

冬虫夏草水提液和醇提液 HPLC 指纹图谱分析

钱正明¹ 孙敏甜¹ 李 华² 刘潇潇² 李文庆¹ 李文佳¹

(1 广东东阳光药业有限公司国家中医药管理局重点研究室, 东莞, 523850; 2 广东省药品检验所, 广州, 510180)

摘要 目的: 建立冬虫夏草水提液和醇提液的高效液相指纹图谱。方法: 采用高效液相色谱对 20 批冬虫夏草和 2 批发酵冬虫夏草菌粉的水提液和醇提液进行分析; 并对所获得的色谱数据进行相似度计算和聚类分析。结果: 建立了冬虫夏草水提液和醇提液指纹图谱, 水提液指纹图谱确定了 7 个共有峰, 醇提液指纹图谱确定了 8 个共有峰; 冬虫夏草水提液和醇提液指纹图谱相似度评价结果均显示 20 批冬虫夏草样本的相似度系数大于 0.9, 2 批发酵冬虫夏草菌粉的相似度系数小于 0.9; 冬虫夏草水提液和醇提液共有峰聚类分析结果均显示, 20 批冬虫夏草与 2 批发酵冬虫夏草菌粉分别聚为不同类。结论: 本文所建立的方法稳定可靠, 可以对冬虫夏草质量进行综合评价, 为其提高产品质量控制提供了依据。

关键词 冬虫夏草; 水提液; 醇提液; 高效液相; 指纹图谱

HPLC Fingerprints Analysis of Aqueous Extract and Methanol Extract of Cordyceps

Qian Zhengming¹, Sun Mintian¹, Li Hua², Liu Xiaoxiao², Li Wenqing¹, Li Wenjia¹

(1 Key Institute of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sun Shine Lake Pharm Co., Ltd, Dongguan 523850, China; 2 Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

Abstract Objective: To establish chemical fingerprints of the aqueous extract and methanol extract of Cordyceps by HPLC. **Methods:** The aqueous extract and methanol extract of 20 batches Cordyceps and 2 batches Cordyceps mycelium were analyzed by HPLC. The chromatographic data was evaluated by similarity analysis and cluster analysis. **Results:** The aqueous extract and methanol extract chemical fingerprints of Cordyceps were developed. Seven common peaks were identified in aqueous extract and eight common peaks were identified in methanol extract. The similarities of 20 batches Cordyceps aqueous extract and methanol extract were higher than 0.9, and the similarities of 2 batches Cordyceps mycelium were lower than 0.9. The cluster analysis result showed that Cordyceps and Cordyceps mycelium were separated in different clusters. **Conclusion:** The developed HPLC fingerprint method is stable and reliable, which helps to the comprehensive quality evaluation of Cordyceps.

Key Words Cordyceps; Aqueous extract; Methanol extract; HPLC; Fingerprint

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.069

冬虫夏草为传统名贵中药材, 具有补肾益肺、止血化痰的功效^[1-3]。在我国主要分布于西藏、青海、四川等高海拔地区, 由于其生长环境的特殊, 其野生资源量有限^[4-6]。近年来随着人民生活水平提高和保健养生意识的增强, 消费者对冬虫夏草的需求越来越大, 造成冬虫夏草市场供不应求, 市场冬虫夏草产品品质参差不齐, 因此对冬虫夏草进行全面质量控制尤为重要^[7-8]。中药指纹图谱是一种全面综合的质量控制方法, 已被广泛运用于中药产品的质量控制^[9-13]。前期冬虫夏草指纹图谱研究报道, 包括红外指纹图谱分析、核磁指纹图谱分析、高效液相指纹图谱分析和高效毛细管电泳指纹图谱分析^[14-16]。其中高效液相色谱具有特征性强, 仪器普及率高等优点在冬虫夏草指纹图谱分析中得到了广泛应用, 但前期冬虫夏草液相指纹图谱研究主要集中于对其

水提液的指纹图谱分析, 这就会造成部分醇溶性化合物信息的缺失^[17-19]。本文在前期文献的基础上, 同时建立了冬虫夏草水提液和醇提液液相指纹图谱方法, 为其产品的全面质量控制提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪(二元泵, 自动进样器, 柱温箱, DAD 检测器, Agilent 化学工作站); 十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); 超纯水机(默克密理博); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会, 版本 2004A)。

