

发酵虫草菌粉及产品指纹图谱建立及多指标成分分析

曹 稳¹, 洪 亮¹, 杨 明², 李绍平^{1*}, 赵 静^{1*}

(1. 澳门大学中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078; 2. 江西国药有限责任公司, 江西 南昌 330096)

摘要:《中国药典》记载的发酵虫草菌粉产品的质量标准中,规定以鸟苷、腺苷、尿苷的含量作为评价相关产品质量的标准。但除此之外,还有许多其他的核苷类成分对发酵虫草菌粉质量控制的影响尚未被探讨。为探究发酵虫草菌粉及产品质控指标选择的合理性,采用超高效液相色谱-紫外检测法对19批发酵虫草菌粉及产品中的9种核苷成分(尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷)进行了定量分析,建立了发酵虫草菌粉样品的指纹图谱,并结合统计学提供了一种分析指标性成分的方法。通过优化样品的提取方法,选择超声提取法制备19批发酵虫草菌粉及产品的供试液;采用Agilent Eclipse Plus C18色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm)进行色谱分析,以甲醇-水为流动相梯度洗脱,对方法的校正曲线、准确度、精密度、重复性和回收率进行了验证。结合对照品指认了指纹图谱中的9个核苷峰,并采用外标一点法测得了各核苷成分的含量。使用化学模式识别对指纹图谱中的共有峰进行分析,聚类分析和主成分分析得到了同样的分类结果:19批样品共分为5类,其中同一发酵虫草菌粉因工艺差异可分为2类,而心肝宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊则各单独分为1类。同时,使用主成分分析获得了各样品中的指标性成分,分别为尿苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤、尿嘧啶,并使用聚类分析再次进行确证,验证了指标性成分的合理性。

关键词: 指纹图谱; 质控指标; 主成分分析; 聚类分析; 发酵虫草菌粉

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2021)09-1006-06

Fingerprint establishment and multi-indicator quantitative analysis of fermented *Cordyceps* powder and products

CAO Wen¹, HONG Liang¹, YANG Ming², LI Shaoping^{1*}, ZHAO Jing^{1*}

(1. State Key Laboratory for Quality Research of Chinese Medicine, University of Macau, Macao 999078, China;
2. Jiangxi Guoyao Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330096, China)

Abstract: Currently, guanosine, adenosine, and uridine contents are specified as the quality criteria for related products in the quality standards for fermented *Cordyceps* powder preparations included in the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia. However, there are many other nucleosides in fermented *Cordyceps* powder, whose effect on the quality control has not yet been discussed. In this study, an ultra-performance liquid chromatography-ultraviolet detection (UPLC-UV) method was used for the quantitative analysis of 9 nucleosides (uracil, cytidine, guanidine, uridine, adenine, inosine, guanosine, thymidine, and adenosine) in 19 batches of fermented *Cordyceps* powder samples and products, and the corresponding fingerprints were established. In addition, a method for analyzing the index components was proposed based on statistics. By optimizing the sample extraction method, ultrasound-assisted extraction was

收稿日期: 2021-06-13

* 通讯联系人. E-mail: spli@um.edu.mo(李绍平); E-mail: jingzhao@um.edu.mo(赵静).

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1711300); 澳门特别行政区科学及科技发展基金(034/2017/A1, 0017/2019/AKP); 广东省重点区域研发计划(2020B111110006); 澳门大学(MYRG2018-00083-ICMS, MYRG2019-00128-ICMS, CPG2021-00009-ICMS).

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (No. 2019YFC1711300); Science and Technology Development Fund, Macau Special Administrative Region (Nos. 034/2017/A1, 0017/2019/AKP); Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (No. 2020B111110006); University of Macau (Nos. MYRG2018-00083-ICMS, MYRG2019-00128-ICMS, CPG2021-00009-ICMS).

