# 基于多糖部分酸降解产物电泳谱的发酵虫草菌粉胶囊鉴定研究

张　建[1]，马梦楠[1]，谢笑莹[1]，卢　凯[1]，郭怀忠[1,2]*
（1. 河北大学药学院，河北保定 071002；2. 河北省药物质量分析控制重点实验室，河北保定 071002）

**摘要**：建立了毛细管区带电泳（CZE）法测定发酵虫草菌粉（FCP）多糖部分酸降解产物。采用 1- 苯基 -3- 甲基 -5- 吡唑啉酮（PMP）使降解产物衍生化。采用未涂层弹性石英毛细管柱，运行缓冲液为 40 mmol/L 四硼酸钠缓冲液（pH 10.1）。检测波长为 245 nm，运行电压为 17 kV，采用重力进样（10 cm×15 s）进行测定。并通过单因素试验和正交设计，优化虫草多糖的部分酸降解条件。结果显示，最优条件为盐酸浓度为 0.8 mol/L，降解温度为 80 ℃，降解时间为 4 h。不同 FCP 胶囊的多糖部分酸降解产物的 CZE 谱图差异明显，特征性强，且实现了准确归类，可用于不同来源 FCP 制剂的质量控制，也为其构效关系研究及其他中药制剂的质量分析提供了参考。

**关键词**：发酵虫草菌粉；虫草多糖；部分降解；毛细管区带电泳；质量分析
**中图分类号**：O657.8　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)02-0240-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.02.011

# Identification of Fermented *Cordyceps* Powder Capsules Based on Capillary Electropherogram of the Partial Acid Degradation Products of Polysaccharides

ZHANG Jian[1], MA Mengnan[1], XIE Xiaoying[1], LU Kai[1], GUO Huaizhong[1,2]*
(*1. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002; 2. Key Lab. of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Baoding 071002*)

**ABSTRACT**: A capillary zone electrophoresis (CZE) method was established to determine the partial acid degradation products of polysaccharides in fermented *Cordyceps* powder (FCP). Degradation products were derived using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). The uncoated flexible fused silica capillary column was used, with 40 mmol/L sodium tetraborate buffer (pH 10.1) as the running buffer. The detection wavelength was 245 nm, the operating voltage was 17 kV, and gravity injection (10 cm×15 s) was used for measurement. And the partial acid degradation conditions of *Cordyceps* polysaccharides were optimized by the single factor experiment and orthogonal design. The results showed that the optimized conditions were as follows: the concentration of hydrochloric acid was 0.8 mol/L, the degradation temperature was 80 ℃, and the degradation time was 4 h. The CZE spectra of the partial acid degradation products of polysaccharides in different FCP capsules were significantly different, with strong characteristics, and accurate classification was achieved, which could be used for the quality control of FCP preparations from different sources, and also provided a reference for its structure-activity relationship research and quality analysis of other traditional Chinese medicine preparations.

**Key Words**: fermented *Cordyceps* powder; *Cordyceps* polysaccharides; partial degradation; capillary zone electrophoresis; quality analysis

**收稿日期**：2021-02-23
**基金项目**：国家自然科学基金项目(21575033)、河北省自然科学基金项目(H2021201018、H2016201221)
**作者简介**：张　建(1993—)，男，硕士研究生，专业方向：中药多糖质量控制。
**通信作者**：郭怀忠(1968—)，男，博士，教授，从事中药质量控制及其药效学研究。
E-mail：ghuaizh@aliyun.com

人工发酵虫草菌粉（fermented *Cordyceps* powder，FCP）系对天然冬虫夏草菌株进行深层发酵得到的菌粉[1]，近年来，其作为日见匮乏的冬虫夏草野生资源的替代品而备受关注。研究表明，FCP 的主要化学成分与天然冬虫夏草类似[2—3]，具

有补肾益肺、止血化痰的功能[4]。以FCP为原料的制剂主要包括金水宝胶囊、百令胶囊、至灵菌丝胶囊以及心肝宝胶囊等，依据所用菌种不同，其主要成分分别为发酵虫草菌粉（Cs-4）、发酵冬虫夏草菌粉（Cs-C-Q80）、虫草被孢菌粉、人工虫草菌丝发酵粉。

