

· 药物研究 ·

冬虫夏草人工繁育品与野生品基于甾醇特征图谱的比较研究

过立农¹, 张美², 刘杰¹, 马双成¹, 钱正明³, 李文佳³, 咎珂^{1*}, 郑健^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 宁夏回族自治区食品药品检验所, 银川 750001; 3. 广东东阳光药业有限公司, 东莞 523808)

摘要 目的: 对冬虫夏草人工繁育品与野生品进行比较研究, 建立基于甾醇类成分的特征图谱, 并比较麦角甾醇含量的差异, 为该药材的质量监管提供参考。方法: 以10批冬虫夏草人工繁育品、17批野生品以及5批凉山虫草为研究对象, 采用超高效液相色谱法, 以麦角甾醇为对照品, 选用 XBridge C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 流动相为甲醇-水 (95:5), 检测波长282 nm, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 采用CHEMPATTERN化学计量学软件对野生品色谱图进行处理, 生成特征图谱, 并计算所有批次的相似度。结果: 17批野生冬虫夏草、10批冬虫夏草人工繁育品与野生品对照图谱之间的相似度均大于0.9, 相似度良好; 而5批凉山虫草相似度均未超过0.8, 相似度较低。10批人工繁育品的平均含量为0.121%±0.031%; 17批野生品的平均含量为0.115%±0.045%; 5批凉山虫草的平均含量为0.468%±0.038%。冬虫夏草人工繁育品和野生品基于甾醇的特征图谱以及麦角甾醇含量基本一致; 与凉山虫草有显著性差异。结论: 本研究有助于冬虫夏草的真伪鉴别, 同时为冬虫夏草人工繁育资源开发以及合理使用提供科学依据。

关键词: 冬虫夏草繁育品; 野生冬虫夏草; 凉山虫草; 特征图谱; 甾醇; 麦角甾醇; 含量比较; 中药材资源开发

中图分类号: R917; R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)08-0951-09
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.02.020

Comparative Study of Characteristic Chromatogram of Cultivated and Wild *Cordyceps sinensis* Based on Sterols

Guo Linong¹, Zhang Mei², Liu Jie¹, Ma Shuangcheng¹, Qian Zhengming³, Li Wenjia³, Zan Ke^{1*}, Zheng Jian^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Ningxia Institute for Food and Drug Control, Yinchuan 750001, China; 3. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd, Dongguan 523808, China)

Abstract Objective: To establish the UPLC characteristic chromatogram based on sterols and to compare the differences of the contents of ergosterol in cultivated and wild *Cordyceps sinensis* so as to provide references for the supervision of this crude drug. **Methods:** 10 batches of cultivated *Cordyceps sinensis*, 17 batches of wild *Cordyceps sinensis* and 5 batches of *Cordyceps liangshanensis* were used as objects and ergosterol was used as

基金项目: 中医药行业科研专项“中药饮片质量保障系统研究(一)”资助(编号 201507002); 十二五国家科技重大专项(编号 2014ZX09304307-002)

作者简介: 过立农, E-mail: 826075517@qq.com

通信作者: 咎珂, 博士, 助理研究员; E-mail: 6206310@qq.com

通信作者: 郑健, 博士, 研究员; 研究方向: 民族药, 分子生物学, 药物化学; E-mail: bjzj825@163.com

reference substance. UPLC analysis was performed on a Waters XBridge C18 column (100×2.1 mm; 1.6 μm). The mobile phase was methanol-water (95:5) with isocratic elution. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 282 nm and the column temperature was 30° C. Chemometrics software Chempattern was employed to generate characteristic chromatogram and calculate similarity. **Results:** Similarities of 17 batches of wild *Cordyceps sinensis* and 10 batches of cultivated *Cordyceps sinensis* were more than 0.9, indicating good similarity. But the similarities of 5 batches of *Cordyceps liangshanensis* were no more than 0.8, indicating poor similarity. The average contents of ergosterol were 0.121% ± 0.031% in cultivated *Cordyceps sinensis*, 0.115% ± 0.045% in wild *Cordyceps sinensis*, and 0.468% ± 0.038% in *Cordyceps liangshanensis*. UPLC characteristic chromatogram and content of ergosterol in cultivated *Cordyceps sinensis* were basically identical to those of the wild *Cordyceps sinensis* and showed significant differences from adulterant *Cordyceps liangshanensis*. **Conclusion:** The results were helpful to authenticate *Cordyceps sinensis* and could provide scientific references for the utilization of cultivated *Cordyceps sinensis*, and the resource development of chinese crude dyug. **Keywords:** cultivated *Cordyceps sinensis*; wild *Cordyceps sinensis*; *Cordyceps liangshanensis*; characteristic chromatogram; sterol; ergosterol; content comparison; resource development of chinese crude dyug

