

RP-HPLC-UV法测定 5种发酵虫草制剂中麦角甾醇的含量*

张萍¹, 肖新月¹, 黄玮², 刘燕¹, 魏锋¹, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 2 四川资阳食品药品检验所, 资阳 641300)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC-UV 法测定 5 种发酵虫草制剂百令胶囊、宁心宝胶囊、心肝宝胶囊、至灵胶囊及金水宝胶囊中麦角甾醇的含量。**方法:** 色谱柱为 Agilent SB TC C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 283 nm, 流动相为甲醇-水 (98:2), 流速 1.0 mL · min⁻¹。**结果:** 麦角甾醇进样量在 0.42~6.29 μg 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.9999$)。平均加样回收率 ($n=3$) 分别为 98.1%, 100.7%, 99.6%; RSD 分别为 2.3%, 1.6%, 1.6%。18 批发酵虫草制剂中麦角甾醇含量, 百令胶囊为 6.06~6.10 mg · g⁻¹, 宁心宝胶囊为 2.51~3.93 mg · g⁻¹, 心肝宝胶囊为 3.47~4.42 mg · g⁻¹, 至灵胶囊为 2.48~4.61 mg · g⁻¹, 金水宝胶囊为 3.45~3.87 mg · g⁻¹。**结论:** 本文方法操作简便、灵敏, 具有良好的重复性和稳定性, 可用于发酵虫草制剂中麦角甾醇的检测。

关键词: 发酵虫草制剂; 麦角甾醇; 反相高效液相色谱紫外法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0258-03

RP-HPLC-UV determination of ergosterol in five preparations of fermental Cordyceps*

ZHANG Ping¹, XIAO Xinyue¹, HUANG Wei², LIU Yan¹, WEI Feng¹, LIN Ruichao¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050, China

2. Sichuan Ziyang Institute for Food and Drug Control Ziyang 641300, China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC-UV method for the determination of contents of ergosterol in the preparations of fermental Cordyceps such as Bailing capsule, Ningxinbao capsule, Xinganbao capsule, Zhiling capsule and Jinshuibao capsule. **Method** The analysis was carried out on an Agilent SB TC C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column eluted with the mobile phase consisting of methanol-water (98:2). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was set at 283 nm. **Results** The linear range of ergosterol was 0.42~6.29 μg ($r=0.9999$). The average recoveries ($n=3$) were 98.1%, 100.7%, 99.6% and RSDs were 2.3%, 1.6%, 1.6% respectively. The contents of ergosterol in preparations of fermental Cordyceps were 6.06~6.10 mg · g⁻¹ (Bailing capsule), 2.51~3.93 mg · g⁻¹ (Ningxinbao capsules), 3.47~4.42 mg · g⁻¹ (Xinganbao capsules), 2.48~4.61 mg · g⁻¹ (Zhiling capsules) and 3.45~3.87 mg · g⁻¹ (Jinshuibao capsules). **Conclusion** The method is effective, sensitive and accurate with high repeatability and stability which is helpful for the determination of ergosterol in the preparations of fermental Cordyceps.

Key words preparations of fermental Cordyceps; ergosterol; RP-HPLC-UV; assay

冬虫夏草为我国名贵中药材, 具有滋补强壮的作用。由于产于西藏、青海等高原地带且资源有限, 近年来人工发酵培育虫草已获成功, 人工发酵虫草制剂也相继问世, 其主要产品有百令胶囊、金水宝胶囊、宁心宝胶囊、心肝宝胶囊和至灵胶囊^[1]。其中, 百令胶囊和金水宝胶囊的质量标准收载在现行中国

药典中, 其他 3 个制剂均收载在卫生部颁成方制剂标准中。据文献报道^[2,3] 人工培育发酵的虫草菌粉与天然冬虫夏草的化学成分和药理作用极其相似, 主要功效成分有核苷类、甾醇类、氨基酸、甘露醇及多糖等。已有文献^[4,5] 报道对发酵虫草制剂中的核苷类、氨基酸及多糖和甘露醇等成分进行了测定, 并

* 国家科技重大专项课题“中药质量标准研究和信息化体系建设平台”(2009ZX09308-004)专题内容

第一作者 Tel: (010) 67095432 E-mail: zhangping0227@sina.com

不同程度地收载于相关质量标准中。而麦角甾醇 (ergosterol) 作为甾醇化合物中的 1 种, 为真菌类的特征甾醇, 却很少受到关注。文献报道的麦角甾醇含量测定方法主要有薄层扫描法^[6]和高效液相色谱法^[7]。本文采用 RP-HPLC 法测定了 18 批发酵虫草制剂中麦角甾醇的含量, 为相关制剂质量标准修订提供了可靠而简便的方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695-2489 高效液相色谱仪, 包括 Waters 2695 分离模式, Waters 2489 紫外双波长检测器, Empower 工作站; METTLER AE240 电子天平; SB3200 超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司); 甲醇为分析纯, 液相用甲醇为色谱纯; 麦角甾醇对照品 (自制, 纯度大于 98%)。

