

HPLC 同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素和麦角甾醇

陈婷*, 刘群, 莫灼康, 徐敏嫦, 陈润添

(广东省东莞市人民医院, 广东 东莞 523059)

[摘要] 目的:建立同时测定冬虫夏草药材中腺苷、虫草素和麦角甾醇的方法。方法:Diamosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 260 nm。结果:腺苷、虫草素和麦角甾醇分别在 0.032 2~0.805, 0.015 4~0.385, 0.084 3~2.107 5 μg 线性关系良好, 回归方程分别为 $Y=2.573X+0.7378$; $Y=2.631X+0.6244$; $Y=2.315X+0.4829$, 平均加样回收率分别为 98.94% (RSD 1.16%), 99.73% (RSD 2.19%), 99.55% (RSD 2.02%)。结论:该方法准确性高, 重复性好, 可作为冬虫夏草药材的质量控制方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 冬虫夏草; 腺苷; 虫草素; 麦角甾醇

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0161-03

Determination of Adenosine, Cordycepin and Ergosterol in *Cordyceps sinensis* by HPLC

CHEN Ting*, LIU Qun, MO Zhuo-kang, XU Min-chang, CHEN Run-tian

(People's Hospital of Dongguan City, Dongguan 523059, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quantitative analysis method for adenosine, cordycepin and ergosterol in *Cordyceps sinensis* by HPLC. **Method:** HPLC was performed on Diamosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of methanol and water at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 30 °C, and the eluate was detected at 260 nm. **Result:** Quantitative analysis of HPLC showed that the linear ranges of adenosine, cordycepin and ergosterol were 0.032 2-0.805, 0.015 4-0.385 and 0.084 3-2.107 5 μg respectively. The average recoveries of adenosine, cordycepin and ergosterol were 98.94% (RSD 1.16%), 99.73% (RSD 2.19%), 99.55% (RSD 2.02%) respectively. **Conclusion:** The method set up is accurate, feasible and reliable, therefore available for the quality control of *C. sinensis*.

[Key words] HPLC; *Cordyceps sinensis*; adenosine; cordycepin; ergosterol

冬虫夏草具有补肺益肾、止血化痰之功效, 主治阳痿遗精、腰膝酸软、久咳虚喘、劳咳痰血、病后体虚或自汗畏寒等症^[1]。现代医学研究表明, 冬虫夏草中核苷类的腺苷、虫草素在调节免疫和抗肿瘤方面有重要作用^[2-4], 麦角甾醇为真菌类的特征甾醇, 是脂溶性维生素 D₂ 的前体, 具有多种生物学活性^[5]。核苷类成分和甾醇类成分的同时测定, 对于全面评价冬虫夏草药材的质量有着重要的意义。本文建立了同时测定腺苷、虫草素和麦角甾醇的方法, 可为冬

虫夏草的质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(G1316A TCC DE63067867 检测器, 四元泵 G1311A, 柱温箱 GP1316A, 在线脱气机 G1322A, Chem-Station 工作站) METTLER TOLEDO AL104 型电子天平, KQ-300VDV 型双频数控超声波清洗器。

1.2 试剂 对照品腺苷(110879-200202)、虫草素(110858-200202)均购自中国药品生物制品检定所(供含量测定用), 麦角甾醇(23408194)购自 Sigma 公司(供含量测定用, 纯度 ≥ 95%), ; 色谱甲醇(天津市富宇精细化工有限公司), 超纯水(自制), 其余试剂均为分析纯; 实验所用冬虫夏草药材来源于西

[收稿日期] 20121113(599)

