

UPLC-MS/MS同时测定蛹虫草中6种成分的含量

陈志远¹, 贡涛², 丁康², 束升阳¹, 居文政^{3*}, 程俊倾⁴

(1. 江苏省中医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210029;
3. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029;
4. 南京本派生物科技有限公司, 南京 210012)

[摘要] 目的:建立同时测定蛹虫草中腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素含量的方法。方法:液质联用技术,以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相等度洗脱,采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱,通过电喷雾离子源,选择正离子模式多反应监测方式检测。结果:腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素的线性范围分别为 37.5~1 200 μg·L⁻¹ ($r=0.9985$), 20~640 μg·L⁻¹ ($r=0.9964$), 40~1 280 μg·L⁻¹ ($r=0.9991$), 77.5~2 480 μg·L⁻¹ ($r=0.9935$), 27.5~880 μg·L⁻¹ ($r=0.9924$), 90~2 880 μg·L⁻¹ ($r=0.9937$), 加样回收率在 92.1%~102.6%, RSD 均 < 8.1%。腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素在蛹虫草中的平均质量分数分别为 268.33, 11.28, 185.66, 1 421.44, 10.67, 812.21 μg·g⁻¹。结论:该法专属性强、快速灵敏,可用于蛹虫草中腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素的含量测定。

[关键词] 蛹虫草; 腺苷; 胞苷; 鸟苷; 甘露醇; 腺嘌呤; 虫草素; 超高效液相色谱-串联质谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0043-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210043

Simultaneous Determination of Six Kinds of Components in Chinese Caterpillar Fungus by UPLC-MS/MS

CHEN Zhi-yuan¹, GONG Tao², DING Kang², SHU Sheng-yang¹, JU Wen-zheng^{3*}, CHENG Jun-qing⁴
(1. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210029, China; 2. First School of Clinical Medicine, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China; 3. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China; 4. Nanjing BenPai Biotechnology Co. Ltd., Nanjing 210012, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a UPLC-MS/MS method for the determination of adenosine, cytidine, guanosine, mannitol, adenine and cordycepin in Chinese Caterpillar Fungus. **Method:** Isocratic elution was carried out with methanol-0.1% formic acid as the mobile phase using liquid chromatography-mass spectrometry technology. The separation was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈, and the mass spectrometer was operated in the positive ionization electrospray (ESI) mode using multiple monitoring (MRM) for analysis of six components. **Result:** The linear ranges of adenosine, cytidine, guanosine, mannitol, adenine and cordycepin were 37.5-1 200 μg·L⁻¹ ($r=0.9985$), 20-640 μg·L⁻¹ ($r=0.9964$), 40-1 280 μg·L⁻¹ ($r=0.9991$), 77.5-2 480 μg·L⁻¹ ($r=0.9935$), 27.5-880 μg·L⁻¹ ($r=0.9924$), 90-2 880 μg·L⁻¹ ($r=0.9937$) respectively. The recoveries of six analytes ranged from 92.1% to 102.6% and the relative standard deviations were all below 8.1%. The average contents of adenosine, cytidine, guanosine, mannitol, adenine and cordycepin were 268.33, 11.28, 185.66, 1 421.44, 10.67, 812.21 μg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** A sensitive, accuracy and suitable UPLC-MS/MS method has been developed, and the method could be applied for the determination of adenosine, cytidine, guanosine, mannitol, adenine and cordycepin in Chinese Caterpillar Fungus.

[收稿日期] 20141209(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09303009-002);江苏省中医药领军人才项目(LJ200906);江苏高校优势学科建设工程项目(2010)

[第一作者] 陈志远, 中药师, 从事医院药学研究, Tel:025-68035747-21124, E-mail:cl1980525@126.com

[通讯作者] * 居文政, 教授, 博士生导师, 从事中药临床药代动力学研究, Tel:025-86617141-21124, E-mail:wzhju333@163.com

[Key words] Chinese Caterpillar Fungus; adenosine; cytidine; guanosine; mannitol; adenine; cordycepin; UPLC-MS/MS

蛹虫草又名北冬虫夏草、北虫草,是由子座(草部分)与菌核(虫的尸体部分)组成的复合体^[1],具有缓解脑溢血和脑血栓、抑制癌细胞生长、增强机体免疫功能、降血糖、抗衰老等^[2-3]多种活性。蛹虫草含有腺苷、胞苷、腺嘌呤等成分^[4-5],且蛹虫草更容易人工栽培^[6],因此蛹虫草目前被选为冬虫夏草的最佳替代品。

