

[中药指纹图谱]

冬虫夏草与虫草发酵菌丝体的 HPLC 指纹图谱比较研究

栾 兰^{1,2}, 王钢力², 林瑞超^{2*}

(1. 北京中医药大学 中药学院 北京 100029; 2. 中国药品生物制品检定所 北京 100050)

关键词:冬虫夏草; 虫草发酵菌丝体; 高效液相色谱法; 指纹图谱

摘要:目的:研究冬虫夏草与虫草发酵菌丝体的高效液相指纹图谱。方法:利用高效液相色谱法 梯度洗脱 测定冬虫夏草与虫草发酵菌丝体样品,色谱条件为:Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×25 mm 5 μm),乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,流速0.5 mL/min,检测波长260 nm。结果:测定冬虫夏草与虫草发酵菌丝体指纹图谱中共有6个峰为共有峰,并确定其中的3个色谱峰分别为尿嘧啶、腺苷、虫草素。结论:本研究所建立的方法可作为虫草发酵菌丝体质量标准制定的参考依据。

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-1528(2010)06-0893-05

Comparative research on HPLC fingerprint of *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia

LUAN Lan^{1,2}, WANG Gang-li², LIN Rui-chao^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

KEY WORDS: *Cordyceps sinensis*; cultured mycelia; HPLC; fingerprint

ABSTRACT: **AIM:** To study *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia by HPLC. **METHODS:** An HPLC established for the fingerprints of *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia was performed on an Agilent C₁₈ (4.6 mm × 25 mm 5 μm) as column and acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution in gradient as mobile phase. The flow rate was 0.5 mL/min, and the detection wavelength was set at 260 nm. **RESULTS:** There were 6 common peaks in HPLC fingerprint of *Cordyceps corensis* and its cultured mycelia, three of which were determined as uracil, adenosine, cordycepin. **CONCLUSION:** The method can be used for the study of fingerprints of cultured mycelia.

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*(Berk.) Sacc) 俗称虫草, 具有益精髓、补虚损、保肺、益肾、止血、化痰等功效, 主要用于虚劳咳嗽、咯血盗汗、阳痿遗精、腰膝酸软等症, 是一种名贵的中药材。冬虫夏草菌丝体为新鲜冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 中分离得到的蝙蝠蛾拟青霉菌(C₅-4) 菌种经发酵培养所得的菌丝体的干燥粉末^[1], 其药理作用与天然虫草相似, 临床上用于治疗肾病、糖尿病、高血脂症、呼吸系统疾病、消化系统疾病、心脑血管疾病、血液疾病、内分泌系统疾病等。

冬虫夏草子实体及无性型的化学成分的种类基本相同^[2], 但是含量差异明显^[3,4]。近年来, 由于过量采集, 野生虫草的产量下降, 价格昂贵, 普通患者难以承受; 同时, 市场的需求量在不断增大, 野生虫草已远远不能满足市场的需

求, 开发人工虫草产品, 使其化学成分的整体含量和水平接近虫草子实体中化学成分的含量和水平, 对确保其疗效是非常重要的。本实验采用高效液相色谱法, 研究冬虫夏草与虫草发酵菌丝体的指纹图谱, 为虫草发酵菌丝体质量控制建立有效方法, 为其成为冬虫夏草替代品提供合理依据。

1 材料与方

1.1 仪器

日本岛津高效液相色谱仪(LC-10AD VP 二元泵; SPD-10AVP 紫外-可见检测器); CLASS-VP 色谱工作站。

1.2 药品与试剂

冬虫夏草(青海省药品检验所提供) 5批, 宁心宝胶囊, 5批(见表1)。金水宝胶囊(江西济民可信制药有限公司), 为新鲜冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 中分离得到

收稿日期:2009-06-19

作者简介:栾 兰(1978-) 女, 在读博士研究生, 研究方向:中药化学成分与质量控制。Tel:(010)67095387 E-mail:luan9896@126.com

