

doi : 10.3969/j.issn.1008-6145.2020.01.0019

高效液相色谱法测定地顶孢霉培养物中的腺苷

徐娟娟,徐自奥,周群,曹珊,李晓祥

(合肥迈可罗生物工程有限公司,合肥 230088)

摘要 建立测定虫草源饲料添加剂地顶孢霉培养物中腺苷含量的高效液相色谱方法。样品经过研碎、超声处理,离心、过滤后上机测定。腺苷的最佳提取条件:以超纯水为浸提液,用超声波浸提,浸提温度为 40℃,浸提时间为 55 min。使用 Waters Spherisorb ODS₂ 柱(150 mm×3.9 mm,5 μm),以甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾混合液(10:90)为流动相,流量为 1.0 mL/min,进样体积为 20 μL,检测波长为 254 nm。腺苷的质量浓度在 0.5~100 μg/mL 范围内与色谱峰面积成良好的线性关系,相关系数为 0.999 0。样品测定结果的相对标准偏差为 1.65%(n=6),3 水平加标的平均回收率为 98.19%。该方法简便、快捷,可准确测定虫草饲料添加剂地顶孢霉培养物中腺苷的含量。

关键词 高效液相色谱法;虫草;地顶孢霉培养物;腺苷

中图分类号:O657.7

文献标识码:A

文章编号:1008-6145(2020)01-0079-04

Determination of adenosine in the culture of *Acremonium terricola* by high performance liquid chromatography

XU Juanjuan, XU Ziao, ZHOU Qun, CAO Shan, LI Xiaoxiang

(Hefei Ma Biological Engineering Co., Ltd., Hefei 230088, China)

Abstract A HPLC method was established to determine adenosine in the culture of *Acremonium terricola*. After crushing, ultrasonic treatment, centrifugation and filtration, samples were detected by HPLC. The best extraction conditions: ultra-pure water as the immersion liquid, extrsrstion by ultrasonic crusher power, immersion temperature of 40℃, immersion time of 55 min. Waters Spherisorb ODS₂ column (150 mm×3.9 mm,5 μm) was used and methanol-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (10:90) was used as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, the sampling amount was 20 μL and the detection wavelength was 254 nm. The mass concentration of adenosine was linear with the chromatograph peak area in the range of 0.5-100 μg/mL with the correlation coefficient of 0.999 0. The relative standard deviation of the detection results was 1.65%(n=6), and the average recovery of three level standard addition was 98.19%. The established method is simple, rapid and accurate, which can be used for the quality control of adenosine in the culture of *Acremonium terricola*.

Keywords high performance liquid chromatography; cordyceps sinensis; the culture of *Acremonium terricola*; adenosine

腺苷全称为腺嘌呤核苷,是核酸的基本结构单位。腺苷广泛存在于动物的肝脏及冬虫夏草等生物体中,是虫草类产品的主要活性成分^[1-2],它具有参与人体代谢和生理调节的功能^[3-4]。

核苷多采用极性溶剂进行提取,比如水、甲醇等^[5],也可以用混合溶剂进行提取,例如一定比例的甲醇溶液或乙醇溶液^[6-7]。腺苷的提取方式有多种,包括超声提取、微波提取、加热回流提取、水浴加热

提取等,其中超声和水浴加热两种提取方式提取率高,操作简单,最为常用。

目前腺苷含量的检测方法有毛细管电泳法、分光光度法、薄层色谱(TCL)法、放射性免疫法和高效液相色谱(HPLC)法^[8-9]等,其中高效液相色谱法因具有分离度好、灵敏度、准确度高、取样量少、自动化程度高、简单易操作等优点而被广泛采用。蔡丹等^[10]利用高效液相色谱法检测蜜环菌发酵液中腺

通讯作者 徐娟娟,质量工程师,主要从事质量分析及研究, E-mail: 273762117@qq.com

收稿日期 2019-11-28

引用格式 徐娟娟,徐自奥,周群,等. 高效液相色谱法测定地顶孢霉培养物中的腺苷[J]. 化学分析计量, 2020, 29(1): 79-82.

XU J J, XU Z A, ZHOU Q, et al. Determination of adenosine in the culture of *acremonium terricola* by high performance liquid chromatography [J]. Chemical analysis and meterage, 2020, 29(1): 79-82.

