

HPLC法同时测定人工蛹虫草不同部位中5种核苷类成分的含量^Δ

张勇^{1*}, 卓宝松², 刘宝岩², 康文艺^{1#}(1.黄河科技学院纳米研究所, 郑州 450063; 2.濮阳市天元虫草研究有限公司, 河南濮阳 457000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1254-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.28

摘要 目的:建立同时测定人工蛹虫草不同部位中5种核苷类成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inert-Sustain C₁₈,流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱),流速为0.6 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃。结果:尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷和虫草素检测进样量线性范围分别为0.568~3.408 μg($r=0.999\ 9$)、0.284~1.704 μg($r=0.999\ 9$)、0.264~1.584 μg($r=0.999\ 9$)、0.232~1.392 μg($r=0.999\ 9$)、1.672~10.032 μg($r=0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为98.2%~103.9%(RSD=1.97%, $n=9$)、96.2%~101.6%(RSD=1.76%, $n=9$)、96.7%~102.0%(RSD=1.94%, $n=9$)、95.1%~99.4%(RSD=1.43%, $n=9$)和95.6%~101.3%(RSD=1.82%, $n=9$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于人工蛹虫草中5种核苷类成分含量的同时测定,蛹虫草不同部位中所含核苷类成分含量不同。

关键词 人工蛹虫草;核苷类;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of 5 Nucleosides from Different Parts of Cultured *Cordyceps militaris* by HPLC

ZHANG Yong¹, ZHUO Baosong², LIU Baoyan², KANG Wenyi¹(1.Nano Research Institute, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450063, China; 2.Puyang Tianyuan Cordyceps Research Co., Ltd., Henan Puyang 457000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 5 nucleoside from different parts of cultured *Cordyceps militaris*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on InertSustain C₁₈ column with mobile phase consisting of methanol-0.02 mol/L monobasic potassium phosphate solution (gradient elution) at the flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of uridine, inosine, guanosine, adenosine and cordycepin were 0.568-3.408 μg($r=0.999\ 9$), 0.284-1.704 μg($r=0.999\ 9$), 0.264-1.584 μg($r=0.999\ 9$), 0.232-1.392 μg($r=0.999\ 9$) and 1.672-10.032 μg($r=0.999\ 8$), respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The recoveries were 98.2%-103.9% (RSD=1.97%, $n=9$), 96.2%-101.6% (RSD=1.76%, $n=9$), 96.7%-102.0% (RSD=1.94%, $n=9$), 95.1%-99.4% (RSD=1.43%, $n=9$) and 95.6%-101.3% (RSD=1.82%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and repeatable, and can be used for simultaneous determination of 5 nucleoside from cultured *C. militaris*, the content of nucleosides are different in different parts of *C. militaris*.

KEYWORDS Cultured *Cordyceps militaris*; Nucleoside; HPLC; Content determination

蛹虫草 *Cordyceps militaris* 又名北冬虫夏草或北虫草,属于囊菌亚门、麦角菌科、虫草属真菌^[1],是虫草菌寄生在鳞翅目、鞘翅目、双翅目等昆虫蛹体及幼虫形成的虫菌复合体^[2]。野生蛹虫草主分布于吉林、辽宁、陕西等地,多长于针叶林、阔叶林或混交林地表土层中鳞翅目昆虫的蛹体上^[3]。

文献研究表明,蛹虫草中含有核苷类化合物和虫草多糖,此外还含有蛋白质、有机酸、维生素及微量元素等多种化学成分^[4-6]。核苷类化合物作为其主要活性成分,具有抗菌、抗炎、抗肿瘤^[7-8]、保护心肌损伤^[9]、抑制血小板

聚集^[10]等作用。因蛹虫草易于规模化人工栽培、主要药效成分与冬虫夏草相近等特点已成为冬虫夏草的优良替代品^[4],目前市场上人工培育的蛹虫草较多,但并无统一规范的质量控制标准,为确保人工蛹虫草合理有效应用,使其质量评价有具体量化指标,同时建立科学合理、可行的质量控制标准,本研究建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定人工蛹虫草中5种核苷类成分,并对10批人工蛹虫草中5种核苷类成分的含量进行测定,同时对人工蛹虫草子实体、蛹体和全草中上述5种成分含量进行对比分析,为其质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz); AB-135S型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司); TGL-16Gr型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);

^Δ 基金项目:河南省产学研项目(No.162107000038);河南省高等学校重点科研项目(No.17B360005)

* 助教,硕士。研究方向:天然药物活性成分。E-mail: zy890113@126.com

通信作者:教授。研究方向:天然产物化学。电话: 0371-23880680。E-mail:kangwenyi@hotmail.com

LC-20AT 型 HPLC 仪,包括 SIL-20AC 自动进样器、LC-20AD 四元低压梯度泵、CTO-20AC 柱温箱、SPD-20AV 检测器(日本 Shimadzu 公司)。

