

金水宝胶囊中发酵虫草菌粉多糖的指纹图谱研究

朱卫丰¹, 赵加茜¹, 刘小林¹, 管咏梅¹, 金 晨¹, 杨 明², 陈丽华^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西国药有限责任公司, 江西 南昌 330052

摘要: 目的 建立金水宝胶囊发酵虫草菌粉多糖的指纹图谱。方法 沸水回流提取金水宝胶囊中的发酵虫草菌粉多糖, 经酸水解和 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生化后采用 HPLC 法分析, 色谱条件为 Phenomenex OOG-4252-EO C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 进样量 20 μL, 检测波长 250 nm, 柱温 30 ℃。结果 对组成发酵虫草菌粉多糖的 11 种单糖成分进行鉴别, 并建立了发酵虫草菌粉多糖指纹图谱。通过指纹图谱分析 10 批金水宝胶囊中各单糖成分, 相似度均大于 0.999, 无显著性差异。结论 建立的发酵虫草菌粉多糖指纹图谱操作简单, 专属性强, 重复性好, 能够客观评价金水宝胶囊的质量。

关键词: 虫草多糖; 发酵虫草菌粉; 金水宝胶囊; 指纹图谱; 甘露糖; 氨基葡萄糖; 核糖; 鼠李糖; 葡萄糖醛酸; 半乳糖醛酸; 葡萄糖; 半乳糖; 木糖; 阿拉伯糖; 岩藻糖

中图分类号: R283.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3322-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.010

Study on fingerprint of polysaccharides from Jinshuibao Capsule

ZHU Wei-feng¹, ZHAO Jia-qian¹, LIU Xiao-lin¹, GUAN Yong-mei¹, JIN Chen¹, YANG Ming², CHEN Li-hua¹

1. Key Laboratory for Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi National Medicine Co., Ltd., Nanchang 330052, China

Abstract: **Objective** To establish a polysaccharide fingerprint analysis method for identifying Jinshuibao Capsule. **Methods** Polysaccharide from fermentation *Cordyceps* powder in Jinshuibao Capsule was extracted by boiling water, hydrolyzed by acid, and precolumn derivatization method for 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP), analyzed by HPLC. The chromatographic conditions were Phenomenex OOG-4252-EO C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), eluting with acetonitrile-0.05 mol/L phosphate buffer salt gradient, and the detection wavelength was 250 nm. The column temperature was 30 ℃. **Results** Eleven monosaccharide components that made up the fermentation *Cordyceps* powder were identified and established the fingerprint of fermentation *Cordyceps* powder polysaccharide. Ten batches of monosaccharide components in Jinshuibao Capsule were analyzed by fingerprints. The similarity was greater than 0.99 with no significant difference. **Conclusion** The fingerprints of fermentation *Cordyceps* powder were simple, specific and reproducible, and the quality of Jinshuibao Capsule is evaluated objectively.

Key words: *Cordyceps* polysaccharide; fermentation *Cordyceps* powder; Jinshuibao Capsule; fingerprints; mannose; glucosamine; ribose; rhamnose; glucuronic acid; galacturonic acid; glucose; galactose; xylose; arabic candy; fucose

金水宝胶囊的主要成分发酵虫草菌粉 (Cs-4) 是由新鲜冬虫夏草中分离得到的麦角菌科真菌蝙蝠蛾拟青霉菌经液体发酵培养所得菌丝体的干燥粉末^[1-2]。研究报道发酵虫草菌粉所含化学成分与天然冬虫夏草相似, 均具有补肺肾、益精气的功效, 临床研究表明, 冬虫夏草有调节人体免疫系统、抗肿瘤、调节肾功能、抗氧化、调节心血管功能等生理

