



梅全喜

现任深圳市宝安纯中医治疗医院中药学科带头人、主任中药师，广州中医药大学教授、博士生导师。兼任全国高等学校中药临床药学创新教材建设指导委员会主任委员、中国癌症基金会鲜药学术委员会副主任委员等学术兼职 10 多项及 10 多家中医药杂志副主编、编委等。主持和参加国家及省部级科研项目 20 多项，获省、市科技进步奖 10 多项。主编出版中药专著 70 多部，公开发表中药研究论文 500 多篇。



钱正明

东阳光集团国家中医药管理局冬虫夏草繁育与产品研发重点研究室主任中药师。现任中国菌物学会会员，《今日药学》编委和《Chinese Medicine》青年编委。主要从事食药真菌质量评价研究，主要研究方向包括质量评价方法开发和标准制定，已制定食药真菌标准 9 项。主持或参与国家、省市级科研项目 20 多项，参与出版著作 4 部，发表科研论文 150 多篇，授权发明专利 60 多项，获省市级科技奖项 7 项。

绿色高效液相色谱法分析四种虫草药材的游离和总甾醇含量

范卫锋^{1,2,3}，李皓翔¹，李文佳²，庄诗诗²，贺媛²，占心侖¹，梅全喜^{3*}，
钱正明^{2*}

1 广州中医药大学，广东 广州 510011

2 宜昌山城水都冬虫夏草有限公司，湖北 宜昌 443300

3 深圳市宝安纯中医治疗医院，广东 深圳 518101

摘要：虫草类药材采用 85%乙醇超声提取游离甾醇、采用 0.5 mol/L 氢氧化钾-乙醇溶液回流提取总甾醇，并用绿色溶剂(乙醇和水)固相萃取法纯化分析溶液。用 HPLC-ELSD 法测定麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的含量，色谱柱为 Poroshell 120 EC-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)，绿色流动相乙醇-

基金项目：湖北省科技重大专项(2020ACA007-05)；深圳市“医疗卫生三名工程”项目(SZZYSM202106004)

Supported by Hubei Science and Technology Major Project (2020ACA007-05) and Shenzhen “Three Projects of Medical and Health Care” (SZZYSM202106004).

*Corresponding authors. E-mail: meiquanxi@163.com, qianzhengming1982@126.com

ORCID: FAN Weifeng (0000-0003-0721-1436), QIAN Zhengming (0000-0002-8467-2941)

Received: 2022-04-24, accepted: 2022-05-23

水(89:11), 流速为 0.5 mL/min, 结果表明所建立的分析方法 3 种甾醇成分在考察的浓度范围内, 线性关系好、精密度和准确度高。20 批虫草类样品均含结合型甾醇和游离型甾醇; 冬虫夏草繁育品与野生品均含 3 种甾醇, 两者含量相当; 凉山虫草(野生品)、蛹虫草(培植品)、蝉花(野生品)可检测到麦角甾醇。该方法可有效鉴别冬虫夏草和其他 3 种虫草产品, 为虫草类产品质量评价提升提供了依据。

关键词: 虫草; 绿色溶剂; 甾醇; 固相萃取; HPLC-ELSD

[引用本文] 范卫锋, 李皓翔, 李文佳, 庄诗诗, 贺媛, 占心伶, 梅全喜, 钱正明, 2022. 绿色高效液相色谱法分析四种虫草药材的游离和总甾醇含量. 菌物学报, 41(11): 1796-1806

Fan WF, Li HX, Li WJ, Zhuang SS, He Y, Zhan XY, Mei QX, Qian ZM, 2022. Determination of free and total sterols in four cordyceps species by green HPLC method. Mycosystema, 41(11): 1796-1806

Determination of free and total sterols in four cordyceps species by green HPLC method

FAN Weifeng^{1,2,3}, LI Haoxiang¹, LI Wenjia², ZHUANG Shishi², HE Yuan², ZHAN Xinyi¹, MEI Quanxi^{3*}, QIAN Zhengming^{2*}

1 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510011, Guangdong, China

2 Yichang Shanchengshuidu Cordyceps Co., Ltd., Yichang 443300, Hubei, China

3 Shenzhen Bao'an Authentic TCM Therapy Hospital, Shenzhen 518101, Guangdong, China

Abstract: Cordyceps herbal samples were extracted by ultrasonic extraction with 85% ethanol for obtaining free sterols, and extracted by reflux extraction with 0.5 mol/L potassium hydroxide-ethanol solution for total sterols. The sample solution was purified by solid phase extraction with green solvent (ethanol and water). Determination of three kinds of sterols (ergosterol, cholesterol and sitosterol) separated from the samples was carried out by HPLC-ELSD, and performed on a Poroshell 120 EC-C₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) with green mobile phase (ethanol:water=89:11) at flow rate of 0.5 mL/min. The results showed that the developed analytical method had a good linear relation, precision and accuracy. All the 20 batches of cordyceps samples contain free and conjugated sterols. All the samples of cultivated and wild *Ophiocordyceps sinensis* contain three kinds of sterols of similar content. *Cordyceps liangshanensis* (wild), *C. militaris* (cultivated) and *C. chanhua* (wild) contain ergosterol. This method can be used to determine sterol content of cordyceps samples for improving the quality evaluation of cordyceps products.

