

冬虫夏草及人工菌丝体的核苷类成分的 HPLC研究

米莉莉,王智华,洪筱坤*
(上海中医药大学药学院,上海 200032)

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc. 为麦角科虫草属的药用真菌,为冬虫夏草菌的子座及其寄主蝙蝠蛾科虫草蝙蝠蛾 *Hepialus armoricanus* Oberthus等幼虫尸体的复合体,具有广泛的药理作用。核苷类成分为虫草有效成分之一,具有扩张心脏和外周血管的药效作用,其中尤以腺苷的作用为显著^[1~3]。《中华人民共和国药典》2000年版对冬虫夏草中腺苷规定,不得少于 0.010%。目前核苷类分析方法有 HPLC法^[4~6]、薄层色谱法^[7,8]、高效毛细管电泳法^[9~11]等。高效液相色谱法主要针对单个指标进行评估,如以腺苷为指标作含量测定^[5~7]。而本研究探讨 HPLC法对冬虫夏草一次进样在同一色谱条件下使核苷类成分得到理想分离的定性、定量分析方法。

1 材料与仪器

- 1.1 材料 腺苷、尿苷、鸟苷对照品 (Sigma公司);乙腈 (Fisher Scientific HPLC)实验所用样品来源见表 1
- 1.2 仪器: 2695型高效液相色谱仪 (Waters公司), Water 2996 PDA检测器; Sartorius 十万分之一分析天平

2 实验部分

- 2.1 色谱条件: 色谱柱: YMC-Polyamine柱 (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm);流动相: 乙腈 (A)-水 (B),梯度洗脱: 0 $\rightarrow$ 10 min, 90% A-10% B; 10 $\rightarrow$ 20 min, 85% A-15% B; 20 $\rightarrow$ 30 min, 80% A-20% B; 30 $\rightarrow$ 40 min, 70% -60% B; 40 min以后 60% A-40% B;流速: 1.0 mL/min;柱温: 28 $^{\circ}$ C;检测波长: 261.8 nm
- 2.2 对照品贮备液的制备: 精密称取腺苷 (adenosine) 25.29 mg,尿苷 (uridine) 51.17 mg,分别置于 25 mL的容量瓶,用 70% 乙醇溶解并定容至刻度作贮备液,精密称取鸟苷 (guanosine) 10.10 mg,置于 20 mL的容量瓶,用 70% 乙醇溶解并定容至刻度作贮备液。
- 2.3 供试品溶液制备: 精密称取样品粉末 0.1 g,置于 10 mL具塞试管,加 70% 乙醇 5 mL,超声提取

表 1 天然虫草与人工菌丝体 (粉)样品
Table 1 Natural *Cordyceps* and cultural mycelium

类型	编号	样品
人工菌丝体 (粉)	1	江西国药菌粉
	2	上海菌粉
	3	浙江万丰菌粉
	4	台湾得荣菌粉
	5	台湾金颖菌粉
	6	台湾生展菌粉
	7	山东菌粉
	8	长白山蛹虫草菌丝
天然虫草	9	青海玉树虫草
	10	西藏昌都虫草
	11	四川甘孜县虫草
	12	新疆阿尔泰山虫草
	13	四川凉山虫草
	14	西藏虫草类似品

- (15 min $\times$ 2), 4 000 r/min离心 10 min,取上清液移入 5 mL容量瓶,用 70% 乙醇定容至刻度,摇匀即得
- 2.4 标准曲线的制备: 分别精密吸取腺苷、尿苷、鸟苷对照品贮备液适量,置于 5 mL的容量瓶配成混合对照品溶液,精密吸取混合对照品溶液适量分别用 70% 乙醇稀释成一系列浓度的溶液,每次进样 20 μ L,测定腺苷、尿苷、鸟苷的峰面积,以进样量 (X)对色谱峰面积 (Y)绘制标准曲线,得回归方程 腺苷: $Y = -313.6052 + 2876.71X$, $r = 0.9999$,线性范围为 47.197~ 606.96 ng;尿苷: $Y = 6221.204 + 2233.597X$, $r = 0.9999$,线性范围为 127.327~ 1637.44;鸟苷: $Y = 1080.271 + 2074.785X$, $r = 0.9999$,线性范围为 47.12~ 606 ng
- 2.5 精密度试验: 取混合对照品溶液连续进样 5次,每次 10 μ L,按色谱条件测定,色谱峰面积,结果腺苷、尿苷、鸟苷的 RSD 分别为 1.23%, 0.56%, 0.95%。
- 2.6 重现性试验: 取 9号样品,分别精密称取 5份,每份 0.1 g,按供试品溶液制备方法制备供试液,按色谱条件进行测定,结果腺苷、尿苷、鸟苷的 RSD 分别为 1.01%, 0.58%, 1.48%。
- 2.7 回收率的测定: 分别精密称取已知含量的虫草