《中华人民共和国药典》2020年版收载了百令胶囊和金水宝胶囊，分别对其总氨基酸、甘露醇、腺苷、鸟苷、尿苷和麦角甾醇等成分进行质量控制。虫草多糖作为FCP的药效物质之一，具有抗菌、抗肿瘤、降血糖和增强免疫力等作用[5−6]，与冬虫夏草的功效一致。朱卫丰等采用HPLC法研究了金水宝胶囊中虫草多糖的单糖组成，发现主要含有甘露糖、氨基葡萄糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖等11种单糖成分[7]；本课题组前期试验也发现不同FCP胶囊中虫草多糖所含单糖成分多有相似，但含量各异[8]，且不适合作为特征成分进行鉴定研究，同时多糖又常因相对分子质量大、溶解度低、结构特征复杂等特点导致其分析困难。近年来的研究表明，中药多糖在一定条件下进行部分降解后，可得到包含一系列单糖、寡糖的降解产物，不仅保留了原多糖的活性，并且可反映原多糖的结构特征[9]，使多糖分析更具有针对性和特征性。WU等通过研究野生和人工养殖的不同来源虫草多糖部分酸降解及酶降解后寡糖的高效薄层色谱（HPTLC）图谱，发现两者的寡糖分布非常接近，继而探讨了人工冬虫夏草替代天然冬虫夏草的可能[10]。但采用多糖部分酸降解产物对金水宝胶囊等FCP制剂的分析尚未见报道。

与HPLC法和HPTLC法相比，毛细管区带电泳（capillary zone electrophoresis，CZE）法具有分辨率高、峰容量大、分析速度快等优点。本研究拟优化FCP胶囊中多糖的部分酸降解条件，测定虫草多糖部分酸降解产物的CZE图谱，并结合聚类分析鉴定不同来源的FCP胶囊，以期为虫草发酵菌株的鉴定和冬虫夏草新药源的开发提供参考[11]。

## 1 仪器与试药

CL1020型高效毛细管电泳仪及HW-2000型色谱工作站（北京彩陆科学仪器有限公司）；未涂层弹性石英毛细管柱（河北永年锐沣色谱器件有限公司）；BT25S型电子分析天平（德国Sartorius公司）；PHS-3C型酸度计（上海理达仪器厂）。

金水宝胶囊（江西济民可信金水宝制药有限公司，规格0.33 g，批号171248、171154、171211）；百令胶囊（杭州中美华东制药有限公司，规格0.5 g，批号130911、1711301、1806316）；至灵菌丝胶囊（河北瑞森药业有限公司，规格0.25 g，批号022180103、022170102、022170604）；心肝宝胶囊（河北长天药业有限公司，规格0.25 g，批号18150601、18160605、18171006）；以上制剂编号分别为S1～S12。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP，日照力德士化工有限公司，含量99.0%）；四硼酸钠（河北省保定化学试剂厂，分析纯）；硫脲（天津市福晨化学试剂厂，分析纯）；乙醇为医用级，甲醇为色谱纯，氢氧化钠、盐酸、正丁醇和三氯甲烷均为分析纯；水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 电泳条件

*毛细管柱* 未涂层弹性石英毛细管柱（70 cm×50 μm×61 cm）；*运行缓冲液* 40 mmol/L四硼酸钠缓冲液（pH 10.1）；*检测波长* 245 nm；*运行电压* 17 kV；*进样量* 重力进样10 cm×15 s；*柱温* 室温。

### 2.2 溶液配制

*PMP衍生化试剂*：精密称取PMP 0.87 g，置10 ml量瓶中，用甲醇溶解并定容，摇匀，即得0.5 mol/L的PMP衍生化试剂。

*内标溶液*：精密称取硫脲0.25 g，置50 ml量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，即得5 mg/ml的硫脲溶液。

*四硼酸钠缓冲液*：精密称取四硼酸钠0.76 g，置50 ml量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，即得40 mmol/L的四硼酸钠缓冲液，再用4 mol/L氢氧化钠溶液调至pH 10.1。

*Sevag试剂*：三氯甲烷与正丁醇照体积比4∶1混匀，即得。

*虫草多糖溶液*：精密称取混匀菌粉胶囊内容物2.0 g，加入超纯水16.0 ml，于100 ℃水浴加热1 h，放冷，离心（2 200×*g*）10 min，取上清液。将残渣

重复提取 2 次，合并 3 次提取的上清液。向虫草多糖提取液中加入乙醇使含醇量为 80%，静置过夜。随后离心（2 200×*g*）5 min，取沉淀物用 80%乙醇溶液洗涤 3 次，得虫草粗多糖。将虫草粗多糖用热水 20 ml 复溶，向多糖溶液中加入 Sevag 试剂 4 ml，剧烈振摇后，离心（2 200×*g*）5 min，吸取上清液，除去水层和三氯甲烷层之间（中间层）变性的蛋白。重复上述步骤，直至中间层无蛋白，转移至 25 ml 量瓶中，用水定容，摇匀，得虫草多糖溶液。