selected to process 19 batches of samples. Chromatographic analysis was performed on an Agilent Eclipse Plus C18 column (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) using methanol and water as the mobile phases under gradient elution. The method was validated based on the calibration curves, accuracy, precision, repeatability, and recovery. The fingerprints of the 19 batches of samples were established, and 16 common peaks were obtained. Among them, nine nucleoside peaks were identified by standards, and their concentrations were determined by the external standard one-point method. Similarity evaluation of the fingerprints was conducted; the similarities of the 19 batches of samples were greater than 0.9. Then, chemical pattern recognition was performed. The same classification results were obtained by hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Thus, the samples could be segregated into five classes, and the fermented *Cordyceps* powders were classified as two types with different fermentation processes. Xinganbao capsules, Bailing capsules and Ningxinbao capsules were each separately classified into one class. This indicated that the chemical recognition pattern could effectively distinguish between the fermented *Cordyceps* powder and different products. PCA was used to calculate the weight value of each common peak for the first time, and the index components among the samples were selected according to the weight value. Finally, the selected index components were used to re-cluster the samples. The results were consistent with those obtained on the basis of the 16 common peaks, thus verifying the rationality of the index components. Therefore, uridine, guanosine, adenosine, adenine, and uracil are recommended for use as evaluation indicators for fermented *Cordyceps* powder and products, allowing for better distinction between the products on the market. In summary, the combination of liquid chromatographic fingerprints and chemical pattern recognition can provide a simple and reliable method for the analysis and quality control of fermented *Cordyceps* powder and products.

Key words: fingerprints; quality control index; principal component analysis (PCA); hierarchical clustering analysis; fermented *Cordyceps* powder

发酵虫草菌粉(fermented *Cordyceps* powder)是从天然冬虫夏草中分离出的虫草菌经液体发酵培养所得菌丝体的干燥粉末^[1]。发酵虫草菌粉的主要化学成分与冬虫夏草类似,但价格相对较低,常作为天然虫草的替代品^[2-4],具有补益肺肾、秘精益气的功效^[5]。市面上以发酵虫草菌粉为原料的制剂有金水宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊、心肝宝胶囊等^[6]。核苷类成分是发酵虫草菌粉中的关键成分,2020版《中国药典》中收录的发酵虫草菌粉制剂金水宝片/胶囊的质量标准中规定以鸟苷、腺苷、尿苷的总含量作为评价相关产品质量的标准,百令胶囊以腺苷含量作为测定标准^[1]。但发酵虫草菌粉中除上述3种核苷类成分外,还有许多其他的核苷类

成分^[7],这些成分对于菌粉和相关产品质量评价的影响尚未被讨论。因此,本文希望通过对发酵虫草菌粉及产品中核苷类成分的分析,探讨其质控指标选择的合理性。

中药指纹图谱能充分反映中药的化学成分信息,具有整体性和全面性,是评价中药质量的常用方法^[8-11]。统计学方法可以对指纹图谱信息进行处理,结合多个指标对中药质量进行分类和综合评价,其中常用的有聚类分析和主成分分析^[12-14]。在对指纹图谱的分析中,本文首次在主成分分析中引入权重计算来获得发酵虫草菌粉共有峰的权重值,以权重值的大小选择其中的指标性成分。在得到指标性成分后,使用聚类分析进一步验证指标性成分能

引用本文:曹稳,洪亮,杨明,李绍平,赵静. 发酵虫草菌粉及产品指纹图谱建立及多指标成分分析. 色谱,2021,39(9):1006-1011.

CAO Wen, HONG Liang, YANG Ming, LI Shaoping, ZHAO Jing. Fingerprint establishment and multi-indicator quantitative analysis of fermented *Cordyceps* powder and products. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(9): 1006-1011.

否代替共有峰实现对不同的样品的区分,从而判断指标性成分的选择是否可信。

本文采用超高效液相色谱-紫外检测法建立了发酵虫草菌粉和市面上 3 种胶囊产品的指纹图谱,测定了其中 9 种核苷类成分的含量。通过化学模式识别对指纹图谱进行评价,并结合统计学提供了一种新的分析、验证指标性成分的方法,为发酵虫草菌粉和产品的质控指标选择提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Ultimate 3000 超高效液相色谱系统,包括自动进样器、在线脱气机、四元梯度泵、柱温箱和 UV 检测器(Thermo, 美国);加压溶剂萃取仪(Dionex, 美国);超声清洗仪(Branson, 美国);十万分之一分析天平(Mettler Toledo, 瑞士);Milli-Q Direct 一体化超纯水机(Millipore, 德国)。

对照品尿嘧啶(uracil)、胞苷(cytidine)、鸟嘌呤(guanine)、胸苷(thymidine)、尿苷(uridine)、腺嘌呤(adenine)、肌苷(inosine)(纯度 $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, 美国),鸟苷(guanosine)、腺苷(adenosine)(纯度 $\geq 98\%$, 北京索莱宝有限科技公司),甲醇(色谱纯, Merck, 德国)。

