

## 论著

## RP-HPLC 法测定冬虫夏草发酵液冻干粉中虫草素和腺苷含量

王海霞 胡高升 蒙 娅 贾景明  
(沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 有效地控制冬虫夏草发酵液冻干粉的质量。方法 建立了测定虫草素和腺苷含量的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)。色谱条件:C<sub>18</sub>柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈+水+甲醇(2+85+2);流速为1.0 ml/min;紫外检测波长260 nm。结果 虫草素浓度在0.45~18.00 μg/ml范围内与峰面积呈线性相关,  $r=0.9993$ , 平均回收率为96.5%,  $RSD$ 为2.3%。腺苷浓度在1.76~17.60 μg/ml范围内与峰面积呈线性相关,  $r=0.9990$ , 平均回收率为97.3%,  $RSD$ 为1.0%。结论 该方法样品处理简便, 结果可靠, 重现性好, 可有效地控制冬虫夏草发酵液冻干粉的质量。

**关键词:**色谱法; 高压液相; 冬虫夏草属; 虫草素; 腺苷; 植物提取物

### Determination of Cordycepin and Adenosine in Freezer-dried Powder of Fermented *Cordyceps Sinensis* by RP-HPLC

WANG Hai-xia, Hu Gao-sheng, Meng Ya, JIA Jing-ming

(Shenyang Pharmaceutical University, Liaoning Shenyang 110016, China)

**Abstract:** **Objective** To control the quality of freezer-dried powder of fermented *C. sinensis*, cordycepin and adenosine were determined by RP-HPLC. **Method** RP-HPLC condition: C<sub>18</sub> column (250 mm ×4.6 mm, 5 μm); acetonitrile + water +

### 3 讨论

本实验27株副溶血性弧菌菌株来自宁波部分菜市场销售的小水产品, 包括淡水产品和海水产品, 主要有牡蛎、毛蚶、蚶子、泥螺、花蛤、蛭子、虾、蟹等, 大部分为养殖产品。经副溶血性弧菌13种O血清分群, 共有9个血清群, 分别为O4群、O3群、O2群、O11群、O5群、O1群、O7群、O9群、O10群。说明宁波市市售小水产品中携带的副溶血性弧菌血清群的多样性, 提示有小水产品引起各种感染的潜在性, 对其属性的认识, 有利于预防和控制此类疾病的发生。

27株副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 均阴性。有文章报道, 所有分离自环境的副溶血性弧菌菌株未见携带 *tdh*。小水产品中携带的副溶血性弧菌毒力与腹泻的关系有待进一步研究。

药敏试验结果表明, 小水产品中分离的副溶血性弧菌对复方新诺明和氯霉素100%敏感, 对青霉素类、-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、头孢类药物都有耐药株, 结果提示副溶血性弧菌也

可能存在超级耐药株。目前, 我国的水产养殖业中广泛使用抗生素, 若不加控制, 将会造成严重后果。

### 参考文献

- [1] 李孝权, 邓志爱, 柴巧学, 等. 副溶血性弧菌食源性疾病分离株的多态性分析[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(增刊): 57-58.
- [2] 张蔚, 孟冬梅, 潘劲草, 等. 杭州地区临床和环境分离副溶血性弧菌菌株携带毒力基因的特征[J]. 中华预防医学杂志, 2004, 38(3): 200-203.
- [3] 刘秀梅, 程苏云, 陈艳, 等. 2003年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 97-99.
- [4] HIN-CHUNG WONG. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan by random amplified polymorphic DNA analysis [J]. J Clin Microbiol, 2001, 34: 1809-1812.
- [5] LU PL, CHANG, PAN HJ, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the investigation of a nosocomial outbreak of *Vibrio Parahaemolyticus* [J]. Microbiol Immunol Infect, 2000, 33(1): 29-33.
- [6] CLSI/NCCLS document M 100-S15. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S].