*虫草多糖部分酸降解液*：精密量取上述虫草多糖溶液 2 ml，加入 1.6 mol/L 盐酸 2 ml，使盐酸浓度达到 0.8 mol/L，密封，于 80 ℃降解 4 h，放冷，用 10 mol/L 氢氧化钠溶液中和，然后将溶液转移至 5 ml 量瓶中，加入内标溶液 0.2 ml，用水定容，摇匀，即得虫草多糖部分酸降解液。

*供试品溶液*：精密量取虫草多糖部分酸降解液 0.2 ml，置 1.5 ml 离心管中，依次加入 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 0.1 ml 和 PMP 衍生化试剂 0.1 ml，涡旋混匀，于 70 ℃反应 0.5 h，放冷，加入 0.3 mol/L 盐酸 0.1 ml 中和，再加入三氯甲烷 1 ml，涡旋混匀，离心（2 200×*g*）3 min，取上清液，再离心（14 800×*g*）3 min，即得供试品溶液。

**2.3** 发酵虫草菌粉多糖部分酸降解条件的优化

对影响多糖部分酸降解效果较大的盐酸浓度、降解温度和降解时间首先进行单因素试验以确定考察范围，再进行正交试验，以寡糖峰数目、峰面积比（寡糖峰面积总和与内标峰面积的比值）为指标进一步优化。

**2.3.1** 盐酸浓度

固定降解温度为 80 ℃、降解时间为 3 h，考察盐酸浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L 时虫草多糖部分酸降解的情况，结果见图 1，盐酸浓度为 0.6 mol/L 时，峰数目和峰面积比最大。

**2.3.2** 降解温度

控制盐酸浓度为 0.6 mol/L、降解时间为 3 h，测定降解温度分别为 60、70、80、90、100 ℃时，虫草多糖部分酸降解的变化情况。结果见图 2，随着温度的升高，峰数目及峰面积比均先增加后减少，在 80 ℃时达到极值。

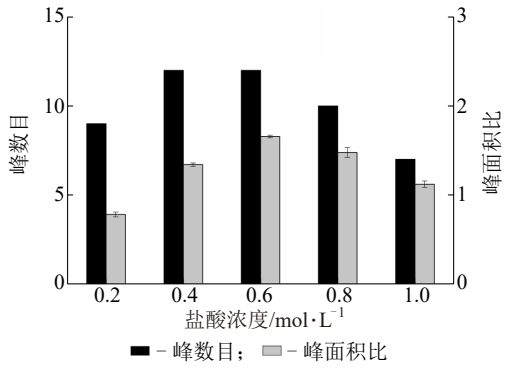



**图 1　盐酸浓度对部分酸降解的影响**（*n*=3）

Fig.1　Effect of Concentration of Hydrochloric Acid on Partial Acid Degradation（*n*=3）

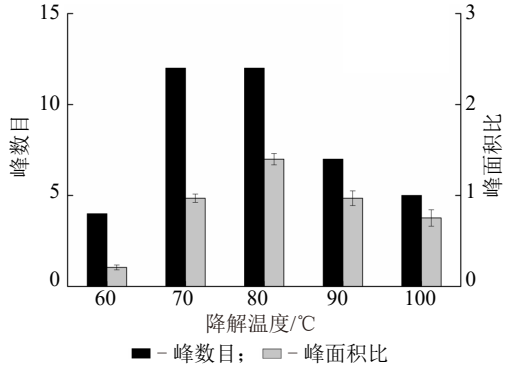



**图 2　降解温度对部分酸降解的影响**（*n*=3）

Fig.2　Effect of Degradation Temperature on Partial Acid Degradation（*n*=3）

**2.3.3** 降解时间

固定盐酸浓度为 0.6 mol/L、降解温度为 80 ℃，改变降解时间分别为 1、2、3、4、5 h，进行降解、衍生化及 CZE 测定。结果见图 3，综合考虑峰数目与峰面积比的变化趋势，部分酸降解 4 h 时峰面积比达到最大且峰数目最多。

