

HPLC法测定冬虫夏草胶囊中腺苷含量

颜栋林 (南宁食品药品检验所, 广西 南宁 530001)

[摘要] 目的 建立冬虫夏草胶囊中腺苷的含量测定方法。方法 色谱柱采用 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (8: 92), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 254 nm; 柱温为 30℃, 外标法测定。结果 腺苷浓度在 0.402 4~60.36 μg/ml (r=1) 范围内与峰面积呈良好线性关系; 平均回收率 (n=6) 为 98.04%, RSD 为 0.63%。结论 本法简便可靠, 可用于冬虫夏草胶囊中腺苷的质量控制。

[关键词] 冬虫夏草胶囊; 腺苷; HPLC

[中图分类号] R927.2 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)04-0293-03

Determination of adenosine in capsule of *Chinese Caterpillar Fungus* by HPLC

YAN Dong-lin (Nanning Institute for Food and Drug Control, Nanning 530001, China)

[Abstract] Objective To establish a method for determination of adenosine in capsule of *Chinese Caterpillar Fungus*.

Methods HPLC was carried out with Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); the mobile phase was acetonitrile-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (8: 92); the flow rate was 1.0 ml/min; the detection wavelength was 254 nm; the column temperature was 30℃; and content calculation was used external standard method. Results The concentration of adenosine in 0.402 4~60.36 μg/ml (r=1) had good linear relationship with peak area; the average recovery was 98.04% (n=6) with RSD of 0.63%. Conclusion This method is simple, reliable and can be used to quality control of adenosine in capsule of *Chinese Caterpillar Fungus*.

[Key words] capsule of *Chinese Caterpillar Fungus*; adenosine; HPLC

冬虫夏草胶囊主要原料为冬虫夏草 (菌丝体)。具有补肺益肾, 止血, 化痰等作用, 用于久咳虚喘, 劳嗽咯血, 阳痿遗精, 腰膝酸痛^[1]。常服虫草, 可以有许多意想不到的保健功效。腺苷为冬虫夏草胶囊中的主要有效成分之一, 保健食品检测方法中有腺苷的测定方法^[2], 但针对性不强, 由于不同品种配方不一, 所用原料也不相同以及制作工艺的差异, 受到杂质的干扰程度不同, 按食品方法试验, 冬虫夏草胶囊中主成分峰腺苷与杂质峰无法有效分离, 为了有效控制产品的质量, 本试验对保健食品中腺苷的含量测定方法进行改进, 为冬虫夏草胶囊中腺苷的测定提供一个参考方法。

1 仪器及试剂

岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪, 紫外检测器, LCSolution 色谱工作站; 腺苷对照品 (879-200001 含量测定用), 购自中国药品生物制品检定所; 冬虫夏草胶囊 (20090603, 20090706, 20090718 广东长兴科技保健品有限公司); 乙腈为 HPLC 级 (美国 Fisher

公司); 水 (娃哈哈饮用纯净水); 乙醇、磷酸二氢钾为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品储备溶液 取腺苷对照品 0.010 06 g 置 25 ml 容量瓶中, 加提取液 (60% 乙醇溶液) 溶解并稀释至刻度, 作为储备液。

2.2 供试品溶液 取 20 粒胶囊内容物, 混匀, 准确称取 0.30 g 试样置 25 ml 容量瓶中, 加入约 20 ml 提取液, 超声 10 min, 取出后放冷至室温, 加提取液至刻度, 混匀后以 3 000 r/min 离心 3 min, 经 0.45 μm 滤膜过滤即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 30℃; 流动相: 乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (8: 92); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 进样量 10 μl; 分析时间为 10 min; 色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取腺苷对照品储备溶液适量, 加提取液配制浓度为 0.4, 2.4, 20, 60 μg/ml 腺苷标准溶液, 取 10 μl 标准溶液注入液相色谱仪进行分析, 以峰面积为纵坐标, 进样浓度为横坐标作图, 结果腺苷的回归方程为: $y = 19.176x$

[作者简介] 颜栋林 (1971-), 男, 主管药师。Tel 13877185365, E-mail 65895155@qq.com.