* 通讯作者:林瑞超, 男, 教授, 博士生导师。Tel:(010)67095307 E-mail:linrch@sina.co

表1 样品来源

编号	样品名称	样品产地	批号
1	金水宝胶囊	江西金水宝制药有限公司	050802
2			051016
3			050937
4			060209
5			051019
6			050526
7			060103
8			051138
9			060307
10			050940
11	冬虫夏草	四川省松潘县尕愣台	4
12		青海省黄南州多福屯	14
13		青海省果洛甘德县清珍乡	3
14		青海省海南兴海河卡乡	7
15		青海省果洛雪山乡九队	12
16	宁心宝胶囊	正大青春宝药业有限公司	0412003
17		江苏神华药业有限公司	0504191
18		上海普康药业有限公司	050501
19		江苏鹏鹞药业有限公司	20040201
20		西藏藏药股份有限公司	040401

的蝙蝠蛾拟青霉菌(CS-4)菌种经发酵培养所得的菌丝体的干燥粉末,10批。

均经中国药品生物制品检定所标本馆张继副主任药师鉴定。对照品:虫草素(中国药品生物制品检定所提供),乙腈为色谱纯(美国J. T. Baker公司产品)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent C₁₈色谱柱(25 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B) 梯度洗脱,见表2。

表2 HPLC 流动相条件

时间/min	流速/(mL/min)	A(H ₂ O)/%	B(Ace)/%
0	0.5	100	0
16	0.5	97	3
21	0.5	97	3
40	0.5	80	20
90	0.5	10	90
95	0.5	10	90
96	0.5	100	0
110	0.5	100	0

2.2 供试品溶液的制备

取样品粉末约0.25 g,精密称定,加入50%甲醇100 mL,置具塞三角瓶中,超声45 min,过滤,将过滤液减压,60℃蒸干,得浸膏,用少量蒸馏水溶解浸膏,定容至25 mL,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取虫草素对照品适量,加甲醇定容于10 mL,即得。

2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL,注入高效液相色谱仪,记录110 min色谱图,即得,见图1。

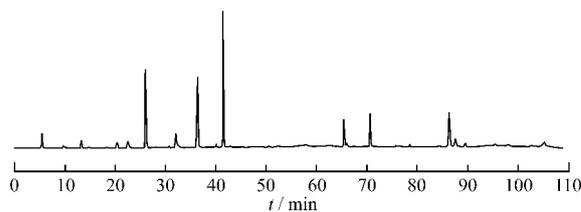


图1 金水宝样品色谱图

2.5 方法学考察

2.5.1 空白试验 吸取空白溶液10 μL注入高效液相色谱仪,结果见图2,表明提取过程中所用溶剂对冬虫夏草与虫草菌丝体指纹图谱中共有峰检出无影响。

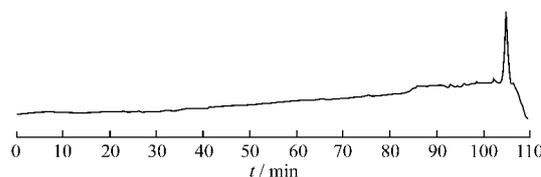


图2 空白溶液色谱图

2.5.2 精密度试验 取金水宝样品,批号050802,按2.3项下的方法制备供试品,连续进样6次,检测指纹图谱,测得其共有峰相对保留时间的RSD < 2%,相对峰面积比值RSD < 3%,表明方法精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取金水宝样品,批号050802,按2.3项下的方法制备样品5份,分别进样,测得其共有峰相对保留时间的RSD < 2%,相对峰面积比值RSD < 3%,表明方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取批号为050802的样品,按2.3项下的方法制备供试品,分别在0, 2, 4, 6, 12 h进样,测得其共有峰相对保留时间的RSD < 2%,相对峰面积比值RSD < 3%,表明样品溶液在12 h内稳定。

2.6 指纹图谱及各项技术参数

根据20批供试品溶液HPLC谱给出的相关参数,比较供试品谱图,其中6个峰是各批供试品所共有的,因此确定这6个峰为共有指纹图谱。在共有峰中,以5号峰峰面积为13.5号峰的峰面积大于总峰面积的10%,计算峰面积比值,其余各共有峰均按其保留时间定性,见图3、表3和表4。