**2.3.4** 正交设计优化

基于上述单因素考察得到的优化结果，并连同其前后水平确定考察范围，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，正交试验因素及水平见表 1。将寡糖峰数目（*x*）与峰面积比（*y*）的综合评分（*Y*，计算公式见式①）为指标对虫草多糖部分酸降解条件进行优化，峰数目所占权重为 0.9，峰面积比所占权重为 0.1。

$$Y=\left(\frac{x}{\text{最大峰数目}}\times 0.9+\frac{y}{\text{最大峰面积比}}\times 0.1\right)\times 100 \quad \text{式①}$$

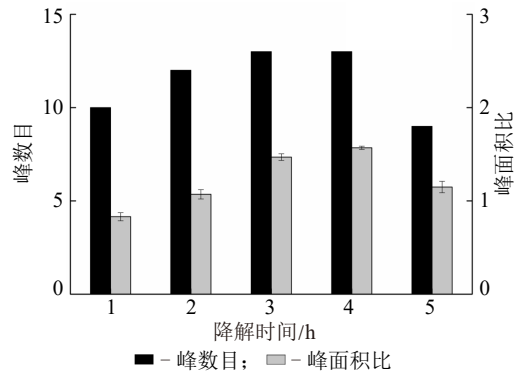



**图 3 降解时间对部分酸降解的影响**（*n*=3）

Fig.3 Effect of Degradation Time on Partial Acid Degradation（*n*=3）

**表 1 正交试验因素水平表**

Tab.1 Factors and Levels of the Orthogonal Experiment

| 因素 | 盐酸浓度（*A*）/mol·L$^{-1}$ | 温度（*B*）/℃ | 时间（*C*）/h |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.4 | 70 | 3 |
| 2 | 0.6 | 80 | 4 |
| 3 | 0.8 | 90 | 5 |

由正交试验结果（表 2）及其方差分析结果（表 3）可知，影响虫草多糖部分酸降解效果的因素顺序为降解温度 > 盐酸浓度 > 降解时间，最优部分酸降解条件的组合为 $A_3B_2C_2$，即盐酸浓度 0.8 mol/L，降解温度 80 ℃，降解时间 4 h。降解温度对虫草多糖部分酸降解效果的影响显著，而盐酸浓度、降解时间影响不显著。

**2.4** 方法学考察

**2.4.1** 精密度试验

取出金水宝胶囊（批号 171211）中的发酵虫草菌粉，混匀，精密称取 2.0 g，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，按照优化条件进行部分酸降解、衍生化并连续进样 6 次，计算得各降解产物峰面积与内标峰面积比值的 RSD（*n*=6）为 2.3%～3.6%，表明此方法精密度良好。

**2.4.2** 重复性试验

照“**2.4.1**”项下方法操作，平行制备 6 份金水宝胶囊（批号 171211）的虫草多糖部分酸降解样品，分别进行 CZE 分析，测得各降解产物峰面积与内标峰面积比值的 RSD（*n*=6）为 2.8%～4.7%，表明该方法重复性良好。

**表 2 虫草多糖部分酸降解条件的正交试验结果**

Tab.2 Orthogonal Experiment Results of the Partial Acid Degradation Conditions of *Cordyceps* Polysaccharide

| 试验编号 | *A*/mol·L$^{-1}$ | *B*/℃ | *C*/h | 综合得分（*Y*） |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.4 | 70 | 3 | 40.56 |
| 2 | 0.4 | 80 | 4 | 95.33 |
| 3 | 0.4 | 90 | 5 | 58.91 |
| 4 | 0.6 | 70 | 4 | 75.33 |
| 5 | 0.6 | 80 | 5 | 80.38 |
| 6 | 0.6 | 90 | 3 | 64.12 |
| 7 | 0.8 | 70 | 5 | 89.88 |
| 8 | 0.8 | 80 | 3 | 92.24 |
| 9 | 0.8 | 90 | 4 | 62.54 |
| $k_1$ | 64.93 | 68.59 | 65.64 | |
| $k_2$ | 73.28 | 89.32 | 77.73 | |
| $k_3$ | 81.55 | 61.86 | 76.39 | |
| R | 16.62 | 27.46 | 12.09 | |
| 最佳方案 | $A_3$ | $B_2$ | $C_2$ | |

**表 3 方差分析结果**

Tab.3 Results of the Variance Analysis

| 误差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | *F*值 | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|
| *A* | 412.87 | 2 | 206.44 | 4.43 | |
| *B* | 1 232.01 | 2 | 616.01 | 13.21 | *P*<0.10 |
| *C* | 262.06 | 2 | 131.03 | 5.62 | |
| *D*（误差） | 93.26 | 2 | 46.43 | | |