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc. 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, 主要分布在我国青海、西藏、甘肃、云南和四川等海拔地区, 是传统的名贵中药材, 在中国有悠久的药用历史, 具有补肾益肺、止血化痰的功效^[1-3]。近年来, 冬虫夏草的人工繁育技术获得突破, 为冬虫夏草稀缺野生资源的可持续发展提供了一条途径^[4]。冬虫夏草主要含有核苷、多糖、多肽、甾醇、氨基酸等多种化学成分^[5-10]。以腺苷为代表的核苷类大极性水溶性成分已经有较多研究报道^[11-13]。麦角甾醇是真菌类的特征甾醇, 是冬虫夏草的重要活性成分之一, 为脂溶性维生素D₂的前体, 具有抗癌、抗衰老、减毒等功效^[14]。本实验以麦角甾醇为对照品, 以凉山虫草为参照, 建立冬虫夏草人工繁育品与野生品基于甾醇的特征图谱, 同时测定麦角甾醇的含量, 并进行比较研究。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Waters H-Class型超高效液相色谱仪(沃特世公司), 二极管阵列检测器(沃特世公司), Sartorius QUINTIX313-1CN 型万分之一电子天平(Sartorius公司), Sartorius MSE125s 型十万分之一电子天平(Sartorius公司)。

1.2 试药

麦角甾醇对照品(中国食品药品检定研究院, 批号111845-201403, 纯度95.5%)。甲醇为色谱纯(Fisher公司), 水为Milli-Q超纯水。色谱柱XBridge C18柱(填料: 十八烷基键合硅胶, 2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm; Waters仪器公司)。

1.3 药材

野生冬虫夏草17批次(样品编号: 1~17), 采自于西藏自治区、青海省、四川省、甘肃省、云南省; 冬虫夏草人工繁育品10批次(样品编号: 18~27), 由广东东阳光药业有限公司提供; 凉山虫草5批次(样品编号: 28~32), 采自四川省凉山彝族自治州。

冬虫夏草人工繁育品和野生品均经中国食品药品检定研究院中药民族药检定所郑健研究员鉴定为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc. 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。凉山虫草为麦角菌科真菌凉山虫草 *Cordyceps liangshanensis* Zeng. Liu et Hu Gray 寄生在鳞翅目昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液的制备

取麦角甾醇对照品约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL量瓶中, 用甲醇溶解配制成约 1 mg · mL⁻¹的

对照品储备溶液；再加甲醇稀释成约 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液，用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2 供试品溶液的制备

取样品粉末（过四号筛）约 $0.2\ \text{g}$ ，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 $25\ \text{mL}$ ，称定重量，超声处理（功率 $250\ \text{W}$ ，频率 $33\ \text{kHz}$ ） $30\ \text{min}$ ，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

3 色谱条件

色谱柱：Waters XBridge C18 柱（ $2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$ ， $1.6\ \mu\text{m}$ ）；流动相：甲醇-水（95:5）；检测波长： $282\ \text{nm}$ ；流速： $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；柱温： $30\ ^\circ\text{C}$ ；进样量： $1\ \mu\text{L}$ 。

4 特征图谱

4.1 精密度试验

精密吸取同一野生冬虫夏草供试品溶液（样品1） $1\ \mu\text{L}$ ，按上述色谱条件连续进样测定6次，记录色谱图。以麦角甾醇参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 $\text{RSD}<1\%$ ，单峰面积占总峰面积大于2%特征峰的相对峰面积 $\text{RSD}<2\%$ ，采用科迈恩（北京）科技有限公司Chempattern化学计量学软件进行评价，相似度（夹角余弦法计算，下同）为0.99，结果表明仪器精密度良好。

