

虫草菌丝中3种有效成分含量测定研究

邓亮, 母多, 徐兴梦, 白祥祥, 施建莲, 郭如芳, 吕昭文, 余文怡, 郭亚东*

(昆明医科大学药学院 暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要:探讨了虫草菌丝中甘露醇、多糖和腺苷的含量测定. 采用剩余滴定法测定甘露醇含量, 硫代硫酸钠滴定液滴定; 比色法测定多糖含量, 以无水葡萄糖作对照; 高效液相色谱法测定腺苷含量, 采用 Shim-pack-C18 色谱柱, 以甲醇-水为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 260 nm. 结果表明: 生产条件不同所得到的虫草菌丝中甘露醇、多糖和腺苷的含量没有相关性. 以单一成分作为虫草菌丝质量控制指标不能全面反映其质量, 选择多指标成分进行含量测定, 能够更好地控制虫草菌丝质量.

关键词: 虫草菌丝; 甘露醇; 多糖; 腺苷; 测定

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2016)06-0063-03

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2016.06.014

Study on the Determination of Three Efficient Components in *Cordyceps Mycelium*

DENG Liang, MU Duo, XU Xingmeng, BAI Xiangxiang, SHI Jianlian, GUO Rufang, LV Zhaowen, YU Wenyi, GUO Yadong*

(College of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural

Products, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: In order to explore the content determination of Mannitol, Polysaccharides and Adenosine in *Cordyceps mycelia*, we used the residual titration and Sodium thiosulfate solution as titrant to determine the mannitol content; the colorimetric method and compared with the dextrose anhydrous as control to determine the polysaccharide content and a HPLC method to determine the adenosine content by adopting the Shim-pack-C18 chromatographic column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-water, and the flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 ℃, detection wavelength of 260 nm. The result showed that the content of mannitol, polysaccharides and adenosine in *Cordyceps mycelium* obtained by different production conditions has no correlation. With single component as the *Cordyceps mycelium* quality control indexes can not fully reflect the quality of *Cordyceps mycelium*, while with content determination of multi-index constituents can better control the quality of *Cordyceps mycelium*.

Key words: *Cordyceps mycelium*; mannitol; polysaccharides; adenosine; determination

虫夏冬草 [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc, 又名虫草] 是我国特产的一种传统名贵中药材, 主要产于西藏、青海、云南和四川等地的高寒山区. 目前, 由于功能食品的大量开发和应用, 使得供需矛盾日益突出. 近年来, 人们通过以冬虫夏草菌发酵, 从而得到虫草菌丝体, 其药理研究表明^[1], 虫草菌丝具有与天然虫草相似的功效, 用虫夏草菌丝体生产各种功能食品, 可以大大降低

成本, 并满足市场需要.

冬虫夏草富含大量对人体有益的有机物质及多种微量元素. 虽然在不同人工培养条件下, 得到的虫草菌丝和不同产地生长的天然冬虫夏草含有的各成分含量有差别, 但是这些成分种类总体上保持基本不变, 其主要含有以下几类物质: 核苷类^[2-4]、多糖类^[5]、氨基酸类^[6]、甘露醇^[7]等. 而现行《中华人民共和国药典》^[8] 只收

收稿日期: 2016-09-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31400303); 昆明医科大学大学生创新基金资助项目(2016060); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2015C016Y).

作者简介: 邓亮(1979—), 女, 湖北恩施人, 讲师, 主要从事药物分析研究.

* 通讯作者: 郭亚东(1960—), 男, 山西晋城人, 教授, 主要药物分析研究, E-mail: yadongkmmc@163.com.

载了冬虫夏草,且质量标准中只测定腺苷含量.此外,中药的特点是多组分共同发挥药理作用.所以本文对不同发酵条件生产的虫草菌丝测定了腺苷、甘露醇和多糖含量,以了解在不同条件生产的产品中,这3种有效成分的含量是否具有相关性,为更好地开发虫草菌丝产品提供依据.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Agilent1200 高效液相色谱仪;超声提取器(HS-10260D, 250 W, 50 KHz);电子天平(梅特勒-托利多 AL204).

腺苷对照品购自中国药品生物制品研究院;甲醇为色谱纯(美国 Merck 公司);水为超纯水;无水葡萄糖购自药店;其他试剂均为分析纯.

虫草菌丝样品由云南大学云南省微生物研究所张烁教授提供.