Keywords: cordyceps; green solvent; sterol; solid phase extraction; HPLC-ELSD

冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 是真菌寄生在蝙蝠蛾科幼虫所形成的中药材(戴玉成和李玉 2011; 张姝等 2013; 董彩虹等 2016; Olatunji *et al.* 2018)。冬虫夏草药用记载首见于 1 300 多

年前《月王药诊》“牙儿札更布(冬虫夏草, 藏语)治肺部疾病”, 在后来的多个藏医书籍中也有记录, 如《藏本草》和《藏医千万舍利》; 其汉本草首载于《本草备要》: 冬虫夏草, 甘平, 保肺

益肾, 止血化痰, 止劳咳(李皓翔等 2020; 梅全喜和李文佳 2020)。冬虫夏草在传统中医药中常用来“润肺”“补肾”“补津液”(马丽等 2020; 范卫锋等 2021)。现代化学成分研究表明冬虫夏草含有甾醇、多糖、核苷、脂肪酸和挥发油等成分, 其中甾醇类为冬虫夏草的主要活性成分之一, 具有调节免疫、抗肿瘤、抗炎和抗氧化等活性(董彩虹 2004; Liu *et al.* 2015; 钱正明等 2016; Venturella *et al.* 2019; Wu *et al.* 2019; 邱健健等 2020; Zhao *et al.* 2020; Kong *et al.* 2021), 因此甾醇类成分常被用于冬虫夏草药材的质量评价(Yang *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2020)。蛹虫草、凉山虫草和蝉花都是我国虫草类重要药材(戴玉成和杨祝良 2008; 李增智等 2021)。

过立农等(2017)和周妙霞等(2021)报道虫草类药材甾醇分析方法多集中于麦角甾醇的含量测定, 麦角甾醇广泛存在于真菌中, 但单一麦角甾醇无法综合体现虫草类药材特点。课题组前期建立了同时测定冬虫夏草中麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的分析方法, 并对不同生长阶段和不同来源冬虫夏草样品进行分析, 结果显示冬虫夏草中 3 种甾醇分别来源于真菌、昆虫和昆虫取食的植物, 很好地体现冬虫夏草药材的特点(钱正明等 2018, 2019)。但前期研究仅分析了 3 种甾醇的总甾醇含量, 样品也局限于冬虫夏草样品; 在液相分析方面, 由于采用水解制备样品, 会造成色谱图前端含有大量杂质, 同时色谱分析用到大量甲醇。本文在前期研究的基础上, 采用固相萃取方法纯化分析样品、绿色溶剂乙醇替代甲醇作为有机流动相、核壳色谱柱替换常规色谱柱作为快速分析柱, 首次建立一种高效绿色的虫草类药材甾醇快速分析方法, 并用新建立的方法首次对冬虫夏草(野生品)、冬虫夏草(繁育品)、蛹虫草、凉山虫草和蝉花等常见虫草类药材中游离和总甾醇进行比较分析, 以期为虫草类药材的质量标准提升提供一种更为全面和高效的评价方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 样品

样本共 20 批, 冬虫夏草(野生品)4 批、冬虫夏草(繁育品)10 批、凉山虫草(野生品)、蛹虫草(培植品)、蝉花(野生品)各 2 批。具体样品信息见表 1, 其中冬虫夏草(野生品)和冬虫夏草(繁育品)经宜昌山城水都冬虫夏草有限公司钱正明高级工程师鉴定为冬虫夏草。

1.1.2 试剂

乙醇(HPLC 级, 赛默飞世尔科技有限公司), 无水乙醇(AR 级, 西陇科学股份有限公司), 无水甲醇(AR 级, 成都科隆化学品有限公司), 甲酸(HPLC 级, 阿拉丁试剂有限公司), ODS-AQ-HG 填料(微孔径: 12 nm, 粒径 50 μm , YMC 公司)。

对照品: 麦角甾醇(中国食品药品检定研究院, 批号: 111845-201604, 纯度: 96.2%)、胆甾醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: K1721170, 纯度: 99.3%)、谷甾醇(上海诗丹德标准技术服务有限公司, 批号: 3389, 纯度: 98.4%)。

1.1.3 主要仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 含在线脱气机、四元泵、柱温箱、自动进样器和 DAD 检测器(安捷伦科技有限公司); 蒸发光散射仪 Sedex 90 型(北京迪克马科技有限公司); XPE205DR 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); ST40R 型离心机(赛默飞世尔科技公司); JAC-2010P 型超声清洗机(KODO TECH 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水仪(默克密理博公司)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相: 乙醇-水(89:11); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL , 流速: 0.5 mL/min。ELSD 参数: 雾化压力为 3.5×10^5 Pa, 噪音过滤

为 5 s, 增益值为 6, 漂移管温度为 35 ℃。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇适量, 加无水乙醇溶解并定容, 备用。

1.2.3 供试品溶液的制备

总甾醇制备: 精密称取虫草类药材粉末(过 3 号筛) 0.5 g, 加入 0.5 mol/L 氢氧化钾-乙醇溶液 10 mL, 80 ℃加热回流提取 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上清液, 用 3 mol/L 盐酸溶液调 pH 7.0, 再调节乙醇浓度为 70%后, 置 ODS-AQ-HG 固相萃取柱(0.5 g)上, 用 20 mL 70%乙醇洗脱, 再用 5 mL 无水乙醇洗脱, 收集无水乙醇洗脱液, 定容至 5 mL, 过 0.45 μm 有机滤膜, 得供试品溶液。

