

雪峰虫草高效液相色谱指纹图谱研究

秦 优^{1,2}, 陈 林², 梁雪娟^{2,3}, 糜亚男^{1,2}, 肖 娟², 张水寒^{1,2,3*}

(1.湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2.湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南 长沙 410013;
3.湖南省 2011 数字中医药协同创新中心, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 建立雪峰虫草药材的高效液相色谱指纹图谱, 为评价其质量提供依据。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为月旭 AQ-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长 260 nm; 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。结果 建立了 11 批雪峰虫草药材高效液相色谱指纹图谱, 确定共有峰 15 个, 采用对照品结合 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对 7 个特征峰进行了指认, 并采用相似度分析、主成分分析、聚类分析的方法对指纹图谱进行了分析。结论 建立雪峰虫草高效液相指纹图谱方法简便、可靠且重复性好, 为雪峰虫草的质量控制提供了有效的手段。

[关键词] 雪峰虫草; 高效液相色谱; 指纹图谱; 质量控制; 聚类分析度; 相似度分析

[中图分类号] R284.1

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.013

HPLC Fingerprint of *Ophiocordyceps xuefengensis*

QIN You^{1,2}, CHEN Lin², LIANG Xuejuan^{2,3}, MI Yanan^{1,2}, XIAO Juan², ZHANG Shuihan^{1,2,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China; 3. 2011 Collaboration and Innovation Center for Digital Chinese Medicine in Hunan, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To establish HPLC fingerprint for *Ophiocordyceps xuefengensis* and provide conference for quality evaluation. **Methods** The HPLC method was used with the condition that the column was Yuexu AQ-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); The detection wavelength was set at 260 nm; The mobile phase was eluted with gradient by mixture of methanol and water (0.1% formic acid); The flow rate was 0.5 mL/min; The column temperature was 30 ℃; The injection was 20 μL. **Results** The HPLC fingerprint for *Ophiocordyceps xuefengensis* collected from eleven different sources was set up. Fifteen common peaks were found, seven of them had been identified by reference substances and HPLC-Q-TOF-MS/MS. The fingerprint was analyzed with methods of cluster analysis, principal component analysis and similarity computation. **Conclusion** The method of HPLC fingerprint for *Ophiocordyceps xuefengensis* is simple, rapid and can be used for identification and evaluation of *Ophiocordyceps xuefengensis*.

[Keywords] *Ophiocordyceps xuefengensis*; HPLC; fingerprints; quality control; cluster analysis; similarity analysis

雪峰虫草为线虫草菌科真菌雪峰虫草菌 *Ophiocordyceps xuefengensis* sp. nov 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体或充满菌丝的干燥幼虫尸体(菌核体), 为线虫草菌科线虫草菌属的一个新种, 经鉴定是目前同属真菌中

与冬虫夏草亲缘关系最近的一个种^[1], 因其产于雪峰山脉而得名。主要成分是腺苷、虫草素、D-甘露醇、多糖、氨基酸等^[2]。目前, 其市场需求量较大, 但尚无统一质量标准。本研究采用高效液相色谱法, 建立了雪峰虫草的高效液相色谱指纹图谱, 采用液

[收稿日期] 2015-10-21

[基金项目] 湖南省科技重大专项(2014FJ1007); 湖南省中医药科研计划项目(201267; 201322); 中医药公共卫生专项“国家基本药物所需中药原料资源调查和监测项目”[财社(2011)-76]。

[作者简介] 秦 优, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药制剂与中药资源综合开发。

[通讯作者] * 张水寒, 女, 研究员, 博士研究生导师, E-mail: zhangshuihan0220@126.com。

质联用技术对指纹图谱中主要特征峰进行了化学指认,综合运用相似度分析、聚类分析以及主成分分析方法对雪峰虫草色谱图进行分析,为全面评价雪峰虫草的品质,严格控制其质量提供有效方法和科学依据。

1 仪器与试剂

1200 Series 型高效液相色谱系统(安捷伦科技公司);6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS/MS (安捷伦科技公司);月旭 AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240 型电子分析天平(METTLER)。

甲醇(色谱纯,美国 TEDIA 公司);甲酸(色谱纯,美国 TEDIA 公司);水(湖南长沙娃哈哈饮料有限公司);其他试剂为分析纯。

腺苷(批号 110879-200202),虫草素(批号 858-200202),尿苷(批号 887-200202),尿嘧啶(批号 1004697-200401),均购自中国药品生物制品检定所。鸟嘌呤(批号 140631-201205)购自中国食品药品检定研究院。11 批雪峰虫草样品编号和批号分别为 S1: 0140318、S2: 20140324、S3: 20140920、S4: 20120426、S5: 20120512、S6: 20121026、S7: 20130601、S8: 0130602、S9: 20130603、S10: 20140421、S11: 20141221)采自雪峰山脉不同县市,经贵州大学西南药用生物资源教育部工程研究中心文庭池教授和湖南省中医药研究院朱如彩研究员共同鉴定为雪峰虫草 *Ophiocordyceps xuefengensis*。