为了控制蛹虫草的质量,研究建立一种蛹虫草相关物质快速、简便、准确的测定方法显得尤为重要。据文献报道,关于蛹虫草中相关成分的检测主要有高效液相色谱法^[7-8]、反相离子对色谱法^[9]、毛细管电泳法^[10]等技术。本研究的主要目的是建立一种基于超声波提取和超高效液相色谱-串联质谱同时测定蛹虫草中 6 种成分的方法,旨在为蛹虫草的质量评价提供科学依据。

1 材料

1.1 试药 蛹虫草(南京本派生物科技有限公司,批号 20131208121,20140116111,20140320121);腺苷(批号 13081813),胞苷(批号 13062509),鸟苷(批号 13091006),甘露醇(批号 13110812),腺嘌呤(批号 13120812),虫草素(批号 13111108)对照品均购于成都普瑞法科技开发有限公司。水为超纯水,甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 1290 系列超高效液相色谱仪(美国 Agilent),6430 系列 LC-MS 三重四级杆质谱仪(配有电喷雾化离子源,MassHunter 色谱工作站,美国 Agilent),AE240 型电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司),MICRO-17R 型冷冻离心机(美国 Thermo 公司),WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),Driect-Q5 型超纯水机(法国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱检测条件 Agilent ZOBAX SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 甲酸水(5:95),流速 200 μL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 2 μL。离子源 ESI,正离子化模式,多反应监测模式(MRM),毛细管电压 4 000 V,干燥气温度 400 °C;腺苷的 Fragmentor 及 CE 值分别为 100,20 V;胞苷的 Fragmentor 及 CE 值分别为 100,10 V;鸟苷的 Fragmentor 及 CE 值分别为 90,10 V;甘露醇的 Fragmentor 及 CE 值分别为 70,10 V;腺嘌呤的

Fragmentor 及 CE 值分别为 100,30 V;虫草素的 Fragmentor 及 CE 值分别为 90,20 V;检测对象腺苷 *m/z* 268.1→136,胞苷 *m/z* 244.2→112.1,鸟苷 *m/z* 284.1→152.1,甘露醇 *m/z* 183.1→69,腺嘌呤 *m/z* 136.1→119.1,虫草素 *m/z* 252.1→136。

2.2 对照品溶液的制备 分别取腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素对照品适量,精密称定,加入 50% 甲醇水溶液溶解定容,配置成腺苷 1 200 μg·L⁻¹,胞苷 640 μg·L⁻¹,鸟苷 1 280 μg·L⁻¹,甘露醇 2 480 μg·L⁻¹,腺嘌呤 880 μg·L⁻¹,虫草素 2 880 μg·L⁻¹的混合对照品溶液。依次进行倍比稀释,配成 6 个不同浓度的系列混合对照品溶液。

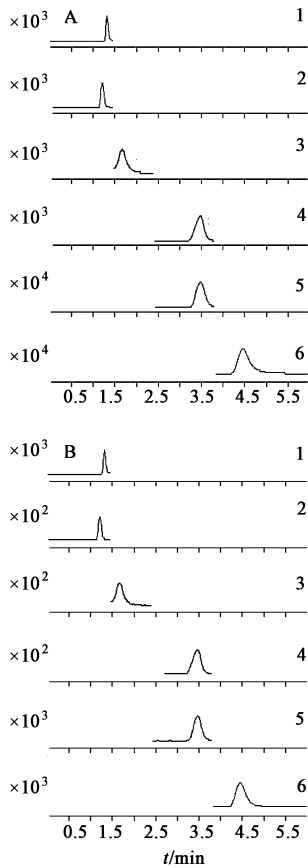
2.3 供试品溶液的制备^[11] 将蛹虫草于烘箱中 40 °C 干燥至恒重,粉碎后过 200 目筛,精密称取干燥粉末 0.5 g,置于 50 mL 量瓶中,加入 90% 甲醇水溶解定容,超声处理 30 min,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 1 mL,置 5 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。按 2.1 项下试验条件下进行测定,见图 1。

2.4 线性关系 分别精密吸取 2.2 项下系列混合对照品溶液 2 μL,按照上述色谱条件进样测定,以峰面积(*Y*)为纵坐标,质量浓度(*X*)为横坐标,绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 蛹虫草中 6 种成分的线性回归分析

