

## HPLC 法测定北冬虫夏草和常见食用菌中腺苷和虫草素

陆巍杰<sup>1</sup>, 唐永范<sup>1</sup>, 高瑞栋<sup>2</sup>

1. 上海国宝企业发展中心, 上海 201203
2. 上海国宝生物工程研究所, 上海 201203

**摘要:** 目的 建立一种 HPLC 法快速测定北冬虫夏草和几种常见食用菌中腺苷和虫草素的方法。方法 Welch Material XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以水-甲醇 (85:15) 为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 258 nm, 柱温 40 °C。结果 腺苷在 0.023 2~0.464 0 μg、虫草素在 0.030 0~0.600 0 μg 与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.97%、99.15%, RSD 分别为 1.41%、1.01%。结论 腺苷普遍存在于各种食用菌子实体中, 而虫草素是虫草属真菌子实体中的特有活性成分。本法简便快速, 为全面评估北冬虫夏草中核苷类成分的质量, 推进人工培育北冬虫夏草替代野生冬虫夏草提供检测方法。

**关键词:** 北冬虫夏草; 冬虫夏草; 腺苷; 虫草素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)04-0313-03

## Determination of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris* and common edible fungi by HPLC

LU Wei-jie<sup>1</sup>, TANG Yong-fan<sup>1</sup>, GAO Rui-dong<sup>2</sup>

1. Shanghai Guobao Enterprise Development Center, Shanghai 201203, China
2. Shanghai Guobao Bioengineering Institute, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To develop a rapid method by using HPLC to quantitatively determine adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris* products and common edible fungi. **Methods** The working conditions: column was Welch Material XB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was composed of water-methanol (85:15) with flow rate of 1.0 mL/min and 258 nm detection wavelength, and temperature was 40 °C. **Results** The linearity range of adenosine and cordycepin were 0.023 2—0.464 0 and 0.030—0.600 μg. The average recovery of adenosine and cordycepin were 98.97% and 99.15% with the RSD of 1.41% and 1.01%, respectively. **Conclusion** Adenosine appears widely in common edible fungi, and cordycepin is characteristic in fruitbodies of *Cordyceps* (Fr.) Link. The HPLC method is simple and fast, and could lay a method on the comprehensive evaluation of the nucleoside components in *C. militaris*, and promot the cultured *C. militaris* to replace the natural *C. sinensis* resources.

**Key words:** *Cordyceps militaris* (L.) Link.; *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; adenosine; cordycepin; HPLC

北冬虫夏草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 又名北虫草、蛹虫草, 在生物学分类上与冬虫夏草同为虫草属, 其功效与野生冬虫夏草相近, 对氢化可的松诱导的老龄小鼠肾损伤具有肾保护作用<sup>[1]</sup>。与野生冬虫夏草人工培育技术遇到的瓶颈相比, 目前人工培育北冬虫夏草的技术已较为成熟, 北冬虫夏草产业化项目也正式被列入国家 863 计划重点项目, 使得北冬虫夏草很有希望成为野生冬虫夏草的替代资源。

已有许多方法检测北冬虫夏草中的有效成分, 如 TLCS-HPLC 联用、毛细管电泳法<sup>[2-3]</sup>。本实验优化了一种快速测定北冬虫夏草子实体中核苷类成分的方法, 为进一步研究产品的功效提供理论支持, 为产品质量控制标准的建立提供参考依据。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪, 包括 LC—10AT 型一元泵, SPD—10A 型 UV-VIS 可变波长检测器, 手动

收稿日期: 2011-04-06

基金项目: 国家 863 计划重点项目 (2007AA021502)

作者简介: 陆巍杰 (1984—), 男, 湖南人, 研发主管, 2007 年获得英国纽卡斯尔大学医学与分子生物学专业纳米医药方向硕士学位, 主要研究方向为北冬虫夏草主要活性成分的提取与纯化。Tel: (021)50800233 E-mail: geraldwei@hotmail.com

进样器, HT—330 型柱温箱。Mettler AE 240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), FW100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司), TDL—40B 型低速台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂)。

