

UPLC 法测定桦褐孔菌菌丝体中甾类化合物的质量分数

汪莲霞, 陆震鸣, 耿燕, 许泓瑜, 张晓梅*, 史劲松, 许正宏

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 建立了采用超高效液相色谱法(UPLC)测定桦褐孔菌发酵菌丝体中的白桦脂醇、麦角甾醇、羊毛甾醇、胆甾醇、豆甾醇和谷甾醇的质量分数的方法。色谱条件以 shim-pack XR-ODSⅢ柱(150 mm×2 mm, 2.2 μm)进行分离, 流动相为乙腈 100%, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 202 nm, 柱温为 30 ℃。结果表明, UPLC 法具有很好的重复性和回收率。甾类化合物分析的日内和日间相对标准偏差分别为 0.10%~0.33%($n=5$)和 0.07%~1.66%($n=5$)。获得了在 0.3~1.6 μg 范围内很好的线性范围。白桦脂醇、麦角甾醇、羊毛甾醇、胆甾醇、豆甾醇和谷甾醇的回收率分为 97.05%, 98.74%, 95.65%, 101.45%, 96.62% 和 96.14%。UPLC 法适合用来快速、准确定量测定桦褐孔菌发酵菌丝体中 6 种甾类化合物。

关键词: 桦褐孔菌; 菌丝体; 甾类化合物; 超高效液相色谱

中图分类号: TS 254 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)02—0170—05

Determination of Steroids in the Mycelia of *Inonotus obliquus* by UPLC

WANG Lianxia, LU Zhenming, GENG Yan, XU Hongyu,

ZHANG Xiaomei*, SHI Jinsong, XU Zhenghong

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A ultra performace liquid chromatography (UPLC) method was applied to determinating the contents of betulin, ergosterol, lanosterol, cholesterol, stigmasterol and sitosterol in the submerged-cultured mycelia of *Inonotus obliquus*. The procedure was carried out on a shim-pack XR-ODSⅢ column (150 mm×2 mm, 2.2 μm), using acetonitrile (100%) as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min. The detecting wavelength was 202 nm and the column temperature was 30 ℃. This method had good reproducibility and satisfactory recoveries. The relative standard deviations of this method were less than 0.10%~0.33% ($n=5$) and 0.07%~1.66% ($n=5$) for intraday and inter-day assays, respectively. A good linear correlation was obtained in a range of 0.3~1.6 μg. The recoveries of betulin, ergosterol, lanosterol, cholesterol, stigmasterol, and sitosterol were 97.05%, 98.74%, 95.65%, 101.45%, 96.62% and 96.14%, respectively. This method could be applied to evaluate real samples, and it was rapid, accurate and suitable for the quantitative determination of the six steroids in the submerged-cultured mycelia of *Inonotus obliquus*.

Keywords: *Inonotus obliquus*, mycelia, steroids, ultra performace liquid chromatography (UPLC)

收稿日期: 2014-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201020); 江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究项目(BY2012052)。

* 通信作者: 张晓梅(1969—), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物制药方面的研究。

E-mail: hanqiaowu@sina.com

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pil. (syn; *Fuscoporia oblique* (Pers.:Fr.) Aoshima) 属于多孔菌科、褐卧孔菌属,是一种寄生在白桦、银桦、榆树、赤杨等树种上的白腐菌^[1]。主要分布于北半球北纬 45°~50° 的地区,北美、芬兰、波兰、俄罗斯的西伯利亚、中国的黑龙江和吉林、日本的北海道等^[2]。早在 16 世纪,俄罗斯、波兰等国民间就利用桦褐孔菌防治心脏病、糖尿病、胃癌、肠癌等疾病^[3]。近几年的研究表明,桦褐孔菌菌核提取物表现出多种生物活性,主要有抗癌、抗氧化、降血糖、抗病毒、抗真菌等^[4-6]。