1.2 材料 甲酸(色谱纯, 阿拉丁); 甲醇(色谱纯, SPECTRUM); 乙腈(色谱纯, SPECTRUM); 水为超纯水; 冬虫夏草及发酵冬虫夏草菌粉样品信息见表 1。

表 1 样品来源表

样品编号	样品名称	来源
S1	冬虫夏草	青海玉树
S2	冬虫夏草	青海玉树
S3	冬虫夏草	青海果洛
S4	冬虫夏草	青海果洛
S5	冬虫夏草	西藏昌都
S6	冬虫夏草	西藏那曲
S7	冬虫夏草	西藏那曲
S8	冬虫夏草	四川理塘
S9	冬虫夏草	四川理塘
S10	冬虫夏草	四川德格
S11	冬虫夏草	青海省售
S12	冬虫夏草	青海省售
S13	冬虫夏草	西藏市售
S14	冬虫夏草	四川省售
S15	冬虫夏草	四川省售
S16	冬虫夏草(繁育品)	公司自产
S17	冬虫夏草(繁育品)	公司自产
S18	冬虫夏草(繁育品)	公司自产
S19	冬虫夏草(繁育品)	公司自产
S20	冬虫夏草(繁育品)	公司自产
S21	发酵冬虫夏草菌粉	公司自产
S22	发酵冬虫夏草菌粉	公司自产

2 方法

2.1 冬虫夏草水提液色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-AQ(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~7 min,0% B,7~25 min,0%~18% B,25~30 min,18%~34% B);流速:0.6 mL/min;柱温:25℃;检测波长:260 nm;进样体积:5 μL。

2.2 冬虫夏草醇提液色谱条件 色谱柱: Waters Xbridge-C18(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相: 水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min,2%~8% B,10~20 min,8%~100% B,20~45 min,100% B);流速: 0.8 mL/min;柱温:35℃;检测波长:280 nm;进样体积:20 μL。

2.3 冬虫夏草水提液供试品溶液制备 取供试品粉末(过3号筛)约0.1 g,精密称定,置于10 mL的玻璃管中,精密加入纯水5 mL,密塞,摇匀,超声30 min,摇匀,滤过,取续滤液,即可。

2.4 冬虫夏草醇提液供试品溶液制备 取供试品粉末(过3号筛)约0.2 g,精密称定,置于10 mL的玻璃管中,精密加入甲醇5 mL,密塞,摇匀,超声30 min,摇匀,滤过,取续滤液,即可。

2.5 色谱数据处理方法 指纹图谱相似度分析:采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”分析,计算方法采用中位数法。聚类分析:采

用SPSS软件进行聚类分析,聚类距离采用欧氏距离法,聚类方法采用ward法。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 取冬虫夏草样品(S1),按“2.3”项下制备冬虫夏草水提液,以水作为空白溶液,按“2.1”项下分析测定(见图1)。从图1中可看到空白溶液在各主要色谱峰出峰位置处均无干扰,表明冬虫夏草水提液指纹图谱检测方法专属性良好。

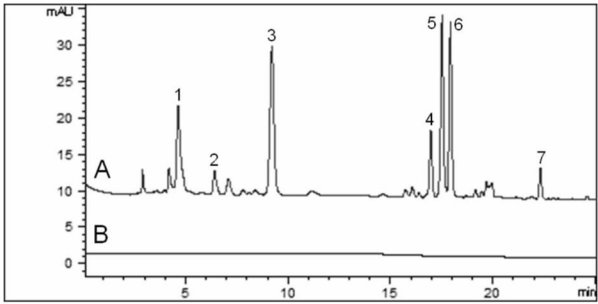


图 1 冬虫夏草水提液指纹图谱专属性试验色谱图

注:A. 冬虫夏草水提液;B. 空白水溶液;1-7. 共有峰

取冬虫夏草样品(S1),按“2.4”项下制备冬虫夏草醇提液,以甲醇作为空白溶液,按“2.2”项下分析测定(见图2)。从图2中可看到空白溶液在各主要色谱峰出峰位置处均无干扰,表明冬虫夏草醇提液指纹图谱检测方法专属性良好。