2 方法与结果

2.1 雪峰虫草供试品溶液的制备 取雪峰虫草粉末约 0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶,加 15% 甲醇 10 mL,称定质量,超声 40 min,取出,放至室温,用 15% 甲醇补足减失的质量。滤过,滤液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备 分别取腺苷、虫草素、鸟嘌呤、尿苷、甘露醇、尿嘧啶对照品约 10 mg,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度作为对照品溶液。

2.3 色谱条件 月旭 AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流速 0.5 mL/min;检测波长 260 nm;柱温 30 ℃;进样量 20 μL;流动相:甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B);梯度洗脱: 0~25 min 保持 2% A,25~30min 从 2% A 洗脱至 10% A, 30~40 min

从 10% A 洗脱至 40% A。

2.4 质谱条件

离子化方式:电喷雾离子化(ESI);检测方式:正负离子检测;扫描范围:30~1 000 m/z;干燥气温度 325 ℃;干燥气体积流量 6.8 L/min;鞘气温度 350 ℃;毛细管电压 4.0 kV;碎片电压 130 V。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 S3 1 份,按照“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下的色谱条件,连续进样 6 次,考察色谱峰相对保留时间(t_R)和相对峰面积的一致性,各主要色谱峰的 t_R 的 RSD<1.5%,相对峰面积 RSD<2%,表明方法精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取 S3 6 份,按照 2.1 项下的方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下的色谱条件进行分析,考察色谱峰 t_R 和相对峰面积的一致性,各主要色谱峰的 t_R 的 RSD<1.5%,相对峰面积 RSD<2%,表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取 S3 1 份,按照“2.1”项下的方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下的色谱条件分别在 0、4、8、12、24 h 进样分析,考察色谱峰 t_R 和相对峰面积的一致性,各主要色谱峰的 t_R 的 RSD<1.5%,相对峰面积 RSD<2%,表明方法重复性良好,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 指纹图谱的建立及共有峰的指认

2.6.1 指纹图谱的建立 按照“2.1”项下的方法制备 11 批样品的供试品溶液,各取 20 μL,在“2.3”项下的色谱条件进行测定,得到 11 批雪峰虫草高效液相色谱指纹图谱(图 1)。确定 15 个色谱峰为雪峰虫草所共有,且共有峰的总面积占总峰面积的 90%,因此确定该 15 个色谱峰为雪峰虫草共有峰,建立共有指纹图谱(R)见图 1。由图 1 可知,雪峰虫草特征明显的主要有 4 个色谱峰(分别为 8、9、11、13 号峰),这 4 个色谱峰即构成雪峰虫草高效液相色谱指纹图谱的特征峰,其中以峰高最高的 9 号峰化学性质稳定,保留时间以及峰面积重复性良好,与其它相邻峰分离良好,采用化学工作站计算该峰的纯度表明该峰为一纯化合物。因此选择 9 号峰为指标峰,其保留时间和峰面积均设为 1,用于计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果表明各共有峰的 t_R 与相对峰面积的 RSD 大部分都小于 1%,个别峰的 RSD 大于 1%,但小于 5%,可以初步说明 10 批雪峰虫草样品的成分以及各成分的量都较稳定。

2.6.2 特征峰的指认 采用对照品并结合高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(HPLC-Q-

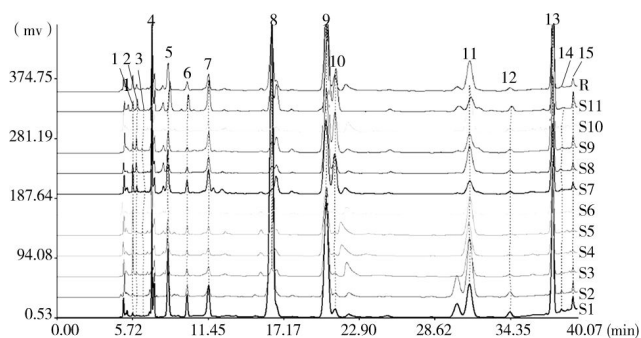


图1 雪峰虫草高效液相色谱指纹图谱

TOF-MS/MS)对雪峰虫草指纹图谱中的特征峰进行分析指认,HPLC工作条件同“2.3”项下色谱条件,在“2.4”项下质谱条件下对雪峰虫草提取物进行检测,结合色谱峰的紫外色谱图、一级质谱数据和二级质谱数据进行分析,指认出5、6、7、9、11、12、13号峰,分别为甘露醇、鸟嘌呤、尿嘧啶、尿苷、腺苷、虫草素。指认结果见表1。