活性^[3-6]。虫草多糖作为发酵虫草菌粉主要活性物质之一, 在调节免疫功能、抗肿瘤、抗氧化等方面发挥着重要作用。以发酵虫草菌粉为原料药的金水宝胶囊已经实现工业化生产, 《中国药典》2015 年版规定金水宝胶囊以腺苷和麦角甾醇为定量测定标准^[7], 而发酵虫草菌粉多糖作为发酵虫草菌粉重要的活性物质之一, 目前尚未作为发酵虫草菌粉质量

收稿日期: 2017-07-23

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-JX-39); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09201-201-30); 江西省高等学校科技落地计划项目 (产学研合作 KJLD13061)

作者简介: 朱卫丰, 女, 教授, 从事中药制剂学与制剂新技术研究。Tel: 13576056015 E-mail: zwf0322@126.com

*通信作者 陈丽华, 女, 教授, 从事中药制剂学与制剂新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: chllly98@163.com

控制的测定目标物^[8]。因此本实验采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生-HPLC 法建立发酵虫草多糖指纹图谱,以指纹图谱为基础分析 10 批金水宝胶囊中发酵虫草多糖的各单糖成分的相似度,并用相似度评价分析。该法操作简单,专属性强,重复性好,能够客观评价金水宝胶囊的质量。

1 仪器、材料和试剂

1.1 仪器

PHS-3C 型 pH 计 (上海电科学仪器股份有限公司); EPED-ESL-10TH-超纯水器 (南京易普达科技发展有限公司); 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); 电子天平 (东华计量测试研究所); Agilent-1260 (美国安捷伦公司); XW-80A-漩涡混合器 (上海青浦沪西仪器厂); HH-S4 二列四孔水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司); 数显鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备); RE-5205 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Millipore 超滤仪 (深圳中联科泰科技有限公司)。

1.2 材料与试剂

无水乙醇 (天津福晨化学试剂厂); 三氯甲烷、PMP、硫酸、甲醇购于国药集团化学试剂有限公司; 乙腈 (色谱级); 对照品阿拉伯糖 (批号 20160109)、半乳糖 (批号 20160311)、鼠李糖 (批号 20160315)、甘露糖 (批号 20160425)、盐酸氨基葡萄糖 (批号 2016060)、核糖 (批号 20160304)、无水葡萄糖 (批号 20150925)、木糖 (批号 20160511) 半乳糖醛酸 (批号 20160320)、岩藻糖 (批号 20160615) 购于上海金惠生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。葡萄糖醛酸 (批号 20160515) 购于中国食品药品检定研究院,质量分数均大于 98%,金水宝胶囊 (批号 15050347、15110711、1601005、16020075、16030133、16040185、16050229、16070345、16080393、16090394,编号 S1~10) 购于江西国药有限责任公司,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取 5 mg 各对照品 (甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖) 超纯水定容至 10 mL,精密量取 0.2 mL 置于 10 mL 玻璃管中,依次加入 0.3 mol/L NaOH 0.2 mL、0.5 mol/L PMP 0.2 mL 甲醇溶液混匀,置于 70 °C 的恒温水浴锅中反应 90 min,反应结束后取出并冷却至室温,加入 0.3

mol/L HCl 0.2 mL 中和,混匀后加入 5 mL 氯仿涡旋 2 min,静置 5 min,吸取下层液弃去,如此萃取 3 次后上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过即得单糖衍生物溶液^[9],所得溶液即为混合对照品溶液。

2.1.2 空白样品的制备 取双蒸水 0.2 mL,按照“2.1.1”项下方法操作,即得空白对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取金水宝胶囊的原料药发酵虫草菌粉 40 g,用 8 倍量沸水回流提取 2 次,每次 2 h,趁热滤过,合并滤液,以 4 000 r/min 的转速离心 15 min,取上清液,弃去沉淀。将上清液浓缩,加 3 倍体积的无水乙醇混合均匀后置于 4 °C 冰箱中静置 8 h,取出后以 4 000 r/min 的转速离心 15 min 后收集沉淀,即为粗多糖。将粗多糖溶于双蒸水中得粗多糖溶液,加入等体积的 *Sevage* 试剂 (三氯甲烷-正丁醇 4:1) 混合后,吸取上清液,重复 3 次。将得到的上清液用 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 95%乙醇,8 000 r/min 离心,取沉淀溶于水。重复 2 次后,将溶液经冷冻干燥,即得发酵虫草菌粉多糖^[10]。

