

HPLC – ELSD法测定不同来源人工蛹虫草子实体中甘露醇的含量

杨昕¹, 涂秩平², 李高^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030 2 瑞丹生物科技有限公司, 东莞 523086)

摘要 目的: 建立 HPLC-ELSD 法测定人工蛹虫草子实体中甘露醇的含量。方法: 采用氨基柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25℃, 进样量 20 μL, 以乙腈-水 (82.5:17.5) 为流动相洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹; ELSD 漂移管温度 90℃, 载气 (N₂) 流速 2.0 L·min⁻¹, 撞击器: 关。结果: 不同来源的人工蛹虫草子实体中甘露醇含量差别较大, 其中以广东 I 号厂家培育的含量最高 (7.5%)。结论: 本方法稳定、可靠, 甘露醇可作为评价人工蛹虫草子实体质量的指标之一。

关键词: 人工蛹虫草子实体; 甘露醇; HPLC-ELSD; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1668-04

HPLC – ELSD determination of mannitol in cultured *Cordyceps militaris* L. Link

YANG Xin¹, TU Zhi-ping², LI Gao¹

(1. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 China

2. Ruidan Biological Technique Co, Ltd Dongguan 523086, China)

Abstract Objective To establish a reliable and accurate HPLC – ELSD method for the determination of mannitol in cultured *Cordyceps militaris* L. Link by optimizing the extraction, separation and analytical conditions. **Method** Separation was achieved on a NH₂ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile–water (82.5:17.5) as mobile phase at 25℃ and a flow rate at 0.5 mL·min⁻¹. The drift tube temperature of ELSD and nitrogen flow rate was set at 90℃, and 2.0 L·min⁻¹, respectively. Impact OFF. **Results** Mannitol was found in 9 samples collected in different areas in China and the variety of mannitol was significant. The highest content (7.5%) was found in Guangdong province. **Conclusion** The current method demonstrated good linearity, selectivity, precision, recovery, short analysis time, and was successfully used to determine the content of mannitol in cultured *Cordyceps militaris* growing in different areas of China.

Key words cultured *Cordyceps militaris* L. Link; mannitol; HPLC – ELSD; content

蛹虫草 (*Cordyceps militaris* L. Link) 为麦角菌科真菌, 与名贵中药冬虫夏草同属异种, 《新华本草纲要》记载蛹虫草“性平, 味甘, 有益肺肾、补精髓、止血化痰等功效”, 用于肺结核及老人虚弱和贫血等症, 为珍贵的中药材。由于连年采挖, 同时人工培养较为困难, 导致冬虫夏草濒临灭绝, 市场价格节节攀升。同属异种的蛹虫草因具有与冬虫夏草相似化学成分, 人工培养较易, 逐渐引起科学工作者的重视^[1]。目前, 河北、辽宁、江苏、广东等地均有蛹虫草的人工培育基地, 并作为食品进行销售。

人工蛹虫草子实体是以大米为培养基, 人工培

养的干燥子实体。与冬虫夏草类似, 含有虫草素、虫草酸、虫草多糖、超氧化物歧化酶和氨基酸等多种生物活性物质^[2], 其中含量较高的虫草酸即为甘露醇, 可作为人工蛹虫草子实体的指控指标之一。目前甘露醇的测定方法有氧化还原滴定法^[3]、薄层扫描法^[4]、分光光度法^[5]、气相色谱法^[6]和高效液相色谱法^[7], 但在实际应用中多采用 2005 年版中国药典规定的氧化还原滴定法和示差折光高效液相色谱法 (HPLC – RID), 目前尚未见 HPLC – ELSD 法测定人工蛹虫草子实体中甘露醇含量的报道。

