

发酵虫草菌粉指纹图谱研究

杨悦¹, 夏聪华², 张菊芳¹, 周屹峰¹ (1.杭州中美华东制药有限公司, 杭州 310000; 2.华东医药股份有限公司, 杭州 310000)

摘要: **目的** 通过对发酵虫草菌粉指纹图谱的深入研究, 为发酵虫草菌粉类产品的质量提高提供思路。**方法** 液质联用确定发酵虫草菌粉类产品(百令胶囊)指纹图谱中 6 个主色谱峰的化学成分; 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 比较天然虫草和不同厂家发酵虫草菌粉指纹图谱相似度及不同干燥方式对指纹图谱的影响。**结果** 百令胶囊指纹图谱中的 6 个主色谱峰成分为尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸、尿苷、鸟苷、腺苷。发酵虫草菌粉的指纹图谱与天然虫草均存在差异, 其中百令胶囊的指纹图谱与天然虫草最接近。干燥方式对指纹图谱影响较大, 采用沸腾干燥方式对应的指纹图谱主色谱峰的面积比最接近天然虫草晒干方式。**结论** 指纹图谱可准确反映发酵虫草菌粉质量及质量控制方式的有效性。

关键词: 发酵虫草菌粉; 指纹图谱; 液质联用; 干燥方式

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)04-0460-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.014

引用本文: 杨悦, 夏聪华, 张菊芳, 等. 发酵虫草菌粉指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 460-462.

Fingerprint Study of Cultured *Cordyceps Sinensis* Powder

YANG Yue¹, XIA Conghua², ZHANG Jufang¹, ZHOU Yifeng¹ (1.Hangzhou Zhongmei Huadong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310000, China; 2.Huadong Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To provide strategies for quality improvement of cultured *Cordyceps sinensis* powder by detailed analysis on its HPLC fingerprint. **METHODS** Using LC-MS on cultured *Cordyceps sinensis* powder(Bailing capsule), six major chromatographic peaks in the fingerprint were identified. A similarity measurement based on Chinese traditional medicine fingerprinting system was used to compare similarities between cultured cordyceps and natural cordyceps, as well as the effect of drying methods on fingerprint profiles. **RESULTS** The 6 major peaks in the fingerprint of Bailing capsule had been identified as: uridine-5-monophosphate, guanylic acid, adenosine-5'-monophosphoric acid, uridine, guanosine and adenosine. The fingerprint of cultured *Cordyceps sinensis* powder differs from that of the natural cordyceps, while Bailing capsule had been shown to be most similar to natural cordyceps. The drying method also had a significant effect on the fingerprint. The product prepared by boil drying method produced the most similar fingerprint profile to the sun dried natural cordyceps. **CONCLUSION** The fingerprinting can accurately reflect the quality of cultured *Cordyceps sinensis* powder and the effectiveness of quality control.

KEYWORDS: cultured *Cordyceps sinensis* powder; fingerprint; LC-MS; drying methods

中药指纹图谱^[1]是鉴别中药真实性、评价药品质量一致性和稳定性的可行模式, 其专属性强, 可为中药的整体质量控制提供科学依据, 能对产品在质量进行综合评价^[2-3]。目前, 市场上发酵虫草菌粉类产品众多, 主要有金水宝胶囊、百令胶囊、心肝宝胶囊、宁心宝胶囊等几大品种。中国药典 2005 年版收录了百令胶囊指纹图谱的鉴定方法^[4-6], 通过对指纹图谱的分析, 反映百令胶囊内在质量的均一性、稳定性。本研究通过对发酵虫草菌粉指纹图谱的深入研究, 为百令胶囊及其他发酵虫草菌粉类产品的质量提供思路。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪、1290-6545 液相-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); KQ-500DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BT25S 型电子分析天平(赛多利斯); FE20 pH 计(梅特勒-托利多); DGG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); DZF-6020 真空干燥箱(苏州江东精密仪器有限公司); GLG-200 沸腾干燥机(常州市振力干燥设备有限公司); Pilot1-2MD 中试冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

乙腈(色谱纯, J.T.Baker); 磷酸(色谱纯, ROE);

作者简介: 杨悦, 女, 硕士, 工程师

Tel: 13958104244

E-mail: yangyue0514@126.com

乙醚[分析纯, 永华化学科技(江苏)有限公司]; 磷酸二氢钾(分析纯, 广东省化学试剂工程技术研究中心); 氢氧化钠(分析纯, 杭州萧山化学试剂厂); 超纯水。

对照品: 尿苷 5-单磷酸(批号: U1752; 供含量测定用)、鸟苷酸(批号: G8377; 供含量测定用)、5'-腺嘌呤核苷酸(批号: A9251; 供含量测定用)、尿苷(批号: U3750; 供含量测定用)、鸟苷(批号: G6264; 供含量测定用)、腺苷(批号: A9251; 供含量测定用), 均由 Sigma 公司提供; 发酵虫草菌粉对照药材(杭州中美华东制药有限公司, 批号: 1103045)。