1.2 色谱条件

色谱柱: Shim-pack-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: $V(\text{甲醇}): V(\text{水}) = 10:90$, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm.

1.3 对照品溶液的配制

精称腺苷对照品 5 mg, 置于 10 mL 容量瓶, 用蒸馏水溶解后定容到刻度, 从中取 2.0 mL 置于 10 mL 容量瓶, 用蒸馏水稀释到刻度, 得到质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品溶液.

1.4 样品测定方法

1.4.1 甘露醇含量测定

参照《中华人民共和国药典》^[8] 中百令胶囊的方法测定甘露醇的含量. 取本品约 1 g, 精称后放入 150 mL 圆底烧瓶中, 精加乙醇 100 mL, 称定质量, 加热回流 2 h, 放冷. 用乙醇补足减失的质量, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置碘瓶中, 精密加入高碘酸钠溶液 50 mL, 置水浴上加热 15 min, 放冷, 加碘化钾试液 10 mL, 密塞, 放置 5 min, 用硫代硫酸钠滴定液 (0.05 mol/L) 滴定, 快到终点时, 加入淀粉指示液 1 mL, 再滴定至蓝色消失, 空白校正. 硫代硫酸钠滴定液 (0.05 mol/L) 对甘露醇 ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) 的滴定度为 0.9109 mg.

1.4.2 多糖含量测定

参照《中华人民共和国药典》^[8] 中枸杞子的方法测定多糖含量. 取无水葡萄糖对照品 25 mg, 精称

后放入 250 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释到刻度, 摇匀, 即得 (每 1 mL 中含无水葡萄糖 0.1 mg).

精密量取对照品溶液 5 份, 体积为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置具塞试管中, 并加水补至 2.0 mL, 各精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速精密加入硫酸 5 mL, 再摇匀, 放置 10 min, 然后置 40 °C 水浴中保温 15 min, 取出后迅速冷却至室温, 以相应的试剂为空白, 于 490 nm 测定波长处, 测定其吸光度, 并以 c 为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线并计算回归方程为 $y = 4.78x + 0.021$.

取本品约 0.5 g, 精称, 加乙醚 100 mL, 加热回流 1 h, 静置, 放冷, 小心弃去乙醚液, 残渣置水浴上挥尽乙醚. 加入 80% (体积分数, 下同) 乙醇 100 mL, 加热回流 1 h, 趁热滤过, 滤渣与滤器用热 80% 乙醇 30 mL 分次洗涤, 滤渣连同滤纸置烧瓶中, 加水 150 mL, 加热回流 2 h. 趁热滤过, 用少量热水洗涤滤器, 合并滤液与洗液, 放冷, 移至 250 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 准确量取 1 mL, 置具塞试管中, 加水 1.0 mL, 依据标准曲线制备项下的办法, 从“各精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL”起, 然后测定吸光度, 按回归方程计算供试品溶液中所含葡萄糖的质量 (mg), 即得.

1.4.3 腺苷测定

参照《中华人民共和国药典》^[8] 中虫夏冬草的方法测定腺苷含量. 采用高效液相色谱法, 取本品粉末约 1.0 g, 精称后放入 150 mL 带塞锥形瓶中, 准确加入蒸馏水 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用蒸馏水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 进样 10 μL, 按外标法计算即得.

2 结果与讨论

在 1.2 项下设定的色谱条件下, 对样品和对照品进行测定, 其色谱图见图 1.

2.1 腺苷测定工作曲线

取 1.3 项下的对照品溶液, 稀释成系列对照液: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.10 mg/mL 各进样 10 μL, 记录色谱图, 以峰面积为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标, 绘制工作曲线并按最小二乘法, 得回归方程为 $Y = 727\,568X - 38\,345$, 相关系数 $r = 0.9958$.

2.2 腺苷测定的精密度和重复性

取质量浓度为 0.03 mg/mL 的对照品溶液, 重

复进样 6 次,进样量 10 μ L,记录峰面积,计算 *RSD* 为 0.42%。精密称取同一样品 6 份,按 1.4.3 方法处理样品,各进样 10 μ L,记录峰面积,计算 *RSD* 为 0.66%。