为建立分离效率高、选择性好, 分析速度快、检

* 通讯作者 Tel: (027) 83692892 E-mail: ligao@163.com

测灵敏度高的甘露醇的定量分析方法, 考察国内不同厂家人工蛹虫草子实体中甘露醇的含量, 合理评价人工蛹虫草子实体质量, 本文采用高效液相色谱蒸发光检测器法对国内 9 个厂家的样品中甘露醇进行了定量分析。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 [Hitachi L7100 泵, Alltech ELSD 2000 蒸发光散射器 (ELSD)], 超声波清洗仪 (QC3120 荆州市楚新电子产品开发有限公司), 台式离心机 (TG16-II 长沙平凡仪器仪表有限公司)。甲醇 (天津市标准科技有限公司) 为色谱纯, 乙腈 (Fisher Scientific 液相色谱级), 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。甘露醇对照品 (Sigma 批号 2000093Q 含量 $\geq 99.5\%$)。人工蛹虫草子实体样品为市售品, 由华中科技大学同济医学院阮金兰教授鉴定, 全部样品于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥粉碎后过 60 目筛。

2 色谱条件

色谱柱: Thermo 氨基柱 ($4.6\text{ mm} \times 200\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 柱温: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈-水 (82.5: 17.5); 流速: $0.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; ELSD 漂移管温度: $90\text{ }^{\circ}\text{C}$; 载气 (N_2) 流速: $2.0\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 撞击器: 关; 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

3 线性关系考察

精密称取干燥至恒重的甘露醇对照品 25 mg 置 25 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 $0.25\ 0.5\ 0.8\ 1.5\ 2.0\text{ mL}$, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度为 $25\ 50\ 80\ 150\ 200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 以峰面积的对数值 (Y) 对浓度的对数值 (X) 进行回归处理, 得甘露醇的线性回归方程: $Y = 1.291X + 3.455\ r = 0.9999 (n = 5)$

试验表明, 甘露醇对照品浓度在 $25 \sim 200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

范围内, 峰面积对数值和浓度对数值呈良好的线性关系。

4 精密度试验

取“线性关系考察”项下浓度为 $80\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 在上述色谱条件下进行 HPLC 分析, 连续进样 5 次, 每次进样 $20\text{ }\mu\text{L}$, 甘露醇峰面积的 RSD 为 0.27% 。

5 检测限

以信噪比为 3:1 时相应的浓度或注入仪器的量进行确定。用流动相将对照品溶液稀释至含甘露醇为 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 进样 $20\text{ }\mu\text{L}$, 测得甘露醇的最低检测限为 $0.1\text{ }\mu\text{g}$

6 定量限

以测得检测限 ($0.1\text{ }\mu\text{g}$) 的 3 倍量为定量限, 则甘露醇的定量限为 $0.3\text{ }\mu\text{g}$

7 重复性试验

精密称取样品粉末 0.1 g 共 6 份, 按“10.1”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件分别进样 $20\text{ }\mu\text{L}$, 测得样品中甘露醇的含量, 结果含量的 RSD ($n = 6$) 为 1.8% 。

8 稳定性试验

取样品粉末 0.1 g 精密称定, 按“10.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 $0\ 2\ 4\ 6\ 8\ 10\text{ h}$ 测定峰面积, RSD 为 1.9% , 表明供试品溶液可稳定存放 10 h 。

9 回收率试验

精密称取样品粉末约 0.05 g 共 9 份, 按低、中、高分别精密加入浓度为 $1000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 $2.0\ 2.5\ 3.0\text{ mL}$, 按“10.1”项下方法制备所需溶液, 按规定色谱条件分别进样 $20\text{ }\mu\text{L}$ 测定, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Recovery data for extraction of Mannitol from cultured *Cordyceps militaris* L. Link

样品号 (sample No)	称样量 (sample weight) /mg	含量 (content) /mg	加入量 (added) /mg	测得量 (found) /mg	平均回收率 (average recovery) /%	RSD %
I	49.92		-	2.5910	-	
II	50.55		-	2.6231	-	
1	49.88	2.5886	2.0	4.6112	101.5	0.72
2	49.92	2.5907	2.0	4.6375		
3	49.97	2.5933	2.0	4.6137		
4	50.09	2.5995	2.5	5.1455	99.6	2.0
5	49.93	2.5912	2.5	5.0432		
6	50.15	2.6026	2.5	5.0764		
7	50.22	2.6063	3.0	5.5338	98.7	1.2
8	50.19	2.6047	3.0	5.5621		
9	50.30	2.6104	3.0	5.6110		