游离甾醇制备: 精密称取虫草类药材粉末

(过 3 号筛) 0.5 g, 加入 85%乙醇 10 mL 超声提取 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上清液调节乙醇浓度为 70%, 置入 ODS-AQ-HG 固相萃取柱(0.5 g)中, 用 20 mL 70%乙醇洗脱, 再用 5 mL 无水乙醇洗脱, 收集无水乙醇洗脱液, 定容至 5 mL, 0.45 μm 有机滤膜滤过, 得供试品溶液。

1.2.4 方法学考察

(1) 精密度试验

日内精密度: 精密吸取对照品溶液按 1.2.1 的色谱条件, 于同 1 d 内连续进样 6 次, 记录峰面积并计算含量的 RSD 值。

日间精密度: 精密吸取对照品溶液按 1.2.1 的色谱条件, 3 d 内连续进样 3 次, 记录峰面积并计算含量的 RSD 值。

表 1 虫草类样品信息

Table 1 The information of samples

编号 No.	名称 Name	产地 Habitat	批号 Lot.
S1	冬虫夏草(野生品) <i>Ophiocordyceps sinensis</i> (wild)	西藏那曲 Naqu, Tibet	200530
S2	冬虫夏草(野生品) <i>O. sinensis</i> (wild)	青海黄南 Huangnan, Qinghai	190530
S3	冬虫夏草(野生品) <i>O. sinensis</i> (wild)	西藏那曲 Naqu, Tibet	190622
S4	冬虫夏草(野生品) <i>O. sinensis</i> (wild)	西藏林芝 Linzhi, Tibet	180515
S5	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	210204
S6	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	210308
S7	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	210428
S8	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	200628
S9	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	200803
S10	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	200820
S11	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	190115
S12	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	191023
S13	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	180316
S14	冬虫夏草(繁育品) <i>O. sinensis</i> (cultivated)	湖北宜昌 Yichang, Hubei	180411
S15	凉山虫草(野生品) <i>Cordyceps liangshanensis</i> (wild)	四川凉山 Liangshan, Sichuan	200427
S16	凉山虫草(野生品) <i>C. liangshanensis</i> (wild)	四川凉山 Liangshan, Sichuan	190606
S17	蛹虫草(培植品) <i>C. militaris</i> (cultivated)	广东韶关 Shaoguan, Guangdong	180719
S18	蛹虫草(培植品) <i>C. militaris</i> (cultivated)	内蒙古 Inner Mongolia	160726
S19	蝉花(野生品) <i>C. chanhua</i> (wild)	山西 Shanxi	160713
S20	蝉花(野生品) <i>C. chanhua</i> (wild)	浙江 Zhejiang	190701

(2) 重复性实验
按 1.2.3 所述方法制备冬虫夏草溶液(S5) 6 份, 每份精密吸取 10 μ L, 按 1.2.1 的色谱条件操作, 分别测得和计算麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇含量的 RSD 值。

(3) 稳定性实验
取冬虫夏草供试品溶液, 室温下按 1.2.1 的色谱条件操作, 分别在 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样, 计算麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的含量并计算 RSD 值。

(4) 分析物的线性回归方程和定量限
取 1.2.2 所述方法制备的 3 种甾醇混合对照品溶液, 以无水乙醇溶液稀释配成系列浓度梯度, 每个浓度分别进样 10 μ L, 按 1.2.1 的色谱条件进行分析, 计算峰面积, 以峰面积对数值(Y) 为纵坐标, 溶液质量对数值(X)为横坐标进行回归计算, 得回归方程、相关系数与线性关系。

(5) 准确度试验
精密称取冬虫夏草(S5、S6 和 S7)各 0.5 g, 平行 3 次, 按实验室前期已验证方法(钱正明等 2019)和本研究开发的新方法分别进行测定, 得到麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇含量, 用已验证的方法测定数据作为理论含量值, 新方法测定数据作为实际测定值, 计算 3 种甾醇的加样回收率数据。

1.3 样品测定
精密称取虫草类药材 0.5 g, 按 1.2.3 所述方法制备供试品溶液。按 1.2.1 的色谱条件进样分析, 计算虫草类药材中麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察
2.1.1 精密度试验
日内精密度: 麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的日内精密度 RSD 值分别为 0.67%、1.09%和 0.72%, 表明该方法日内精密度良好。

日间精密度: 麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的日间精密度 RSD 值分别为 1.05%、1.64%和 2.70%, 表明该方法日间精密度良好。

2.1.2 重复性实验
麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇重复性的 RSD 值分别为 0.27%、0.78%和 0.78%, 表明本方法重复性好。

2.1.3 稳定性实验
麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇 24 h 稳定性的 RSD 值分别为 1.46%、2.40%和 3.23%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.1.4 分析物的线性回归方程和定量限
线性回归方程、相关系数与定量限分析结果表明, 3 种甾醇在各自相应的线性范围具有良好的线性关系, 方法灵敏度较好(表 2)。

