

蛹虫草 HPLC 特征图谱的建立及其方法学研究

史文婷¹, 徐崇范², 门英², 丁桂兰², 魏春雁^{3*}

(1. 长春中医药大学临床医学院, 长春 130117; 2. 吉林省药品检验所, 长春 130033; 3. 吉林省农业科学院/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(长春), 长春 130033)

摘要: 为准确有效鉴别蛹虫草, 采用 Luna C18(2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-pH 6.5 磷酸盐缓冲液为流动相, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 梯度洗脱, 260 nm 波长检测, 建立了蛹虫草 HPLC 特征图谱。以鸟苷、尿苷、胞苷、腺苷、腺嘌呤、虫草素 6 种标准品做对照, 指认了 13 批样品中的共有特征色谱峰 8 个, 并指认其中的鸟苷峰为参照峰。该方法的精密度、重现性和稳定性均符合要求。该方法可用于蛹虫草的定性鉴别和质量评价。

关键词: 蛹虫草; HPLC 特征图谱; 方法学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)03-0134-05

Establishment of HPLC Characteristic Chromatogram of *Cordyceps Militaris* and Its Methodology

SHI Wenting¹, XU Chongfan², MEN Ying², DING Guilan², WEI Chunyan^{3*}

(1. Clinical Medicine College, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117; 2. Jilin Provincial Institute for Drug Control, Changchun 130033; 3. Jilin Academy of Agricultural Sciences / Risk Assessment Lab of Agricultural Products Quality and Safety (Changchun), Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the P. R. C., Changchun 130033, China)

Abstract: In order to accurately and effectively identify *Cordyceps militaris*, its HPLC characteristic chromatogram was established with Luna C18(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column in a gradient elution of methanol-phosphate buffer (pH 6.5), at the flow rate of 0.5 mL/min and 30 °C column temperature. Guanosine, uridine, cytidine, adenosine, adenine and cordycepin were used as reference standard. Total 8 characteristic peaks in 13 batches of samples were identified and the guanosine peak was identified as the reference peak. The precision, repeatability and stability of this method were all met with the requirements. This method could be used for qualitative identification and quality evaluation of *C. militaris*.

Key words: *Cordyceps militaris*; The HPLC specific chromatogram; Methodology

蛹虫草, 又名北冬虫夏草、蛹草^[1], 为麦角菌科真菌蛹虫草菌的子座及所寄生昆虫蛹的干燥复合体。野生蛹虫草主要分布于吉林、辽宁、陕西等地, 具有补肺益肾之功效, 现代研究表明, 蛹虫草主要含有核苷类化合物、虫草多糖、蛋白质、氨基酸糖醇和甾醇类等化学成分, 在免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗感染等方面具有多种药理活性, 广泛用于肿瘤、免疫功能低下, 包括艾滋病

感染等多种疾病^[2-3]。蛹虫草作为一种补益类的食药真菌受到广大消费者青睐, 其质量控制的研究越来越得到重视, 苏颖等研究了人工蛹虫草指纹图谱^[4]。特征图谱也可以反映蛹虫草化学成分的种类和数量, 是一种多指标的综合性定性鉴别手段。本文采用 HPLC 法建立蛹虫草特征图谱, 旨在为蛹虫草的质量一致性及稳定性控制提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

蛹虫草: 13 批样品, 其中 10 批为人工培养品, 批号分别为: 20160901、20160902、20160903、20160904、20160905、20170101、20170102、

收稿日期: 2020-01-19

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20150201007YY); 农业农村部农产品质量安全风险评估重大专项 (GJFP2017006)

作者简介: 史文婷 (1986-), 女, 实验师, 硕士, 主要从事临床药理学研究。

通讯作者: 魏春雁, 女, 博士, 研究员, E-mail: weichy@yeah.net

20170103、20170701、20170901(编号依次为S1~S10),均由吉林中晟药业有限公司提供;另外3批为野生品,产地分别为吉林九台土门岭、吉林永吉和辽宁西丰(编号为S11~S13)。经吉林农业大学中药材学院包海鹰教授鉴定,基源均为蛹虫草(*Cordyceps militaris*(Linn. et Fr.)Link)。