金水宝胶囊(江西济民可信金水宝制药有限公司, 批号: 12020); 心肝宝胶囊(河北长天药业有限公司, 批号: 130103); 宁心宝胶囊(云南白药集团丽江药业有限公司, 批号: LF12001); 百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司, 批号: 131024)。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸、尿苷、鸟苷、腺苷对照品适量, 加纯水制成每 1 mL 含以上各对照品 0.2 mg 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

称取发酵虫草菌粉 0.5 g 置具塞锥形瓶中, 加乙醚 20 mL, 密塞, 浸泡 30 min, 滤过, 弃去乙醚, 残渣挥干, 连同滤纸一并置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.5% 磷酸溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用 0.5% 磷酸溶液补足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 HPLC 色谱条件^[4]

Alltima™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相: 0.04 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~15 min, 100%A; 15~45 min, 100%→85%A); 流速 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长 260 nm; 进样量 20 μL。

2.4 LC-MS 色谱和质谱条件^[7]

2.4.1 色谱条件 Alltima™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相: 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~15 min, 100%A; 15~45 min, 100%→85%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL。

2.4.2 质谱条件 ESI 离子源, 离子源温度 350 °C; 毛细管电压 3 500 eV; 负离子检测模式; 雾化压力 40 psi; 干燥氮气流速 10 L·min⁻¹; 扫描范围: 100~1 000 amu。

2.5 指纹图谱主成分的确定

根据质谱和对照品保留值确定供试药品色谱的 6 个主色谱峰为: 尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸、尿苷、鸟苷、腺苷。结果见表 1, HPLC 图见图 1。

表 1 质谱图各组分归属

Tab. 1 Identification of components by HPLC-MS

保留时间/min	化学成分	分子量	M/m/z
8.6~8.7	尿苷 5-单磷酸	324.18	323.0
9.7~9.7	5'-腺嘌呤核苷酸	347.22	346.1
9.9~10.0	鸟苷酸	363.22	362.0
11.1~12.1	尿苷	244.20	243.5
12.1~12.2	腺苷	267.24	265.9
12.9~12.9	鸟苷	283.24	281.9

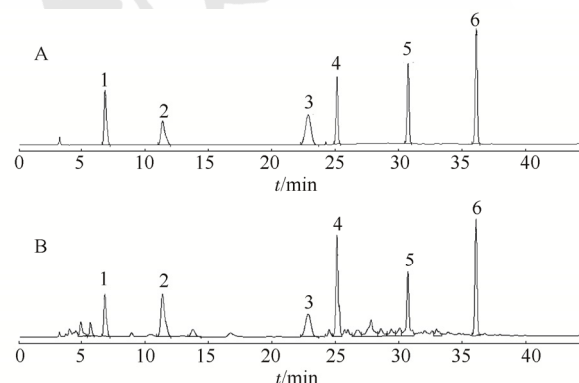


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-尿苷 5-单磷酸; 2-鸟苷酸; 3-尿苷; 4-5'-腺嘌呤核苷酸; 5-鸟苷; 6-腺苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-test sample; 1-uridine-5-monophosphate; 2-guanic acid, 3-uridine; 4-adenosine-5'-monophosphoric acid; 5-guanosine; 6-adenosine.

2.6 指纹图谱反映不同厂家发酵虫草菌粉与天然虫草的差异

取天然虫草, 百令、金水宝、宁心宝、心肝宝胶囊各 0.5 g, 按照“2.2”和“2.3”项下方法操作, 按照外标法计算 6 种主色谱峰含量, 其中各胶囊 3 种核苷(尿苷、鸟苷、腺苷)含量均高于天然虫草; 3 种核苷酸(尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸)含量中, 只有百令胶囊高于天然虫草, 其他 3 家胶囊含量均较低, 甚至没有。结果见表 2。

采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行计算, 结果发现, 发酵虫草菌粉和天然虫草均存在差异, 但百令胶囊的指纹图谱与天然虫草相似度最高。

表 2 天然虫草和发酵菌粉中核苷类物质含量对比

Tab. 2 Nucleoside contents comparison between cultured cordyceps and natural cordyceps