1.2 试剂

尿苷对照品(批号:120624)、肌苷对照品(批号:121013)、鸟苷对照品(批号:120521)、腺苷对照品(批号:120521)和虫草素对照品(批号:120401)均购自成都普菲德生物科技有限公司,纯度均>98%;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

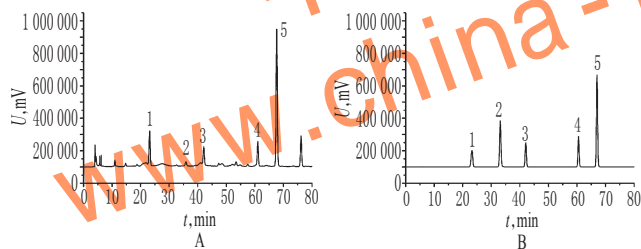
1.3 药材

蛹虫草(购自河南省濮阳天元虫草研究有限公司,批号:Y20150519-615、Y20150520-720、Y20150522-721、Y20150525-722、Y20150526-725、Y2015062601-723、Y2015072403-818、Y2015080201-829、Y20150805-902、Y2015081202-911、Y2016042103-602)由河南大学中药研究所李昌勤教授鉴定为真品。标本存放于河南大学中药研究所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:InertSustain C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 0 A; 5~30 min, 0→5% A; 30~35 min, 5%→7.5% A; 35~80 min, 7.5%→21.3% A);流速:0.6 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃。在上述色谱条件下,理论板数以尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷和虫草素峰计≥3 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图1。



A. 供试品; B. 混合对照品; 1. 尿苷; 2. 肌苷; 3. 鸟苷; 4. 腺苷; 5. 虫草素
A. test sample; B. mixed control; 1. uridine; 2. inosine; 3. guanosine; 4. adenosine; 5. cordycepin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取待测成分对照品各适量,精密称定,加20%甲醇溶液制成尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷、虫草素质量浓度分别为0.284、0.142、0.132、0.116、0.83 6 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 准确称取药材样品粉末(过50目筛)0.2 g,置于4 mL离心管中,精密加入2 mL 20%甲醇溶液,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,加20%甲醇溶液补足减失的质量,以半径为12 cm、5 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液2、4、6、8、10、12 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
尿苷	$y = 3\,473\,366.1972x - 18\,907.000\,0$	0.999 9	0.568~3.408
肌苷	$y = 4\,239\,733.0986x - 846.866\,7$	0.999 9	0.284~1.704
鸟苷	$y = 4\,549\,927.0563x - 9\,043.933\,3$	0.999 9	0.264~1.584
腺苷	$y = 5\,699\,013.7931x - 7\,476.866\,7$	0.999 9	0.232~1.392
虫草素	$y = 4\,738\,003.0759x + 496\,224.000\,0$	0.999 8	1.672~10.032

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷、虫草素峰面积的RSD分别为0.063%、0.078%、0.089%、0.173%、0.606% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:Y20150519-615)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷、虫草素峰面积的RSD分别为1.687%、1.506%、1.059%、1.261%、0.219% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:Y20150519-615)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷、虫草素峰面积的RSD分别为0.931%、1.409%、2.452%、2.444%、1.153% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:Y20150519-615)适量,共6份,分别加入低、中、高质量待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.8 样品含量测定

取10批药材样品和批号为Y2016042103-602的药材样品不同部位粉末各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3、表4(表中“-”为未测得)。

3 讨论

由于蛹虫草主要活性成分核苷类物质具有较大的极性,因此笔者在预试验中比较了甲醇、水、甲醇-水3种不同溶剂体系。结果表明,20%甲醇溶液效果最好,因此确定20%甲醇溶液作为提取溶剂。建立分离条件时