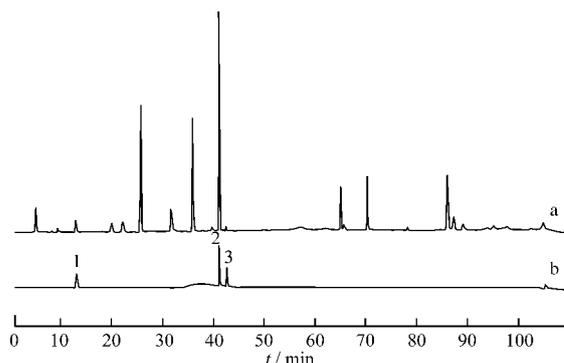


图3 1号菌丝体样品与混合对照品色谱图

a. 1号样品色谱图 b. 3种混合对照品色谱图

1 尿嘧啶 2 腺苷 3 虫草素

表3 20批样品共有峰相对保留时间

样品编号	峰号					
	1	2	3	4*	5	6
1	0.375	0.634	0.726	1	1.153	1.187
2	0.371	0.628	0.723	1	1.149	1.189
3	0.371	0.623	0.721	1	1.149	1.186
4	0.373	0.626	0.723	1	1.147	1.189
5	0.372	0.625	0.722	1	1.147	1.194
6	0.372	0.632	0.720	1	1.146	1.193
7	0.372	0.631	0.720	1	1.146	1.189
8	0.372	0.633	0.721	1	1.145	1.189
9	0.372	0.635	0.723	1	1.148	1.188
10	0.371	0.636	0.724	1	1.152	1.187
11	0.367	0.623	0.720	1	1.148	1.187
12	0.363	0.616	0.719	1	1.147	1.186
13	0.360	0.614	0.716	1	1.136	1.175
14	0.361	0.623	0.721	1	1.131	1.170
15	0.362	0.624	0.718	1	1.134	1.173
16	0.363	0.624	0.718	1	1.135	1.174
17	0.363	0.625	0.719	1	1.134	1.174
18	0.364	0.624	0.718	1	1.137	1.176
19	0.363	0.621	0.717	1	1.139	1.179
20	0.363	0.619	0.717	1	1.142	1.181
平均	0.368	0.626	0.720	1	1.143	1.183
RSD	1.3	0.95	0.37	0	0.43	0.62

表4 20批样品共有峰相对峰面积

编号	百分含量/%		非共有峰百分含量/%
	百分含量	峰3 峰5	
1	19.54	16.44	26.24
2	10.01	20.04	18.72
3	12.67	18.45	17.87
4	17.40	28.52	21.87
5	13.85	21.30	15.14
6	15.96	15.78	29.45
7	12.85	20.07	18.92
8	10.21	26.13	12.92
9	13.90	20.45	21.22
10	11.69	13.93	16.69
11	29.73	23.64	21.4
12	32.29	27.27	28.97
13	27.20	27.25	9.65
14	23.58	33.58	14.05
15	33.11	27.29	20.41
16	10.00	19.68	2.95
17	10.65	16.03	4.01
18	12.55	39.56	4.5
19	12.45	29.58	3.84
20	13.23	20.79	4.66

3 讨论

3.1 冬虫夏草与虫草发酵菌丝体指纹图谱的比较

目前对冬虫夏草与虫草发酵菌丝体的研究多集中在核苷类成分,而对两者的其他成分的比较研究则相对较少,本文对冬虫夏草与菌丝体的HPLC指纹图谱进行比较研究,发现两者极性大的部分化学成分相似,而极性相对较小的部分

化学成分存在较大的差异,从图4可以看出,天然虫草与虫草发酵菌丝体在65 min、70 min、86 min左右的色谱峰具有明显的差别,此时间的色谱峰为金水宝样品的特征峰,天然虫草在这个时间内没有相应的色谱峰,而宁心宝胶囊中只有个别样品在65 min、70 min有相应的色谱峰,其他样品在此时间内没有吸收。