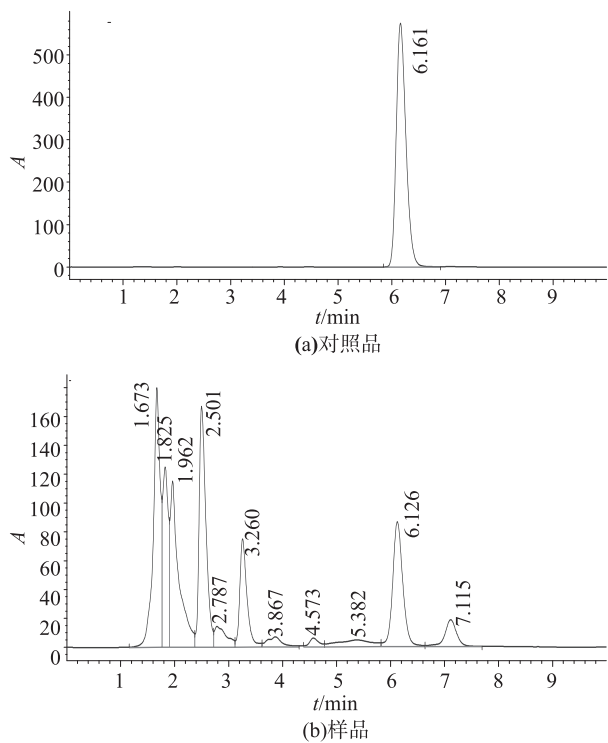


图1 对照品和样品色谱图

2.3 回收率试验

精密称取 0.5 g 已经测定含量的样品 6 份,各加入质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液 1 mL,按 1.4.3 进行样品前处理,进样量 10 μ L,记录峰面积,计算其平均回收率为 97.8%,*RSD* 为 4.4%

2.4 样品测定

按设计的方法分别测定了 7 个样品中甘露醇、多糖和腺苷的含量,测定结果见表 1。

表 1 样品测定结果

样品序号	甘露醇	多糖	腺苷
1	51.00	35.20	1.32
2	123.70	34.10	0.74
3	98.20	32.60	0.79
4	21.80	41.20	1.30
5	37.90	16.40	0.68
6	80.00	25.80	2.91
7	141.90	31.50	0.64

3 结论

在腺苷测定中,药典方法采用磷酸盐缓冲液做流动相,而本实验中不用磷酸盐,只用甲醇和水作为流动相,对色谱柱具有较好的保护作用,峰型很好,且精密度和重复性都能满足实验要求。

从 7 个样品的 3 种有效成分含量测定的结果分析,多糖的含量很稳定,多数含量在 30 mg/g 左右,含量最高的与含量最低的仅相差 2.5 倍;而甘露醇和腺苷的最高含量与最低含量分别相差 6.5 倍和 4.5 倍.说明虫草菌丝的生产条件不同,所得产品对多糖含量影响较小,而对甘露醇和腺苷的含量则影响较大。

7 个样品中含量最高的分别是:甘露醇 7 号样品,多糖 4 号样品,腺苷 6 号样品;含量最低的则分别是:甘露醇 4 号样品,多糖 5 号样品,腺苷 7 号样品.由此可见,这 3 种有效成分的含量多少在 7 个样品中并没有相关性,多种因素都会影响其有效成分的含量,并且虫草菌丝发挥作用是多种成分协同作用的结果,仅以单一成分作为质量控制指标不能全面反映它的质量,因此,目前大都选择多指标成分进行含量测定,才能够更好地控制其质量。

[参考文献]

[1] 卢玉兰,翁开敏.冬虫夏草的药理作用研究[J].中国药师,2003,6(6):371-372.

[2] 郭亚东,张萍,李璠,等.高效液相色谱法测定冬虫夏草及其代用品中腺苷含量[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):89-91.

[3] 范志华,汤卫华,林霖.HPLC 法测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量[J].现代食品科技,2007,23(7):94-97.

[4] 常正娇,韩萍,刘利娥,等.杂粮蛹虫草菌丝共生体中虫草素的优化提取及测定[J].食品工业科技,2016,37(7):237-242.

[5] 白云娥,王毅,刘许媛.冬虫夏草、亚香棒虫草中多糖的含量测定[J].中国医院药学杂志,2001,21(1):19-21.

[6] 郭亚东,杨敏,张萍.冬虫夏草中甘露醇和氨基酸的含量测定[J].昆明师范高等专科学校学报,2007,29(4):35-36.

[7] 蔡仲军,尹定华,黄天福,等.不同产地冬虫夏草甘露醇含量比较[J].中国药房,2003,14(8):505-507

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药工业出版社,2015:115-832.