分别精密称取多糖提取物 20 mg,置于安瓿瓶中,加入 2 mL 1 mol/L 的硫酸,置于数显鼓风干燥箱中水解 8 h,水解温度为 100 °C。取出后冷却至室温,2 mol/L NaOH 中和至 pH 值为 7,再用 10 000 r/min 高速冷冻离心机离心 10 min,取其上清液定容至 5 mL,即得多糖水溶液^[11]。精密吸取多糖水解液 0.2 mL 置于 10 mL 玻璃管中,按照“2.1.1”项下方法进行衍生化反应,所得溶液即为供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex OOG-4252-EO C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min,检测波长 250 nm; 进样量 20 μL,流动相梯度洗脱系统见表 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 取空白样品、混合对照品和供

表 1 乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗脱系统

Table 1 Acetonitrile-0.05 mol/L phosphoric acid buffer salt elution system

t/min	乙腈/%	0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液/%
0~15	17	83
30~31	17~19	83~81
31~37	19	81
37~40	19~17	81~83
40~55	17	83

试品溶液,在“2.2”项色谱条件下进样 20 μL 。记录色谱图,图谱显示供试品溶液 11 个主峰与对照品溶液保留时间一致,空白溶液只有 PMP 峰,在甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖衍生物的出峰时间处没有对应峰,说明空白溶液对发酵虫草菌粉多糖衍生物中的其他组分没有干扰。见图 1。

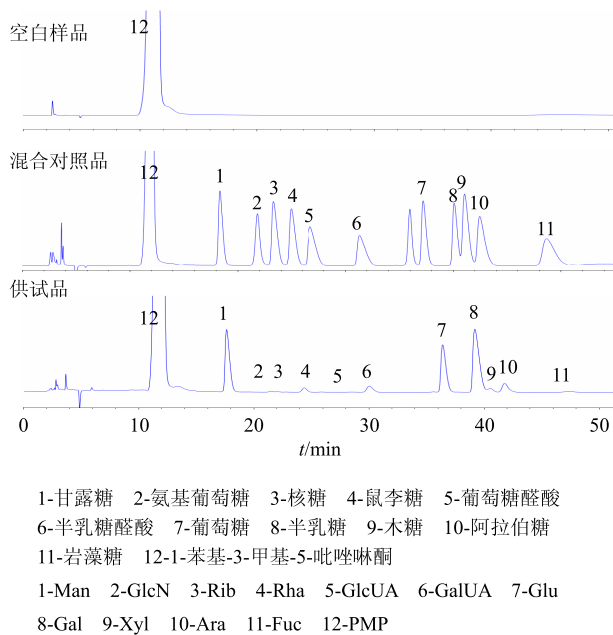


图 1 发酵虫草菌粉多糖 PMP 衍生物 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of PMP derivatives of fermentation Cordyceps powder

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项混合对照品溶液 200 μL , 分别进样 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 μL , 测定不同体积对应的峰面积, 用峰面积 (Y) 对各单糖的质量浓度 (X) 回归, 得标准曲线, 其回归方程见表 2。由表 2 可知, 相对应的单糖衍生物的线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密称取发酵虫草菌粉多糖适量, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 进样 5 次, 每次进样 20 μL , 记录色谱图, 以对称因子接近 1、分离度较好的葡萄糖峰为参照峰, 计算样品衍生物中共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 5%, 符合药典规定的要求, 说明仪器具有良好的精密度。

2.3.4 稳定性试验 精密称取发酵虫草菌粉多糖适量, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 分别