4.2 稳定性试验

精密吸取同一野生冬虫夏草供试品溶液（样

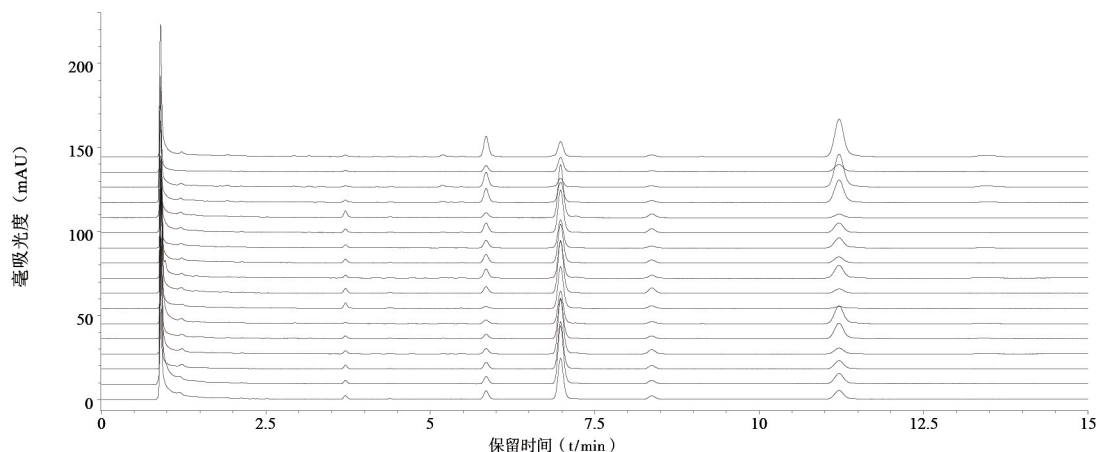
品1） $1\ \mu\text{L}$ ，分别于0、2、4、6、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定，记录色谱图。以麦角甾醇为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 $\text{RSD}<1\%$ ，单峰面积占总峰面积大于2%特征峰的相对峰面积 $\text{RSD}<2\%$ ，采用Chempattern化学计量学软件进行评价，相似度为0.99，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

4.3 重复性试验

取同一野生冬虫夏草供试品溶液（样品1）6份，精密称定，按“2.2”节下方法分别制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$ ，分别进样测定，记录色谱图。以麦角甾醇为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各特征峰相对保留时间的 $\text{RSD}<1\%$ ，单峰面积占总峰面积大于2%特征峰的相对峰面积 $\text{RSD}<2\%$ ，采用Chempattern化学计量学软件进行评价，相似度为0.99，表明该方法重复性好。

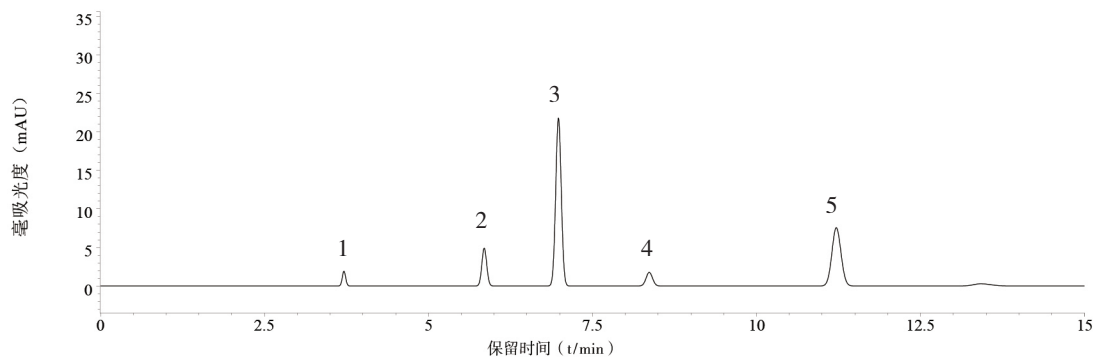
4.4 冬虫夏草特征图谱的建立

取不同批次的野生冬虫夏草（样品1~17）粉末，精密称定，按“2.2”节下方法制备供试品溶液，精密吸取 $1\ \mu\text{L}$ ，分别进样测定，记录15 min的UPLC色谱图（图1）。根据结果，采用Chempattern化学计量学软件进行数据分析处理，设定样品1为参照图谱，将其他样品的色谱峰与参照图谱进行自动匹配，生成野生冬虫夏草的特征图谱（图2）。