## 1.2 药品与试剂

腺苷对照品购自中国药品生物制品检定所, 质量分数 $\geq 99\%$ , 批号 110879-200202; 虫草素对照品购自美国 Sigma 公司, 质量分数 $\geq 98\%$ ; 人工北冬虫夏草子实体(批号 20091218、20100407、20100511)由上海国宝企业发展中心提供, 其菌种经中国科学院微生物研究所鉴定为蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 斜面菌种, 药材经上海市农业科学院崔星明教授鉴定, 置于烘箱 80 °C 鼓风烘干。野生冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 和野生北冬虫夏草 *C. militaris* (L.) Link 产地三江源, 姬松茸 *Agaricus blazei* Murrill 产地宁德, 美味牛肝菌 *Boletus edulis* Bull. ex Fr. 产地宁德, 灰树花 *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray 产地宁德, 猴头菇 *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. 和羊肚菌 *Morehella esculenta* (L.) Pers 产地长白山, 以上真菌均购自上海义林进出口食品有限公司, 经上海国宝企业发展中心高明光高级工程师鉴定。对于食用菌菇类, 将其菌伞和菌柄分开, 粉碎备用; 对于野生虫草, 将其子座和幼虫两部分分开, 粉碎备用。水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Welch Material XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 以水-甲醇(85:15)为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 258 nm, 柱温 40 °C; 进样量 20 μL。

### 2.2 供试品溶液的制备

称取 1.0 g 粉碎并过 20 mm 孔径筛的样品, 置于 100 mL 具塞离心管内。用 10 mL 水浸润, 缓慢加入 40 mL 无水乙醇, 同时使用涡旋振荡器振荡, 使混合均匀, 超声提取 30 min, 于 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液于 100 mL 量瓶中。不溶物用 80%乙醇溶液 20 mL 洗涤、离心, 收集上清液, 并定容至 100 mL, 即得。

### 2.3 对照品溶液的制备

取经 105 °C 减压干燥至恒定质量的腺苷、虫草素对照品适量, 精密称定, 加 80%乙醇制成含腺苷

23.2 μg/mL, 虫草素 30.0 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

### 2.4 系统适用性试验

分别精密吸取对照品溶液、北冬虫夏草供试品溶液各 20 μL, 注入色谱仪, 测定, 结果在色谱图中腺苷、虫草素色谱峰分离良好, 且无杂质峰干扰。见图 1。

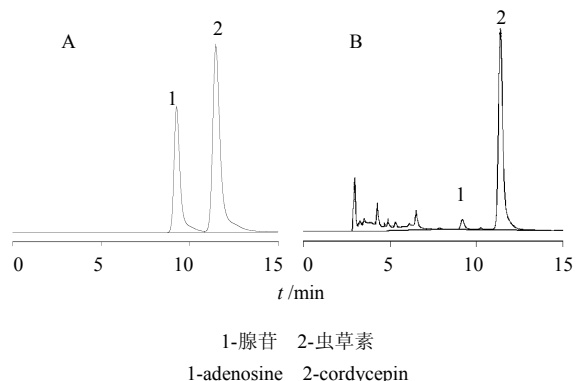


图 1 对照品(A)和北冬虫夏草(B)的 HPLC 图  
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and *C. militaris* (B)

### 2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20、25 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 计算得腺苷的回归方程:  $Y=2\ 735.9 X-4\ 947.5$  ( $r=0.998\ 7$ ), 结果表明, 腺苷在 0.023 2~0.464 0 μg 线性关系良好; 虫草素的回归方程:  $Y=2\ 654.2 X-15\ 027$  ( $r=0.997\ 6$ ), 结果表明, 虫草素在 0.030 0~0.600 0 μg 线性关系良好。

### 2.6 精密度试验

吸取混合对照品溶液 20 μL, 按色谱条件重复进样 5 次, 记录峰面积, 结果腺苷峰面积的 RSD 为 0.42%, 虫草素峰面积的 RSD 为 0.35%。

### 2.7 重现性试验

取批号 20091218 人工北冬虫夏草药材粉末 5 份, 制备供试品溶液, 精密吸取 20 μL, 测定, 计算得腺苷和虫草素质量分数的 RSD 分别为 1.61%、2.31%。

### 2.8 稳定性试验

取批号 20091218 人工北冬虫夏草药材粉末, 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8 h 进样, 计算得腺苷和虫草素峰面积的 RSD 分别为 1.79%、2.12%。说明供试品溶液在 8 h 内稳定。