表1 雪峰虫草色谱峰的 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果

峰号	保留时间 (min)	选择离子	质荷比 (m/z)	二级碎片 离子	分子式	化合物
5	6.744	[M-H] ⁻	181.072	3 101.024 3	C ₆ H ₁₄ O ₆	甘露醇
6	9.847	[M+H] ⁺	152.056	3 135.029 4	C ₅ H ₅ N ₅ O	鸟嘌呤
7	11.453	[M-H] ⁻	111.019	7 41.999 2	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	尿嘧啶
9	20.327	[M+H] ⁺	245.052	2 113.031 0	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	尿苷
11	31.220	[M+H] ⁺	268.103	9 136.057 2	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷
12	34.280	[M+H] ⁺	252.091	6 136.055 9	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	虫草素
13	37.769	[M+H] ⁺	284.093	3 150.077 8	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	鸟苷

2.7 雪峰虫草指纹图谱的分析

2.7.1 相似度评价 将测定获得的11批雪峰虫草指纹图谱导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版),进行色谱峰匹配,生成对照图谱(见图1),用于11批雪峰虫草样品相似度评价。结果表明,11批雪峰虫草药材中除第1、2批药材的相似度低于0.90外,其他9批药材指纹图谱均在0.90以上,相似度均较高,见表2。

表2 11批雪峰虫草药材指纹图谱相似度评价结果

序号	雪峰虫草批号	相似度	序号	雪峰虫草批号	相似度
1	20140318	0.646	7	20130601	0.961
2	20140324	0.666	8	20130602	0.989
3	20140903	0.993	9	20130603	0.952
4	20120426	0.982	10	20140421	0.970
5	20120512	0.982	11	20141221	0.969
6	20121026	0.991			

2.7.2 主成分分析 应用SPSS 17.0统计学软件,对雪峰虫草药材指纹图谱的15个峰进行主成分分析。由表3和表4可以看出,第一主成分以12、15、9、7、13、14、8、6号峰为主,占信息量的42.8%;第二主成分以10、2、4、3号峰为主,占信息量的24.5%;第三主成分以5、6、7号峰为主,占信息量的14.8%;第四主成分以3、9、11、5号峰为主,占信息量的7.0%。前4个主成分累计贡献率为89.2%,基本反映了总体信息。由“2.6.2”项下特征峰的指认结果可知,第一主成分中的6、7、9、11、12、13号峰均为核苷类化合物。

表3 4个主成分的特征值及贡献率

主成分	特征值	贡献率(%)	累计贡献率(%)
1	6.423	42.8	42.8
2	3.673	24.5	67.3
3	2.222	14.8	82.1
4	1.057	7.0	89.2

表4 主成分载荷矩阵表

峰号	主成分			
	1	2	3	4
峰1	-0.885	0.173	0.249	0.244
峰2	0.307	0.795	-0.422	-0.278
峰3	-0.486	0.585	0.177	0.510
峰4	-0.227	0.739	0.028	0.127
峰5	0.410	-0.162	0.776	0.291
峰6	0.579	-0.029	0.765	-0.182
峰7	0.815	0.351	0.440	-0.072
峰8	0.692	-0.609	0.226	0.013
峰9	0.842	0.058	-0.274	0.438
峰10	0.389	0.897	0.067	0.022
峰11	-0.096	-0.822	-0.326	0.301
峰12	0.923	-0.162	-0.008	-0.014
峰13	0.750	0.088	-0.368	0.466
峰14	0.749	-0.078	-0.438	-0.138
峰15	0.875	0.278	-0.056	0.036

2.7.3 系统聚类分析 应用SPSS 17.0统计学软件,对雪峰虫草药材高效液相色谱指纹图谱进行聚类分析。由聚类分析结果(图2)可知:11批样品大致分为2类,其中S4、S5、S6、S3、S8、S10、S7、S11、S9归为一类;S1和S2归为一类。由相似度分析结果可知,S1和S2相似度相对较低,而S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11相似度相对较高,聚类分析结果与相似度评价结果基本一致,两种评价方法得到了相互印证。由此可知,不同批次雪峰虫草的质量基本稳