注：自上到下分别对应样品1~17。

图1 17批野生冬虫夏草UPLC色谱图



3. 麦角甾醇

图 2 野生冬虫夏草 UPLC 特征图谱

4.5 特征峰的标定

根据17批野生冬虫夏草的特征图谱检测结果,共标定5个特征峰。经过与对照品比对,可知3号峰为麦角甾醇,其余4个峰根据二极管阵列检测器光谱特征与3号峰的相似性以及文献推测^[15],也应为甾醇类成分。

4.6 冬虫夏草人工繁育品、野生品与凉山虫草特征图谱的比较

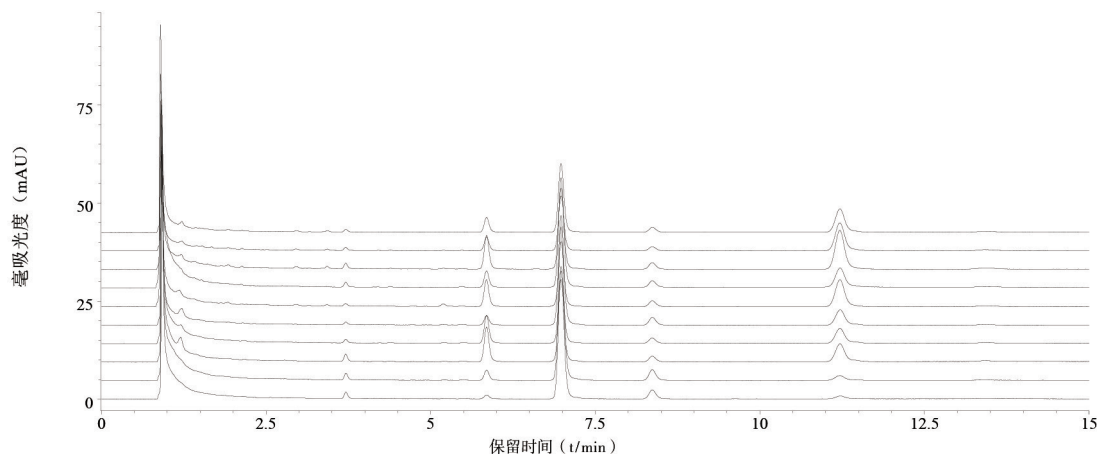
取不同批次的人工繁育品(样品18~27)和凉山虫草粉末(样品28~32),精密称定,按“2.2”节下方法制备供试品溶液,精密吸取1 μ L,分别进样测定,记录15 min的UPLC色谱图(图3~4)。根据结果,采用Chempattern化学计量学软件进行数据分析处理,计算野生品、人

工繁育品与凉山虫草图谱的相似度(图5),分别为0.97, 1.00, 0.97, 0.99, 0.98, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 0.98, 0.95, 0.99, 1.00, 1.00, 1.00, 0.99, 1.00, 1.00, 1.00, 0.99, 0.99, 0.99, 0.99, 1.00, 1.00, 1.00, 0.96, 0.93, 0.80, 0.76, 0.76, 0.75, 0.74。由此可见,野生冬虫夏草与人工繁育品基本一致;与凉山虫草特征图谱差异较大。