[收稿日期: 2007-01-19]

中图分类号: R15; S944.3; R378.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2007)04-0307-03

作者简介: 王海霞 女 硕士生

通讯作者: 贾景明 男 副教授 博士

methanol (2 + 85 + 2) as mobile phase. The flow rate was 1 ml/min and detected at 260 nm. **Results** The results indicated that the concentration of cordycepin within the range from 0.45 ~ 18.00  $\mu\text{g/ml}$  was linearly correlated with the peak area,  $r = 0.9993$ , the average recovery was 96.5% and relative standard deviation  $RSD$  was 2.3%. The linear range of adenosine was 1.76 ~ 17.60  $\mu\text{g/ml}$ ,  $r = 0.9990$ , the average recovery was 97.3% and  $RSD$  was 1.0%. **Conclusion** This method is simple and credible. It has a good stability and can control the quality of freezer-dried powder of fermented *C. sinensis* effectively.

**Key word**: Chromatography, High Pressure Liquid; Cordyceps; CORDYCEPIN; Adenosine; Plant Extracts

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) 属于真菌门,子囊菌纲,肉座菌目,麦角菌科,虫草属的一种名贵药用真菌<sup>[1]</sup>。虫草属菌中含有多种具有医疗保健功效的活性物质,其中虫草素(cordycepin)和腺苷(adenosine)是主要活性物质<sup>[2]</sup>。研究发现,虫草素具有抑菌、抗癌和抗病毒等作用;腺苷有舒张血管、降血压、减慢心率、镇静、抗惊厥、抗菌、抗病毒、抗辐射损伤、钙离子拮抗及杀虫等功能<sup>[3]</sup>。冬虫夏草发酵液冻干粉是在冬虫夏草发酵液中加入一定量的赋形剂,按特定工艺进行低温冷冻干燥得到的。该制剂能够有效地保存冬虫夏草发酵液中的活性成分,而且具有制备简单和储存方便等特点。为了控制产品质量,对冬虫夏草发酵液冻干粉中虫草素和腺苷建立快速、简便、准确的测定方法具有重要的意义。以往文献报道的关于虫草素和腺苷的含量测定方法有紫外分光光度法<sup>[4]</sup>、薄层扫描法<sup>[5]</sup>、毛细管电泳法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7]</sup>,本实验采用 RP-HPLC 法对冬虫夏草发酵液冻干粉中的虫草素和腺苷的含量进行测定。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 日本岛津高效液相色谱系统(泵 SHIMADZU LC-10ATyp,紫外检测器 SHIMADZU SPD-10ATyp,柱温箱(天津奥特赛恩斯 AT-330),旋转蒸发仪(河南省太康县科教仪器厂),电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司 DK-98 型),虫草素对照品(纯度 99.0%,SIGMA 公司),腺苷对照品(纯度 98.5%,中国药品生物制品检定所),乙腈和甲醇(天津康科德科技有限公司)为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂为分析纯。

**虫草素标准溶液的配制** 精密称取 2.25 mg 虫草素对照品,90%甲醇定容至 25 ml,然后用 90%甲醇分别稀释成 0.45、1.26、4.50、9.00、13.50、18.00  $\mu\text{g/ml}$  系列对照溶液,依次经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤备用。

**腺苷标准溶液的配制** 精密称取 2.20 mg 腺苷对照品,90%甲醇定容至 25 ml,然后用 90%甲醇分别稀释成 1.76、4.40、8.80、13.50、17.60  $\mu\text{g/ml}$  系列对照溶液,依次经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤备用。

**供试品溶液的配制** 精密称取 0.5 g 冬虫夏草

发酵液冻干粉,置磨口锥形瓶中,加入 20 ml 90%甲醇,水浴回流 2 h,抽滤,残渣用 90%甲醇洗涤 3 次,将滤液合并浓缩,90%甲醇定容至 5 ml 容量瓶中,再经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱 反相 DIAMON SIL C<sub>18</sub> 烷基硅胶柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 检测波长: 260 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相 乙腈 + 水 + 甲醇 = 2 + 85 + 2。