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg·L ⁻¹
腺苷	$Y = 148\ 356X + 14\ 506$	0.998 5	37.5 ~ 1 200
胞苷	$Y = 55\ 901X + 1\ 293.2$	0.996 4	20 ~ 640
鸟苷	$Y = 68\ 367X + 3\ 515$	0.999 1	40 ~ 1 280
甘露醇	$Y = 1\ 377X + 969.74$	0.993 5	77.5 ~ 2 480
腺嘌呤	$Y = 28\ 510X + 3\ 919.8$	0.992 4	27.5 ~ 880
虫草素	$Y = 204\ 409X + 66\ 650$	0.993 7	90 ~ 2 880

2.5 精密度试验 取低、中、高 3 个浓度的混合对照品分别重复进样 6 次,进样量 2 μL,按 2.1 项下条件进行测定,记录峰面积。结果腺苷峰面积的 RSD 分别为 4.1%,3.2%,3.4%;胞苷的峰面积 RSD 分别为 2.3%,3.1%,4.3%;鸟苷峰面积的 RSD 分别为 3.3%,1.5%,3.6%;甘露醇峰面积的 RSD 分别为 4.2%,2.5%,2.7%;腺嘌呤峰面积的 RSD 分别为 3.8%,3.7%,3.7%;虫草素峰面积的



1. 胞苷; 2. 甘露醇; 3. 腺嘌呤; 4. 鸟苷; 5. 腺苷; 6. 虫草素; A 对照品; B. 供试品

图 1 蛹虫草 UPLC-MS/MS

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of Chinese Caterpillar Fungus

RSD 分别为 3.9%, 2.9%, 3.5%。

2.6 稳定性试验 取同一批号(20131208121)分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下条件进行测定。结果腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 4.3%, 3.8%, 2.2%, 2.9%, 3.5%, 结果表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 分别取同一批号样品(20131208121)6 份, 按供试品溶液的制备方法操作, 依法测定。结果腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素含量分别为 545.3, 27.3, 362.8, 2258.5, 16.3, 1451.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; RSD 分别为 1.6%, 2.5%, 2.8%, 3.3%, 2.9%, 2.6%。表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品(批号 20131208121)约 0.25 g, 分别精密加入各对照品溶液适量, 按 2.3 项下方法制备, 依法测定, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 蛹虫草中 6 种成分的加样回收率试验

Tab 2 Average recoveries for 6 analytes of Chinese Caterpillar Fungus

成分	称样量 /mg	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
腺苷	250.4	71.34	70.48	142.81	101.4	100.6	2.1
	250.6	71.40	70.48	144.21	103.3		
	250.5	71.37	70.48	140.16	97.6		
	250.8	71.46	70.48	142.92	101.4		
	250.2	71.29	70.48	140.64	98.4		
	250.9	71.49	70.48	143.03	101.5		
胞苷	250.4	2.62	2.52	5.26	104.8	100.6	4.2
	250.6	2.62	2.52	5.00	94.3		
	250.5	2.62	2.52	5.22	103.1		
	250.8	2.63	2.52	5.21	102.4		
	250.2	2.62	2.52	5.21	102.6		
	250.9	2.63	2.52	5.05	96.3		
鸟苷	250.4	54.23	50.40	104.22	99.2	97.6	4.1
	250.6	54.27	50.40	105.28	101.2		
	250.5	54.25	50.40	100.87	92.5		
	250.8	54.31	50.40	101.49	93.6		
	250.2	54.18	50.40	105.69	102.2		
	250.9	54.34	50.40	103.12	96.8		
甘露醇	250.4	368.39	360.82	741.11	103.3	100.6	3.3
	250.6	368.68	360.82	744.66	104.2		
	250.5	368.53	360.82	719.25	97.2		
	250.8	368.97	360.82	720.05	97.3		
	250.2	368.09	360.82	741.18	103.4		
	250.9	369.12	360.82	723.81	98.3		
腺嘌呤	250.4	2.67	2.48	5.11	98.4	98.2	3.9
	250.6	2.67	2.48	4.98	93.4		
	250.5	2.67	2.48	5.20	102.2		
	250.8	2.67	2.48	5.06	96.4		
	250.2	2.66	2.48	5.22	103.2		
	250.9	2.67	2.48	5.04	95.4		
虫草素	250.4	232.76	220.82	450.93	98.8	95.6	2.9
	250.6	232.95	220.82	436.99	92.4		
	250.5	232.86	220.82	439.10	93.4		
	250.8	233.14	220.82	442.25	94.7		
	250.2	232.58	220.82	451.63	99.2		
	250.9	233.23	220.82	442.57	94.8		