5 冬虫夏草人工繁育品、野生品以及凉山虫草麦角甾醇的含量测定

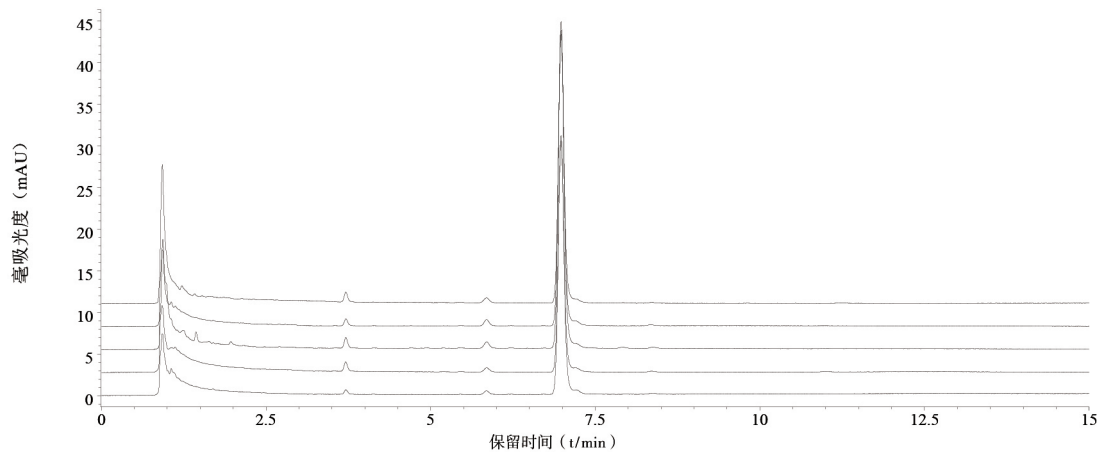
5.1 系统适用性试验

按“3”节下色谱条件进行检测,以麦角甾醇计算理论塔板数大于6000,分离度大于1.5。记录对照品溶液及供试品溶液的色谱图(图6)。



注:自上到下分别对应样品18~27。

图 3 冬虫夏草人工繁育品色谱图



注：自上到下分别对应样品 28 ~ 32。

图 4 凉山虫草色谱图

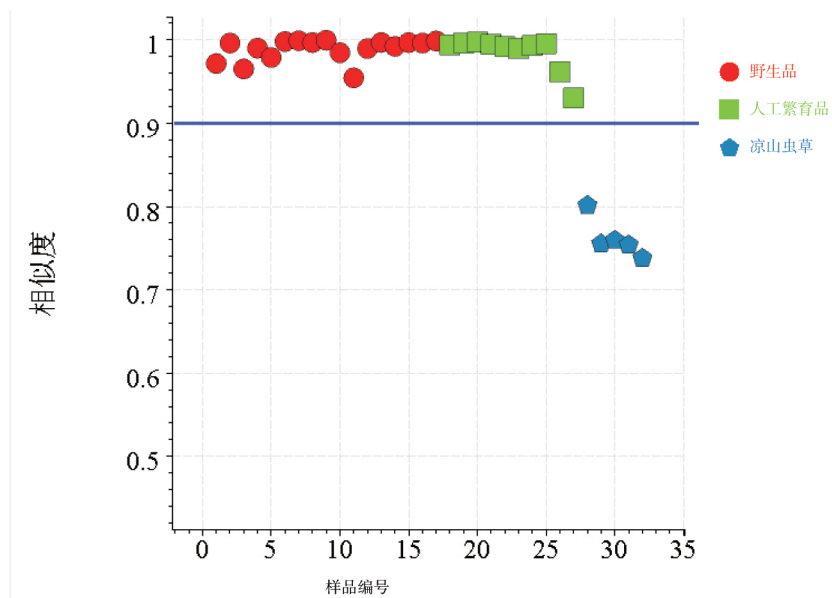
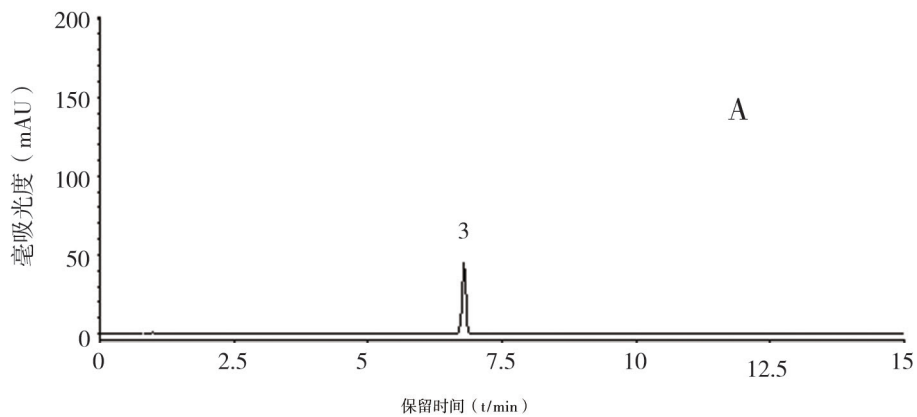
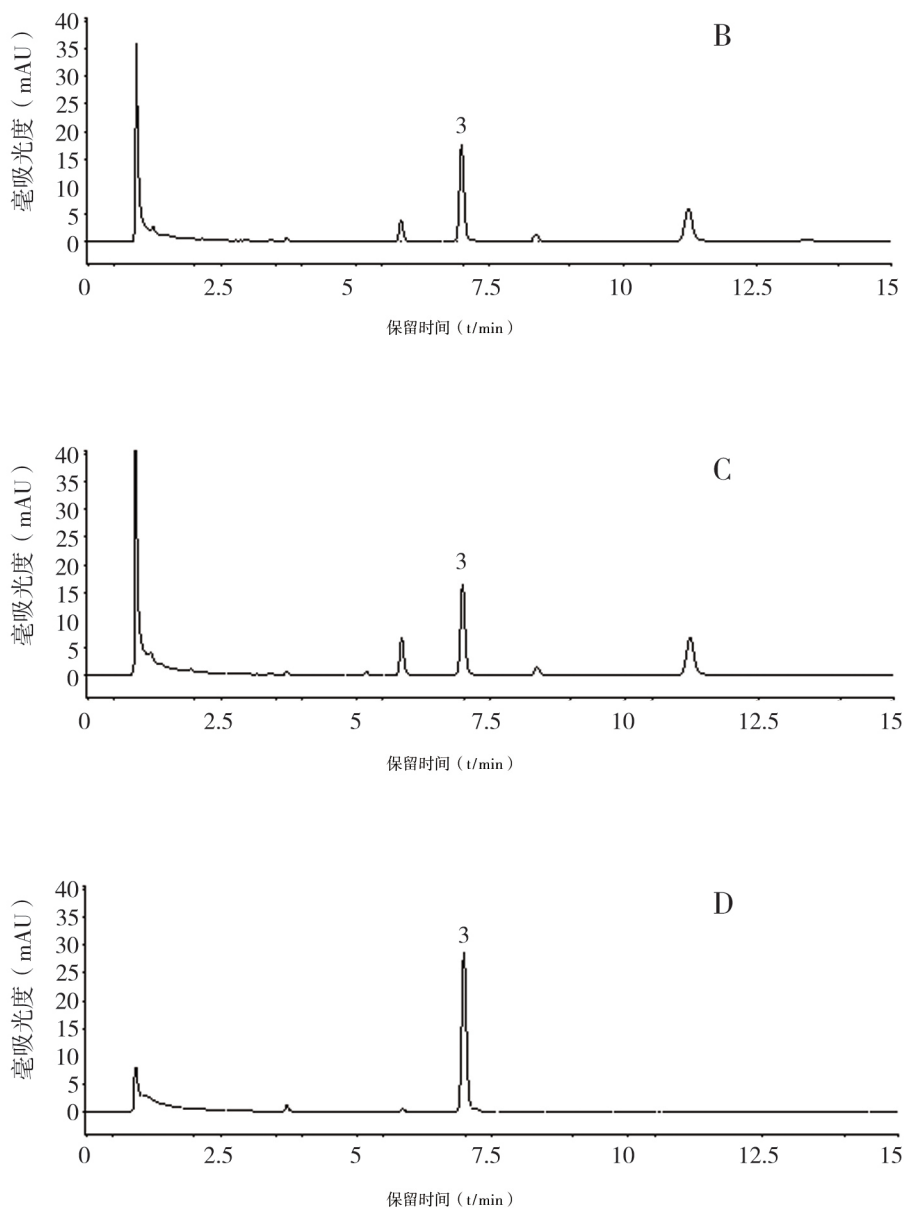


图 5 野生冬虫夏草、冬虫夏草人工繁育品以及凉山虫草相似度分析





A. 麦角甾醇对照品; B. 野生冬虫夏草; C. 冬虫夏草人工繁育品; D. 凉山虫草; 3. 麦角甾醇。

图 6 野生冬虫夏草、冬虫夏草人工繁育品以及凉山虫草的 UPLC 色谱图

5.2 线性关系考察

精密吸取对照品储备液，加甲醇稀释成每 1 mL 分别含 10.15、20.30、50.75、101.5、203.0、507.5 μg 的溶液，按上述色谱条件测定，以对照品浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线，并进行线性回归，得回归方程：

$$Y = 2432X + 3832, r = 0.9999$$

结果表明，麦角甾醇进样量在 10.15 ~ 507.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

5.3 精密度试验

精密吸取对照品溶液 ($101.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 μL ，按上述色谱条件连续进样 6 次，分别测定峰面积，结果峰面积的平均值为 254674 ± 1850 ， $\text{RSD} = 0.42\%$ ，表明仪器精密度良好。