表 2 11 种单糖标准曲线

Table 2 Standard curves of 11 monosaccharides

单糖	标准曲线	r	线性范围/ μg
甘露糖	$Y=10\,847\,X-15.3$	0.999 9	0.66~3.94
氨基葡萄糖	$Y=7\,669.5\,X+132.87$	0.999 9	0.69~4.16
核糖	$Y=11\,219\,X-1.66$	0.999 9	0.68~4.08
鼠李糖	$Y=8\,522\,X+334.8$	0.999 8	0.71~4.27
葡萄糖醛酸	$Y=8\,804.5\,X+97.5$	0.999 6	0.67~3.94
半乳糖醛酸	$Y=8\,215.9\,X+24.28$	0.999 6	0.66~3.96
葡萄糖	$Y=9\,410\,X-174.16$	0.999 4	0.75~4.47
半乳糖	$Y=9\,683\,X+185.33$	0.999 7	0.67~4.00
木糖	$Y=12\,523\,X-180.98$	0.999 9	0.76~4.54
阿拉伯糖	$Y=12\,723\,X-271.46$	0.999 5	0.65~3.90
岩藻糖	$Y=10\,567\,X+375.1$	0.999 7	0.68~4.08

在 1、3、5、15、24 h 进样检测, 每次进样 20 μL , 记录色谱图, 以对称因子接近 1、分离度较好的 7 号峰葡萄糖为参照峰, 计算样品衍生物中共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 5%, 符合药典规定的要求, 说明多糖溶液在 0~24 h 具有良好的稳定性。

2.3.5 重复性试验 精密称取发酵虫草菌粉多糖适量, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 重复此操作 5 次, 分别进样, 每次进样 20 μL , 记录每份样品的色谱图, 以对称因子接近 1、分离度较好的 7 号峰葡萄糖为参照峰, 计算样品衍生物中共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 11 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 5%, 符合药典规定的要求, 说明方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取发酵虫草菌粉多糖适量, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 供试品溶液中加入适量的甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖衍生物, 计算各单糖衍生物的回收率。测定回收率在 95%以上, RSD 值分别为 0.82%、0.84%、1.31%、3.11%、0.92%、1.06%、1.38%、0.28%、0.95%、0.96%、0.56%, 均小于 5%, 表明方法符合测定要求。

2.4 发酵虫草菌粉多糖指纹图谱的建立及相似度分析

分别精密称取 10 批次金水宝胶囊提取的发酵

虫草菌粉多糖 20 mg, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液、按“2.2”项色谱条件进样, 得到的色谱图导入中国药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)(均值法)”, 选择 7 号峰葡萄糖为参照(S)峰, 得到发酵虫草菌粉水解多糖的指纹图谱, 并进行相似度评价, 见图 2 和表 3。由表 3 可知, 10 批的金水宝多胶囊的相似度都大于 0.990, 无显著性差异, 可以应用于对金水宝胶囊的质量评价。

3 讨论

利用紫外分光检测器对虫草多糖的酸水解衍生物进行全波长扫描, 样品在 250 nm 左右各峰有最大

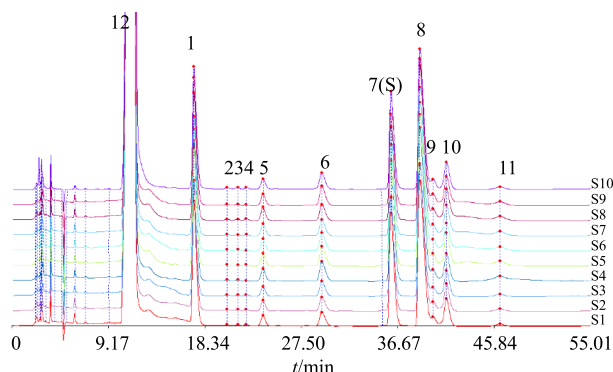


图 2 发酵虫草菌粉多糖指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of fermentation *Cordyceps* powder