发酵虫草菌粉原料 10 批(依次标记为 S1~S10),心肝宝胶囊 3 批(批号:18190401、18200402、18200401,依次标记为 S11~S13,河北长天药业有限公司),百令胶囊 3 批(批号:1911366、1908318、1907333,依次标记为 S14~S16,杭州中美华东制药有限公司),宁心宝胶囊 3 批(批号:200401、200402、200103,依次标记为 S17~S19,上海普康药业有限公司),每个胶囊产品取 20 粒,分别混合均匀后作为待测样品。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C18 分析柱(150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m),柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL/min,流动相甲醇(A)和水(B)。梯度洗脱程序:0~8.0 min, 0% A; 8.0~8.5 min, 0% A~5% A; 8.5~20.0 min, 5% A~25% A; 20.0~22.0 min; 25% A~100% A。进样量 5 μ L,检测波长 260 nm。

1.2.2 对照品溶液制备

分别称取对照品适量,精密称定,加水溶解制成质量浓度为 10.7 mg/L 尿嘧啶、3.8 mg/L 胞苷、

10.4 mg/L 鸟嘌呤、51.8 mg/L 尿苷、10.1 mg/L 腺嘌呤、2.1 mg/L 肌苷、40.6 mg/L 鸟苷、3.7 mg/L 胸苷、50.5 mg/L 腺苷的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液制备

取样品粉末 0.5 g,精密称定。加入水 25 mL,称量。超声(功率 881 W,频率 43 kHz)处理 10 min,放冷,加水补足减少的质量,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液过 0.45 μ m 滤膜待用。

2 结果与讨论

2.1 样品提取方法的考察

分别采用超声辅助提取法和加压溶剂萃取法提取发酵虫草菌粉样品,在优化条件下,两种提取方法得到的 9 种核苷含量无显著差异(见图 1a)。由于超声辅助提取样品的操作更为简单,且超声提取仪器更常见^[15],因此选择超声辅助提取作为样品的提取方法。同时实验对超声提取时间进行了考察(10、20、30、40 min),结果显示,不同超声提取时间得到的核苷含量无显著差异(见图 1b)。因此选择室温下超声辅助提取 10 min 作为样品的提取条件,并以此条件提取全部样品。

2.2 方法学考察

分别精密吸取适量对照品溶液,加水稀释成 5

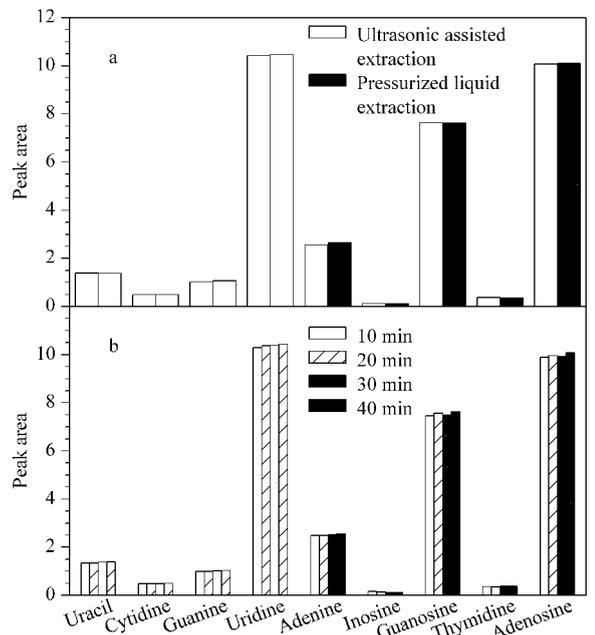


图 1 不同 (a) 提取方法和 (b) 超声提取时间对样品中核苷峰面积的影响

Fig. 1 Effect of different (a) extraction methods and (b) ultrasound time on the peak areas of nucleosides in the samples

个不同浓度的对照品溶液,按 1.2.1 节方法进样测定,以峰面积(Y)对对照品质量浓度(X , mg/L)进行线性回归。9 个组分在各自的范围内线性关系良好,回归系数(R^2)均不小于 0.999(见表 1)。

表 1 9 个核苷成分的回归方程、线性范围、相关系数

Table 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients (R^2) of the nine nucleoside components

Nucleoside	Regression equation	Linear range/ (mg/L)	R^2
Uracil	$Y=0.2472X+0.0075$	2.1-32.1	1.0000
Cytidine	$Y=0.1041X+0.0010$	0.8-11.5	1.0000
Guanine	$Y=0.1881X-0.0484$	2.1-31.2	0.9999
Uridine	$Y=0.1383X+0.0337$	10.4-155.4	1.0000
Adenine	$Y=0.3052X+0.0644$	2.0-30.4	0.9998
Inosine	$Y=0.1071X+0.0002$	0.4-6.3	1.0000
Guanosine	$Y=0.1337X+0.0287$	8.1-121.9	0.9997
Thymidine	$Y=0.1324X+0.0012$	0.7-11.0	0.9999
Adenosine	$Y=0.1842X+0.0525$	10.1-151.5	1.0000

Y : peak area; X : mass concentration, mg/L.