+ 1 262. 6 $r= 1$; 表明腺苷浓度在 0. 402 4~ 60 36 $\mu\text{g}/\text{m}$ 线性关系良好。

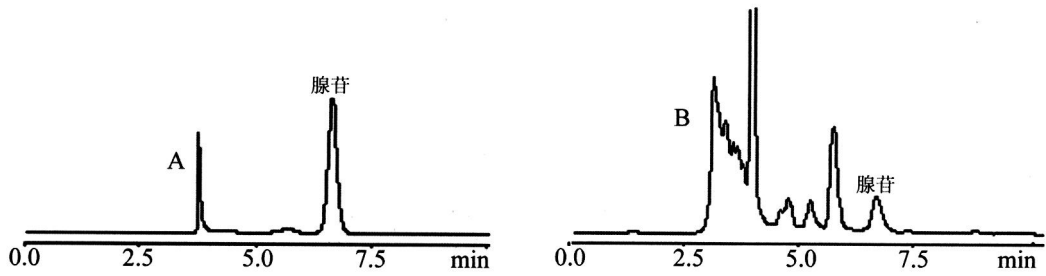


图 1 对照品 (A)样品 (B)HPLC 色谱图

2.5 精密度试验 精密吸取上述腺苷对照品溶液 10 μl , 按上述色谱条件重复进样 5 次, 测定。结果腺苷峰面积的 $RSD (n=5)$ 为 0.71%, 表明腺苷在该试验条件下具有良好精密度。

2.6 重复性试验 精密称取同一批号冬虫夏草胶囊 (批号 20090603) 5 份, 按供试品溶液制备方法操作, 并按上述色谱条件测定含量。腺苷平均含量 ($n=5$) 为 59.642 $\text{mg}/100\text{g}$ RSD 为 0.47%, 结果表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 20090603) 分别于 0, 3, 6, 12, 24 h 进样 10 μl 测定峰面积, 结果样品中腺苷峰面积的 RSD 为 0.57%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收试验 取均匀样品内容物 0.15 g 试样置 25 ml 容量瓶中, 准确加入腺苷对照品 90.54 μg 从“加入约 20 ml 提取液”始, 按 2.2 同法配制, 进样量 10 μl 结果腺苷回收率 ($n=6$) 为 98.04%, RSD 为 0.63%。表 1 结果表明, 该方法准确。

表 1 加样回收试验结果

取样量 (g)	峰面积	平均峰面积	主要原原有量 (μg)	标准物质加入量 (μg)	主要分测出量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RDS (%)
0.1539	136.633, 136.338, 136.499	136.390	93.17	90.54	182.14	98.27		
0.1544	136.926, 136.938, 137.112	136.992	93.47	90.54	182.94	98.8		
0.1533	135.342, 135.324, 135.531	135.399	92.81	90.54	180.82	97.21		
0.1509	134.925, 134.933, 134.977	134.945	91.35	90.54	180.21	98.14	98.04	0.63
0.1506	134.918, 134.943, 135.022	134.961	91.17	90.54	180.23	98.37		
0.1522	135.029, 135.016, 135.066	135.037	92.14	90.54	180.33	97.40		

2.9 检测限 取腺苷标准溶液 (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2 ml 置 25 ml 容量瓶中, 从“加入约 20 ml 提取液”始, 按 2.2 同法配制, 进样量 10 μl 按信噪比三倍计算, 结果检测限为 0.3 $\text{mg}/100\text{g}$ 。

2.10 样品含量测定 冬虫夏草胶囊 3 批样品, 按供试品溶液制备方法操作, 按本文色谱条件测定含量, 见表 2 结果 3 批样品中腺苷含量 ($\text{mg}/100\text{g}$) 分别为 59.59, 60.01, 59.35。

表 2 样品含量测定结果

批号	取样量 (g)	峰面积	含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	含量平均值 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	回收率 (%)	折回收率后含量 ($\text{mg}/100\text{g}$)
20090603	0.3448	150.109, 150.098, 150.093	581.4, 581.3, 581.3	584.2	98.04	59.59
	0.3377	148.718, 148.612, 148.057	588.1, 587.7, 585.5			
20090706	0.3388	149.079, 149.388, 150.099	587.6, 588.8, 591.3	588.3	98.04	60.01
	0.3378	148.631, 148.619, 148.389	587.6, 587.5, 586.6			
20090718	0.3241	145.109, 145.098, 145.257	583.0, 582.0, 583.6	581.9	98.04	59.35
	0.3381	146.818, 147.142, 147.086	579.9, 581.2, 581.0			

注: 稀释倍数为 25 倍。

3 讨论

3.1 流动相选择 按食品标准方法, 使用甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (10:90) 作流动相,

结果发现对照品溶液与样品溶液先后进针得出腺苷主峰保留时间有明显差异,而且理论板数有很大差别,调节流动相比使腺苷主峰保留时间延长至 24 min,发现样品与对照品腺苷主峰出峰时间相差近 1 min,这明显不合理,用加标溶液进针,发现主峰变形不对称,说明主峰位置受到杂质干扰,按本实验使用的色谱柱以甲醇作有机相无法有效分离。改用乙腈作有机相,结果基线稳定,峰形相对较好,主峰保留时间为 6.5 min,样品主成分峰与杂质峰达到基线分离,理论板数按腺苷峰计算为 4 800 与对照品的 5 000 理论板数相近。