**1.2.2 校正曲线的制备** 分别取以上不同浓度的对照溶液准确进样 5  $\mu\text{l}$ , 平行操作 3 次,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制校正曲线。虫草素在 0.45 ~ 18.00  $\mu\text{g/ml}$  的范围内呈良好线性关系,回归方程为  $y = 11\,217x + 11\,542$ ,  $r = 0.9993$ ; 腺苷在 1.76 ~ 17.60  $\mu\text{g/ml}$  的范围内呈良好线性关系,回归方程为  $y = 13\,840x - 581.37$ ,  $r = 0.9990$ 。虫草素、腺苷对照品的色谱图见图 1、图 2,保留时间分别为 37.457 min 和 26.807 min。

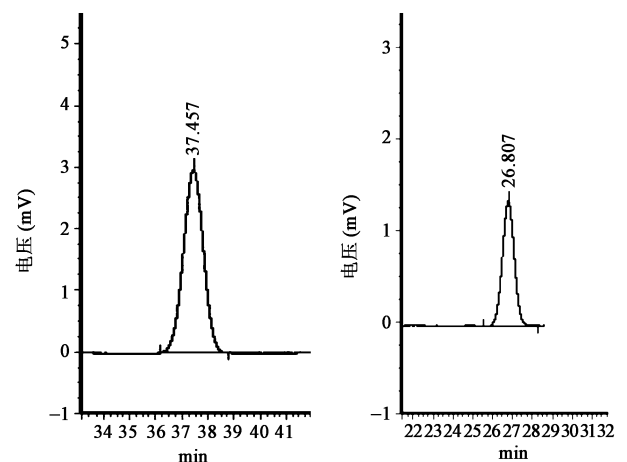


图 1 虫草素对照品色谱图 图 2 腺苷对照品色谱图

## 2 结果

**2.1 精密度试验** 虫草素精密度试验 分别取浓度为 0.45、4.50、13.50  $\mu\text{g/ml}$  的虫草素对照溶液,依本方法进行日内和日间精密度试验。结果见表 1。 $RSD$  分别为 0.9% ~ 1.9%、1.5% ~ 3.0%。

腺苷精密度试验 分别取浓度为 1.76、8.80、17.60  $\mu\text{g/ml}$  的腺苷对照溶液,依法进行日内和日间精密度试验,见表 2。 $RSD$  分别为 1.0% ~ 1.9%,

1.8% ~ 2.5%。

表 1 虫草素精密度的试验

	浓度(μg/ml)	RSD(%)
日内精密度 (n=7)	0.45	1.9
	4.50	1.3
	13.50	0.9
日间精密度 (n=7)	0.45	3.0
	4.50	2.2
	13.50	1.5

表 2 腺苷精密度的试验

	浓度(μg/ml)	RSD(%)
日内精密度 (n=7)	1.76	1.9
	8.80	1.2
	17.60	1.0
日间精密度 (n=7)	1.76	2.5
	8.80	2.2
	17.60	1.8

2.2 回收率试验 平行称取 4 份已知含量样品各 0.5 g, 分别加入虫草素对照品 36 μg、腺苷对照品 4.4 μg, 进行回收率试验, 按供试品溶液制备及测定方法操作。每份平行测定 3 次, 计算回收率。虫草素的回收率范围为 99.5% ~ 94.3%, 腺苷的回收率范围为 98.2% ~ 95.1%。平均回收率分别为 96.5% 和 97.3%, RSD 分别为 2.3% 和 1.0%。

2.3 重现性试验 取同一批样品, 按供试品制备项下操作 5 次, 进样, 读取峰面积, 求得样品中虫草素和腺苷的含量。数据见表 3, 虫草素 RSD = 2.8%, 腺苷 RSD = 1.9%。