取混合对照品溶液连续进样 6 次,测定检测系统精密度;取发酵虫草菌粉 1 号样品,按 1.2.3 节方法平行制备供试品溶液 6 份,进样测定重复性;分别在供试品溶液制备后 0、4、8、12 和 24 h 进样,测定样品稳定性;精密度试验、重复性试验、稳定性试验中 9 个组分相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明仪器的精密度、方法的重复性、样品的稳定性良好。

取发酵虫草菌粉样品 6 份,分别精密加入与样品等量的肌苷、胞苷、胸苷、尿嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、鸟苷、尿苷、腺苷对照品,按优化的超声提取法处理,进样测定,计算回收率。各核苷组分的平均回收率为 95.6%~101.2%,表明方法的准确度良好。

2.3 含量测定

将 19 批发酵虫草菌粉及产品分别按 1.2.3 节方法制备供试品溶液,按 1.2.1 节的色谱条件分别进样测定,其中 9 种混合标准品溶液的色谱图见图 2a, 1 号样品的色谱图见图 2b。依据保留时间鉴定样品中各核苷成分,并记录 260 nm 波长下各成分的色谱峰面积。按外标一点法分别计算各组分的含量,结果见附表 1(详见 <http://www.chrom-China.com>)。不同产品中各核苷成分的含量区别较大,但尿苷、鸟苷、腺苷的含量均比较高。

2.4 指纹图谱的建立

将 19 批发酵虫草菌粉及产品的色谱图导入至

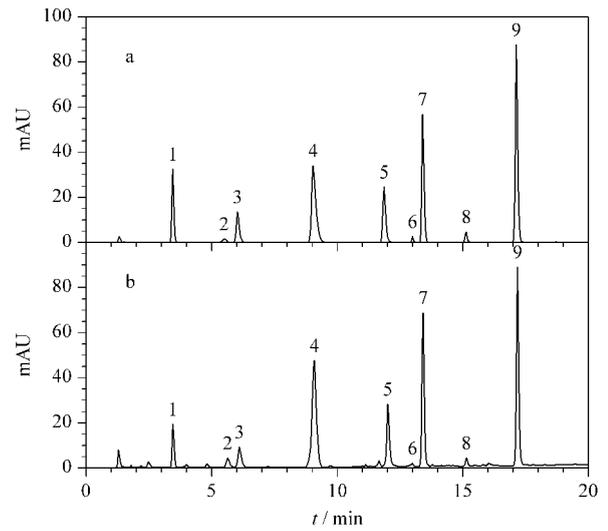


图 2 (a) 混合对照品溶液及 (b) 1 号发酵虫草菌粉样品的指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of (a) the mixed standard solution and (b) No. 1 fermented *Cordyceps* powder sample

1. uracil; 2. cytidine; 3. guanine; 4. uridine; 5. adenine; 6. inosine; 7. guanosine; 8. thymidine; 9. adenosine.

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1 版本)”软件进行处理,生成对照指纹图谱(R)和样品的指纹图谱(见图 3)。19 批发酵虫草菌粉样品的色谱图中共识别出 16 个主要的共有特征峰,根据对照品将 9 个共有峰分别鉴定为尿嘧啶、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷,样品的各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.0%,共有指纹峰的峰面积百分比大于 99%。

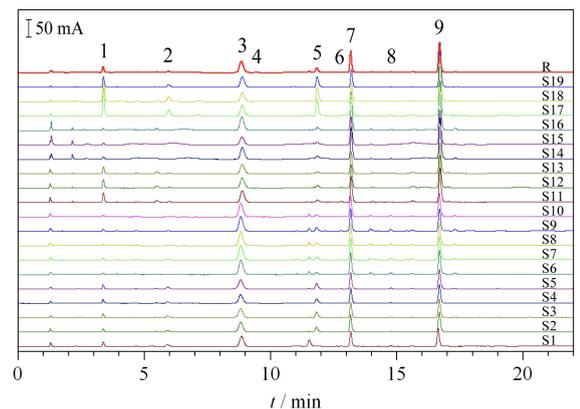


图 3 发酵虫草菌粉样品及产品的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of fermented *Cordyceps* powder samples and products

R: reference fingerprint; S1-S10: fermented *Cordyceps* powder; S11-S13: Xinganbao capsule; S14-S16: Bailing capsule; S17-S19: Ningxinbao capsule.