3.2 取样量 采用 0.5、1.2 g 样品量做比较,加样回收取半量,结果表明随着取样量增大,回收率越低,这是因为软胶囊中的植物油与提取液乳化的造

成的影响。实验证明取样量不大于 0.5 g 腺苷能完全提取,回收效果让人满意。

3.3 定量方法 按外标法计算(批号 20090603)折回收率后为 61.75 mg/100 g 按标准曲线计算为 61.66 mg/100 g 两种方法的 RAD 为 0.08%,两者无明显差异,因此采用外标法定量。

【参考文献】

[1] 中国药典 2005版.一部[S]. 2005: 75.
 [2] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003: 300.

[收稿日期] 2009-11-30

[修回日期] 2010-03-18

(上接第 247页)

[23] 李晓如, 赵君, 兰正刚, 等. 药对川芎羌活挥发油的气-质联用分析与化学计量学解析[J]. 中南大学学报, 2007, 38(4): 681.
 [24] 李国辉, 李晓如, 邹桥, 等. 采用气相色谱-质谱法分析药对麻黄-羌活的挥发油[J]. 中南大学学报(自然科学报), 2007, 38(5): 888.
 [25] Mehdi JH, Behrooz Z, Hassan S. Use of gas chromatography-mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cummin and caraway[J]. Journal Chromatogr A, 2007, 1143(1-2): 5.
 [26] 李国辉, 曾笑, 张斌, 等. 气相色谱-质谱法分析羌活挥发油成分[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(6): 19.
 [27] Xu CJ, Liang YZ, Chau FT. Identification of essential components of *Houttuynia cordata* by gas chromatography/mass spectrometry and the integrated chemometric approach[J]. Talanta, 2005, 68(1): 108.
 [28] Zhao CX, Liang YZ, Fang HZ, et al. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils[J]. Journal Chromatogr A, 2005, 1096(1-2): 76.
 [29] Mehdi JH, Hadi P, Hassan S. Development of a method for analysis of Iranian damask rose oil. Combination of gas chromatography-mass spectrometry with Chemometric techniques[J]. Anal Chim Acta, 2008, 623(1): 11.
 [30] Mehdi JH, Behrooz Z, Hassan S. Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques[J]. Journal Chromatogr A, 2006, 1114(1): 154.
 [31] Guo FQ, Liang YZ, Xu CJ, et al. Analyzing of the volatile chemical constituents in *Artemisia capillaris* herba by GC-MS and correlative chemometric resolution methods[J]. Journal Pharm Biomed Anal, 2004, 35(3): 469.

[32] Guo FQ, Liang YZ, Xu CJ, et al. Comparison of the volatile constituents of *Artemisia capillaris* from different locations by gas chromatography-mass spectrometry and projection method[J]. Journal Chromatogr A, 2004, 1054(1-2): 73.
 [33] Gong F, Liang YZ, Xu QS, et al. Gas chromatography-mass spectrometry and chemometric resolution applied to the determination of essential oils in *Cortex Cinnamomi*[J]. Journal Chromatogr A, 2001, 905(1-2): 193.
 [34] Gong F, Liang YZ, Fung YS. Analysis of volatile components from *Cortex cinnamomi* with hyphenated chromatography and chemometric resolution[J]. Journal Pharm Biomed Anal, 2004, 34(5): 1029.
 [35] 陈勇, 李晓如, 曾笑, 等. 荆芥挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 世界科技研究与发展, 2007, 29(4): 43.
 [36] 陈勇, 李晓如, 曾笑, 等. 气相色谱-质谱和化学计量学解析法分析防风挥发油成分[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(6): 500.
 [37] 赵晨曦, 梁逸曾, 李晓宁. 丁香挥发油化学成分与抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(3): 381.
 [38] Zeng YZ, Zhao CX, Liang YZ, et al. Comparative analysis of volatile components from *Clematis* species growing in China[J]. Anal Chim Acta, 2007, 595(1-2): 328.
 [39] 李晓如, 梁逸曾, 杨辉, 等. 中药药对的化学成分研究——川芎赤芍挥发油的 GC-MS 分析[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(3): 443.
 [40] 李晓如, 梁逸曾, 李晓宁. 气相色谱-质谱和化学计量学解析法分析药对麻黄桂枝挥发油成分[J]. 药学学报, 2007, 42(2): 187.
 [41] 李国辉, 李晓如, 刘少印. 药对桂枝-羌活挥发油成分分析[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(7): 15.

[收稿日期] 2009-10-10

[修回日期] 2009-10-29