1.2 试剂

标准物质:鸟苷(批号:111977-201501)、尿苷(批号:887-200202)、腺嘌呤(批号:886-200001)、腺苷(批号:879-20001)、虫草素(批号:110858-201503)(中国食品药品检定研究院)、胞苷(批号:BCBT2613, SIGMA公司)。甲醇(色谱纯,美国Fisher公司),磷酸二氢钠和磷酸氢二钠(分析纯,北京化工厂),水(满足《中华人民共和国药典》2015年版二部纯化水的要求,自制)。

1.3 主要仪器

LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司),BS124S电子天平(感量:0.1 mg,德国Sartorius公司),KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 混合标准品溶液制备

取“1.2”项6种标准品适量,精密称定,用20%甲醇制成每1 mL含胞苷25 μ g、尿苷40 μ g、腺嘌呤30 μ g、鸟苷35 μ g、腺苷45 μ g和虫草素50 μ g的混合溶液,即得。

1.4.2 供试品溶液制备

取“1.1”项蛹虫草样品粉末0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入20%甲醇20.0 mL,称定重量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz,室温)30 min,放冷,再称定重量,用20%甲醇溶液补足减失的重量,摇匀,即得。

1.4.3 色谱条件

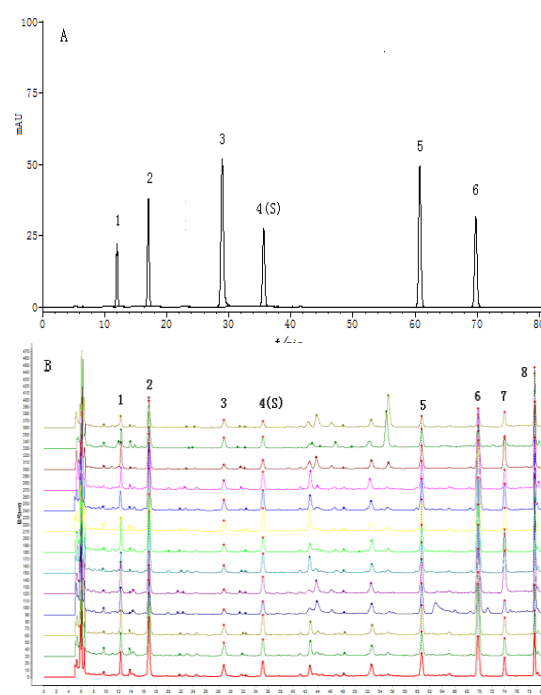
色谱柱:Luna C18(2)(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相:甲醇(A)-pH 6.5磷酸盐缓冲液(取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.07 g和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.13 g,加水溶解并稀释至1 000 mL,混匀)(B),梯度洗脱[0~13 min/ φ (A)=3%、13~60 min/ φ (A)=3%~13%、60~70 min/ φ (A)=13%~24%、70~80 min/ φ (A)=24%~95%],流速0.5 mL/min,检测波长260 nm,进样量10 μ L,柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 特征图谱的建立

2.1.1 混合标准品HPLC图谱

吸取“1.4.1”项混合标准品溶液,按“1.4.3”项色谱条件进样,记录色谱图,见图1A,结果显示,6个成分得到很好分离。



注:1-胞苷,2-尿苷,3-腺嘌呤,4-鸟苷,5-腺苷,6-虫草素,7-未知物1,8-未知物2

图1 混合标准品(A)与13批样品叠加(B)HPLC色谱图

2.1.2 共有峰的确定及参照峰的选择

吸取“1.4.2”项供试品溶液13份,按照“1.4.3”项色谱条件进样,结果见图1B的13批样品色谱叠加图,表明“1.4.3”项条件对13批样品中的6种对照品对应成分均能得到较好的分离。