产品	成分/%					
	尿苷 5-单磷酸	鸟苷酸	尿苷	5'-腺嘌呤核苷酸	鸟苷	腺苷
天然虫草	0.04	0.01	0.02	0.10	0.01	0.02
百令胶囊	0.13	0.20	0.21	0.24	0.30	0.30
金水宝	0.06	0.04	0.27	0.06	0.37	0.39
宁心宝	0.00	0.00	0.63	0.00	0.40	0.44
心肝宝	0.00	0.00	0.29	0.06	0.36	0.40

2.7 指纹图谱反映不同干燥方式对质量的影响

取百令胶囊湿片, 分别采用冷冻干燥、100 °C 真空干燥、100 °C 烘箱干燥、100 °C 沸腾干燥、自然晒干 5 种干燥方式, 按照“2.2”和“2.3”项下方法操作, 按照外标法计算 6 种主色谱峰含量, 结果显示, 6 种核苷(尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸、尿苷、鸟苷、腺苷)在晒干和沸腾干燥中均存在, 且含量相近; 冷冻干燥、真空干燥、烘箱干燥中 3 种核苷(尿苷、鸟苷、腺苷)含量较高, 3 种核苷酸(尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸)含量较低, 甚至没有。说明干燥方式对指纹图谱影响较大, 结果见表 3。

采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行计算, 结果显示, 自然晒干与沸腾干燥指纹图谱的相似度最高。

表 3 不同干燥方式下百令胶囊中核苷类物质含量

Tab. 3 Nucleoside contents in Bailing capsule by different drying methods

干燥方法	成分/%					
	尿苷 5-单磷酸	鸟苷酸	尿苷	5'-腺嘌呤核苷酸	鸟苷	腺苷
冷冻干燥	0.08	0.00	0.08	0.26	0.24	0.36
烘箱干燥	0.11	0.00	0.07	1.45	1.16	1.21
真空干燥	0.09	0.02	0.10	0.82	0.94	0.95
沸腾干燥	0.19	0.31	0.32	0.27	0.48	0.46
自然晒干	0.09	0.09	0.24	0.10	0.15	0.11

3 分析与讨论

中国药典 2015 年版中, 百令胶囊指纹图谱只确定了尿苷和腺苷 2 个主色谱峰成分, 其他 4 个

主色谱峰成分未知, 本研究通过 LC-MS, 确定了所有的主色谱峰的化学成分为: 尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸、尿苷、鸟苷、腺苷。

目前, 市场上发酵虫草菌粉类产品众多, 主要有金水宝胶囊、百令胶囊、心肝宝胶囊、宁心宝胶囊等几大品种。本研究按照药典方法, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 以天然虫草为对照, 发现发酵虫草的指纹图谱与天然虫草均存在差异, 其中百令胶囊的指纹图谱与天然虫草最接近。

通过对不同干燥方式的考察, 发现干燥方式对指纹图谱影响较大。由表 3 可知, 指纹图谱中 2 大类物质核苷酸(尿苷 5-单磷酸、鸟苷酸、5'-腺嘌呤核苷酸)和核苷(尿苷、鸟苷、腺苷)存在一定的负相关关系, 表明 2 类物质可能存在互相转化, 而不同干燥方式中的空气、温度和水分等因素可能对其转化有较大影响, 但尚有待进一步研究。自然晒干与沸腾干燥指纹图谱的相似度最高。

此外笔者对自然晒干和自然阴干方式做了比较, 两者指纹图谱无明显差异。

REFERENCES

- [1] LI Q, DU S M, ZHANG Z L, et al. Progress in fingerprint technology on Chinese materia medica and prospect of its future development [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(22): 3095-3104.
- [2] CAI R P, LU J, YU Y, et al. Establishment of UPLC fingerprint of Shaoyao ganciao decoction: a classical herbal formula [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(4): 473-478.
- [3] LUO X Q, LI S S, CHEN H F, et al. Study on HPLC fingerprint of genuine regional drug of aurantii fructus in Jiangxi [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(24): 2949-2953.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2015: 832
- [5] ZHU M, JIN Z Z, CHEN Y, et al. Identification of Bailing capsule by RP-HPLC fingerprint [J]. Chin Tradit Patent Med(中成药), 2007, 29(9): 1254-1256.
- [6] WU Y, CHEN L H, JIN C, et al. Chemical constituents and quality control of products of fermented *Cordyceps sinensis* power [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(20): 220-227.
- [7] AN R, BO M P. Ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrum detector technology: Dramatically improve the quality of result on residues and their metabolites analysis in food and agro-products [J]. Mod Sci Instr(现代科学仪器), 2006, 16(1): 20-23.

收稿日期: 2019-02-15

(本文责编: 李艳芳)