌丝粉腺苷含量的影响

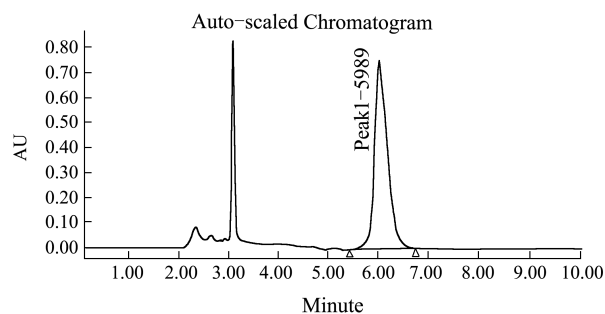


图 3 样品 1 中腺苷含量的色谱图

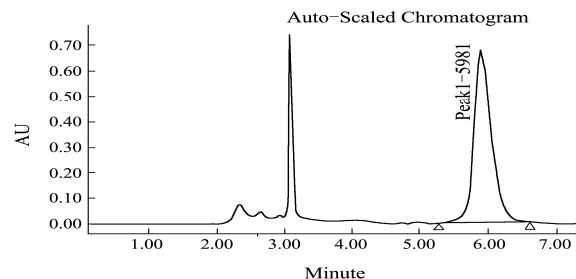


图 4 样品 2 中腺苷含量的色谱图

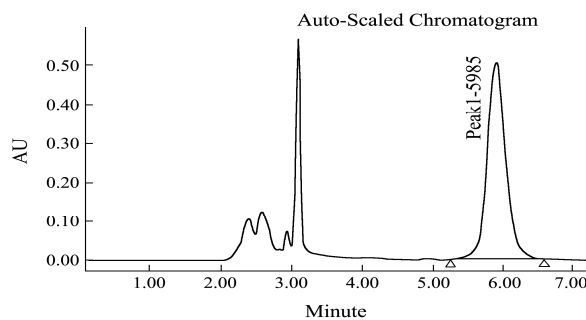


图 5 样品 3 中腺苷含量的色谱图

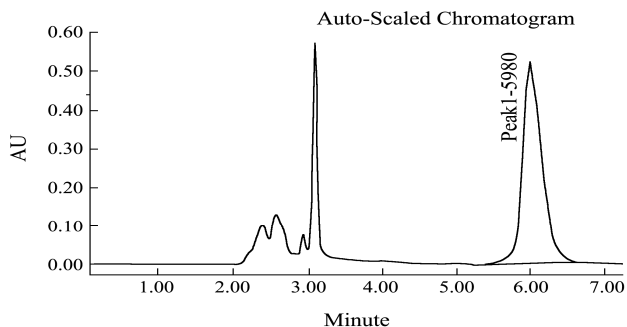


图 6 样品 4 中腺苷含量的色谱图

数据记录、计算方法及计算结果如表 3 所示:

$$\text{腺苷浓度 } (C_X) = \frac{C_R \times A_X}{A_R}$$

$$\text{腺苷含量 } (\%) = \frac{C_X \times 50 \times 10^{-6} \times 100}{W}$$

式中: A_X -样品峰面积; A_R -对照品的峰面积平均值, 1788650; C_X -样品的浓度, $\mu\text{g/mL}$; C_R -对照品的浓度: 54.8 $\mu\text{g/mL}$; W -试样重量, g

表 3 色谱图数据及样品中腺苷含量

色谱图	保留时间 /min	样品峰面 积/ A_x	腺苷浓度 $C_x/(\mu\text{g/mL})$	样品中腺苷 含量/%
样品 1	5.989	1433552	43.92	0.219
样品 2	5.981	1446191	44.30	0.222
样品 3	5.985	1642029	50.31	0.252
样品 4	5.980	1713238	52.49	0.262

在相同的操作条件下, 冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷组分的保留时间相同, 因而采用样品和标准品的保留时间相对照来进行定性分析。而进行定量分析时, 采用色谱仪的自动积分器和计算机数据处理软件自动测量色谱峰的全部面积, 在一定浓度范围内, 组分的浓度与所测的峰面积呈线性关系。采用浓度变化范围十分接近待测组分含量的腺苷标准品溶液绘出浓度对峰面积的标准曲线, 进行样品分析时, 在与标准样品

严格相同的条件下定量进样, 由所得峰面积在标准曲线上测定被测组分含量。

3 结论

HPLC 法测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷含量的色谱条件为反相键合的色谱柱 ODS Hypersil 5 μm , 125 \times 4 mm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 260 nm; 流动相: 0.06 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇-四氢呋喃 (150:10:1.5); 流速: 1.0 mL/min。平均回收率为 99.11%, RSD 为 0.60%。

通过以上实验表明用高效液相色谱法定量分析虫草菌丝粉中腺苷含量的方法准确、快速、重现性好, 以此作为检测的质量标准, 为冬虫夏草发酵菌丝粉提供质量控制依据, 符合中国药典规定的腺苷测定方法。对于甄别和判定假冒伪劣的“虫草”或代用品具有一定意义。

参考文献

- [1] 吴春敏,叶榕平.HPLC 法测定冬虫夏草中腺苷含量[J].中草药,1999,9 (30):658-660
- [2] 中华人民共和国药典[M].2005
- [3] 朱明华编.仪器分析(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2000.7
- [4] 乔坤云,赵其文,严淑云,王成.HPLC 测定冬虫夏草菌粉中腺苷含量[J].2003,3:42-43

(上接第 74 页)

- [16] Schuster B , Retey1 Serine2202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine of Phenylalanine ammonia lyase , Side-directed mutagenesis studies on the enzyme from parsley (*Petroselinum crispum* L.)[J]. FEBS Lett ,1994,349:252-541
- [17] 杨顺楷,杨亚力,杨维力.苯丙氨酸解氨酶 (PAL,E.C.4.2.1.5) 反应机理研究新进展[J].生物加工过程,2004,4(2):1-5
- [18] 王燕,刘卫红,杜何为,等.底物、末端产物对离体银杏叶苯丙

- 氨酸解氨酶活性的影响[J].果树学报,2004,21(5):443-446
- [19] 王敬文,薛应龙.植物苯丙氨酸解氨酶的研究I. 植物激素对甘薯块根苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸羟化酶活性变化及其伴随性的影响[J].植物生理学报,1981,7(3):373-379
- [20] 董艳珍.植物苯丙氨酸解氨酶基因的研究进展[J].生物技术通报,2006 增刊:31-33
- [21] 缪元颖,杨顺楷,刘成君.苯丙氨酸解氨酶的分子生物学研究进展[J].应用与环境生物学报,2001,8(6):672-675

极致营养的黑色美食

乌梅, 含多种维生素, 生津去火, 涵养内气; 黑桑葚, 润肌肤, 乌须发, 固精气; 黑李子, 清肝除热, 活血生精; 覆盆子, 强阴壮阳, 悦泽肌肤, 安和五脏, 温和益气, 补肝明目; 黑豆, 活血润肤, 改善发质, 减少色素沉淀; 黑米, 补肝益肾, 丰肌润发; 黑芝麻, 含多种多糖、软磷脂、芝麻素、蛋白质等; 黑木耳, 化痰, 补气益志。