2.1.5 准确度试验
新建立分析方法 3 种甾醇平均加样回收率在 96%–100%之间(RSD $\leq$ 3%), 表明该方法准确度良好(表 3)。

2.2 样品测定
采用新建立的分析方法对 20 批虫草类药材中的总甾醇和游离甾醇进行定量分析, 4 种虫草类药材中麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇的色谱图见图 1, 20 批样品甾醇含量结果见表 4。

表 2 三种甾醇的线性回归方程及定量限
Table 2 Linear regression data and LOQ of 3 kinds of sterols

对照品 Reference substance	线性回归方程 Regressive equations	相关系数 Correlative coefficient	线性范围 Linear range (μ g)	定量限 LOQ (ng)
麦角甾醇 Ergosterol	$Y=1.204\ 4X+3.346\ 0$	0.999 8	0.326–3.264	9.79
胆甾醇 Cholesterol	$Y=1.301\ 1X+3.474\ 0$	0.998 2	0.197–1.968	7.87
谷甾醇 Sitosterol	$Y=1.318\ 8X+3.393\ 9$	0.999 0	0.054–0.536	10.72

表 3 三种甾醇加样回收率数据
Table 3 The recovery of 3 kinds of sterols (n=9)

化合物 Components	序号 No.	批号 Batch	测量值 Measured value (%)	理论值 Actual value (%)	回收率 Recovery (%)	平均值 $\bar{x}$ (%)	相对标准偏差 RSD (%)
麦角甾醇 Ergosterol	1	S5	0.342	0.342	100.00	99.73	1.83
	2	S5	0.343	0.342	100.29		
	3	S5	0.341	0.342	99.71		
	4	S6	0.329	0.325	101.23		
	5	S6	0.322	0.325	99.08		
	6	S6	0.323	0.325	99.38		
	7	S7	0.319	0.325	98.15		
	8	S7	0.314	0.325	96.62		
	9	S7	0.335	0.325	103.08		
胆甾醇 Cholesterol	1	S5	0.118	0.124	95.16	96.85	2.07
	2	S5	0.118	0.124	95.16		
	3	S5	0.118	0.124	95.16		
	4	S6	0.119	0.123	96.75		
	5	S6	0.122	0.123	99.19		
	6	S6	0.118	0.123	95.93		
	7	S7	0.117	0.122	95.90		
	8	S7	0.119	0.122	97.54		
	9	S7	0.123	0.122	100.82		
谷甾醇 Sitosterol	1	S5	0.041	0.041	100.00	96.74	3.13
	2	S5	0.039	0.041	95.12		
	3	S5	0.037	0.041	90.24		
	4	S6	0.043	0.044	97.73		
	5	S6	0.043	0.044	97.73		
	6	S6	0.043	0.044	97.73		
	7	S7	0.038	0.038	100.00		
	8	S7	0.036	0.038	94.74		
	9	S7	0.037	0.038	97.37		

3 讨论

3.1 样品制备

总甾醇样品制备：本研究参照钱正明等(2019)的方法采用 0.5 mol/L 氢氧化钾-乙醇溶液进行样品制备，样品溶液在色谱图 0–10 min 有一个明显的杂质峰。为了去除杂质，对样品提取溶液采用固相萃取进行纯化。首先考察填料 ODS-AQ-HG (Qian *et al.* 2020)的用量(0.25、0.5 和 1.0 g)，结果表明 0.25 g 填料不能完全吸附提取液中的杂质,0.5 g 和 1.0 g 填料均可吸附杂质，因此选用 0.5 g ODS-AQ-HG 作为实验条件。为

了有效洗脱杂质峰，比较不同浓度乙醇(10%–90%)对样品中杂质的去除情况，结果显示只有 70%以上浓度的乙醇才能有效洗涤样品中的杂质；但在 80%乙醇溶剂洗脱试验中，分析物(麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇)也会随杂质一起被洗脱，故实验选择 70%乙醇作为洗脱溶剂；同时对洗脱溶剂用量进行考察,发现 20 mL 70%乙醇溶液即可有效除去杂质。最后为了快速洗脱实验所需的分析物(麦角甾醇、胆甾醇和谷甾醇)，采用无水乙醇作为洗脱剂，并对无水乙醇的用量进行考察，结果表明 5 mL 无水乙醇即可有效洗脱分析物。