冬虫夏草发酵液冻干粉色谱图见图 3, 测定结果为虫草素含量 86.82 μg/g, 腺苷含量 7.21 μg/g。

2.4 稳定性试验 精密称取 0.5 g 冬虫夏草冻干粉粉末, 按供试品溶液制备方法制备, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 测定含量, 虫草素 RSD = 2.0%, 腺苷 RSD = 2.6%。

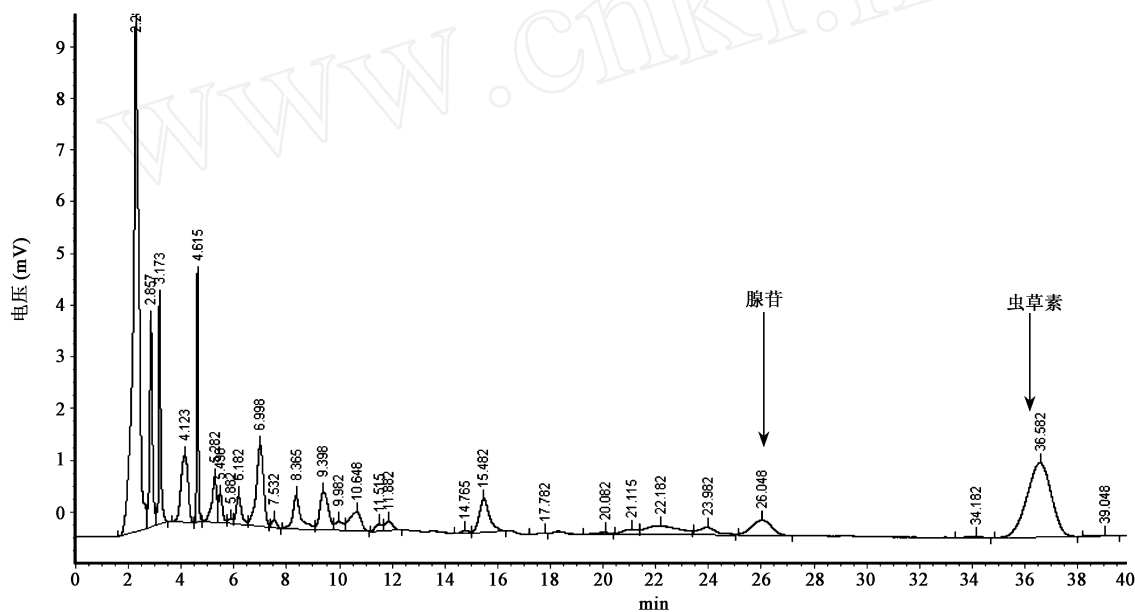


图 3 冬虫夏草发酵液冻干粉样品色谱图

表 3 重现性测定结果

试验序号	样品加入量(g)	腺苷峰面积(μV/s)	腺苷含量(μg/g)	虫草素峰面积(μV/s)	虫草素含量(μg/g)
0.5019	20914	7.12	108416	85.64	
0.5053	21128	7.21	114385	90.00	
0.5038	21365	7.39	105048	86.02	
0.5024	21023	7.21	109232	86.32	
0.5013	20561	7.11	105864	86.13	

表 4 不同提取时间对于虫草素和腺苷含量的影响

提取时间(min)	虫草素含量(μg/g)	腺苷含量(μg/g)
30	75.41	4.23
60	78.95	5.55
90	83.08	6.29
120	87.41	7.19

### 3 讨论

3.1 提取时间 本实验采用回流提取法, 比较了不同提取时间对于虫草素和腺苷提取效果的影响, 数据见表 4。结果表明, 回流提取 120 min 时, 提取效果最好。

3.2 前处理方法采用回流提取, 回收率及重现性均符合色谱实验要求, 效果较好。本品选用 RP-HPLC 法测定虫草素和腺苷含量, 不仅操作简单快捷, 且稳定性好, 可用来作为冬虫夏草发酵液冻干粉的质量测定及控制。