苷含量,黄丽俊^[11]等利用高效液相色谱法同时检测虫草制品中腺苷和虫草素含量的研究。张博等^[12]利用高效液相色谱法测定虫草菌粉中腺苷的含量。王世礼等^[8]利用高效液相色谱法测定颐神颗粒中腺苷的含量。以上报道的高效液相色谱方法检测虫草饲料添加剂地顶孢霉培养物中腺苷,分离度不理想,达不到完全浸提的效果。笔者通过优化腺苷浸提方法,满足地顶孢霉培养物及系列产品中腺苷高效液相色谱方法检测的需要。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪:LC-10ATvp型,日本岛津公司;

紫外检测器:LC-20AD型,日本岛津公司;

超声波提取仪:VGT-1990QTD型,超声功率为200 W,广东固特超声股份有限公司;

电动离心机:80-3型,常州普天仪器制造有限公司;

针式过滤器: $\Phi 13$ mm,孔径为 $0.45 \mu\text{m}$;

分析天平:FA2004型,感量为 0.001 g ,上海舜宇恒平科学仪器有限公司

腺苷标准样品:纯度为99%,美国Sigma公司;

腺苷标准储备溶液: 0.4 mg/mL ,准确称量腺苷标准样品 40 mg ,用水溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中,于 4°C 下可保存 30 d ;

腺苷标准溶液: 0.1 mg/mL ,取一定体积的腺苷标准储备液,用水稀释并定容,于 4°C 下保存;

甲醇:色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司;

磷酸二氢钾:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

实验室用水为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Waters Spherisorb ODS₂型柱($150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$,美国沃特世公司);检测器:岛津SPD-10Avp型紫外-可见光检测器;检测波长: 254 nm ;流动相:甲醇- 0.01 mol/L 磷酸二氢钾混合液($10:90$),流量为 1.0 mL/min ;柱温: 35°C ;进样体积: $20 \mu\text{L}$;定量方法:色谱峰面积外标法。

1.3 样品处理及测定

取 5 g 试样,粉碎后混匀,准确称取 1 g 粉碎后的试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 容量瓶中,加入约 45 mL 超纯水,置于超声波破碎仪中,于 40°C 提取 55 min 。取出,加入超纯水定容至标线,混匀后

用离心机以 3000 r/min 转速离心 3 min 。上清液经 $0.45 \mu\text{m}$ 和 $0.22 \mu\text{m}$ 两层滤膜过滤后供液相色谱分析使用。样品中腺苷含量按照式(1)计算:

$$X = \frac{S_1 c V \times 1000}{S_2 m} \quad (1)$$

式中: X ——试样中腺苷含量, mg/kg ;

S_1 ——试样色谱峰面积;

c ——腺苷标准溶液的质量浓度, mg/mL ;

V ——试样定容体积, mL ;

S_2 ——腺苷标准溶液色谱峰面积;

m ——试样质量, g

计算结果保留3位有效数字。平行样相对误差绝对值应不大于5%。

2 结果与讨论

2.1 浸提液的选择

取地顶孢霉培养物样品^[7],分别采用 45 mL 乙醇、10%乙醇水溶液、流动相和超纯水为浸提液,于 40°C 超声浸提 45 min ,腺苷含量测定结果列于表1。由表1可知,用10%乙醇水溶液浸提效果最佳,而超纯水和10%乙醇水溶液浸提结果差别不明显。从节约成本方面考虑,用超纯水作为提取液。

表1 使用不同提取液腺苷的含量测定结果 mg/kg

超纯水	10%乙醇-水	乙醇	流动相
375	380	300	351

2.2 浸提温度的选择

取地顶孢霉培养物样品^[7],用 45 mL 超纯水作为浸提液,分别于 $25, 35, 40, 45, 50^\circ\text{C}$ 超声提取 45 min ,不同浸提温度下地顶孢霉培养物中腺苷的含量测定结果如图1所示。由图1可知,在其它条件不变的情况下,随着浸提温度的升高,腺苷的含量逐渐增加,当浸提温度为 50°C 时,腺苷的含量有所下降,综合考虑实验成本及效果,选择浸提温度为 40°C 。