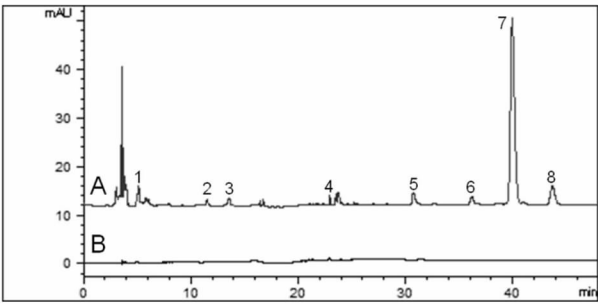


图 2 冬虫夏草醇提液指纹图谱专属性试验色谱图

注:A. 冬虫夏草醇提液;B. 空白甲醇溶液;1-8. 共有峰

3.1.2 精密度试验 取冬虫夏草样品(S1),按“2.3”项下制备冬虫夏草水提液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定冬虫夏草水提液指纹图谱。结果以4号峰的保留时间和峰面积为参照,计算样品中所含7个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间RSD小于1.0%,峰面积比RSD小于3.7%,相似度系数均大于0.9,表明精密度良好。

取冬虫夏草样品(S1),按“2.4”项下制备冬虫夏草醇提液,按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,

测定冬虫夏草醇提液指纹图谱。结果以 8 号峰的保留时间和峰面积为参照,计算样品中所含 8 个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间 *RSD* 小于 1.8%,峰面积比 *RSD* 小于 5.0%,相似度系数均大于 0.90,表明精密度良好。

3.1.3 重复性试验 取冬虫夏草样品(S1)6 份,按“2.3”项下制备冬虫夏草水提液,按“2.1”项下色谱条件测定。考察样品中 7 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积,各共有峰的相对保留时间 *RSD* 小于 1.0%,峰面积比 *RSD* 小于 5.7%,相似度系数均大于 0.90,表明方法重复性良好。

取冬虫夏草样品(S1)6 份,按“2.4”项下制备冬虫夏草醇提液,按“2.2”项下色谱条件测定。考察样品中 8 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积,各共有峰的相对保留时间 *RSD* 小于 0.8%,峰面积比 *RSD* 小于 5.7%,相似度系数均大于 0.90,表明方法重复性良好。

3.1.4 稳定性试验 取冬虫夏草样品(S1),按“2.3”项下制备冬虫夏草水提液,按“2.1”项下色谱条件在 0,1,2,3,4,5,6 h 测定其指纹图谱。对不同进样时间样品中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察,结果显示 6 h 内各共有峰相对保留时间 *RSD* 小于 1.2%,峰面积比 *RSD* 小于 7.0%,相似度系数均大于 0.90,表明冬虫夏草水提液供试品溶液在 6 h 内稳定。

取冬虫夏草样品(S1),按“2.4”项下制备冬虫夏草醇提液,按“2.2”项下色谱条件在 0,4,8,12,18,24 h 测定其指纹图谱。对不同进样时间样品中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察,结果显示 24 h 内各共有峰相对保留时间 *RSD* 小于 1.5%,峰面积比 *RSD* 小于 7.4%,相似度系数均大于 0.90,表明冬虫夏草醇溶性供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.2 指纹图谱相似度评价

3.2.1 水溶性指纹图谱建立及相似度评价 取冬虫夏草药材,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项下色谱条件测定。将 10 批冬虫夏草药材水提液(S1-S10)的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,得到 10 批药材 260 nm 波长下的液相指纹图谱,并生成共有模式的对照指纹图谱,采用此对照指纹图谱对 20 批冬虫夏草样本(S1-S20)及 2 批发酵虫草菌丝粉样本(S21-S22)进行相似度评价(图 3),20 批冬虫夏草样品的相似度均大于 0.90,2 批发酵冬虫夏草菌粉的相似度均低于 0.90