10 样品含量测定

10.1 供试品溶液的制备 精密称取人工蛹虫草子实体粉末各 0.1 g 加水 5 mL, 精密称重, 超声 (功率 120W, 频率 40 kHz) 提取 5 min, 放至室温, 再称重, 用水补足减失重量, 摇匀, 高速离心 (10000 r·min⁻¹) 10 min, 分别精密量取上清液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

10.2 含量测定 精密量取供试品溶液 20 μL, 按上述色谱条件进行分析, 以外标法计算含量。结果见表 2 图 1。

表 2 不同厂家人工蛹虫草子实体中甘露醇的含量 (n = 3)

Tab 2 The content of mannitol in cultured *Cordyceps militaris* from different areas

样品编号 (sample No.)	来源 (origin)	含量 (content) %	RSD %
001	河北 (Hebei)	I 6.47	1.5
002		II 6.03	0.88
003		III 2.87	1.2
004	江苏 (Jiangsu)	I 5.58	1.5
005		II 6.24	0.49
006		III 6.07	1.1
007	广东 (Guangdong)	I 7.57	0.55
008		II 5.06	0.45
009		III 5.61	0.36

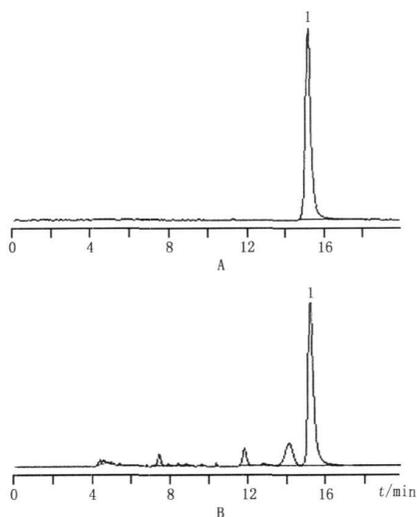


图 1 人工蛹虫草子实体 HPLC-ELSD 色谱图

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms of cultured *Cordyceps militaris*

A. 对照品 (reference substance) B. 样品 (sample)

1 甘露醇 (mannitol)

11 讨论

11.1 提取工艺的选择

根据甘露醇易溶于水, 略溶于乙醇, 不溶于乙醚

的物理特性, 本论文采用正交试验的方法优选了甘露醇的提取工艺, 通过对乙醇浓度、溶剂用量、时间和温度的考察, 最终确定了如正文所述的最佳提取工艺。

11.1.1 正交试验样品溶液的制备 精密称取人工蛹虫草子实体粉末各 0.1 g 按表 3 加入适量提取溶剂, 精密称重。按“10.1”项下方法制备 9 份正交试验样品溶液。分别精密量取上清液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

表 3 正交试验因素水平表

Tab 3 Evaluating indicators of orthogonal test

水平 (levels)	溶剂倍量 (solvent amount) /mL	超声时间 (extraction time) /min	提取温度 (temperature) /°C	乙醇浓度 (proportion of ethanol) %
1	2	5	25	0
2	5	15	40	40
3	10	30	60	80

11.1.2 试验结果 经方差分析, 乙醇浓度及溶剂用量对甘露醇提取含量有显著的影响, 提取时间和提取温度无显著影响; 由极差分析可得, 对甘露醇提取有影响的因素顺序为: 溶剂用量 > 乙醇浓度 > 提取温度 > 提取时间; 有直观分析得甘露醇最佳提取条件为: 纯水, 5 mL, 由于提取时间、提取温度对提取率无显著影响, 为缩短整个分析时间, 将提取时间定为 5 min 为方便提取, 将提取温度定为常温 25 °C。结果如表 4 表 5 所示。

表 4 正交试验直观分析表

Tab 4 Intuitive analysis of orthogonal test

样品号 (sample No.)	溶剂倍量 (solvent amount)	超声时间 (extraction time)	提取温度 (temperature)	乙醇浓度 (proportion of ethanol)	含量 (content)
1	1	1	1	1	7.36
2	1	2	2	2	7.04
3	1	3	3	3	6.91
4	2	1	2	3	8.01
5	2	2	3	1	8.56
6	2	3	1	2	8.45
7	3	1	3	2	8.29
8	3	2	1	3	7.69
9	3	3	2	1	8.08
均值 (average) 1	7.103	7.887	7.833		8.000
均值 (average) 1	8.340	7.763	7.710		7.927
均值 (average) 3	8.020	7.813	7.920		7.537
极差 (range)	1.237	0.124	0.210		0.463