5.4 重复性试验

取本品粉末（18号样品），共6份，每份约0.2 g，精密称定，按“2.2”节下方法制备供试品溶液并进行测定，结果麦角甾醇平均含量为0.104%，RSD = 2.2%，表明本试验重复性良好。

5.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(18号样品)，分别于配制后0、2、4、8、12、24 h测定峰面积，麦角甾醇峰面积平均值为 254814 ± 2075 ，RSD = 0.68%，可知供试品溶液在24 h内稳定。

5.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品（18号样品），共6份，每份约0.1 g，分别置具塞锥形瓶中，再分别依次精密加入浓度为 $20.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的麦角甾醇对照品溶液5.0 mL和甲醇20.0 mL，称定重量，超声处理（功率250 W，频率33 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤，取续滤液，分别按样品分析方法操作，测定每份含量，计算回收率，结果见表1。

表 1 麦角甾醇加样回收试验结果（ $n=6$ ）

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
0.1046	0.1015	0.2038	97.71	99.32	1.54
0.1056	0.1015	0.2086	101.52		
0.1064	0.1015	0.2057	97.84		
0.1075	0.1015	0.2085	99.47		
0.1034	0.1015	0.2036	98.74		
0.1026	0.1015	0.2048	100.64		

5.7 样品含量测定

供试品溶液，进行测定，结果见表 2。

对收集的各地样品，按“2.2”节下方法制备

表 2 冬虫夏草中麦角甾醇的含量测定结果（ $n=3$ ）

样品编号	样品批次	采集日期	采集地	含量 /%
1	野生冬虫夏草 -1	2015.5.24	西藏林芝	0.0501
2	野生冬虫夏草 -2	2015.6.3	西藏昌都	0.0461
3	野生冬虫夏草 -3	2015.5.23	西藏林芝	0.0288
4	野生冬虫夏草 -4	2015.5.25	西藏拉萨	0.0662
5	野生冬虫夏草 -5	2015.6.6	青海果洛	0.168
6	野生冬虫夏草 -6	2015.5.5	青海黄南	0.139
7	野生冬虫夏草 -7	2015.6.7	青海玉树	0.0923
8	野生冬虫夏草 -8	2015.5.30	西藏比如	0.125
9	野生冬虫夏草 -9	2015.6.3	云南德钦	0.123

续表 2

样品编号	样品批次	采集日期	采集地	含量 /%
10	野生冬虫夏草 -10	2015.6.3	青海海南	0.154
11	野生冬虫夏草 -11	2015.6.7	青海玉树	0.141
12	野生冬虫夏草 -12	2015.5.20	四川甘孜	0.0984
13	野生冬虫夏草 -13	2015.6.3	西藏加查	0.123
14	野生冬虫夏草 -14	2015.5.20	四川甘孜	0.156
15	野生冬虫夏草 -15	2015.5.20	甘肃甘南	0.172
16	野生冬虫夏草 -16	2015.5.20	四川阿坝	0.131
17	野生冬虫夏草 -17	2015.6.6	青海果洛	0.119
18	冬虫夏草人工繁育品 -1	2015.4.2	湖北宜都	0.104
19	冬虫夏草人工繁育品 -2	2015.4.7	湖北宜都	0.0733
20	冬虫夏草人工繁育品 -3	2015.4.7	湖北宜都	0.100
21	冬虫夏草人工繁育品 -4	2015.3.14	湖北宜都	0.120
22	冬虫夏草人工繁育品 -5	2015.4.10	湖北宜都	0.157
23	冬虫夏草人工繁育品 -6	2015.4.09	湖北宜都	0.133
24	冬虫夏草人工繁育品 -7	2015.4.10	湖北宜都	0.146
25	冬虫夏草人工繁育品 -8	2015.4.11	湖北宜都	0.123
26	冬虫夏草人工繁育品 -9	2015.4.17	湖北宜都	0.168
27	冬虫夏草人工繁育品 -10	2015.4.22	湖北宜都	0.0852
28	凉山虫草 -1	2015.4.15	四川凉山	0.474
29	凉山虫草 -2	2015.4.16	四川凉山	0.448
30	凉山虫草 -3	2015.4.17	四川凉山	0.514
31	凉山虫草 -4	2015.4.18	四川凉山	0.488
32	凉山虫草 -5	2015.4.19	四川凉山	0.416