(表 2)。

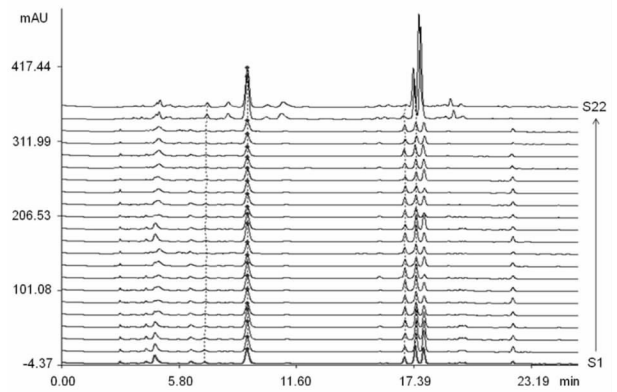


图 3 冬虫夏草水提液指纹图谱叠加图

表 2 冬虫夏草水提液指纹图谱相似度

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.989	S12	0.987
S2	0.973	S13	0.977
S3	0.990	S14	0.982
S4	0.993	S15	0.965
S5	0.998	S16	0.980
S6	0.982	S17	0.989
S7	0.990	S18	0.956
S8	0.955	S19	0.972
S9	0.985	S20	0.984
S10	0.951	S21	0.807
S11	0.988	S22	0.816

3.2.2 醇溶性指纹图谱建立及相似度评价 取冬虫夏草药材,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,“2.2”项下色谱条件测定。将 10 批冬虫夏草药材醇提液(S1-S10)的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,得到 10 批药材 280 nm 波长下的液相指纹图谱,并生成共有模式的对照指纹图谱,采用此对照指纹图谱对 20 批冬虫夏草样本(S1-S20)及 2 批发酵虫草菌丝粉样本(S21-S22)进行相似度评价(图 4),20 批冬虫夏草样品的相似度均大于 0.90,2 批发酵冬虫夏草菌粉的相似度均低于 0.90

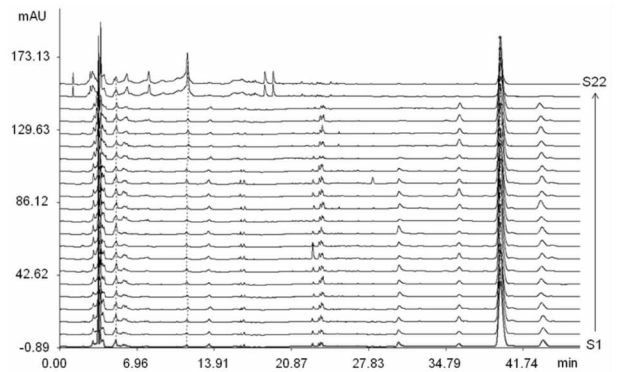


图 4 冬虫夏草醇提液指纹图谱叠加图

表 3 冬虫夏草醇提液指纹图谱相似度

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	1.000	S12	1.000
S2	1.000	S13	0.999
S3	1.000	S14	1.000
S4	1.000	S15	1.000
S5	1.000	S16	0.999
S6	0.999	S17	0.997
S7	1.000	S18	0.998
S8	0.999	S19	0.998
S9	1.000	S20	0.998
S10	0.999	S21	0.718
S11	0.998	S22	0.687

3.3 聚类分析

3.3.1 冬虫夏草水提液样品聚类分析 运用 SPSS 软件对 22 批冬虫夏草水提液样品共有峰峰面积色谱数据进行聚类分析,运用 ward 法,以欧式距离法作为样品相似度距离公式,结果见图 5。22 批样品被分为 2 类:Ⅰ类为冬虫夏草样品(S1-S20),Ⅱ类为发酵冬虫夏草菌粉(S21-S22)。