收集了发酵虫草制剂 5 个品种 18 批次样品。

2 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB TC C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (98:2); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 283 nm; 柱温 25 °C。

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液 精密称取麦角甾醇对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

3.2 供试品溶液 取胶囊内容物粉末 0.5 g 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定重量, 超声 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 处理 1 h 放冷至室温, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 滤过, 取续滤液, 即得。

4 方法学验证

4.1 系统适用性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 在“2”项色谱条件下, 注入液相色谱仪测定, 记录色谱图, 见图 1。从图 1 中可见, 本实验条件下, 麦角甾醇与其他化学成分能达到基线分离, 理论塔板数以麦角甾醇峰计为 1.17×10^4 。

4.2 线性关系考察 精密吸取“3.1”项下的对照品溶液 2.5, 10, 15, 20, 30 μL 注入液相色谱仪, 在“2”项色谱条件下进行测定, 记录峰面积, 以峰面积积分值 Y 为纵坐标, 对照品进样量 X (μg) 为横坐标, 进行回归分析, 得麦角甾醇线性回归方程为:

$$Y = 1.0 \times 10^6 X - 5.76 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

结果表明麦角甾醇进样量在 0.42~6.29 μg 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

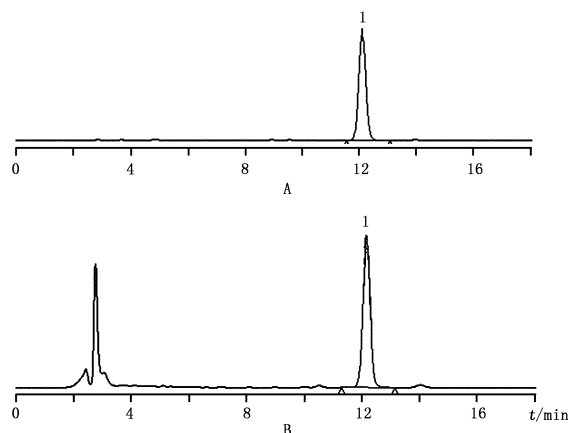


图 1 麦角甾醇对照品 (A) 和百令胶囊样品 (B) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of ergosterol reference substance (A) and sample of Bailing capsules (B)

1. 麦角甾醇 (ergosterol)

4.3 精密度及定量限试验 精密量取同一供试品溶液各 10 μL, 在“2”项色谱条件下, 连续进样测定 6 次, 根据测定的麦角甾醇峰面积的结果计算 RSD 为 0.28%, 说明精密度良好。同时将麦角甾醇对照品溶液稀释 10000 倍, 在“2”项色谱条件下, 进样 7 μL 测定, 按麦角甾醇与基线噪音峰面积 $SN = 10$ 作为定量限, 为 1.47×10^{-4} μg。

4.4 重复性试验 按“3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2”项色谱条件下, 进样 10 μL, 测定含量。结果样品中麦角甾醇含量平均值 ($n = 6$) 为 0.62%, RSD 为 1.6%, 说明方法的重复性良好。

4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 10 μL, 分别于 2, 4, 8, 12, 24 h 在“2”项色谱条件下进样测定, 根据测定的麦角甾醇峰面积的结果计算 RSD 为 0.86%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的 1 号样品 0.25 g 共 9 份, 每 3 份为一组, 每组中分别加入相当于样品含量的 80%, 100%, 120% 的对照品, 按“3.2”项下方法制备溶液, 在“2”项色谱条件下, 进样 10 μL, 测定, 计算麦角甾醇回收率 ($n = 3$) 分别为 98.1%, 100.7%, 99.6%; RSD 分别为 2.3%, 1.6%, 1.6%。

4.7 样品的测定 取供试品溶液各 10 μL, 在“2”项色谱条件下, 进行色谱测定, 记录麦角甾醇的峰面积, 以外标法计算含量。本品按干燥品计测定结果见表 1。

表 1 18批发酵虫草制剂中麦角甾醇
含量测定结果 (mg·g⁻¹, n=2)

Tab 1 Results of content determination of
ergosterol in 18 preparations

编号 (No.)	样品 (sample)	来源 (source)	批号 (Lot no.)	麦角甾醇含量 (contents) /mg·g ⁻¹
1	百令胶囊 (Bailing	A	091027	6.10
2	capsules)		091028	6.08
3			091029	6.06
4	宁心宝胶囊 (Ningxinbao	B	090401	2.51
5	capsules)		091101	3.19
6			02809003	3.13
7		C	0906002	3.89
8			091201	3.93
9	心肝宝胶囊 (Xinganbao		090810	3.47
10	capsules)	D	100104	4.42
11	至灵胶囊 (Zhiling		091005	4.61
12	capsules)		090902	4.58
13		E	091103	4.50
14			20090516	2.59
15			20081210	2.48
16	金水宝胶囊 (Jinshuibao	F	091102	3.87
17	capsules)		091103	3.45
18			091104	3.47