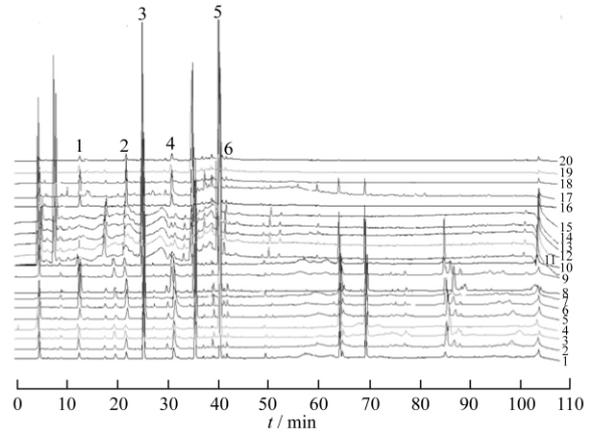


图4 20批冬虫夏草和虫草发酵菌丝体色谱图

编号1~10.金水宝胶囊 11~15.冬虫夏草 16~20.宁心宝胶囊

3.2 虫草素、尿嘧啶、尿苷的LC-MS指认

3.2.1 虫草素的指认

虫草素在天然虫草和虫草发酵菌丝体中含量极微,本试验通过将样品与虫草素标准品进行HPLC比较,并进一步通过LC-MS进行色谱峰的指认,确定其中的虫草素成分,指认过程如下:

图5为天然虫草LC-MS总离子流图。

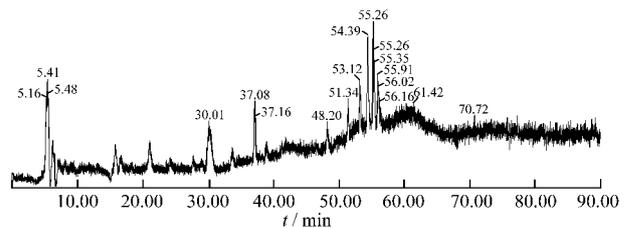
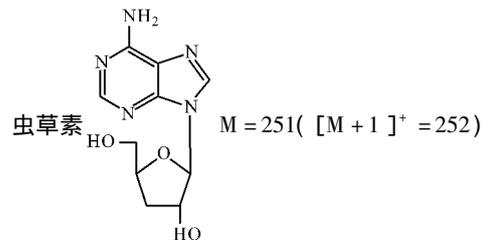


图5 冬虫夏草样品LC-MS总离子流图



所以将虫草样品的总离子流图中取出正离子[M + 1]⁺ = 252特征离子流图如图6。

由图中可清楚看出38.8 min左右时为252正离子的波峰。对冬虫夏草样品的总离子流图38.8 min离子扫描积分并扣除本底后可得到该时刻的样品正离子情况,可明显看到虫草素的分子离子峰,但是由于干扰物质较多,所以杂峰较

多,如图7。

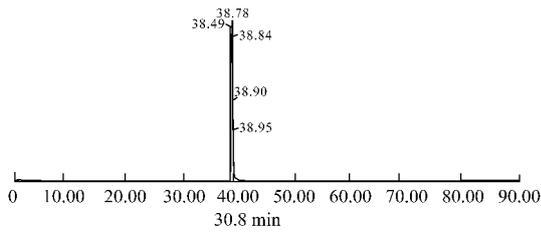


图6 冬虫夏草样品正离子 $[M + 1]^+ = 252$ 特征离子流图

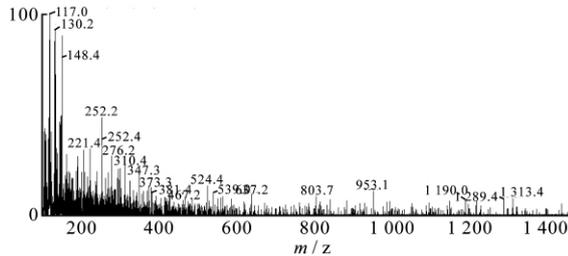
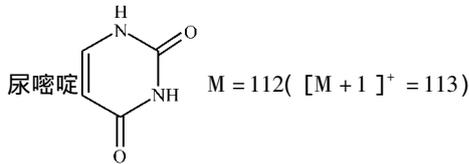


