

均匀设计在蚕蛹虫草和冬虫夏草 活性成分分析中的应用

周枝凤, 梁逸曾, 胡 芸, 郭方遒

(中南大学 化学化工学院 中药现代研究中心, 湖南 长沙 410083)

摘 要: 采用均匀实验设计方法快速找到蚕蛹虫草活性成分的高效液相色谱最优分离条件; 将该优化条件用于蚕蛹虫草和冬虫夏草的水溶性成分的分离取得满意结果, 并对部分组分进行了定性定量分析; 均匀实验设计方法可较快找到复杂未知或半未知体系的色谱分离条件。

关键词: 蚕蛹虫草; 冬虫夏草; 均匀设计; 信息量; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.72; Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2004)02-0035-03

Uniform Design Applied to the Determination of Active Components of *Cordyceps Militaris* and *Cordyceps Sinensis*

ZHOU Zhi-feng, LIANG Yi-zeng, HU Yun, GUO Fang-qiu

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Research Center for the Modernization of Chinese Herbal Medicine,
Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: The optimal HPLC chromatographic conditions for the separation of active components in *Cordyceps militaris* were found with the aid of uniform design. As the optimized conditions were applied to separate the water-soluble active constituents in extracts from *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis*, satisfactory results were obtained. Both qualitative and quantitative analyses of some active constituents have been conducted on the basis of optimized separation. Hence, uniform design is a good method to optimize the chromatographic separation conditions of complicated systems with unknown or uncertain components.

Key words: *Cordyceps militaris*; *Cordyceps sinensis*; Uniform design; Information quantity; HPLC

高效液相色谱是分析中药活性成分的重要工具^[1], 在虫草的成分分析中应用十分广泛^[2,3]。但影响色谱分离的因素很多, 寻找一个复杂体系特别是复杂未知体系的最佳色谱分离条件并非易事。为找到最佳色谱分离条件, 常用的优化方法有正交设计法^[4]、单纯形法^[5]等, 但这些方法对试验水平数较多的情况难于处理。均匀设计法^[6]克服了正交设计法实验次数随实验参数水平数增长过快的缺点和单纯形法陷入局部最优的可能性, 可在有效减少试验次数的同时较快找到最优解, 在化学化工等方面得到了十分广泛的应用^[7], 但在复杂的色谱分析体系中, 均匀设计的应用还不多见^[8]。

本文用均匀实验设计方法较快找到分离蚕蛹虫草活性物质的色谱分离条件, 并应用于冬虫夏草和蚕蛹虫草水溶性成分的色谱分离, 结果令人满意。同时对冬虫夏草和蚕蛹虫草中腺苷、尿嘧啶、腺苷成分进行了定性定量分析。

1 理论部分

均匀试验设计是基于数论方法提出的部分因子设计, 与正交试验设计方法相似, 精心设计好一套表格供使用者选择。在实际应用中, 往往难以使得试验的每个因子都具有相同的试验水平, 为适应试验的需要, 可通过拟水平的方法来实现^[9]。

根据信息理论^[10], 对相同的样本, 从色谱图中获得的信息量越大, 表明其分离效果越好。由 Shannon 方程^[11], 信息量计算如下:

收稿日期: 2003-04-01; 修回日期: 2004-01-05

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20235020)

作者简介: 周枝凤(1976-), 女, 广西桂平人, 硕士; 梁逸曾, 联系人。

$$I = - \sum_{i=1}^n p_i \log p_i \quad (i \text{ 表示任一保留时间点, } n \text{ 为总的保留时间点数})$$

式中 p_i 表示在第 i 个保留时间点经标准化后的色谱量测值, I 表示信息量。色谱标准化表示如下:

$$p_i = x_i / \sum_{i=1}^n x_i \quad (x_i \text{ 是第 } i \text{ 个保留时间点的色谱响应值})$$

2 实验部分

2.1 仪器药品

Agilent1100 高效液相色谱, G1315A DAD 二极管阵列紫外检测器, 上海 BRANSONSB2200 超声波发生器。冬虫夏草(西藏产)购自长沙市九芝堂药店, 蚕蛹虫草由云南省某研究所提供。腺苷、尿苷、尿嘧啶均购自 Sigma 公司。流动相甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2.2 检测条件