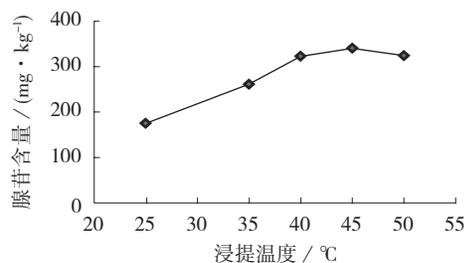


图1 不同提取温度下腺苷含量测定结果

2.3 浸提时间的选择

取地顶孢霉培养物样品^[7],用 45 mL 超纯水作为浸提液,分别于 40°C 超声浸提 $35, 45, 55, 65, 75, 80 \text{ min}$,不同浸提时间下地顶孢霉培养物中腺苷的

含量测定结果如图2所示。由图2可知,在其它条件不变的情况下,随着浸提时间的增加,腺苷的含量逐渐增加,浸提时间达到75 min后腺苷的含量变化不大。综合考虑提取效果和工作效率,选择浸提时间为55 min。

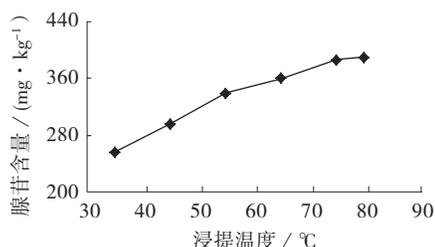


图2 不同提取时间腺苷测定结果

2.4 色谱条件的确定

本实验色谱条件参考文献[8,12-13]。因为地顶孢霉培养物样品是混合型物质,有效成分复杂多样,文献中的色谱条件无法满足完全分离的要求,通过试验对色谱条件进行了改进,参考文献[14-15]中流动相有乙腈-水(5:95)或0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-甲醇(85:15)等,试验选定甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾(10:90)为流动相,色谱峰形尖锐,样品中杂质峰对测定对象色谱峰无干扰,分离效果良好。将腺苷对照品溶液在200~400 nm波长范围内进行扫描,测得腺苷在250~260 nm间有最大吸收,故选择最常用的254 nm为检测波长,标准样品和样品色谱峰如图3、图4。

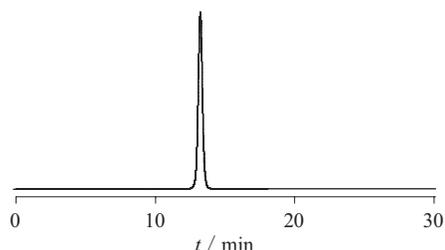


图3 腺苷标准样品色谱图

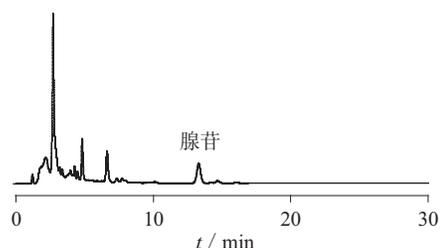


图4 腺苷样品色谱图

2.5 线性范围和检出限

用超纯水对腺苷标准溶液进行稀释,分别配制质量浓度为0.5,1.0,5,25,50,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的腺苷系列标准工作溶液,各取20 μL 过滤后进样测定,

以质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为自变量、色谱峰面积(y)为因变量进行线性回归,计算线性方程和线性相关系数。结果表明腺苷的质量浓度在0.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与色谱峰面积成良好的线性关系,线性方程为 $y=26\,667x-30\,559$,相关系数为0.9990。

将腺苷标准溶液逐级稀释,当其产生的信号值为基线噪音6次重复性标准偏差的3倍时对应的腺苷标准溶液浓度即为检出限^[16-17],试验得方法的检出限为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 精密度试验

取同一批次的6个样品,按1.3方法测定其中的腺苷含量,试验结果列于表2。由表2可知,测定结果的相对标准偏差为1.65%,表明该方法精密度良好。

表2 精密度试验结果

测定值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RSD/ %
313.6,306.1,316.2,312.5,307.6,319.8	312.6	1.65

2.7 加标回收试验

取已知含量的地顶孢霉培养物样品^[7],添加3个水平的腺苷标准样品,按照1.3方法处理并测定其中腺苷的含量,计算回收率,结果列于表3。由表3可知,3个添加水平的腺苷平均回收率为98.19%,表明本法测定结果准确、可靠。