表 5 方差分析表

Tab 5 Variance analysis of orthogonal test

因素 (indicators)	偏差平方和 (sum of variances)	F比 (F ratio)	显著性 (signi- ficance)
溶剂倍量 (solvent amount) /mL	2.472	107.478	**
温度 (temperature) /℃	0.067	2.913	
乙醇浓度 (concentration of ethanol) %	0.372	16.174	*
时间 (extraction time) /min	0.023	1.000	
误差 (error)	0		

$\alpha = 0.1$

11.2 色谱条件的选择 由于甘露醇为极性化合物,不能采用常规的反相色谱柱进行测定,如采用C₁₈分离,色谱峰几乎不被色谱柱所保留,很快被洗脱下来,杂质干扰严重,无法测定。氨基柱为中等极性色谱柱,其键合相上的氨基可与甘露醇选择性作用,而达到与其他杂质分离的目的,因此选择氨基柱,结果表明分离效果较好;先后应用不同比例甲醇-水、乙腈-水为流动相洗脱,考虑待测峰与前一小杂质峰的分度及待测峰的对称性,最终确定测定甘露醇含量的最佳流动相为乙腈-水(82.5:17.5)。

11.3 检测条件的选择 甘露醇无紫外吸收,不能采用紫外检测。现有文献报道中多采用碘量法或高效液相色谱示差折光检测的方法,碘量法操作复杂,专属性不高,折光检测灵敏度低,同时检测受外界环境影响较大。而ELSD检测器对于无生色团、无紫外线吸收或紫外末端吸收的样品以及挥发性低于流动相的任何组分的测定具有独特优势,专属性好,灵

敏度高,适合中药中甘露醇的含量测定。通过对检测参数:载气流速和漂移管温度的反复试验调整,最终确定ELSD检测器的最佳参数为漂移管温度90℃,载气(N₂)流速2.0 L·min⁻¹,撞击器:关。

参考文献

- 1 WEI Hui-ping(韦会平), XIAO Bo(肖波), HU Kai-shi(胡开始). Study on *Cordyceps militaris* (蛹虫草药用价值考). *J Chin Med Mater*(中药材), 2004, 27(3): 215
- 2 LIN Qun-ying(林群英), SONG Bin(宋斌), LI Tai-hui(李泰辉). Advances in the studies on *Cordyceps militaris* (蛹虫草研究进展). *Microbiology*(微生物学通报), 2006, 33(4): 154
- 3 ChP(中国药典). 2005 VolII (二部): 72
- 4 WANG Bao-qi(汪宝琪), PANG Zhi-gong(庞志功). TLC determination of D-mannitol in Xizang *Cordyceps sinensis* (西藏冬虫夏草中D-甘露醇的薄层扫描分析). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1995, 26(4): 189
- 5 LI Xue-qin(李雪芹), BAO Tian-tong(包天桐), WANG Yan(王雁). Determination of mannitol in Dongchongxiacao (*Cordyceps sinensis*) by colorimetric method (比色法测定冬虫夏草中甘露醇的含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 24(1): 19
- 6 WANG Bo(王波), XU Zhe(徐哲), JIN Shun-ji(金顺姬), et al GC determination of mannitol in *Cordyceps militaris* (气相色谱法测定蛹虫草中D-甘露醇的含量). *Acad Period Changchun Coll Tradit Chin Med*(长春中医药学报), 2005, 21(2): 37
- 7 LIU Mou-sheng(刘谋胜), YANG Ya-ling(杨亚玲), LIN Qiang(林强), et al SPE-HPLC study on internal standard method for determination of mannitol in *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (固相萃取高效液相色谱内标法测定冬虫夏草中甘露醇的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(2): 194

(本文于2008年10月16日收到)