表2 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg			加样回收率,%			平均加样回收率,%	RSD,%
				1	2	3	1	2	3		
尿苷	0.100 3	0.217 0	0.163 0	0.381 0	0.377 0	0.384 0	100.6	98.2	102.5	101.5	1.97
	0.100 0	0.214 0	0.204 0	0.426 0	0.423 0	0.415 0	103.9	102.5	98.6		
	0.100 7	0.220 0	0.245 0	0.468 0	0.473 0	0.470 0	101.1	103.4	102.1		
肌苷	0.100 3	0.085 0	0.063 0	0.147 0	0.146 0	0.145 0	98.3	97.3	96.2	99.0	1.76
	0.100 0	0.083 0	0.078 0	0.162 0	0.160 0	0.161 0	101.2	98.3	99.4		
	0.100 7	0.086 0	0.094 0	0.180 0	0.178 0	0.181 0	100.0	98.8	101.6		
鸟苷	0.100 3	0.090 0	0.069 0	0.160 0	0.157 0	0.156 0	101.9	97.8	96.7	99.3	1.94
	0.100 0	0.089 0	0.086 0	0.176 0	0.174 0	0.173 0	102.0	99.9	98.1		
	0.100 7	0.091 0	0.103 0	0.195 0	0.193 0	0.191 0	100.8	99.0	97.6		
腺苷	0.100 3	0.101 0	0.076 0	0.176 0	0.174 0	0.175 0	98.0	96.2	96.8	97.6	1.43
	0.100 0	0.099 0	0.095 0	0.194 0	0.192 0	0.190 0	99.4	97.4	95.1		
	0.100 7	0.102 0	0.114 0	0.214 0	0.215 0	0.215 0	97.7	99.0	98.8		
虫草素	0.100 3	0.825 0	0.630 0	1.430 0	1.463 0	1.439 0	96.1	101.3	97.5	97.7	1.82
	0.100 0	0.813 0	0.790 0	1.585 0	1.568 0	1.581 0	97.8	95.6	97.3		
	0.100 7	0.834 0	0.950 0	1.781 0	1.758 0	1.755 0	99.7	97.2	96.8		

表3 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 3 Results of contents determination of samples(n=3,mg/g)

样品批号	尿苷	肌苷	鸟苷	腺苷	虫草素
Y20150519-615	2.060	0.802	0.852	0.957	7.814
Y20150520-720	1.013	0.415	0.329	0.496	4.560
Y20150522-721	1.329	0.631	0.563	0.653	6.138
Y20150525-722	0.948	0.501	0.337	0.453	4.089
Y20150526-725	1.184	0.518	0.517	0.551	3.513
Y2015062601-723	0.963	-	0.366	0.481	3.853
Y2015072403-818	0.626	0.5388	-	0.416	3.650
Y2015080201-829	1.366	0.454	0.473	0.589	7.898
Y20150805-902	1.104	0.662	0.491	0.651	5.727
Y2015081202-911	1.719	1.398	0.539	0.864	5.554

表4 蛹虫草不同部位中5种核苷类成分含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 4 Determination of 5 nucleosides from different parts of *C. militaris*(n=3,mg/g)

药材部位	尿苷	肌苷	鸟苷	腺苷	虫草素
子实体	0.414	0.147	0.233	0.520	1.112
蛹体	0.171	0.203	0.249	0.148	0.358
全草	0.554	0.232	0.394	0.506	0.624

笔者考察了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸盐缓冲液等不同洗脱系统,以及等度和梯度洗脱方式。参考2015年版《中国药典》(一部)冬虫夏草中腺苷分离条件:流动相为酸盐缓冲液-甲醇(85:15, V/V)等度洗脱,检测波长260 nm^[11];同时参考文献[12]中色谱条件,最终选择甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱,此条件下5种核苷类成分可以完全与杂质峰分离并具有较好峰形和出峰时间。

参照2015年版《中国药典》(一部)中冬虫夏草的质量标准规定腺苷含量不得少于0.010%^[11],黄兰芳等^[13]发现蛹虫草中腺苷的含量与冬虫夏草相似,甚至更高,多在0.01%以上。结果分析可知,10批人工蛹虫草中的虫草素和尿苷含量较高,其中批号为Y20150519-615的待

测药材样品中5种核苷类成分总含量相对高于其他批次。肖亦农等^[14]报道同一菌株、相同培养条件下,不同培养基所得的虫草子实体甘露醇、多糖及矿物质元素有明显差异。可见,培养基原料不同对蛹虫草有效成分的影响很大。

对比分析同一批次蛹虫草的子实体、蛹体及全草中5种核苷类成分,发现子实体中尿苷、腺苷及虫草素3种成分含量明显高于蛹体;鸟苷在二者中的含量无明显差异;肌苷含量蛹体高于子实体。因此可知,蛹虫草不同部位中所含核苷类成分含量不同,可为蛹虫草的合理利用和开发提供理论依据。

蛹虫草如今作为冬虫夏草的最佳替代品,具有很高的药用及经济价值,且相较于冬虫夏草或野生蛹虫草来说成本更低、效益更高,具有更好的开发利用前景。进行优良菌种的选育、提高蛹虫草产量及有效成分含量,成为对蛹虫草研究的重要内容之一;同时,加强药效物质基础深层次研究,也可为其临床应用和相关产品研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:131.
- [2] 李军,陈广生,方清茂,等.人工培养蛹虫草与冬虫夏草的比较研究[J].成都中医药大学学报,2010,33(3):82-83.
- [3] 郑壮丽,黄春花,梅彩英,等.蛹虫草国内外研究的新进展[J].环境昆虫学报,2011,33(2):225-233.
- [4] 王瑞华.人工蛹虫草质量标准及指纹图谱分析研究[D].武汉:华中科技大学,2008.
- [5] 樊慧婷,林洪生.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):95-97.
- [6] 万朋,高俊涛,吕世杰.蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2015,38(6):95-97.
- [7] Feng Y, Yan Z, Wang BB. Effects of polysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelium on physical fatigue in