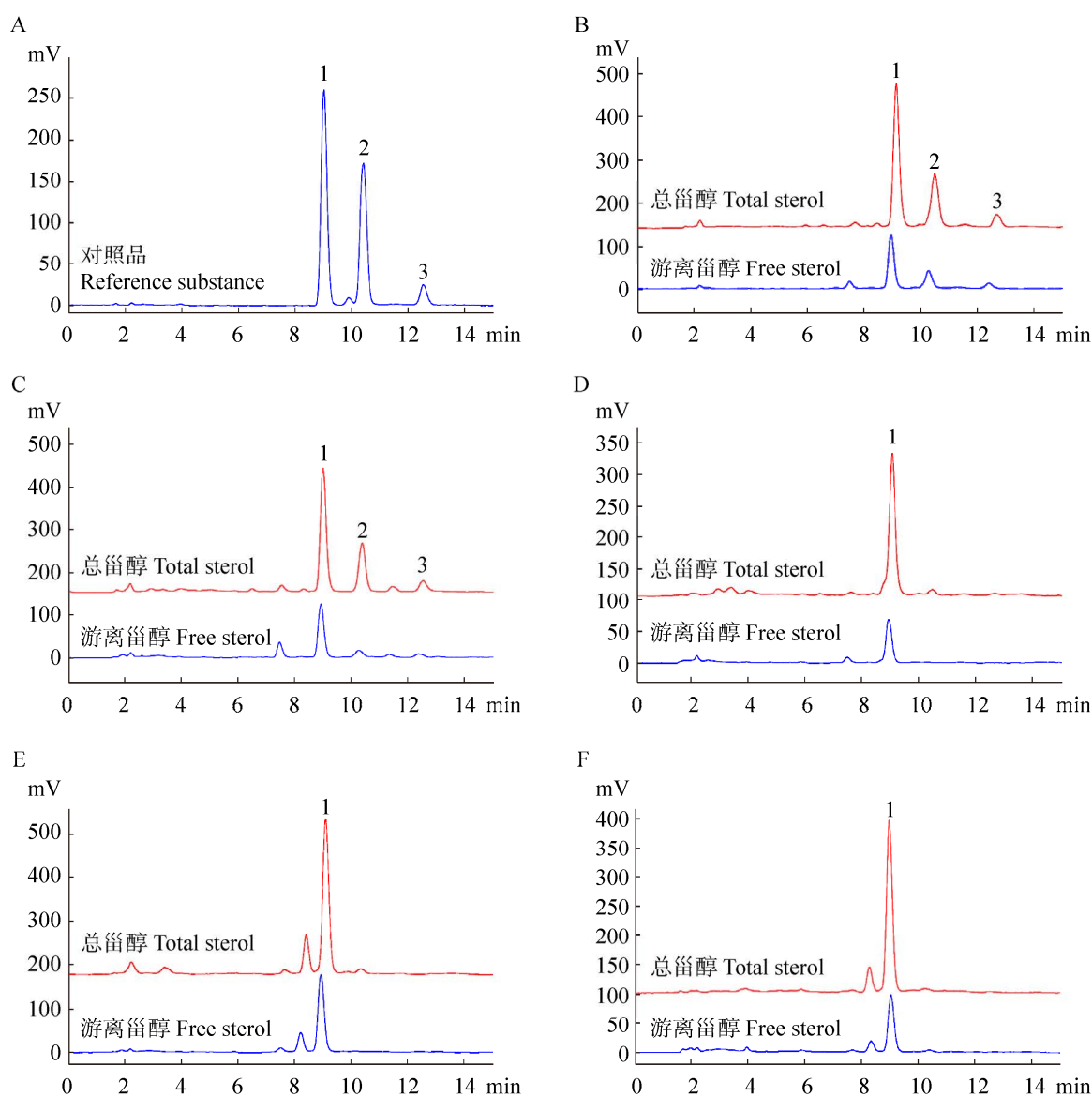


图1 虫草类药材 HPLC-ELSD 色谱图 1: 麦角甾醇; 2: 胆固醇; 3: 谷甾醇. A: 对照品; B: 冬虫夏草(野生品); C: 冬虫夏草(繁育品); D: 凉山虫草(野生品); E: 蛹虫草(培植品); F: 蝉花(野生品)
Fig. 1 HPLC-ELSD chromatogram of sterols in cordyceps herbal sample. 1: Ergosterol; 2: Cholesterol; 3: Sitosterol. A: Reference substance; B: *Ophiocordyceps sinensis* (wild); C: *O. sinensis* (cultivated); D: *Cordyceps liangshanensis* (wild); E: *C. militaris* (cultivated); F: *C. chanhua* (wild).

游离甾醇样品制备: 参考陈婷等(2013)的超声条件, 采用 20 倍的料液比进行样品提取, 并对不同乙醇浓度提取效果进行比较 (70%、75%、80%、85%、90%、95%和 100%), 结果表明 85%乙醇适合作为提取游离甾醇溶剂, 能有效提取样品中的游离甾醇, 同时提取

液中干扰物质较少。

本实验开发的分析方法相对前期文献报道方法, 采用乙醇-水进行样品提取, 降低了整体实验有害溶剂消耗。同时采用固相萃取技术对样品溶液进行纯化, 为后期快速色谱分析的开展奠定了基础。