对照图1A、B两图发现:13批次样品均具有一致的特征峰,且具有8个共有峰。选取峰位和峰值稳定性均好的鸟苷特征峰(峰4)作为参照峰,分别计算各共有峰的相对保留时间,结果见表1。

2.2 方法学考察

2.2.1 重复性试验

称取6份S5号蛹虫草粉末,每份0.5 g,按“1.4.2”项方法制备供试品溶液,按“1.4.3”项色谱条件分别进样,记录色谱图,分别计算各个色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表2、表3,表明方法重复性良好。

2.2.2 溶剂干扰试验

取20%甲醇溶液和S5号蛹虫草供试品溶液,按“1.4.3”项色谱条件进样。结果见图2。由图2(A)可知,空白溶剂中未出现干扰供试品溶液测定的色谱峰。

表 1 13批蛹虫草共有峰相对保留时间

峰号	样品编号													RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	0.353	0.350	0.349	0.351	0.351	0.352	0.353	0.351	0.351	0.353	0.351	0.352	0.351	0.34
2	0.481	0.480	0.480	0.479	0.479	0.482	0.482	0.481	0.481	0.480	0.477	0.481	0.479	0.29
3	0.824	0.821	0.821	0.815	0.822	0.822	0.822	0.829	0.829	0.830	0.818	0.829	0.829	0.59
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.727	1.716	1.715	1.739	1.725	1.724	1.729	1.713	1.720	1.727	1.745	1.721	1.729	0.53
6	1.986	1.971	1.969	2.004	1.983	1.983	1.989	1.967	1.979	1.988	2.008	1.979	1.990	0.62
7	2.107	2.077	2.074	2.129	2.104	2.108	2.118	2.076	2.086	2.095	2.139	2.084	2.098	0.98
8	2.252	2.224	2.222	2.291	2.241	2.249	2.260	2.237	2.242	2.257	2.302	2.241	2.258	1.03

表 2 方法的重复性(相对保留时间)考察结果

峰号	相对保留时间						RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	
1	0.350	0.350	0.350	0.351	0.351	0.351	0.16
2	0.481	0.481	0.480	0.481	0.481	0.481	0.09
3	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.823	0.00
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.718	1.719	1.719	1.721	1.720	1.720	0.06
6	1.974	1.975	1.975	1.977	1.977	1.977	0.07
7	2.099	2.101	2.101	2.102	2.101	2.102	0.05
8	2.229	2.230	2.231	2.232	2.233	2.233	0.07

表 3 方法的重复性(相对峰面积)考察结果

峰号	相对峰面积						RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	
1	0.571	0.573	0.677	0.672	0.661	0.663	7.87
2	2.754	2.570	2.721	2.743	2.786	2.818	3.16
3	0.540	0.535	0.584	0.576	0.520	0.514	5.31
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.637	1.617	1.659	1.669	1.705	1.759	3.05
6	4.782	4.687	4.545	4.413	4.400	4.316	4.01
7	1.196	1.134	1.090	1.089	1.053	1.191	5.21
8	1.673	1.637	1.661	1.642	1.611	1.604	1.65

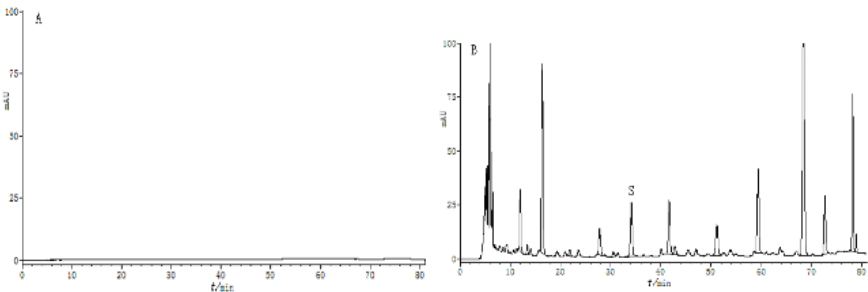


图 2 空白溶剂(A)与 S5 号供试品溶液(B)HPLC 色谱图

2.2.3 稳定性试验

称取 S5 号蛹虫草粉末 0.5 g,按“1.4.2”方法制备供试品溶液,按“1.4.3”项色谱条件,每间隔 5 h

进样,连续进样 6 次,记录色谱图,分别计算各个色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 4、表 5,表明供试品溶液室温放置 25 h 内稳定。