论著

# 食品安全与卫生的关系及发展展望

高志胜

(江苏省卫生监督所,江苏 南京 210009)

**摘要:**目的 阐述食品安全和食品卫生二者之间的关系及发展趋势。方法 通过食品的定义,比较食品卫生和食品安全等相关概念,分析食品在卫生与安全上存在着既卫生又安全的食品、卫生但不安全的食品、安全但不卫生的食品和不卫生不安全的食品的 4 种关系。结果 食品本身应具有安全的和卫生的属性,食品卫生与食品安全是两个概念,二者之间有共同点也有各自不同的部分,内涵上不存在谁大谁小的问题。结论 食品安全不是食品卫生发展的高级阶段,两者将长期并存、不会互相取代反而将相互促进。

**关键词:**食品;安全;卫生

## Advance of Relationship and Development of Food Safety and Its Hygiene

GAO Zhi-sheng

(Jiangsu Province Institute of Health Inspection, Jiangsu Nanjing 210009, China)

**Abstract: Objective** To elucidate the relationship and development of food safety and its hygiene. **Method** From the definition of food, the relevant definitions of food hygiene with food safety were compared, the four relationships for hygiene and safety, hygiene but not safety, safety but not hygiene, and neither hygiene nor safety were analyzed. **Results** Both safety and hygiene may be properties of food, the concepts of food safety and food hygiene may be difference. They were same parts as well as different parts. The aspects on the safety and hygiene could not be said that it was important or not important between the food safety and food hygiene. **Conclusion** Food safety may not be advanced phase of food hygiene and both would be very important.

**Key word:** Food; Safety; Hygiene

近来,社会对食品安全和卫生的关注程度越来越高,也带来了食品安全与食品卫生的概念究竟谁大谁小的争论,有的人认为卫生的概念大,说食品首先应是卫生的,然后才是安全的;也有人认为食品首先应该是安全的,认为若食品连安全都谈不上又何谈卫生,甚至有用“食品安全”取代“食品卫生”的趋势<sup>[1]</sup>。上述观点应该说都不够准确和全面,食品安全不是食品卫生发展的高级阶段,二者不会也不可

能互相取代。

### 1 有关概念及比较

1.1 安全与卫生 根据《现代汉语词典》的定义,安全是不受威胁,没有危险、危害、损失,不出事故;卫生为干净,不肮脏,能保护或有益于健康,防止疾病。安全所涉及的内容很多,如国家安全、交通安全等,卫生也包括许多方面,如环境卫生、劳动卫生等。

### 参考文献

- [1] 林群英,钟月金,李泰辉,等. 虫草属生物学研究进展[J]. 食用菌学报,2006,13(2):89-92.
- [2] 张兴辉,石力夫,胡晋红. 冬虫夏草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材,2000,23(11):722-724.
- [3] 董洪新,吕作舟. 冬虫夏草的研究概况[J]. 中国食用菌,2002,21(2):5-7.
- [4] ZHANG GUAN-DE, LI YF-XIA. Studies on determination of nucleosides and their bases in Chinese medicinal fungus Cordyceps Sinensis[J]. Chin J Pharm Anal, 1987,7(1):6.
- [5] 丁振成. 薄层扫描法测定金水宝胶囊腺苷含量[J]. 中国药学杂志,1995,30(6):380.
- [6] 李绍平,李萍. 毛细管电泳法测定冬虫夏草中核苷类的含量[J]. 药物分析杂志,2001,21(2):77-79.
- [7] 郭澄. 高效液相色谱法测定人工虫草菌丝中腺苷和虫草素的含量[J]. 中国中药杂志,1998,23(4):236.

[收稿日期:2007-03-22]

中图分类号:R15;O657.72;Q949.372.6

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2007)04-0309-04

作者简介:高志胜 男 主任医师