色谱柱: Hypersil ODS 柱(粒径 4.5 μm , 250 mm $\times$ 4.0 mm i. d.), 流动相组成和流速依据均匀设计表格的条件分别进行; 洗脱液 A: 含不同量甲醇的水溶液, 洗脱液 B: 不同 pH 值和不同浓度的 KH_2PO_4 缓冲溶液; 洗脱液 A 在 0~4 min 保持 10%, 4~60 min 由 10% 增加到 30%。扫描范围: 210~390 nm, 扫描间隔: 0.402 s/次。

2.3 样品液的制备

将蚕蛹虫草和冬虫夏草样品在 40 $^\circ\text{C}$ 的烘箱中干燥 3 h, 碾碎过孔径为 0.9 mm 的筛。取 0.500 g 蚕蛹虫草粉末, 用 50% 的甲醇水溶液作提取液, 超声波提取 2 h, 过滤, 滤液减压浓缩至干, 用 50% 的甲醇定容至 10 mL, 得色谱条件优化测定液。

分别称取上述样本粉末各 0.500 g, 加入蒸馏水适量, 超声波提取 2 h, 滤液减压浓缩至干, 用 50% 的甲醇定容至 10 mL, 得待测液。

3 结果与讨论

3.1 色谱分离条件的选择

流动相中甲醇含量、流动相 pH 值、缓冲溶液盐浓度、流速等是影响高效液相色谱分离的主要因素。在均匀设计中, 实验个数通常取实验参数的两倍, 由均匀实验设计表^[9], 选取 $U^*_8(8^4)$ 表, 经拟水平变化得 $U^*_8(8^2 \times 4^3)$ 表, 将各因素的水平依次填入即得实验安排表, 见表 1。

表 1 色谱分离条件的均匀设计表
Table 1 Levels of chromatographic separation conditions adopted in uniform design

Run	pH	$c(\text{KH}_2\text{PO}_4) / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Flow rate $v / (\text{mL} \cdot \text{min}^{-1})$	$\phi(\text{CH}_3\text{OH}) / \%$	I / bit
1	4.0	25	1.0	40	6.559 5
2	4.6	15	0.6	80	7.813 7
3	5.2	35	1.0	100	8.586 5
4	5.8	5	1.2	80	6.943 0
5	6.4	40	0.6	60	7.357 6
6	7.0	10	0.8	40	6.501 0
7	7.6	30	1.2	60	6.717 8
8	8.2	20	0.8	100	7.197 6

理论上讲, 50% 的甲醇水溶液做提取剂应当比纯水所得的成分复杂, 所以以 50% 的甲醇水溶液做提取液所得物进行色谱优化实验。依据表 1, 分别进样 10 μL 优化测定液进行检测得到不同色谱分离条件下的色谱图, 见图 1。图 1 中, No. 1~No. 8 分别对应于表 1 中的 Run 1~Run 8 色谱条件下的色谱图。直观上看, No. 2、No. 3、No. 5 的色谱峰较多, 大部分色谱峰都达到了基线分离且色谱峰分布较均匀, 所需的流出时间都较短。

图 1 中, 各图或多或少都存在色谱基线漂移, 所以先对色谱图进行基线校正以扣除基线漂移对色谱图信息量的贡献。不同色谱条件的色谱图信息量列于表 1 的最后一列。其中 Run 3 所对应的色谱指纹图信息量最大 ($I = 8.5865 \text{ bit}$), 即图 1 中 No. 3 的分离质量最好。