Peaks 1-9 were the same as that in Fig. 2.

2.5 指纹图谱评价

2.5.1 指纹图谱的相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1 版本)”软件,将对照图谱作为参照图谱,计算 19 批发酵虫草菌粉及产品指纹图谱的相似度。各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.0%, 19 批样品的相似度均大于 0.9, 相似度结果见表 2。要进一步分析其中的代表性成分, 须进行化学模式识别。

表 2 19 批发酵虫草菌粉样品及产品的相似度

Table 2 Similarities of the 19 batches of fermented *Cordyceps* powder samples and products

No.	Similarity	No.	Similarity	No.	Similarity
S1	0.986	S8	0.979	S15	0.956
S2	0.993	S9	0.977	S16	0.974
S3	0.988	S10	0.983	S17	0.903
S4	0.995	S11	0.988	S18	0.903
S5	0.991	S12	0.985	S19	0.948
S6	0.982	S13	0.982		
S7	0.982	S14	0.974		

2.5.2 主成分分析

采用 MATLAB 软件,将共有峰的峰面积数据作为变量,分别对发酵虫草菌粉和 3 种产品各自进行主成分分析,并计算每个成分的权重值。权重值代表该成分峰对主成分的贡献,权重值越高,对主成分贡献越大,将权重值大于 0.1 的成分作为样品的指标性成分。经分析,各样品中指标性成分如下:发酵虫草菌粉原料中的尿苷(0.24)、鸟苷(0.14)、腺苷(0.14)、尿嘧啶(0.10);心肝宝胶囊样品中的腺苷(0.20)、尿苷(0.18)、鸟苷(0.17)、尿嘧啶(0.12);百令胶囊样品中的尿嘧啶(0.19)、鸟苷(0.18)、腺嘌呤(0.16)、腺苷(0.14)、尿苷(0.10);宁心宝胶囊样品中的尿嘧啶(0.22)、腺苷(0.21)、腺嘌呤(0.20)、尿苷(0.10)、鸟苷(0.10)。

对 19 个样品同时进行主成分分析,其主成分分析得分图显示,19 个样品可分为 5 类(见图 4),分别为:S1~S5、S6~S10、S11~S13、S14~S16 和 S17~S19。其中 S1~S10 为 10 批发酵虫草菌粉样品,由两种发酵工艺制得,不同工艺得到的产品质量存在差异,因此聚为两类;S11~S13、S14~S16 和 S17~S19 分别为心肝宝胶囊、百令胶囊、宁心宝胶囊 3 种产品,来自不同厂家,其生产工艺和生产环境不同,均会造成产品之间的差异。而同种产品不同批次之间的一致性较好,因此各产品单独聚为一类。对 19 批样品同时进行权重计算,有 5 个成分权重值大于 0.1,分别为:尿苷(0.28)、鸟苷(0.14)、尿嘧啶

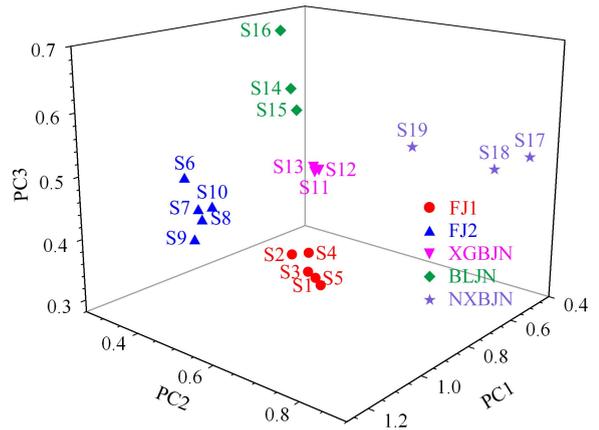


图 4 发酵虫草菌粉样品及产品的主成分分析得分图
Fig. 4 Scores of principal component analysis for fermented *Cordyceps* powder samples and products

FJ1: fermented *Cordyceps* powder (S1-S5); FJ2: fermented *Cordyceps* powder (S6-S10); XGBJN: Xinganbao capsule (S11-S13); BLJN: Bailing capsule (S14-S16); NXBJN: Ningxinbao capsule (S17-S19).