[通讯作者] * 陈婷, 主管中药师, 从事中药鉴定工作, Tel: 13544617270, E-mail: zangqingguovip@126.com

藏那曲、青海玉树、四川康定、云南迪庆和甘肃甘南,由广州中医药大学黄海波教授鉴定为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。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-8] 色谱柱为 Diamosil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水梯度洗脱(0~15 min, 15% 甲醇; 15~16 min, 15%~100% 甲醇; 16~30 min, 100% 甲醇), 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 260 nm。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品溶液 分别取腺苷、虫草素和麦角甾醇对照品适量, 精密称定, 加 80% 乙醇溶解并制成每 1 mL 分别含腺苷 0.032 2 mg、虫草素 0.015 4 mg、麦角甾醇 0.084 3 mg 的混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液^[9] 取干燥至恒重的供试品, 研成细粉, 取约 0.50 g, 精密称定, 置具塞平底烧瓶中, 精密加入 80% 乙醇 10 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 80% 乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验 按 2.1 项下色谱条件, 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪中, 测定, 色谱图见图 1~2。结果供试品溶液色谱图中, 腺苷、虫草素和麦角甾醇的保留时间与相应对照品溶液色谱图一致, 与其相邻色谱峰的分度度均 > 1.5。

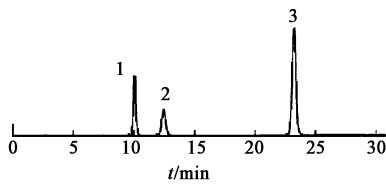
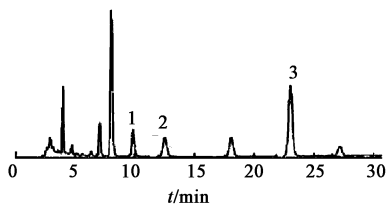


图1 混合对照品 HPLC



1. 腺苷; 2. 虫草素; 3. 麦角甾醇

图2 供试品 HPLC

2.3.2 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液, 分别进样 1, 5, 10, 15, 20, 25 μL, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。以峰面积

(Y) 对进样量(μg) 进行线性回归, 得腺苷、虫草素和麦角甾醇的回归方程分别为 $Y = 2\ 573X + 0.737\ 8$ ($r = 0.999\ 5$); $Y = 2\ 631X + 0.624\ 4$ ($r = 0.999\ 7$); $Y = 2\ 315X + 0.482\ 9$ ($r = 0.999\ 6$)。结果表明, 腺苷、虫草素和麦角甾醇分别在 0.032 2~0.805, 0.015 4~0.385, 0.084 3~2.107 5 μg 线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取 2.2.1 项下的混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续测定 5 次, 记录峰面积。结果腺苷、虫草素和麦角甾醇峰面积的 RSD 分别为 0.71%, 0.74%, 0.66%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取产地西藏那曲的药材, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 平行 5 份, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 计算含量。结果冬虫夏草药材中腺苷、虫草素和麦角甾醇的平均质量分数分别为 0.50, 0.27, 1.1 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.1%, 2.1%, 1.8%, 表明方法的重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一产地(西藏那曲)药材, 按 2.2.2 项下方法制备溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 10 h 进样, 测定腺苷、虫草素和麦角甾醇的峰面积。结果腺苷、虫草素和麦角甾醇的峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.98%, 1.1%, 表明溶液在 10 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的冬虫夏草(西藏那曲)粉末约 0.25 g, 精密称定, 平行 6 份, 置具塞圆底烧瓶中, 分别精密加入混合对照品溶液(腺苷 0.025 2 g·L⁻¹、虫草素 0.013 5 g·L⁻¹、麦角甾醇 0.057 2 g·L⁻¹) 5 mL 和 80% 乙醇 5 mL, 密塞, 称定质量, 其余按 2.2.2 项下方法操作, 制得供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.4 含量测定 取冬虫夏草药材, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 并按 2.1 项下色谱条件进行测定, 采用标准曲线法计算含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 测定指标的选择 文献报道冬虫夏草中含有腺苷、虫草素、麦角甾醇和其他成分^[8], 鉴于其他成分的可测性差^[10](无专属性、含量低、无对照品等), 为了建立一个简便、有效的质控标准, 经试验筛选, 最终确定上述 3 种成分作为指标。