注：$F_{0.10}(2, 2)=9.0$，$F_{0.05}(2, 2)=19.0$

**2.4.3** 稳定性试验

取出金水宝胶囊（批号 171211）中的发酵虫草菌粉，混匀，分别精密称取 2.0 g，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，将上述配制的供试品溶液分别于常温放置 0、2、4、6、8 h 进行 CZE 测定，计算得各降解产物峰面积与内标峰面积比值的 RSD（*n*=5）为 1.4%～2.9%，说明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

**2.4.4** 耐用性试验

照“**2.4.1**”项下方法制备金水宝胶囊（批号 171211）的虫草多糖部分酸降解样品，参考“**2.1**”项下电泳条件以不同的分离电压（16.99、17.00、17.01 kV）、不同浓度的四硼酸钠缓冲液（38、40、42 mmol/L）、不同 pH 值的四硼酸钠缓冲液（pH 10.0、10.1、10.2）进样测定，计算各降解产物峰面积与内标峰面积比值的 RSD，考察方法耐用性。结果表明，在上述条件下各成分峰都能达到良好的分离，峰面积比值的 RSD（*n*=3）均小于 3%，表明该方法耐用

性良好。此外还考察了不同检测波长（243、245、247 nm）对测定结果的影响，结果显示该条件下峰面积比值的 RSD（$n$=3）大于 10%，说明检测波长对虫草多糖部分酸降解产物的测定影响较为显著，应严格控制。

**2.5** 样品测定

分别取金水宝胶囊、百令胶囊、至灵菌丝胶囊和心肝宝胶囊各 3 批，进行虫草多糖的提取、部分酸降解和衍生化后，按“**2.1**”项下的电泳条件进行 CZE 测定。结果见图 4，同一品种各批次产品谱图之间并无明显区别，但不同品种的谱图之间差异明显。根据本课题组前期研究[8]，谱图中 PMP 峰之前的峰为寡糖峰，之后的峰为单糖峰，可较全面地反映各产品多糖的结构特征，实现 4 种 FCP 制剂的准确鉴定。

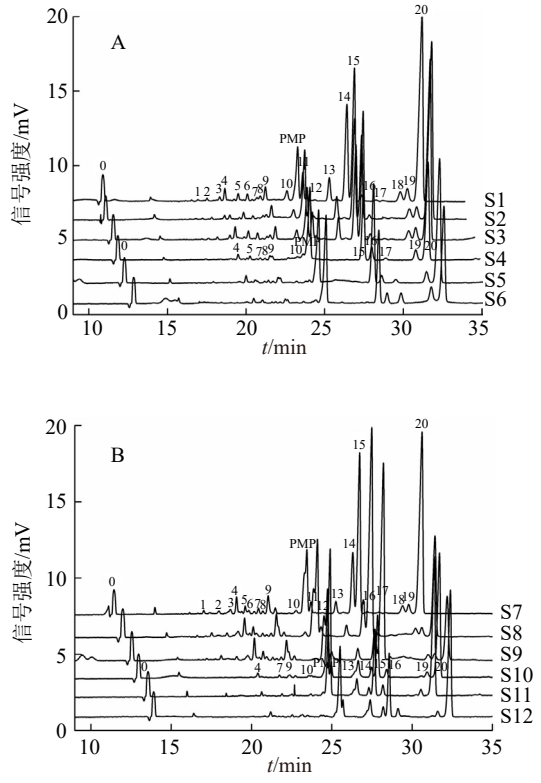
虫草多糖部分酸降解产物 PMP 衍生物的迁移时间取决于其核质比。在碱性电泳条件下，衍生物本身基本不带电荷，但由于缓冲液中的硼酸根离子易与糖发生可逆的络合作用，使衍生物整体带负电，而这种络合作用与衍生物的空间结构有关。硼酸根离子与单糖的络合作用最强，由于弯曲等空间位阻的影响，双糖、三糖等低聚糖中的单糖与硼酸根离子的络合作用依次减弱，因而单糖的核质比（负电性）最高、迁移时间长，而衍生物聚合度越高，核质比（负电性）越小，因此迁移时间越短。

**2.6** 聚类分析

为进一步探讨多糖部分酸降解产物在虫草菌粉胶囊质量分析中的应用，对测得的 12 批 FCP 胶囊多糖部分酸降解产物 CZE 图谱进行聚类分析。运用 Minitab 17 软件，取谱图中的 20 个特征峰面积与内标峰面积的比值为变量，采用最长距离法以 Manhattan 距离为量度进行观测值聚类分析。聚类结果如图 5 所示，距离为 1.11 时 S10、S11、S12 号样品归为一类；距离为 2.43 时 S7、S8、S9 号样品归为一类；距离为 3.29 时 S1、S2、S3 号样品归为一类；距离为 3.59 时 S4、S5、S6 号样品归为一类，即不同种类的 FCP 胶囊分别聚为一类。