(0.13)、腺苷(0.10)、腺嘌呤(0.10),即这些成分可以作为区别全部样品的指标成分。

2.5.3 聚类分析

将 19 批样品的共有峰峰面积作为变量,导入 SPSS 软件中进行聚类分析,结果见图 5a。由结果可知,19 批样品可聚为 5 类,与主成分分析结果一致。同时,使用主成分分析中筛选出的 5 个指标成分对 19 批样品进行聚类分析,得到的结果如图 5b,与使用全部共有峰进行聚类分析的结果一致,说明仅使用这 5 种指标成分就可以实现对不同的发酵虫草菌粉和产品的区分。

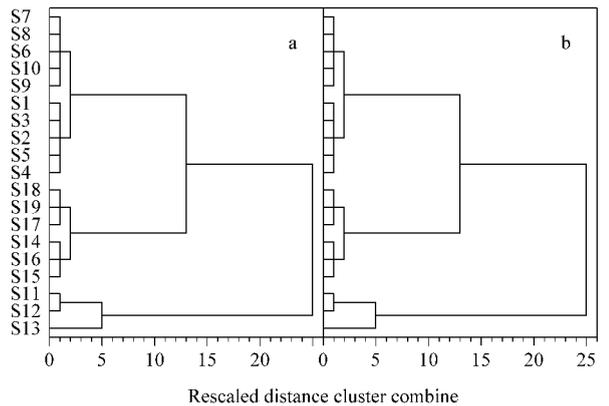


图 5 发酵虫草菌粉样品及产品的 (a) 共有峰及 (b) 指标成分的聚类分析树状图

Fig. 5 Cluster analysis dendrograms for (a) common peaks and (b) index components of fermented *Cordyceps* powder samples and products

3 结论

本文建立了一种发酵虫草菌粉原料和市场上3种主要产品的指纹图谱,得到了16个共有峰,测定了其中9个核苷的含量,并结合统计学方法分析得到了指标性成分,分别为尿苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤、尿嘧啶。以上结果表明,该方法可以定量分析发酵虫草菌粉中多种核苷成分。同时,利用液相色谱指纹图谱结合化学模式识别,可以分析与评价发酵虫草菌粉及产品中的指标性成分,为其质量控制提供简单、可靠的方法。将该分析方法进一步扩展,可以为其他中药指纹图谱的建立、指标成分的分析提供参考,为中药质量评价提供实验依据。

参考文献:

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 1153
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1153
- [2] Wu Y, Chen L H, Jin C, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, 23(20): 220
吴瑶, 陈丽华, 金晨, 等. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 220
- [3] Fan H, Li S P, Xiang J J, et al. Anal Chim Acta, 2006, 567(2): 218
- [4] Zhang W W, Gong T, Han D H, et al. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 35(1): 87
张薇薇, 龚韬, 韩东河, 等. 北京中医药, 2016, 35(1): 87
- [5] Zhao P, Yang M, Deng M M. Drug Evaluation, 2020, 17(19): 5
赵鹏, 杨明, 邓愍民, 药品评价, 2020, 17(19): 5
- [6] Yang P, Zhao X X, Zhang Y W, et al. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(3): 463
杨平, 赵晓霞, 张永文, 等. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 463
- [7] Yang F Q, Li S P. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(1): 231
- [8] Zhao J, Ma S C, Li S P. J Pharm Biomed Anal, 2018, 147: 473
- [9] Zhao Y, Kao C P, Liao C R, et al. Chin Med, 2017, 12(1): 1
- [10] Luo X Q, Li S S, Chen H F, et al. Chinese Journal of New Drugs, 2018, 27(24): 2949
罗小泉, 李珊珊, 陈海芳, 等. 中国新药杂志, 2018, 27(24): 2949
- [11] Zhu M, Chen B L, Shi S M. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2016, 33(5): 611
祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611
- [12] Cui L L, Zhang Y Y, Shao W, et al. Ind Crop Prod, 2016, 85: 29
- [13] Sun L L, Wang M, Ren X L. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(20): 4339
孙立丽, 王萌, 任晓亮. 中草药, 2017, 48(20): 4339
- [14] Li J, Li J, Fu P, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(15): 130
李江, 李娇, 付鹏, 等. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 130
- [15] Li W F, Song J, Shi J Y. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2013, 37(4): 342
李万芳, 宋健, 石俊英. 山东中医药大学学报, 2013, 37(4): 342