表 4 虫草含量测定结果

Table 4 The content analyses of sterols in samples of cordyceps

批次 Batch	麦角甾醇 Ergosterol (%)		胆甾醇 Cholesterol (%)		谷甾醇 Sitosterol (%)	
	总甾醇	游离甾醇	总甾醇	游离甾醇	总甾醇	游离甾醇
	Total	Free	Total	Free	Total	Free
S1	0.278	0.128	0.154	0.056	0.052	0.023
S2	0.362	0.202	0.157	0.075	0.054	0.033
S3	0.292	0.125	0.139	0.046	0.045	0.019
S4	0.379	0.181	0.161	0.068	0.059	0.032
S5	0.343	0.259	0.118	0.049	0.039	0.023
S6	0.323	0.205	0.119	0.040	0.043	0.019
S7	0.325	0.191	0.119	0.036*	0.037	0.018
S8	0.340	0.198	0.134	0.034*	0.046	0.020
S9	0.360	0.217	0.143	0.037*	0.050	0.019
S10	0.415	0.276	0.159	0.050	0.048	0.021
S11	0.364	0.145	0.137	0.028*	0.045	0.015
S12	0.339	0.174	0.134	0.034*	0.058	0.020
S13	0.338	0.177	0.140	0.033*	0.061	0.025
S14	0.359	0.191	0.151	0.042	0.052	0.018
S15	0.239	0.101	-	-	-	-
S16	0.306	0.109	-	-	-	-
S17	0.480	0.286	-	-	-	-
S18	0.489	0.345	-	-	-	-
S19	0.564	0.148	-	-	-	-
S20	0.349	0.155	-	-	-	-

注：*该数据为调整进样量为 15 μL 测定所得

Note: * This data was obtained by adjusting the injection volume to 15 μL.

3.2 色谱分析

绿色分析技术源于经典的“绿色化学”，使用可再生、环境友好的溶剂，减少产生危害物，降低或消除环境危害，实现清洁生产，促进绿色生态建设。目前，针对虫草类甾醇含量测定多采用甲醇或乙腈作为色谱分析有机流动相，甲醇、乙腈对环境和仪器操作人员危害较大。如钱正明等(2019)报道冬虫夏草甾醇分析采用常规反相色谱柱以甲醇-水流动相进行色谱分离，其分析时间通常在 25 min 左右，甲醇使用量约为 25 mL。为了开发高效绿色的冬虫夏草甾醇色谱分析方法，本研究选用快速分析核壳色谱柱(Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈)作为样品分析柱，并进一步比较甲醇和乙醇作为有机流动相对样品分析的效果。结果显示乙醇-水和甲醇-水流

动相体系比较，乙醇-水体系不仅可以在较短的时间内达到甲醇-水体系的分离效果,还可以有效降低有毒有机溶剂的用量，因此实验采用乙醇-水(89:11)作为实验流动相。通过对不同柱温(30、35 和 40 ℃)的比较发现，高温可以降低色谱柱的柱压并缩短分析时间,过高的温度会降低分析物分离度，最终采用 35 ℃作为实验条件。此次实验色谱条件相对前期报道方法，采用了核壳快速分析色谱柱。核壳色谱柱独特的填料结构，不仅保证了化合物的超高分离效率，还有效降低了色谱柱产生的柱压，在普通液相色谱仪上即可实现类似超高压液相色谱的分离效果(陈菁等 2021；Fan *et al.* 2021)。相比前期报道分析 3 个甾醇需要 25 min，本研究只需要 15 min，显著提高了分析检测速度。本实验采用

乙醇替代甲醇作为流动相,有效降低了有毒有害溶剂的使用,对实验分析人员和环境都起到了很好的保护作用。

3.3 样品分析

虫草类药材的甾醇可分为游离甾醇和结合甾醇,从含量测定的结果来看,虫草类药材中均含有游离甾醇和结合甾醇,两者的含量大致相当。对比冬虫夏草中3种主要甾醇含量发现,无论是总甾醇还是游离甾醇,麦角甾醇含量均最高,其次为胆甾醇和谷甾醇。通过比较不同分析样品的甾醇含量,发现冬虫夏草繁育品和野生品均含有3种甾醇,冬虫夏草(繁育品)3种甾醇总含量为 $0.534\%\pm 0.040\%$,游离甾醇总含量为 $0.261\%\pm 0.045\%$;冬虫夏草(野生品)总甾醇含量为 $0.533\%\pm 0.054\%$,游离甾醇含量为 $0.247\%\pm 0.050\%$,冬虫夏草生态繁育品与野生品游离甾醇和总甾醇含量范围相似。蛹虫草(培植品)、凉山虫草(野生品)和蝉花(野生品)中均含有麦角甾醇,其中蛹虫草(培植品)的总麦角甾醇($0.485\%\pm 0.005\%$)和游离麦角甾醇($0.316\%\pm 0.030\%$)的含量最高,凉山虫草(野生品)中总麦角甾醇($0.273\%\pm 0.034\%$)和游离麦角甾醇($0.105\%\pm 0.004\%$)的含量最低。该方法可以有效区分冬虫夏草和其他3种虫草样品,有助于提升虫草类产品的质量评价水平。

麦角甾醇为真菌类药材的特征成分,也是虫草药材甾醇中含量较高的成分,在冬虫夏草、蛹虫草、凉山虫草和蝉花中均有发现。胆甾醇主要来源动物,真菌也能有少量的合成,冬虫夏草样品可以检测到大量的胆甾醇,而蛹虫草、凉山虫草和蝉花没有检测到胆甾醇;由该结果推测本文分析的4种虫草药材,其胆甾醇主要来源于寄主昆虫,其真菌不合成胆甾醇或者合成量很少;冬虫夏草寄主昆虫蝙蝠蛾幼虫含有一定量胆甾醇,而凉山虫草和蝉花寄生昆虫不含胆甾醇或含量很低无法用本实验方法检测到。谷甾醇主要来源