## 3 小结

本研究以 FCP 胶囊药效物质之一的多糖为质控指标，测定了金水宝等不同 FCP 胶囊中多糖部分酸降解产物的 CZE 图谱，实现了对功效相近、但来源不同的 FCP 胶囊的有效鉴定。本方法简便高效、




A：S1 ～ S6 批 FCP 胶囊，B：S7 ～ S12 批 FCP 胶囊
0 - 内标；1 ～ 10 - 寡糖；11、12 和 18 - 未知单糖；
13 - 木糖；14 - 阿拉伯糖；15 - 葡萄糖；16 - 核糖；
17 - 鼠李糖；19 - 甘露糖；20 - 半乳糖

**图 4　12 批 FCP 胶囊多糖部分酸降解产物 CZE 谱图**

Fig.4　CZE Spectra of Partial Acid Degradation Products of Polysaccharide from Twelve Batches of FCP Capsules

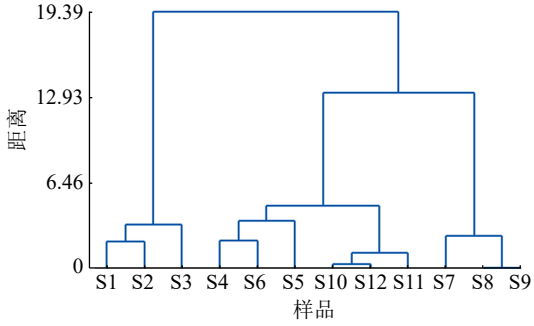



**图 5　12 批 FCP 胶囊的聚类分析**

Fig.5　Cluster Analysis of Twelve Batches of FCP Capsules

特征性强，可为FCP类产品药效物质研究及质量控制提供参考，并有助于其他中药制剂多糖成分质量控制方法的开发。

## 参考文献：


[1] 吴 瑶, 陈丽华, 金 晨, 等. 发酵虫草菌粉类产品质量标准研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, **23**(20): 220-227.

[2] 张薇薇, 龚 韬, 韩东河, 等. 人工虫草与冬虫夏草成分的比较研究[J]. 北京中医药, 2016, **35**(1): 87-91.

[3] 邹秦文, 肖新月, 林瑞超. 冬虫夏草液体深层发酵菌丝体相关制剂的研究现状[J]. 药物分析杂志, 2009, **29**(4): 680-687.

[4] 赵加茜, 朱卫丰, 陈丽华, 等. 基于主成分分析和聚类分析的发酵虫草菌粉类产品氨基酸比较研究[J]. 中草药, 2018, **49**(12): 2866-2872.

[5] YAN J K, WANG W Q, WU J Y. Recent advances in *Cordyceps* sinensis polysaccharides: mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: a review [J]. *J Funct Foods*, 2013, **6**(1): 33-47.

[6] LI S P, ZHAO K J, JI Z N, *et al*. A polysaccharide isolated from *Cordyceps* sinensis, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury [J]. *Life Sci*, 2003, **73**(19): 2503-2513.

[7] 朱卫丰, 赵加茜, 刘小林, 等. 金水宝胶囊中发酵虫草菌粉多糖的指纹图谱研究[J]. 中草药, 2017, **48**(16): 3322-3326.

[8] 张 建, 卢 凯, 刘艳萍, 等. 毛细管区带电泳法测定不同虫草菌粉制剂中多糖的单糖组成[J]. 中草药, 2019, **50**(1): 90-96.

[9] YANG F F, GUO H Z, ZHANG L S, *et al*. Identification of confusable herbal medicines by mapping of partial degradation products from herbal medicine polysaccharides [J]. *Anal Sci*, 2018, **34**(11): 1291-1296.

[10] WU D T, CHEONG K L, WANG L Y, *et al*. Characterization and discrimination of polysaccharides from different species of *Cordyceps* using saccharide mapping based on PACE and HPTLC [J]. *Carbohydr Ploym*, 2014, **103**: 100-109.

[11] 安 超, 马赛箭, 常 帆, 等. 冬虫夏草相关菌丝体发酵产品研发策略概述[J]. 陕西农业科学, 2016, **62**(9): 119-122.