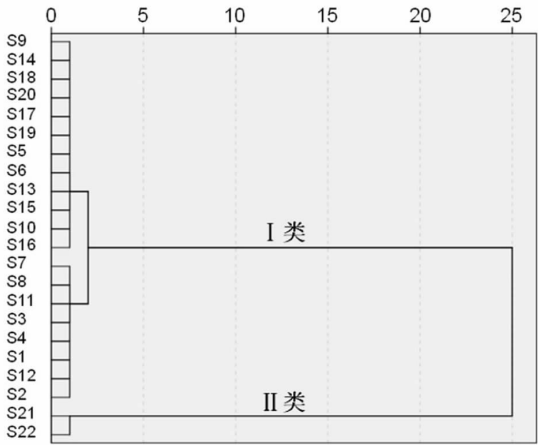


图 5 冬虫夏草水提液样品聚类分析树状图

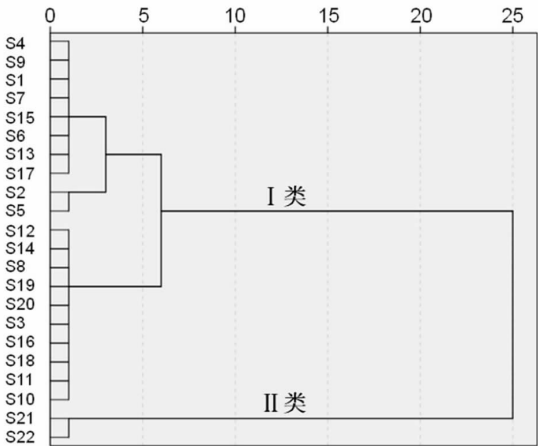


图 6 冬虫夏草醇提液样品聚类分析树状图

3.3.2 冬虫夏草醇提液样品聚类分析 运用 SPSS

软件对 22 批冬虫夏草醇提液样品共有峰峰面积色谱数据进行聚类分析,运用 ward 法,以欧式距离法作为样品相似度距离公式,结果见图 6。22 批样品被分为 2 类:Ⅰ类为冬虫夏草样品(S1-S20),Ⅱ类为发酵冬虫夏草菌粉(S21-S22)。

4 讨论

4.1 色谱条件优化 冬虫夏草水提液中存在大量大极性成分,在反向色谱模式下需要用 100% 水溶液做流动相才可有效分离,但常规反向色谱柱在纯水流动相条件下会造成色谱柱损坏,无法完成大极性成分分离工作。根据本观察组前期结果显示 Agilent ZORBAX SB-AQ 色谱柱在纯水条件下可以有效分析冬虫夏草中的大极性化合物,因此本实验选用了该款色谱柱作为分析柱^[20];流动相系统比较了水-乙腈系统和 0.1% 甲酸水溶液-乙腈系统,结果显示流动相中添加甲酸,有利于色谱峰的分离;同时也比较了不同柱温(25 ℃ 和 35 ℃)对色谱分离的影响,结果两者无明显区别,本文选择了室温 25 ℃ 作为实验条件;检测波长主要参照前期冬虫夏草水溶性指纹图谱文献报道,选择了 260 nm 作为检测波长。

冬虫夏草醇提液中醇溶性成分较多,本实验通过初步试验发现采用 Waters X-bridge 色谱柱及水-乙腈流动相系统即可对供试品成分进行较好的分离。通过比较柱温 25 ℃ 和 35 ℃,结果显示 35 ℃ 时色谱分离较好,因此选择其作为分析条件;检测波长采用 DAD 检测器对样品色谱图进行全波长分析,发现 280 nm 色谱峰较多,峰形较好,故选择 280 nm 作为检测波长。

4.2 冬虫夏草指纹图谱数据分析 通过比较 20 批冬虫夏草(S1-S20)和 2 批发酵虫草菌粉(S21-S22)水提液及醇提液相似度系数(表 2、表 3),可以发现 10 批野生冬虫夏草样品(S1-S10)、5 批市售野生冬虫夏草样品(S11-S15)和 5 批冬虫夏草繁育样品(S16-S20)在水溶性成分和醇溶性成分上均具有较好的一致性(相似度系数大于 0.93),均可有效区分发酵冬虫夏草菌粉样品(相似度系数小于 0.82)。进一步对 20 批冬虫夏草(S1-S20)和 2 批发酵虫草菌粉(S21-S22)水提液及醇提液共有色谱峰面积数据进行聚类分析结果(图 5、图 6),发现 20 批冬虫夏草药材包括 10 批野生采集样品、5 批市场采购样品和 5 批繁育样品在水提液色谱数据和醇提液色谱数据上均聚为一类,具有较好的一致性,同时和发酵冬虫夏草菌粉色谱数据又有明显的区分。本实验建立