艾纳香及其伪品假东风草的HPLC指纹图谱研究^Δ

冯 华^{1,2*}, 杨 焯², 王祥培^{2#}, 吴红梅², 杨贤友²(1.遵义市食品药品检验所, 贵州 遵义 563002; 2.贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1257-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.29

摘要 目的:建立艾纳香及其伪品假东风草的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Ultimate-C₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.6 mL/min,检测波长为270 nm,柱温为25 ℃,进样量为7 μL。以槲皮素为参照物,对16批艾纳香药材和5批假东风草药材采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行共有峰指认和相似度分析。结果:16批艾纳香药材有61个共有峰,相似度为0.931~0.995,明显高于5批假东风草药材的相似度。结论:该研究所建指纹图谱可为艾纳香的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 艾纳香;假东风草;高效液相色谱法;指纹图谱;鉴别

Study on the HPLC Fingerprint of *Blumea balsamifera* and Its Fake *B. riparia*

FENG Hua^{1,2}, YANG Ye², WANG Xiangpei², WU Hongmei², YANG Xianyou²(1.Zunyi Institute for Food and Drug Control, Guizhou Zunyi 563002, China; 2.School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint for *Blumea balsamifera* and its fake *B. riparia*. METHODS: HPLC was performed on the column of Ultimate-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 0.6 mL/min, detection wavelength was 270 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 7 μL. Using quercetin as a reference, *Similarity Evaluation Software for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2004 A edition) was used for the common peaks identification and similarity analysis of 16 batches of *B. balsamifera* and 5 batches of *B. riparia*. RESULTS: There were 61 common peaks in the 16 batches of *B. balsamifera*, similarity degree was 0.931-0.995, which was higher than the similarity degree of 5 batches of *B. riparia*. CONCLUSIONS: The established fingerprint can provide reference for the identification and quality evaluation of *B. balsamifera*.

KEYWORDS *Blumea balsamifera*; *Blumea riparia*; HPLC; Fingerprint; Identification

艾纳香来源于菊科植物艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC 的叶及嫩枝,又名大风艾、冰片艾、大艾等,为贵州苗药,具有祛风除湿、温中止泻、活血解毒的功效,用于治疗风寒感冒、风湿痹痛、寒湿泻痢、跌扑伤痛等症^[1-2]。贵州地区还将同属植物假东风草 *B. riparia* (BL.) DC 的叶及嫩枝作为艾纳香药材来源^[2]。由于艾

纳香与假东风草为同科同属植物,两者的药材性状、显微特征及成分等方面相似或相近,难以区别^[3-4],而中药材指纹图谱能够表征中药材所含的物质成分,并可在“共性”中寻找“唯一”的特征^[5-6]。因此,笔者为了确定艾纳香药材品种来源准确性,借助高效液相色谱(HPLC)指纹图谱技术^[7]建立了艾纳香药材的HPLC指纹图谱,

- mice[J]. *Bangl J Pharmacol*, 2012, 7(7): 217-221.
- [8] 叶艳清, 李国平, 蒲泽锦, 等. 腺苷通过内质网应激途径诱导HepG2细胞凋亡的研究[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(5): 596-601.
- [9] 王阳, 高明宇, 李铁铮, 等. 腺苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(2): 145-147.
- [10] 王冬梅, 刘景汉, 周俊, 等. 腺苷对血小板体外激活的抑制

- 作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13(6): 1094-1098.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115.
- [12] 张彬, 李倩, 党爱华. HPLC法同时测定赤子爱胜蚓药材中尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺苷的含量[J]. *中国药房*, 2016, 27(12): 1692-1694.
- [13] 黄兰芳, 郭方遒, 梁逸曾, 等. HPLC-ESI-MS测定冬虫夏草和蚕蛹虫草中腺苷和虫草素含量[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(8): 762-764.
- [14] 肖亦农, 韩梅, 赵春燕. 不同培养基对蛹虫草子实体甘露醇、多糖和矿质元素含量的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2009, 40(2): 227-229.

Δ 基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(No. 黔科合中药字[2010]5028号); 贵州省高层次创新人才培养项目(No. 遵市科合人才[2015]35号)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 食品药品检验及新药研发。
E-mail: fenghua781014@163.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 新药研发及药物鉴定。电话: 0852-8928059

(收稿日期: 2016-10-16 修回日期: 2016-12-13)

(编辑: 张 静)