2.9 样品测定 取 3 批蛹虫草,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样 2 μL ,并按 2.1 项下条件测定,计算各批蛹虫草中腺苷、胞苷、鸟苷、甘露醇、腺嘌呤、虫草素的含量,结果见表 3。

表 3 蛹虫草中 6 种化学成分含量测定 ($n=3$)

批号	腺苷	胞苷	鸟苷	甘露醇	腺嘌呤	虫草素
20131208121	271.52	13.52	180.94	1 479.34	8.25	725.17
20140116111	248.03	9.82	159.13	1 311.44	13.12	780.36
20140320121	285.43	10.49	216.91	1 473.53	10.63	931.1

3 讨论

曾采用高效液相色谱法检测蛹虫草中的成分,但存在各成分相互干扰严重,无法进行准确的定量分析,某些成分含量低,无明显的响应信号;操作繁琐、灵敏度低、分析速度慢、多成分含量同时测定色谱条件摸索困难等问题。

通过对不同规格的色谱柱进行比较,结果采用 Agilent ZOBAX SB C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 150 mm, 5 μm) 所得色谱峰保留时间适中,峰形较好。实验中分别尝试采用正、负 2 种离子模式,发现正离子模式下的离子化效率明显高于负离子模式。同时,考察了流动相的组成与比例对分析结果的影响,结果表明当甲醇-0.1% 甲酸水溶液 (5:95) 时,6 个化合物分离良好,彼此不会相互影响,且均在 5 min 内出峰。

多数文献报道^[12-14],虫草类制品一般只测定腺苷和虫草素,其中腺苷已被用作冬虫夏草的质控指标,而虫草中其他核苷类物质(如胞苷、腺嘌呤),因含量较低,较少作为含量测定指标。而仅以单一成分作为质量控制的指标存在一定的局限性,需建立多种有效成分的含量测定方法才更容易全面控制虫草类制品质量,本实验与文献相比,目标成分多,方法准确、简便、快速,重复性和分离效果好,为科学控制虫草类制品提供了可靠而简单的方法。

[参考文献]

[1] 郑婷婷,李多伟,王英娟,等. 蛹虫草液体培养条件优

化及有效成分含量分析[J]. 菌物研究, 2004, 2 (4):22-25.

[2] 凌建亚,孙迎节,吕鹏,等. 虫草属真菌中虫草素的超声波提取及其毛细管电泳测定[J]. 菌物系统, 2002, 21(3):394-399.

[3] 樊慧婷,林洪生. 蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(15):2549-2552.

[4] 贡成良,吴友良,朱军贞,等. 家蚕蛹虫草的人工培育及其成分分析[J]. 中国食用菌, 1993, 12(4):21-23.

[5] 刘静明,钟裕容,杨智,等. 蛹虫草化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(10):32-33.

[6] 张红霞,吴畏,陈伟,等. 北冬虫夏草发酵液中虫草素和腺苷含量的 HPLC 分析[J]. 上海农业学报, 2005, 21(4):53-56.

[7] Ikeda Rie, Nishimura Miho, Sun Yen, et al. Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of Cordyceps and its allies[J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(6):630-636.

[8] 张元杰,钱正明,陈肖家,等. HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1):33-36.

[9] Xie J W, Huang L F, Hu W, et al. Analysis of the main nucleosides in Cordyceps Sinensis by LC/ESI-MS [J]. Molecules, 2010, 15(1):305-314.

[10] Gong Y X, Li S P, Li P, et al. Simultaneous determination of six main nucleosides and bases in natural and cultured Cordyceps by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 2004, 1055(1/2):215-221.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:106, 824-825.

[12] 黄兰芳,郭方遒,梁逸曾,等. HPLC-ESI-MS 测定冬虫夏草和蚕蛹虫草中腺苷和虫草素含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8):762-764.

[13] 简利茹,杜双田. HPLC 与 LC-MS/MS 测定蛹虫草发酵液中虫草素的方法比较[J]. 食品科学, 2013, 34(14):276-279.

[14] 周菊峰,周芸,郭方遒,等. LC/ESI-MS 分离和测定冬虫夏草及其代用品的有效成分[J]. 分析科学学报, 2005, 21(2):194-196.

[责任编辑 顾雪竹]