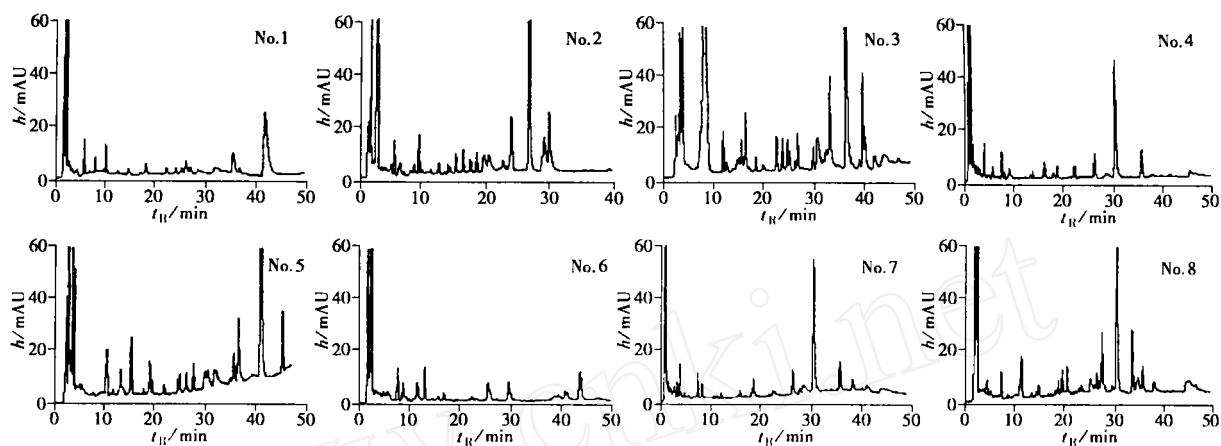


图 1 表 1 中不同色谱条件下的色谱图, $\lambda = 262 \text{ nm}$

Fig. 1 Chromatographic profiles under various conditions as described in table 1, $\lambda = 262 \text{ nm}$

由于均匀设计的各因素水平均匀分布于实验空间, 其最好的实验点往往就在最优实验点附近, 可选择最好点作为最优点进行实验。本文选择图 1 的 No. 3 所对应的条件作为样品的分离条件, 即 $\text{pH} = 5.2$, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\phi(\text{MeOH}) = 100\%$, 流速是 1.0 mL/min 。

3.2 样品液的检测

使用上述优化的色谱条件, 测定了蚕蛹虫草和冬虫夏草的水溶性活性成分, 其色谱图见图 2。经高效液相色谱工作站的峰纯度检验得知, 色谱峰几乎都为单组分峰, 各组分的分离基本上达到了常规分离要求。

在该色谱条件下, 做了腺苷、尿苷、尿嘧啶标准对照品的检测, 对样品中部分色谱峰进行了定性分析, 结果参见图 2 中的标识。线性范围内, 以色谱峰面积 y 对质量浓度 $x(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 做回归, 得到腺苷、尿苷、尿嘧啶的回归曲线分别为: $y = 7.90 \times 10^2 x + 4.47 \times 10^3$ ($r = 0.999$); $y = 5.31 \times 10^2 x - 1.70 \times 10^3$ ($r = 0.998$); $y = 8.95 \times 10^3 x + 6.85 \times 10^2$ ($r = 0.998$)。经外标法, 冬虫夏草中腺苷、尿苷、尿嘧啶含量分别是 0.159 、 0.463 、 0.00325 mg/g ; 蚕蛹虫草中腺苷、尿苷的含量为 1.00 和 0.358 mg/g 。

3.3 回收率试验

加入一定量的腺苷、尿苷、尿嘧啶标准对照样品, 依据同样的方法检测, 测得回收率分别是 99.8% 、 98.8% 、 99.0% 。

4 结 论

采用均匀实验设计方法, 用信息量作为判断标准, 较快找到优化的色谱条件, 应用于蚕蛹虫草和冬虫夏草的水溶性成分的检测, 色谱峰的分离达到了常规的分析要求。采用均匀实验设计可通过较少的实验较快找到满意的色谱分离条件, 适合复杂中药体系的色谱分离条件的优化。

参考文献:

[1] 吴惠勤, 谢培山. 南雄银杏叶中银杏黄酮含量的 HPLC 测定[J]. 分析测试学报, 2001, 20(6): 53-55.

(下转第 40 页)

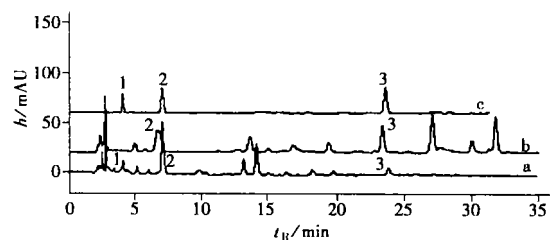


图 2 冬虫夏草、蚕蛹虫草和核苷类标准对照物的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris* and nucleoside standards

a. *Cordyceps sinensis*; b. *Cordyceps militaris*; c. nucleoside standards; 1. Uracil; 2. Uridine; 3. Adenosine; $\lambda = 262 \text{ nm}$