于植物,在冬虫夏草中检测到谷甾醇推测是蝙蝠蛾幼虫取食富含谷甾醇植物饲料后储存在体内用于自身生长的营养物质;凉山虫草和蝉花寄主昆虫由于啃食植物种类不同,在体内基本没有谷甾醇的含量;蛹虫草子实体多为米饭培养基培植因此不存在谷甾醇。

4 结论

本文首次对4种虫草类药材进行游离甾醇和总甾醇的含量测定,采用固相萃取纯化样品溶液、核壳色谱柱结合绿色流动相进行快速色谱分析。通过对不同样品的比较分析发现,4种虫草样品中甾醇类型均存在游离和结合状态;冬虫夏草(野生品)与冬虫夏草(繁育品)均含有3种甾醇且两者3种甾醇的含量也基本一致,凉山虫草(野生品)、蝉花(野生品)和蛹虫草(培植品)含有麦角甾醇。本文研究结果为虫草类药材中甾醇成分的质量评价提供科学数据。

[REFERENCES]

- Chen Q, Zhou JQ, Tan GY, Li DQ, Fan WF, Xie JY, Qian ZM, 2021. Rapid analysis of antioxidant in hoveniae semen by online extraction HPLC-ABTS. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 41(2): 203-209 (in Chinese)
- Chen T, Liu Q, Mo ZK, Xu MC, Chen RT, 2013. Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol in *Cordyceps sinensis* by HPLC. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 19(6): 161-163 (in Chinese)
- Dai YC, Li Y, 2011. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China. Mycosystema, 30(4): 515-518 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. Mycosystema, 27(6): 801-824 (in Chinese)
- Dong CH, 2004. Review on advances of polysaccharides from *Cordyceps sinensis*. Food Science, 25(7): 195-198 (in Chinese)
- Dong CH, Li WJ, Li ZZ, et al., 2016. Cordyceps industry in China: current status, challenges and perspectives: Jinhu declaration for cordyceps industry development.

- Mycosystema, 35(1): 1-15 (in Chinese)
- Fan WF, Zhou JQ, Wu Z, Tan GY, Li HX, Mei QX, Qian ZM, 2021. Analysis of antioxidants in *Chrysanthemum indicum* flos by online gradient extraction and HPLC-FRAP. *Analytical Methods*, 13(20): 2283-2289
- Fan WF, Zou YS, Li WJ, Li HX, Wang XD, Mei QX, Qian ZM, 2021. Analysis of potential mechanism of Chinese cordyceps in treating renal fibrosis based on network pharmacology and molecular docking. *Mycosystema*, 40(11): 2295-3011 (in Chinese)
- Guo LN, Zhang M, Liu J, Ma SC, Qian ZM, Li WJ, Zan K, Zheng J, 2017. Comparative study of characteristic chromatogram of cultivated and wild *Cordyceps sinensis* based on sterols. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 31(8): 951-959 (in Chinese)
- Kong BH, Yap CSA, Razif M, Ng ST, Tan CS, Fung SY, 2021. Antioxidant and cytotoxic effects and identification of *Ophiocordyceps sinensis* bioactive proteins using shotgun proteomic analysis. *Food Technology and Biotechnology*, 59(2): 201-208
- Li HX, Chen L, Li WJ, Jin LL, Qian ZM, Mei QX, 2020. Textural research on Chinese cordyceps. *Journal of Fungal Research*, 18(2): 68-73 (in Chinese)
- Li ZZ, Luan FG, Hywel-Jones NL, Zhang SL, Chen MJ, Huang B, Sun CS, Chen ZA, Li CR, Tan YJ, Dong JF, 2021. Biodiversity of cordycipitoid fungi associated with *Isaria cicadae* Miquel II: teleomorph discovery and nomenclature of chanhua, an important medicinal fungus in China. *Mycosystema*, 40(1): 95-107 (in Chinese)
- Liu Y, Wang JH, Wang W, Zhang HY, Zhang XL, Han CC, 2015. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 575063
- Ma L, Li CY, Qian ZM, Wu J, Gao JL, 2020. Function of Jin-Shui interaction therapy on lung disease by Chinese cordyceps and its physiological basis. *Journal of Fungal Research*, 18(2): 80-85 (in Chinese)
- Mei QX, Li WJ, 2020. Research and application of fresh *Cordyceps sinensis*. China Press of Tradition Medicine, Beijing. 1-481 (in Chinese)
- Olatunji OJ, Tang J, Tola AJ, Auberon F, Oluwaniyi OO, Ouyang Z, 2018. The genus *Cordyceps*: an extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Fitoterapia*, 129: 293-316
- Qian ZM, Li WQ, Sun MT, Liu XZ, Li EW, Li WJ, 2016. Analysis of chemical compounds in Chinese cordyceps. *Mycosystema*, 35(4): 476-490 (in Chinese)
- Qian ZM, Sun MT, Li WQ, Li GR, Li WJ, 2019. Content analyses of three kinds of sterols in different development stages of Chinese cordyceps. *Mycosystema*, 38(4): 539-544 (in Chinese)
- Qian ZM, Sun MT, Li WQ, Li GR, Li WJ, Mei QX, 2018. Comparative analysis of sterols in different parts of *Cordyceps sinensis*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 29(12): 2856-2858 (in Chinese)
- Qian ZM, Wu Z, Li CH, Tan GY, Hu HK, Li WJ, 2020. A green liquid chromatography method for rapid determination of ergosterol in edible fungi based on matrix solid-phase dispersion extraction and a core-shell column. *Analytical Methods*, 12(26): 3337-3343
- Qiu JJ, Zhang YM, Li GR, Li WJ, Chen XX, Yang ZF, 2020. Pharmaceutical and clinical research progress on Chinese cordyceps and related products against respiratory inflammatory diseases. *Journal of Fungal Research*, 18(2): 86-92 (in Chinese)
- Venturella G, Saporita P, Gargano ML, 2019. The potential role of medicinal mushrooms in the prevention and treatment of gynecological cancers: a review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(3): 225-235
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Yang FQ, Feng K, Zhao J, Li SP, 2009. Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured *Cordyceps* by one-step derivatization followed with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5): 1172-1178
- Zhang S, Zhang YJ, Shrestha B, Xu JP, Wang CS, Liu XZ, 2013. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: research advances, issues and perspectives. *Mycosystema*, 32(4): 577-597 (in Chinese)
- Zhao JQ, Shi TN, Zhu WF, Chen LH, Guan YM, Jin C, 2020. Quality control method of sterols in fermented *Cordyceps sinensis* based on combined fingerprint and quantitative analysis of multicomponents by single marker. *Journal of Food Science*, 85(10): 2994-3002
- Zhou MX, Zhuang SS, Li WQ, Wang XD, Yang FQ, Qian ZM, 2021. Rapid determination of ergosterol in Chinese cordyceps by core-shell column. *Pharmacy Today*, 31(10): 733-736 (in Chinese)