的冬虫夏草水提液和醇提液指纹图谱方法可以从水溶性成分和醇溶性成分 2 个方面评价药材质量的品质,有助于提升冬虫夏草的全面质量控制水平。

参考文献

- [1] 陈璐, 万德光, 国锦琳. 冬虫夏草的本草新考[J]. 吉林中医药, 2014, 34(10): 1022-1023.
- [2] 董彩虹, 李文佳, 李增智, 等. 我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言[J]. 菌物学报, 2016, 35(1): 1-16.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115.
- [4] 李文佳, 董彩虹, 刘杏忠, 等. 冬虫夏草培植技术研究进展[J]. 菌物学报, 2016, 35(4): 375-387.
- [5] 尹定华, 陈仕江, 马开森. 冬虫夏草资源保护、再生及持续利用的思考[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 814-816.
- [6] 刘天平, 卓嘎, 郭健斌. 西藏冬虫夏草资源可持续利用探讨[J]. 西藏研究, 2010, 29(3): 114-120.
- [7] 吴树华, 叶愈青, 李强. 商品冬虫夏草的品质评价[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(7): 83-84.
- [8] 李水福. 冬虫夏草的品质亟待重视[J]. 中国药业, 2010, 19(10): 71-72.
- [9] 陈士林, 陈四保, 杨大坚, 等. 葛根高效液相指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 661-663.
- [10] 黄芳, 祝婧云, 梁新丽. 葛根药材中化学成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(12): 2789-2792.
- [11] 席梅, 王欣, 陆艳. 白芷有效成分含量测定及其指纹图谱研究

[J]. 世界中医药, 2016, 11(11): 2434-2436.

- [12] Liang Y Z, Xie P S, Chau F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines [J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(3): 410-421.
- [13] Liang X M, Jin Y, Wang Y P, et al. Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(11): 2033-2044.
- [14] 詹泽苹, 李华, 黄亮, 等. 冬虫夏草繁育品与野生品红外指纹图谱一致性评价[J]. 中国现代中药, 2016, 18(3): 312-315.
- [15] 武彦舒, 周丹蕾, 鄯丹, 等. 天然虫草与虫草菌丝体的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2212-2214.
- [16] 阎正, 张智慧, 于趁, 等. 冬虫夏草 HPCE 指纹图谱测定中样品的预处理方法[J]. 医学研究与教育, 2010, 27(2): 4-6.
- [17] 王冰, 李宁, 董婷霞, 等. 冬虫夏草中核苷类成分含量测定及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 952-956.
- [18] 高晓霞, 周伟平, 谢明容, 等. 西藏冬虫夏草水提液 HPLC 指纹图谱研究及核苷类成分测定[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(1): 44-51.
- [19] 王春云, 阎正, 苑若瑶, 等. 冬虫夏草的高效液相指纹图谱研究[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 260-265.
- [20] 钱正明, 李文庆, 王传喜, 等. 高效液相色谱定量分析比较 4 种虫草药材的核苷类成分[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2493-2499.

(2017-08-31 收稿 责任编辑: 徐颖)

(上接第 3132 页)

证候疗效指标与西医的能反应疾病本质特征的有关指标均能反应受试者病情的变化。同样研究慢性盆腔炎属瘀毒证且疗前血 WBC 异常患者的中医证候积分及主症下腹胀/刺痛、腰骶刺痛的积分差值与血 WBC 差值的相关性, 发现其 Pearson 相关比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。且其体征积分差值与中医证候积分差值的 Pearson 相关比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。慢性盆腔炎有血象变化者并不多, 故我们重点把能反应中医证候的证候积分与能反应西医疾病特征的体征积分做相关性研究, 2 者的 Pearson 相关比较, 差异有统计学意

义 ($P < 0.05$) 的。痔疮出血属瘀毒证者其中医证候积分与其能反应疾病特征的便血症状的 Pearson 相关以及其中医证候疗效及疾病疗效的 Spearman 相关比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示以 1 个中医证候带 3 个不同病种的疾病的以证为主, 证病结合的中药综合疗效评价模式有其科学性与可行性。

参考文献

- [1] 王吉耀. 内科学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2005.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.

(2017-10-09 收稿 责任编辑: 张文婷)