为 0.02 mol/L NaCl(0.01 mol/L, pH 8.0, Tris - HCl), 流速: 0.1 mL/min, 3 mL/tube。得到两个峰形对称的蛋白质 - 糖组分, 这两个蛋白质组分均为糖蛋白。收集第一个峰组分, 对水透析后冷冻干燥, 得到小麦胚芽水溶性糖蛋白 WGGP。

2.2 WGGP 的寡糖链对其热力学性质的影响

WGGP 和去糖基化 WGGP 样品的 DSC 分析如图 3 所示。从测定结果可以得出两样品的热力学参数见表 1, WGGP 的热变性温度为 96.098 °C, 而去糖基后的热变性温度为 74.338 °C, 因此糖蛋白上的寡糖分子对于蛋白质具有较好的稳定作用, 具有增强蛋白质抗变性功能。

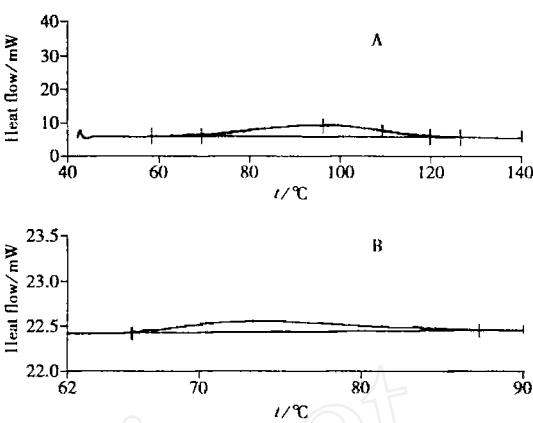


图 3 WGGP(A)和去糖基化的 WGGP(B)的 DSC 分析扫描曲线
Fig. 3 Thermogram of WGGP(A) and deglycosylated WGGP(B) determined by DSC

表 1 DSC 测得的两样品的热力学参数
Table 1 The thermodynamic parameters of two samples determined by DSC

Sample	Onset <i>t</i> ₀ / °C	Peak <i>t</i> _p / °C	End <i>t</i> _e / °C	Area Δ <i>H</i> _{cal} / mJ
WGGP(麦胚糖蛋白)	69.391	96.098	119.830	657.288
Deglycosylated WGGP(去糖基化WGGP)	65.853	74.338	79.967	8.818

参考文献:

[1] MONTREUIL J, Vliegenthart J F G. Glycoproteins[M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1995. 1 - 10.

[2] 孙 册, 莫汉庆. 糖蛋白与蛋白聚糖的结构、功能和代谢[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 1.

[3] 陈惠黎, 王克夷. 糖复合物的结构和功能[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997. 85.

[4] BEELEY J G. Glycoprotein and proteoglycan techniques, as laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol 16[M]. New York Oxford: Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1985. 63 - 67, 165 - 170.

[5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 11 - 12.

[6] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265 - 275.

[7] 朱科学. 小麦胚芽水溶性糖蛋白的特性与结构研究[硕士学位论文][D]. 无锡: 江南大学, 2002. 44 - 45.

(上接第 37 页)

[2] 何 玲, 马冰如, 马甲生, 等. 蚕蛹虫草和冬虫夏草化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 1993, 28(5): 279 - 280.

[3] 郭 澄, 朱 杰, 张 纯, 等. 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 - 237.

[4] 林 轩, 何金兰. 人工神经网络法用于高效毛细管电泳分离条件优化的研究[J]. 分析测试学报, 1998, 17(5): 54 - 57.

[5] 王秀英. 青霉素 G 酶促裂解液的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 1995, 14(4): 79 - 81.

[6] 方开泰. 均匀设计: 数论方法在实验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363 - 372.

[7] LIANG Y Z, FANG K T, XU Q S. Uniform design and its applications in chemistry and chemical engineering[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2001, 58: 43 - 57.

[8] LEE A W M, CHAU W F, FION S Y, *et al.* An example of a sequential uniform design: Application in capillary electrophoresis[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1997, 39: 11 - 18.

[9] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀实验设计[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 73 - 76.

[10] 俞汝勤. 现代分析化学的信息理论基础[M]. 长沙: 湖南大学出版社, 1987. 88 - 101.

[11] 陈 运, 周 亮, 陈 新. 信息论与编码[M]. 北京: 电子工业出版社, 2002. 20 - 21.