3.2 检测波长的选择 腺苷、虫草素的最大吸收波长为 260 nm^[11], 麦角甾醇的最大吸收波长为 283 nm, 在 260 nm 处也有较大的吸收, 为提高检测的准确性和灵敏度, 经试验筛选, 确定检测波长为 260 nm。

表1 3种成分加样回收试验

成分	样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	率/%	/%
腺苷	0.126 1	0.126 0	0.250 7	98.89	98.94	1.16
	0.124 0	0.126 0	0.247 2	97.78		
	0.129 1	0.126 0	0.254 2	99.29		
	0.123 8	0.126 0	0.251 1	101.03		
	0.125 6	0.126 0	0.249 7	98.49		
	0.123 8	0.126 0	0.247 5	98.17		
虫草素	0.067 5	0.067 5	0.132 8	96.74	99.93	3.99
	0.066 4	0.067 5	0.132 8	98.37		
	0.066 3	0.067 5	0.139 1	107.85		
	0.067 2	0.067 5	0.134 3	99.41		
	0.066 3	0.067 5	0.133 1	98.96		
	0.067 1	0.067 5	0.133 4	98.22		
麦角甾醇	0.278 2	0.286 0	0.556 0	97.13	99.532	2.23
	0.273 6	0.286 0	0.554 8	98.32		
	0.284 8	0.286 0	0.568 1	99.06		
	0.273 1	0.286 0	0.551 7	97.41		
	0.277 0	0.286 0	0.570 4	102.59		
	0.273 0	0.286 0	0.563 1	101.43		

表2 冬虫夏草药材中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量

产地	mg·g ⁻¹		
	腺苷	虫草素	麦角甾醇
西藏那曲	0.50	0.26	1.1
青海玉树	0.62	0.25	1.0
四川康定	0.35	0.22	0.88
云南迪庆	0.40	0.20	0.73
甘肃甘南	0.38	0.18	0.66

实验所用冬虫夏草均收集自道地产区,属质量上乘之品,但因生长环境、采收时间等的不同,所测

成分含量存在差异,仅从数据分析,属西藏那曲和青海玉树所产虫草的质量最佳。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:106.
- [2] 姜泓,刘珂,孟舒,等. 人工蛹虫草子实体化学成分[J]. 药学学报,2000,35(9):663.
- [3] 柴建萍,白兴荣,谢道燕. 蛹虫草主要有效成分及其药理功效[J]. 云南农业科技,2003,32(4):22.
- [4] Eiichi N Kodama, Ronald P McCaffrey, Keisuke Yusa. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase positive (TdT+) leukemic cells [J]. Biochem Pharmacol,2000,59:273.
- [5] 陈勇,曾萍,温庆伟,等. 灵芝配方颗粒中麦角甾醇的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):53.
- [6] 王海霞,胡高升,蒙娅,等. RP-HPLC法测定冬虫夏草发酵液冻干粉中虫草素和腺苷含量[J]. 中国食品卫生杂志,2007,19(4):309.
- [7] 毛新亮,郑国栋,张晨,等. 反相高效液相色谱法同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素、肌苷含量方法的研究[J]. 中南药学,2009,7(12):895.
- [8] 赵英永,赵晔,林瑞超,等. RP-HPLC法测定猪苓中麦角甾醇的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(6):898.
- [9] 陆巍杰,唐永范,高瑞栋. HPLC法测定北冬虫夏草和常见食用菌中腺苷和虫草素[J]. 现代药物与临床,2011,26(4):313.
- [10] 魏玲,赵应华,郭遂. 冬虫夏草活性成分的含量研究概况[J]. 华西药学杂志,2003,18(5):359.
- [11] 刘丹,席荣刚. HPLC法同时测定腺苷和虫草素的含量[J]. 沈阳药科大学学报,增,81.

[责任编辑 顾雪竹]