图7 冬虫夏草样品 38.3min 质谱图

Fig.7 The MS spectra of *Cordyceps sinensis*

3.2.2 尿嘧啶的指认



所以将2号冬虫夏草样品的总离子流图中取出正离子 $[M + 1]^+ = 113$ 特征离子流图如图8。

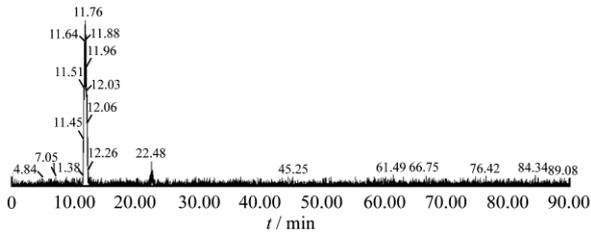


图8 冬虫夏草样品正离子 $[M + 1]^+ = 113$ 特征离子流图

由图中可清楚看出 11.76 min 左右时为 113 正离子的波峰。对 80 号冬虫夏草样品的总离子流图 11.76 min 离子扫描积分并扣除本底后可得到该时刻的样品正离子情况,可明显看到尿嘧啶的分子离子峰,如图9。

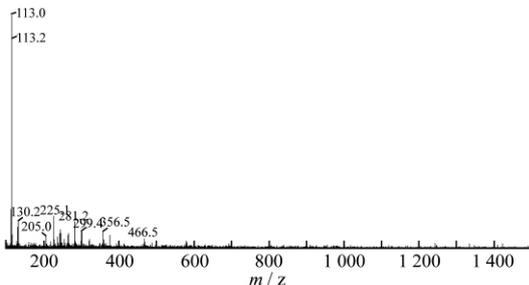
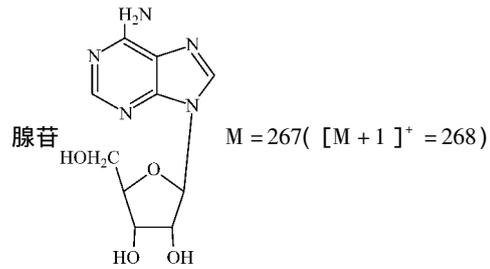


图9 冬虫夏草样品 11.797 min 质谱图

3.2.3 腺苷的指认



所以将2号冬虫夏草样品的总离子流图中取出正离子 $[M + 1]^+ = 268$ 特征离子流图如图10。

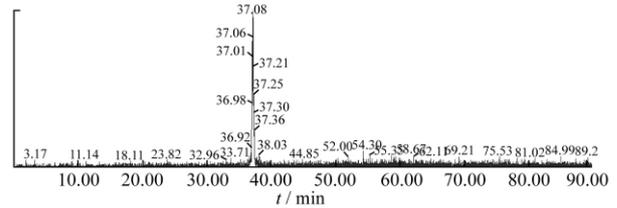


图10 冬虫夏草样品正离子 $[M + 1]^+ = 268$ 特征离子流图

由图中可清楚看出 37.08 min 左右时为 268 正离子的波峰。对2号冬虫夏草样品的总离子流图 37.076 min 离子扫描积分并扣除本底后可得到该时刻的样品正离子情况,可明显看到腺苷的分子离子峰,如图11。

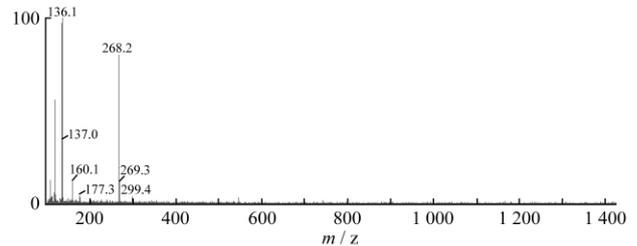


图11 冬虫夏草样品 37.076 min 质谱图

3.3 供试品溶液的制备

采用甲醇-水(1:1)提取方法制备虫草发酵菌丝体供试品溶液,所得峰数多,分离效果好,但在此提取条件下制备冬虫夏草供试品溶液,分离效果不好;采用纯甲醇提取的方法制备冬虫夏草供试品,所得峰数多,分离效果好,见图12~13。