5 讨论

5.1 提取方法的选择 本实验分别考察了水浴加热回流 60 min 和 120 min 及超声提取 60 min 对样品中麦角甾醇提出率的影响。结果发现该 3 种方法无明显差异,故选择操作方法相对简便的超声提取方法。同时又对超声时间进行了考察,分别超声处理 20 30 40 50 60 70 80 min,超声 60 min 测得麦角甾醇峰面积值最大,故采用超声提取 60 min。

5.2 提取溶剂量的选择 分别用甲醇 10 20 30 mL 提取,考察对样品中麦角甾醇提出率的影响。结果发现提取溶剂用量影响不大。为减少溶剂的使用,采用 10 mL 甲醇提取。

5.3 流动相的选择 本实验分别考察了甲醇与水的不同比例 (100:0; 98:2; 95:5; 90:10) 洗脱条件下, HPLC 色谱图中对照品麦角甾醇峰形及保留时间。发现随着流动相中水的比例增加,麦角甾醇色谱峰保留时间变长,色谱峰分离效果更佳,但色谱峰也相应变宽。综合考虑到以上因素的影响,最终确定流动相为甲醇-水 (98:2)。

5.4 由测定结果可见, 5 种发酵虫草制剂中, 百令胶囊中麦角甾醇含量较高, 为 6.06~6.10 mg·g⁻¹; 金

水宝胶囊中含量较低, 为 3.45~3.87 mg·g⁻¹; 并且上述两品种中麦角甾醇含量批间差异不大。推测是这 2 个品种均为独家生产, 生产工艺相对稳定, 故样品质量相对稳定。而多企业生产的样品, 如宁心宝胶囊样品中的麦角甾醇含量在 2.51~3.93 mg·g⁻¹; 至灵胶囊中样品含量为 2.48~4.61 mg·g⁻¹; 不同企业的产品中麦角甾醇含量差别明显。而同为独家生产的心肝宝胶囊样品中麦角甾醇的含量为 3.47~4.42 mg·g⁻¹, 范围较宽, 尚难以解释。由此可见, 各企业的发酵菌种不同、生产工艺不同, 决定了不同发酵制剂, 甚至不同企业之间产品中麦角甾醇成分含量有差异。因此, 很有必要建立麦角甾醇的含量测定方法, 以有效评价各发酵虫草制剂的质量。

5.5 本文建立的 HPLC 定量测定方法, 经方法学验证该方法灵敏、快速、准确, 适用于发酵虫草制剂的质量标准控制。

参考文献

1 ZOU Q in- wen (邹秦文), XIAO Xin- yue (肖新月), LIN Rui- chao (林瑞超). The research situation of related preparation of submerged fermentation of Cordyceps sinensis (冬虫夏草液体深层发酵菌丝体相关制剂的研究现状). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29(4): 680

2 SONG Jin- di (宋金娣), XU He- fen (徐荷芬), SHAO Xiang- ming (邵向明), et al. Study on the immuno- protection ability and anti- tumor ability of Cordyceps sinensis mycelium (冬虫夏草菌丝体免疫特性测试). *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 1999, 6(4): 52

3 YOU Ming- le (游明乐). Fermentation Cordyceps fungal substance and themain natural Cordyceps activity ingredients comparative study (发酵虫草菌质与天然虫草主要活性成分含量比较研究). *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2009, 2: 129

4 ZHANG Ping (张萍), XIAO Xin- yue (肖新月), LI Yuan- ke (李远科), et al. Chemical analysis of nucleosides and alkalines components in five preparations of fermental Cordyceps (5 种发酵虫草中核苷及碱基成分的分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29(6): 889

5 ZOU Q in- wen (邹秦文), XIAO Xin- yue (肖新月), LIU Yan (刘燕), et al. Pre- column derivatization RP- HPLC determination of 17 amino acids in Bailing capsules (百令胶囊中 17 种氨基酸的柱前衍生化 RP- HPLC 法含量测定). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2010, 30(5): 796

6 WEI Guo- lin (魏国林). Determination of ergosterol in Cordyceps sinensis by TLC scan (薄层扫描法测定冬虫夏草中麦角甾醇的含量). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1998, 9(6): 529

7 DUAN Shao- jun (段韶军), ZHANG Zhong- peng (张忠鹏), LI Fei- fei (李菲菲), et al. Determination of ergosterin in Chinese catapillar fungus by reversed- phase high performance liquid chromatography (高效液相色谱法测定人工虫草中麦角甾醇的含量). *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2006, 37(6): 611

(本文于 2010 年 7 月 23 日收到)