表 3 10 批金水宝胶囊样品相似度结果

Table 3 Similarity of 10 batches of Jinshuibao Capsule

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000										0.999
S2	0.998	1.000									0.997
S3	0.997	0.996	1.000								0.998
S4	0.999	0.999	0.999	1.000							0.999
S5	0.999	0.999	0.998	0.997	1.000						0.999
S6	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	1.000					0.998
S7	0.995	0.994	0.999	0.998	0.999	0.996	1.000				0.999
S8	0.997	0.997	0.998	0.995	0.998	0.996	0.997	1.000			0.998
S9	0.999	0.999	0.999	0.998	0.997	0.999	0.999	0.995	1.000		0.999
S10	0.998	0.998	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.998	0.998	1.000	0.999
对照	0.999	0.997	0.998	0.999	0.999	0.998	0.999	0.998	0.999	0.999	1.000

吸收, 故选择 250 nm 为液相检测波长。实验中比较了 20、25、30、35 °C 柱温条件各单糖分离效果, 温度越低, 各单糖不易分离, 色谱峰易重叠, 综合考虑, 选择柱温为 30 °C。发酵虫草菌粉多糖各单糖极性线性不同, 选择线性洗脱时, 很难把多糖的各个组分完成分离开来, 故而采用梯度洗脱的方法。实验中选择不同的流动相体系进行梯度洗脱, 综合比较各个色谱峰的分离度和对称因子, 最终选择乙腈-磷酸盐缓冲液作为流动相, 并确定最佳梯度洗脱条件。

本实验采用 HPLC 法对金水宝胶囊的主要成分发酵虫草多糖进行检测分析, 其色谱图导入中国药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)(均值法)”进行相似度评价。由分析结果可知, 发酵虫草菌粉多糖主要含有甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖

醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖 11 种单糖成分, 通过发酵虫草多糖指纹图谱比较 10 批金水宝胶囊虫草多糖各单糖成分, 批次之间的相似度达到 99%, 表明了金水宝胶囊的主要成分发酵虫草菌粉具有较好的稳定性。本方法直观、简便, 专属性强, 重复性好, 可用于金水宝胶囊的质量控制和评价。

参考文献

- [1] 王 晓, 张 萍, 魏 锋, 等. 发酵虫草菌粉及制剂质量控制方法研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(10): 63-66.
- [2] 陈丽华, 岳国超, 管咏梅, 等. 星点设计-效应面法优化发酵虫草菌粉全粉末压片工 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(11): 192-1196.
- [3] Wang M, Meng X Y, Yang R L, *et al.* Cordyceps militaris polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice [J].

- Carbohydr Polym*, 2012, 89(2): 461-466.
- [4] Chen W, Yuan F, Wang K, *et al*. Modulatory effects of the acid polysaccharide fraction from one of anamorph of *cordyceps sinensis* on *ana-1* cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 739-745.
- [5] 邹赢铎, 陈雅琳, 储智勇, 等. 冬虫夏草成分及活性研究进展 [J]. 海军医学杂志, 2014, 35(1): 83-85.
- [6] Zhang Y, Yang M, Gong S, *et al*. *Cordyceps sinensis* extracts attenuate aortic transplant arteriosclerosis in rats [J]. *J Surg Res*, 2012, 175(1): 123-130.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 黄慧莲, 杨敏娟, 管咏梅, 等. 近 5 年发酵虫草菌粉的化学成分和临床应用研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(10): 2242-2247.
- [9] 秦垂新, 曹子丰, 黄绮敏, 等. 黄精多糖水解物柱前衍生 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 65-66.
- [10] 张清华. 发酵虫草菌粉多糖的分离鉴定及脂质体的制备研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2014.
- [11] 闫景坤, 吴建勇, 金 蓓, 等. 酸水解冬虫夏草胞外多糖的分子质量变化及动力学研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 82-85.