## 2.9 加样回收率试验

取批号 20091218 人工北冬虫夏草药材粉末 5 份, 约 1.0 g, 精密称定, 分别精密加入腺苷、虫草素对照品 1.578、10.247 mg, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果腺苷和虫草素的平均回收率分别为 98.97%、99.15%, RSD 分别为 1.41%、1.01%。

## 2.10 样品测定

分别取 3 批北冬虫夏草(批号 20091218、20100407、20100511) 各 3 份, 制备供试品溶液, 以外标法计算腺苷和虫草素的量。同法对常见真菌进行测定, 结果见表 1。

表 1 北冬虫夏草和真菌中腺苷和虫草素的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of adenosine and cordycepin in *C. militaris* and other fungi (n=3)

样 品	部 位	腺苷/%	虫草素/%
北冬虫夏草 (批号 20100511)	全	0.069	1.307
北冬虫夏草 (批号 20091218)	全	0.070	1.225
北冬虫夏草 (批号 20100407)	全	0.062	1.528
野生北冬虫夏草	全	0.075	0.124
野生冬虫夏草	子座	0.069	0.019
	幼虫	0.023	0.009
姬松茸	伞	0.096	—
	柄	0.086	—
美味牛肝菌	伞	0.094	—
	柄	0.046	—
灰树花	伞	0.034	—
	柄	0.022	—
猴头菇	伞	0.044	—
	柄	0.019	—
羊肚菌	全	0.130	—

—: 未检出

—: undetected

虫草素作为虫草属真菌的特有功效成分, 仅存在于北冬虫夏草和冬虫夏草中, 在其他食用菌中均未检出。野生冬虫夏草中虫草素的量较低, 并且从

实验结果可以看到子座部位中虫草素的量比幼虫部位的高。野生北冬虫夏草中的虫草素是野生冬虫夏草的 10 倍左右, 而本公司提供的北虫草子实体中的虫草素的质量分数为 1.307%, 是野生北冬虫夏草的 10 倍, 超过野生冬虫夏草中虫草素量的 100 倍。

腺苷是食用菌通用的质量控制指标。对各种食用菌分部位进行腺苷测定后, 发现大多数伞菌的食用菌其菌伞部位的腺苷的量高于菌柄部位的腺苷的量, 一般菌伞腺苷的量为菌柄腺苷量的 1~4 倍。

## 3 讨论

随着北冬虫夏草生产规模的扩大和产品的开发, 虫草素作为主要功能和活性成分, 其检测越来越频繁和重要。

目前对冬虫夏草中核苷类成分分析所采用的方法一般为化学方法和 HPLC 法<sup>[5]</sup>。相对于传统的化学方法, HPLC 法操作简便, 在色谱条件选择上, 以甲醇-水为流动相要比缓冲溶液体系分析时间长, 但分离效果好, 避免了缓冲盐体系对仪器的影响<sup>[6]</sup>。

腺苷和虫草素的 HPLC 法测定结果效果好, 易辨识, 量相对较高, 不同批次的人工北冬虫夏草药材中腺苷和虫草素的量不同, 腺苷和虫草素的量能反映该批药材的质量, 可以作为人工北冬虫夏草的质量控制指标, 另一方面, 这种质控标准的确立也为人工北冬虫夏草替代野生虫草资源提供参考。

## 参考文献

- [1] 施明珠, 李有贵, 钟 石, 等. 北冬虫夏草对氢化可的松诱导的老龄小鼠肾损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 160-163.
- [2] 黄 蕾, 许滨斌, 苏 颖, 等. 虫草属真菌中主要活性成分含量的比较 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2008, 26(1): 74-77.
- [3] 凌建亚, 孙迎节, 吕 鹏, 等. 虫草属真菌中虫草素的超声波提取及其毛细管电泳测定 [J]. 菌物系统, 2002, 21(3): 394-399.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [5] 李 祝, 刘爱英, 梁宗琦, 等. 虫草菌素的生物活性及检测方法 [J]. 食用菌学报, 2002, 9(1): 57-62.
- [6] 李雅洁, 高燕菊, 张国英, 等. 蛹虫草菌丝体中单核苷酸类组分的高效液相色谱分析 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1711.