[附中文参考文献]

陈菁, 周建桥, 谭国英, 李德强, 范卫锋, 谢菊英, 钱正明, 2021. 在线提取 HPLC-ABTS 联用快速分析枳椇

- 子中抗氧化成分. 药物分析杂志, 41(2): 203-209
- 陈婷, 刘群, 莫灼康, 徐敏嫦, 陈润添, 2013. HPLC 同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素和麦角甾醇. 中国实验方剂学杂志, 19(6): 161-163
- 戴玉成, 李玉, 2011. 中国六种重要药用真菌名称的说明. 菌物学报, 30(4): 515-518
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27(6): 801-824
- 董彩虹, 2004. 冬虫夏草多糖的研究进展. 食品科学, 25(7): 195-198
- 董彩虹, 李文佳, 李增智, 等, 2016. 我国虫草产业发展现状、问题及展望-虫草产业发展金湖宣言. 菌物学报, 35(1): 1-15
- 范卫锋, 邹园生, 李文佳, 李皓翔, 汪小东, 梅全喜, 钱正明, 2021. 基于网络药理学和分子对接技术探讨冬虫夏草治疗肾纤维化的潜在作用机制. 菌物学报, 40(11): 2295-3011
- 过立农, 张美, 刘杰, 马双成, 钱正明, 李文佳, 胥珂, 郑健, 2017. 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. 中国药事, 31(8): 951-959
- 李皓翔, 陈铃, 李文佳, 金李玲, 钱正明, 梅全喜, 2020. 冬虫夏草的本草考证. 菌物研究, 18(2): 68-73
- 李增智, 栾丰刚, Nigel L. Hywel-Jones, 张胜利, 陈名君, 黄勃, 孙长胜, 陈祝安, 李春如, 谭悠久, 董建飞, 2021. 与蝉花有关的虫草菌生物多样性的研究 II: 重要药用真菌蝉花有性型的发现及命名. 菌物学报, 40(1): 95-107
- 马丽, 李昌煜, 钱正明, 吴际, 高建莉, 2020. 冬虫夏草金水相生治疗肺脏疾病的作用及其生理基础. 菌物研究, 18(2): 80-85
- 梅全喜, 李文佳, 2020. 鲜冬虫夏草的研究与应用. 北京: 中国中医药出版社. 1-481
- 钱正明, 李文庆, 孙敏甜, 刘杏忠, 李二伟, 李文佳, 2016. 冬虫夏草化学成分分析. 菌物学报, 35(4): 476-490
- 钱正明, 孙敏甜, 李文庆, 李光荣, 李文佳, 2019. 冬虫夏草不同生长阶段甾醇类含量分析. 菌物学报, 38(4): 539-544
- 钱正明, 孙敏甜, 李文庆, 李光荣, 李文佳, 梅全喜, 2018. 冬虫夏草不同部位甾醇类成分比较分析. 时珍国医国药, 29(12): 2856-2858
- 邱健健, 张奕敏, 李光荣, 李文佳, 陈欣欣, 杨子峰, 2020. 冬虫夏草在呼吸系统炎性疾病的药理及临床研究进展. 菌物研究, 18(2): 86-92
- 张姝, 张永杰, Shrestha B, 徐建平, 王成树, 刘杏忠, 2013. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望. 菌物学报, 32(4): 577-597
- 周妙霞, 庄诗诗, 李文庆, 汪小东, 杨丰庆, 钱正明, 2021. 基于核壳色谱技术快速测定冬虫夏草中麦角甾醇的含量. 今日药学, 31(10): 733-736