* 收稿日期: 2002-12-20
作者简介: 米莉莉 (1971-),女,广西人,讲师,现在上海中医药大学攻读药理学博士学位,研究方向为中草药质量标准控制。
Tel (021) 54231358

样品(江西国药菌粉,批号为 0202026)共 5份样品,每份约 0.05 g,精密加入已知量的对照品溶液适量,按供试品溶液制备项下测定,并计算出腺苷、尿苷、鸟苷的平均回收率分别为 99.44%, 98.22%, 95.67%, *RSD*分别为 0.34%, 2.44%, 0.94%。

2.8 样品测定:样品(除菌粉外)粉碎后过 50目筛,30℃真空干燥 6 h,按供试品溶液制备方法制备样品供试液,溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液进样,采用标准曲线法计算样品中腺苷、尿苷、鸟苷的含量。天然虫草和人工虫草中核苷类成分色谱图见图 1,含量测定结果见表 2。

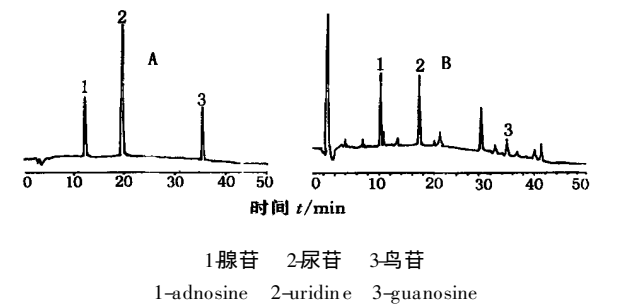


图 1 混合对照品(A)和天然虫草(B, 10号样品)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standard substance (A) and natural *Cordyceps* (No. 10, B)

表 2 虫草样品中核苷类成分的含量测定结果(*n*= 3)

Table 2 Contents of nucleosides in *Cordyceps* (*n*= 3)

样品	腺苷 <i>I</i> /(mg ⁺ g ⁻¹)	尿苷 <i>I</i> /(mg ⁺ g ⁻¹)	鸟苷 <i>I</i> /(mg ⁺ g ⁻¹)	总和 <i>I</i> /(mg ⁺ g ⁻¹)
1	3.38	3.80	3.09	10.27
2	1.61	2.31	1.04	4.96
3	3.04	2.75	2.29	8.08
4	2.44	3.13	1.76	7.33
5	1.08	0.14	—	1.22
6	0.72	0.51	0.24	1.47
7	0.87	0.60	0.33	1.80
8	0.67	0.45	—	1.12
9	0.20	0.58	0.09	0.87
10	0.31	0.56	0.09	0.96
11	0.30	0.42	0.08	0.80
12	0.07	0.07	—	0.14
13	0.27	0.26	0.08	0.61
14	—	0.37	0.02	0.39

3 讨论

3.1 人工菌丝体中所测得的核苷类成分含量明显高于天然虫草,其中鸟苷的含量更是远远高于天然虫草。

3.2 以核苷类成分总和计算结果可知,人工菌丝体中以 1号江西国药菌粉核苷类成分含量最高,其次为 3号浙江万丰菌粉、4号台湾得荣菌粉;天然虫草以 10号西藏昌都虫草核苷类成分含量最高,其次为 9号青海玉树虫草、11号四川甘孜虫草。

3.3 本研究采用梯度洗脱技术将核苷类成分一次进样即在给定的色谱条件下获得理想分离,并将其定量分析。实验结果表明,该法操作简便,灵敏度高、重现性。

References

[1] Guo H B, Yang Z M. Advances in pharmacology of *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(3): 231-233.

[2] Zhao Y Q, Yi M, Cheng L J. The summary of chemical research in *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(12): 950-953.

[3] Ma D Y, Li, Ji H, *et al.* Advances in pharmacology of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(6): 455-458.

[4] Gong F, Peng Y Q, Cui H, *et al.* Hyphenated chromatography applied to multicomponent determination of *Cordyceps sinensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(3): 214-217.

[5] LI X Q, Wang Y, Bao T T. Determining the content of adenosine in *Cordyceps sinensis* by RP-HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(1): 12-14.

[6] Cheng Y. The determination of contents of adenosine from *Cordyceps hawkesii* Ging by HPLC [J]. *J Traditi Chin Med Jiangxi Coll* (江西中医学院学报), 1998, 10(1): 32-33.

[7] Guo C, Zhu J, Zhang C, *et al.* The determination of contents of adenosine and *Cordyceps* by HPLC. [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(4): 236-237.

[8] Huang H B, Jiang Y Q. Study on quality standardization for Chongcao Oral Liquid [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1999, 21(5): 228-230.

[9] Chen M, Zhang R. Study on the determination method of contents of nucleosides from *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1995, 17(4): 40-41.

[10] Li S P, Li P, Ji H, *et al.* The contents and their change of nucleosides from natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(6): 436-439.

[11] Li H Y. The determination of effective contents from cultural *Cordyceps sinensis* [J]. *J Hebei Univ* (河北大学学报), 2001, 21(3): 277-279.