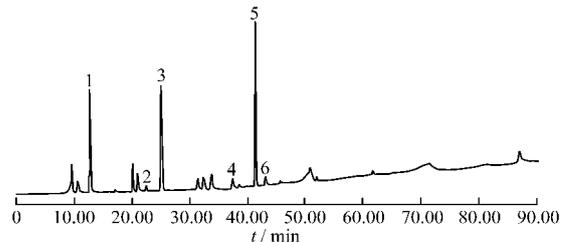


图12 冬虫夏草甲醇提取色谱图

本实验因考虑到20批样品的分离效果,固采用2.2项下方法制备供试品溶液,此条件下,天然虫草中共有6个峰的分离效果不是很理想。

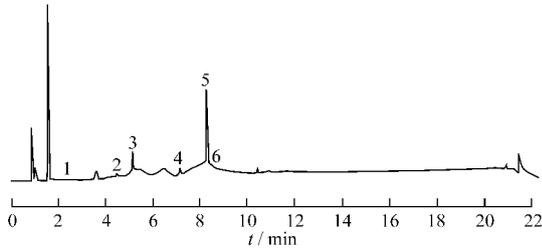


图 13 冬虫夏草甲醇-水(1:1)提取色谱图

3.4 测定方法

3.4.1 检测波长的选择

供试品于 190 ~ 400 nm 进行扫描,结果表明在 260 nm 处,各对照品响应值较高,其他峰也有较好的分离,故检测波长定在 260 nm。

3.4.2 流动相及洗脱方式的考察优化

冬虫夏草及虫草发酵菌丝体所含化学成分复杂,且各种类型的化合物的极性差别较大,考察了等梯度甲醇-水系统、乙腈-水系统、及甲醇-0.1%磷酸水等度洗脱、乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度系统,结果发现,乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度系统,在110 min可以使色谱峰全部洗出,且分离较好,故选

择该系统为流动相。

参考文献:

- [1] 梁宗琦. 虫生真菌的多样性[J]. 生物多样性, 1996, 4(4): 235-241.
- [2] Li SP, Su ZR, Dong TTX, et al. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sisensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9: 319-324.
- [3] Tai HH, Li HS, Chien YH, et al. A companion of the chemical composition and bioactive of the Chinese medicinal mushroom *dongchongxiaocao*, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. *Food Chemistry*, 2002, 78: 463-469.
- [4] 徐锦堂. 中国药用真菌[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社, 1997, 452-510.
- [5] Zhang XQ, Zhong WJ. The Current Study Situation of Pharmacologic Effects of *Cordyceps Sinensis* and Cultured Mycelium *Cordyceps Sinensis* [J]. *Chin J Environ Occup Med*, 2002, 19(2): 122-123.

怀牛膝 HPLC 指纹图谱研究

郭湘洁, 杨中林*, 周培培, 李 萍
(中国药科大学现代中药重点实验室, 江苏 南京 210009)

关键词: 怀牛膝; 指纹图谱; 高效液相色谱法

摘要: 目的: 建立怀牛膝药材的 HPLC 指纹图谱。方法: 采用 HPLC 法测定 10 个不同产地的怀牛膝药材, 制定指纹图谱。色谱柱为 C_{18} , 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 250 nm, 进样量为 20 μ L, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。结果: 得到分离度、重现性均较好的怀牛膝药材 HPLC/UV 指纹图谱, 得到 15 个共有峰。结论: 该方法简便、可靠、重现性好, 可用于怀牛膝的质量控制。

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528(2010)06-0897-04

The fingerprints of *Achyranthes bidentata* Bl. by HPLC

GUO Xiang-jie, YANG Zhong-lin*, ZHOU Pei-pei, LI Ping
(Key Lab of Modern TCM, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

KEY WORDS: *Achyranthes bidentata* Bl.; fingerprint; HPLC

ABSTRACT: AIM: To establish HPLC fingerprint of *Achyranthes bidentata* Bl. METHODS: Ten batches of *Achyranthes bidentata* Bl from different habitats were measured by RP-HPLC, and their fingerprints were obtained. C_{18} column was used. Acetonitrile and water gradient elution were adopted as a mobile phase, the flow rate was

收稿日期: 2009-09-05

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30730113)

作者简介: 郭湘洁 (1982 -) 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂的研究。Tel: (025) 83271426 E-mail: gxj2009@163.com

* 通讯作者: 杨中林 (1950 -) 教授, 博士生导师。Tel: (025) 83271425 E-mail: yzl1950@yahoo.com.cn