6 讨论

6.1 特征图谱

本文建立的基于甾醇的冬虫夏草UPLC特征图谱, 标示5个特征峰, 17批野生冬虫夏草、10批冬

虫夏草人工繁育品与野生品对照图谱之间的相似度均大于0.9, 相似度良好, 两者成分比例相似; 5批凉山虫草相似度均未超过0.8, 均未检出5号峰, 并且3号峰麦角甾醇峰明显偏高。

6.2 含量测定

本试验测定了10批冬虫夏草人工繁育品和17批野生冬虫夏草中麦角甾醇的含量,10批人工繁育品的平均含量为 $0.121\% \pm 0.031\%$;17批野生品的平均含量为 $0.115\% \pm 0.045\%$;5批凉山虫草的平均含量为 $0.468\% \pm 0.038\%$ 。人工繁育品批次之间差异性比野生品小。麦角甾醇含量采用统计学方法 t 检验进行分析,人工繁育品和野生品之间 $P > 0.05$,说明冬虫夏草人工繁育品和野生品之间的麦角甾醇含量无显著性差异。冬虫夏草人工繁育品和野生品的含量与凉山虫草之间 P 均小于0.05,凉山虫草中麦角甾醇含量明显高于冬虫夏草人工繁育品和野生品。

6.3 小结

本实验在同一色谱条件下,建立了冬虫夏草人工繁育品和野生品基于甾醇的特征图谱,同时测定了麦角甾醇的含量,并以凉山虫草做参照,有助于冬虫夏草的种类鉴别,并且能够为冬虫夏草人工繁育品质量控制以及该药材的资源开发提供科学依据。

参考文献:

- [1] 郭海平,杨智敏.冬虫夏草药理作用研究进展[J].中草药,1999,30(3):231-233.
- [2] 戚三涛,张凤华,李杨,等.冬虫夏草研究概况及展望[J].生物医药,2012,15(5):41-43.
- [3] 中国药典:一部[S].2015:115-115.
- [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):1-13.
- [5] 钱正明,李文庆,孙敏甜,等.冬虫夏草化学成分分析[J].菌物学报,2016,35(4):476-490.
- [6] 艾中,钱正明,李文佳,等.冬虫夏草核苷类成分分析

研究进展[J].菌物学报,2016,35(4):388-403.

- [7] 钱正明,廖娜,李文庆,等.现代分析技术在冬虫夏草质量评价中的应用[J].中国现代中药,2016,18(5):708-714.
- [8] Zhao J, Xie J, Wang L Y, et al. Advanced Development in Chemical Analysis of Cordyceps [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 87(1434):271-289.
- [9] 石岩,肖新月,程显隆,等.冬虫夏草中游离麦角甾醇的研究[J].中国现代中药,2012,14(7):15-17.
- [10] 陈婷,刘群,莫灼康,等.HPLC同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素和麦角甾醇[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):161-163.
- [11] 钱正明,周妙霞,孙敏甜,等.冬虫夏草不同部位核苷类成分比较分析[J].世界科学技术:中医药现代化,2014,16(11):2390-2394.
- [12] 管珂,苏蕊,刘杰,等.冬虫夏草人工繁育品与野生冬虫夏草中腺苷含量的比较研究[J].中国药事,2016,30(6):598-603.
- [13] Yang F Q, Li D Q, Feng K, et al. Determination of Nucleotides, Nucleosides and their Transformation Products in Cordyceps by Ion-pairing Reversed-phase Liquid Chromatography - mass Spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(34):5501-5510.
- [14] 曹龙辉,李晓珺,赵文红,等.麦角甾醇的研究进展[J].中国酿造,2014,33(4):9-12.
- [15] Jing-ping Yuan, Jiang-hai Wang, Xin Liu, et al. Simultaneous Determination of Free Ergosterol and Ergosterol Esters in Cordyceps Sinensis by HPLC [J]. Food Chemistry, 2007, 105(4):1755-1759.

(收稿日期 2016年10月27日 编辑 王萍)