表 4 稳定性(相对保留时间)考察结果

峰号	相对保留时间(h)						RSD(%)
	0	5	10	15	20	25	
1	0.350	0.350	0.350	0.351	0.351	0.351	0.16
2	0.481	0.481	0.480	0.481	0.481	0.481	0.09
3	0.823	0.823	0.823	0.824	0.823	0.823	0.05
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.718	1.719	1.719	1.720	1.720	1.720	0.05
6	1.974	1.976	1.976	1.977	1.976	1.976	0.05
7	2.099	2.101	2.101	2.101	2.100	2.100	0.04
8	2.229	2.230	2.231	2.233	2.232	2.232	0.07

表 5 稳定性(相对峰面积)考察结果

峰号	相对峰面积						RSD(%)
	0 h	5 h	10 h	15 h	20 h	25 h	
1	0.571	0.670	0.664	0.662	0.661	0.527	9.78
2	2.754	2.687	2.720	2.761	2.796	2.540	3.36
3	0.540	0.586	0.523	0.579	0.517	0.537	5.28
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.637	1.669	1.671	1.697	1.778	1.574	4.03
6	4.782	4.519	4.436	4.380	4.351	4.322	3.81
7	1.196	1.119	1.101	1.152	1.050	1.147	4.43
8	1.673	1.698	1.662	1.639	1.621	1.519	3.85

表 6 不同色谱柱各共有峰相对保留时间考察结果

色谱柱	峰号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Luna (±5%)	0.33 ~ 0.37	0.46 ~ 0.50	0.79 ~ 0.87	1.00	1.64 ~ 1.82	1.89 ~ 2.09	2.00 ~ 2.22	2.14 ~ 2.36
Agilent TC	0.357	0.489	0.864	1.00	1.636	1.852	1.939	2.023
Venusil XBP	0.351	0.473	0.785	1.00	1.778	2.051	2.241	2.395

2.2.4 不同色谱柱影响试验

选用 Agilent TC-C18(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Venusil XBP C18(A) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 2 种不同品牌的色谱柱,用 S5 号蛹虫草供试品溶液,按“1.4.3”项色谱条件分别进样,结果见表 6。由于中药材特征峰的各共有峰的相对保留时间一般规定在±5%之内,但 2 种色谱柱达不到此要求,故本实验限定 Luna C18(2)色谱柱。

2.2.5 不同型号仪器影响试验

选用岛津 LC-2010A 的仪器,用 S5 号蛹虫草供试品溶液,按“1.4.3”项色谱条件进样,结果表明,该型号 HPLC 仪满足相对保留时间的要求。

2.2.6 提取溶剂、方式和时间的考察

2.2.6.1 提取溶剂选择:考察甲醇、50% 甲醇、20% 甲醇和水 4 种提取溶剂对蛹虫草的提取效率,结果极性相对偏低的甲醇和 50% 甲醇提取的样品色

谱峰信息少;极性偏大的 20% 甲醇和水提取的样品色谱峰数量明显增多,而 20% 甲醇提取的样品色谱分离更好,所以,选择 20% 甲醇作为提取溶剂。

2.2.6.2 提取方式选择:比较回流提取、超声提取 2 种提取方法,回流提取所得色谱峰虽然多于超声提取,但在几个特征峰处的色谱行为稍差,所以,选择超声提取作为本研究的提取方法。