表3 加标回收试验结果

本底值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	添加量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测得值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/ %	平均 回收率/%
312.6	50	346.1,355.7,350.9	96.77	98.19
	80	389.6,390.1,389.4	99.26	
	100	406.3,405.9,407.6	98.54	

2.8 实际样品测定

将5批地顶孢霉培养物样品按照1.3步骤处理,在1.2色谱条件下测定,测定结果列于表4。

表4 地顶孢霉培养物实际样品腺苷含量测定结果

样品	色谱保留时间/min	腺苷含量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
01	13.598	305.6
02	13.527	343.7
03	13.517	348.0
04	13.504	320.9
05	13.511	312.8

由表4数据可知,样品中腺苷和腺苷标准样品的色谱保留时间基本一致,重现性良好;利用本方法测定不同样品中腺苷的含量,测定结果基本一致。表明本法可行。

3 结语

对虫草饲料添加剂地顶孢霉培养物中腺苷的提取条件进行了优化,样品前处理简单,回收率高,

稳定性好,实现了对腺苷的准确测定,方法高效、经济、准确,同时使用试剂对环境污染小,适用于虫草饲料添加剂地顶孢霉培养物中有效成分腺苷含量的检测。

笔者在试验过程中发现,在不同的季节,随着外界环境温度的不同,提取相当含量的腺苷所用时间有所不同,因此方法中浸提时间可以根据季节适当调整,范围为50~80 min,具体关系有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张红霞,吴畏,陈伟,等.北冬虫夏草发酵液中虫草素和腺苷含量的HPLC分析[J].上海农业学报,2005,21(4): 53-56.
- [2] 陈千良,甘志杰,孙文基. HPLC法测定人工蛹虫草子实体中虫草素[J].西北大学学报,2003,10(5): 569-571.
- [3] 张昌颖.核酸生物化学[M].北京:人民卫生出版社,1993.
- [4] 甘宾宾,潘艳坤. HPLC法测定保健食品中虫草素和腺苷含量[J].中国卫生检验杂志,2006,16(11): 1310-1311.
- [5] 宋江峰,刘春泉,李大婧,等. HPLC-DAD测定人工北冬虫夏草中虫草素含量[J].食品科学,2008,29(4): 352-354.
- [6] 彭日煌,谢明勇,王远兴等. RP-HPLC测定虫草菌粉中核苷类成分[J].食品与机械,2005,21(1): 61-63.
- [7] 汪宇,于荣敏,杨光照. 高效液相色谱法测定蛹虫草人工固体培养物中核苷类化合物的含量[J].中国生化药物杂质,2004,25(5): 306-308.
- [8] 王世礼,杜玲杰,王丽娟,等. HPLC法测定颐神颗粒中腺苷的含量[J].江西中医药大学学报,2018,30(26): 75-77.
- [9] 张安宁,袁书林,孙林超,等. 反相液相色谱法测定发酵虫草菌粉腺苷含量[J].食品研究与开发,2011,32(12): 126-129.
- [10] 蔡丹,刘景圣,修琳,等. 高效液相色谱法检测蜜环菌发酵液中腺苷含量[J].食品科学,2012,30(20): 274-276.
- [11] 黄丽俊,李利东,宓晓黎. 高效液相色谱法同时检测虫草制品中腺苷和虫草素含量的研究[J].农学通报,2015,5(5): 25-28.
- [12] 张博,杨黎彬,李金娟. 高效液相色谱法测定虫草菌粉中腺苷的含量[J].光谱实验室,2011,28(2): 899-902.
- [13] 贾增永,王玉. 高效液相色谱法测定金水宝胶囊中腺苷及腺嘌呤的含量[J].中国新药与临床杂志,2011,30(10): 786-788.
- [14] 王桂英,孙伟红,庄燕. 高效液相色谱法测定虫草胶囊中腺苷的含量[J].食品安全质量检测学报,2018,9(7): 1644-1648.
- [15] 吴燕,杨滨. HPLC法同时测定保健品中腺苷和虫草素含量的研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(6): 983-985.
- [16] 胡云,严志刚,张林. 高效液相色谱法检测蛹虫草胶囊中腺苷含量的方法研究[J].现代农业科技,2011(12): 324-325.
- [17] 尚岩岩,张岩岩,曾慧. 高效液相色谱-串联质谱法测定塑料中的1-甲基-2-吡咯烷酮[J].化学分析计量,2019,28(1): 20-23.