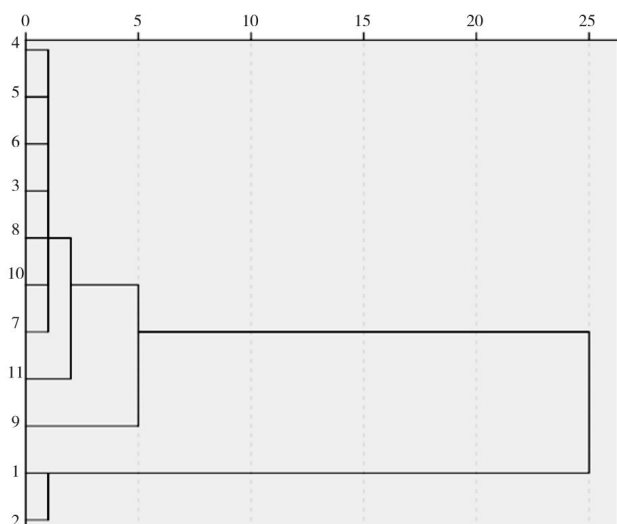


图2 雪峰虫草指纹图谱聚类分析结果

定,但部分共有峰所对应的化学成分的量还存在一定的差异。

3 讨论

3.1 流动相的优化

本实验共考查了6个不同的流动相系统,即甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液。结果表明,以乙腈为有机相时,完成出峰时间较短,得到的色谱峰的数目不多,且色谱峰的分度不如甲醇,故有机相选择甲醇。甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液考查结果表明,甲醇-0.1%甲酸水溶液分离的色谱峰峰形状与分离度最好,故将其作为本实验流动相。

3.2 流速的优化

本研究分别考察了1 mL/min、0.8 mL/min及0.5 mL/min三种不同流速下色谱图的出峰情况,结果显示在0.5 mL/min下能获得最佳的分析效果。

3.3 色谱柱的优化

本研究分别考查了月旭AQ-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)和Agilent Poroshell 120 SB-AQC₁₈(4.6 mm×100 mm,2.7 μm)色谱柱,结果显示,在月旭AQ-C₁₈色谱柱中本实验所分离的色谱峰分离度较好,峰数多,稳定性好。

3.4 检测波长的选择

本研究使用二极管阵列检测器对样品进行200~400 nm的全波长扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在260 nm下检测到的峰的数目较多,分离度较好,特征峰明显且峰形较好。

3.5 小结

指纹图谱技术运用到中药质量控制,避免了利用单一成分含量测定中药质量的不足,在一定程度上反应了中药的“真实面目”,为中药质量评价提供了新思路和新方法,已日益成为国内外广泛接受的中药及其制剂质量评价模式^[3-7]。

本研究首次建立雪峰虫草药材高效液相色谱指纹图谱,选取了15个稳定性好,特征性明显的色谱峰作为共有峰,并采用对照品结合HPLC-Q-TOF-MS/MS技术对7个特征峰进行了指认,分别为甘露醇、鸟嘌呤、尿嘧啶、尿苷、腺苷、虫草素和鸟苷。采用相似度对雪峰虫草11批样品进行分析,结果表明,除批号S1和S2之外,其他的9批样品相似度系数均大于0.90。系统聚类分析的结果与相似度评价结果基本吻合,说明不同批次雪峰虫草药材化学组成存在一定差异性。共有峰主成分分析结果可知,核苷类成分在区分雪峰虫草药材中起到重要作用,可作为评价雪峰虫草药材的质量的指标成分。本研究建立的指纹图谱方法简便易行,且稳定可靠、重现性较好,为雪峰虫草的质量控制研究提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Wen TC, Zhu RC, Kang JC, et al. *Ophiocordyceps xuefengensis* sp. nov. from larvae of *Phassus nodus* (Hepialidae) in Hunan Province, southern China [J]. *Phytotaxa*, 2013,123 (1): 41~50.
- [2] 张水寒,蔡萍,陈林,等.高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱分析雪峰虫草化学成分[J].*中草药*,2015,46(6):817-821.
- [3] 秦昆明,方前波,蔡宝昌,等.指纹图谱技术在方剂现代研究中的应用现状[J].*世界科学技术—中医药现代化*,2009,11(2):287-293.
- [4] 李倩,罗祖良,杨小丽.中药质量控制方法研究述评[J].*中医学报*,2012,27(4):448-451.
- [5] 周卿意骏,张水寒,高尚,等.银黄清肺胶囊HPLC指纹图谱研究[J].*中草药*,2015,46(9):1 314-1 320.
- [6] 谢彩侠,刘蕊,白雁,等.玉米须的HPLC指纹图谱[J].*中国实验方剂学杂志*,2015,21(9):64-66.
- [7] 肖云芝,万露,刘朝勇,等.鳖甲HPLC指纹图谱的分析模式探讨[J].*中国实验方剂学杂志*,2015,21(6):32-36.

(本文编辑 苏维)