2.2.6.3 提取时间选择:考察 30 min 和 60 min 提取时间,结果二者的色谱行为基本一致,所以,选择超声 30 min 为提取时间。

2.2.7 检测波长确定

考察 6 种标准品的紫外吸收图谱,最大吸收波长均在(260±10)nm 之间,结合文献报道^[5-6],确定 260 nm 作为检测波长。

2.2.8 流动相、流速和梯度的选择

考察甲醇-水、甲醇-pH 6.5 磷酸盐缓冲液^[7]两

种流动相系统,结果后者所得色谱行为好,且比前者多一个特征峰,所以,选择甲醇-pH 6.5 磷酸盐缓冲液为流动相。

由于蛹虫草中核苷类成分的极性差别较大,考察 0.5、0.7、1.0 mL/min 三种流速,参照文献报道^[8],调整多种不同比例的梯度系统,综合分离效果、主要色谱峰的特征和重现性,最终选择 0.5 mL/min 和“1.4.3”项的梯度比例。

3 结 论

本项研究得到的蛹虫草 HPLC 特征图谱,标定了共有的 8 个特征峰,并指认其中鸟苷峰为参照峰。所建立的测定方法精密性、重现性和稳定性均符合要求,可用于蛹虫草内在质量控制的检测,为蛹虫草进一步“一测多评”提供参考。

参考文献:

- [1] 严仲铠,李万林.中国长白山药用植物彩色图志[M].北京:人民卫生出版社,1997:1.
- [2] 樊慧婷,林洪升.蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(15):2549-2552.
- [3] 温慧颖,辛树权.北虫草生长发育条件的初步探究[J].东北农业科学,2016,41(3):99-103.
- [4] 苏颖,李竞.人工蛹虫草 HPLC 指纹图谱的建立[J].亚太传统医药,2012,8(3):10-11.
- [5] 牛聪聪,王身艳,刘畅,等.HPLC 测定人工蛹虫草中 6 种核苷类成分的含量[J].中国生化药物杂志,2016,36(3):169-175.
- [6] 潘兴娇,张杰,沈昱翔,等.HPLC 同时测定云南重楼根茎中 9 种核苷类成分的含量[J].中药材,2016,39(4):813-818.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:115.
- [8] 王朋展,相美容,李灿,等.HPLC 法同时测定不同来源半夏及其伪品中 9 种核苷类成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(2):212-218.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第 133 页)

- [9] 胡延生,姜继发,建德锋,等.欧李愈伤组织诱导及分化研究[J].吉林农业科学,2015,40(6):98-100.
- [10] 袁芳,宋凯杰,杨泽东,等.铁皮石斛茎类原球茎的诱导及植株再生[J].东北农业科学,2019,44(4):66-71.
- [11] 石建国.凌源青龙河流域早花忍冬的有性繁殖及保护利用研究[J].景观农业,2017(11):108.
- [12] 武爱龙,何冰,吴建阳,等.响应面法在植物组织培养中的应用进展[J].安徽农学通报,2020,26(17):21-22.
- [13] 王欢,姜哲,许士钊,等.早花忍冬离体快繁技术[J].北方园艺,2015(4):95-98.
- [14] 梁琦兰,张启昌,杨振国,等.蓝靛果忍冬芽体组织培养技术研究[J].北华大学学报,2006,7(6):549-551.
- [15] 武爱龙,何冰,吴建阳,等.响应面法优化珍珠相思不定

芽诱导及增殖培养条件[J].分子植物育种,2020,18(23):7868-7878.

- [16] 李闯,张海燕,谭化,等.马铃薯新品种“吉薯 1 号”茎尖脱毒及组培快繁研究[J].东北农业科学,2019,44(6):62-64,73.
- [17] 张玉英,韦正乙,王云鹏,等.番茄叶片高频再生体系建立[J].吉林农业科学,2014,39(2):78-82,86.
- [18] Guo X,Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *phellinusignarius*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010,80(2):344-349.
- [19] 赵春莉,刘子平,李金英,等.“红双喜”月季组培苗瓶外生根技术研究[J].东北农业科学,2019,44(3):28-32.

(责任编辑:刘洪霞)