随着研究的深入,越来越多的活性成分被分离出来,其中甾类化合物是重要的一类物质,主要包括白桦脂醇、羊毛甾醇、麦角固醇等^[8]。近年来,甾类化合物在预防癌症、抗炎和降胆固醇等方面的作用引起了人们的广泛关注,将这种天然产物用于癌症预防比化学合成药物更加安全有效,因此人们期望获得大量天然甾类化合物^[7]。桦褐孔菌子实体只有在活的桦木上生长 10~15 年才具有较高的药用价值,且平均每 2 万棵桦木中只有一棵生长桦褐孔菌,资源十分稀有^[9]。目前还不能进行人工栽培,其价格日渐升高。因此,运用发酵工程技术生产桦褐孔菌菌丝体,为研究和开发桦褐孔菌提供充足的原材料具有相当大的现实意义^[10]。为高效监测桦褐孔菌发酵过程中甾类化合物的合成,建立 UPLC 法测定桦褐孔菌菌丝体中甾类化合物是很有必要的。Gao 等^[11]建立了采用 HPLC 法定量测定桦褐孔菌子实体和发酵菌丝体中白桦脂醇、麦角甾醇、胆甾醇、羊毛甾醇、豆甾醇和谷甾醇含量的方法,但是分析时间较长,需要 40 min 左右。作者拟建立 UPLC 法用于桦褐孔菌发酵菌丝体中 6 种甾类化合物的快速、准确定量分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

岛津 UPLC LC-30A 超高效液相色谱仪:日本岛津公司,包括 prominence SPD-M20A 二极管阵列检测器、Nexera CTO-30A 柱温箱、New LC-30AD (送液单元)、Nexera SIL-30AC 自动进样器;分析天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Synergy UV 水纯化系统:北京超越未来科技发展有限公司;6 种甾类化合物标准品(白桦脂醇、麦角甾醇、羊毛甾醇、胆甾醇、豆甾醇和谷甾醇):美国 Sigma 公司;

甲醇和乙腈:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;Millipore 0.22 μm 滤膜:上海兴亚净化材料厂。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品溶液的制备 甾类化合物的标准品溶液的制备:分别称取白桦脂醇、麦角甾醇、羊毛甾醇、胆甾醇、豆甾醇和谷甾醇 5 mg,以适量甲醇溶解,分别置 50 mL 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,得终质量浓度为 0.1 mg/mL 的标准品溶液。过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液作为标准品溶液;甾类化合物的混合标准(混标)溶液的制备:各取 1 mL 标准品溶液,合并摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液作为混标溶液。

1.2.2 桦褐孔菌发酵菌丝体的制备

1) 发酵摇瓶培养基:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 2.5 g/L, 黄豆粉 2.5 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, pH 5。

2) 摇瓶发酵:500 mL 三角瓶装 100 mL 培养基,接种体积分数 10%,150 r/min、28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d。重复 3 次,取平均值。

3) 菌丝体的制备:发酵终止后,将培养液于 4 800 r/min 离心 10 min,弃上清液,菌丝体用蒸馏水冲洗至无颜色,冷冻干燥至恒重,称量菌丝干重。

1.2.3 样品溶液的制备 称取桦褐孔菌发酵菌丝体 0.2 g,用 2 mL 甲醇超声提取 2 h,超声功率 200 W,提取温度 45 $^{\circ}\text{C}$,提取液过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液作为样品溶液。

1.2.4 色谱条件 色谱柱为 shim-pack XR-ODS III (150 mm $\times$ 2 mm,2.2 μm),流动相为乙腈(100%),流速为 0.8 mL/min,检测波长为 202 nm,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。

1.2.5 线性关系考察 分别取不同体积(3、6、9、12、15、18 μL)的混标,按上述色谱条件测定,将各甾类化合物的峰面积(Y)与进样量(X)进行线性回归。

1.2.6 精密度试验 1 d 内连续 5 次对同一甾类化合物标准品进行 UPLC 分析(日内精密度),另外连续 5 d 对同一标样进行 UPLC 分析(日间精密度),测定各标准品的保留时间和峰面积,计算精密度(以相对标准偏差表示)。

1.2.7 准确度试验 为了测定标准曲线的准确度,各甾类化合物标准溶液分别以不同进样量进行分析。进样量分别为:0.6 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}\times 6 \mu\text{L}$)、1.2 (0.1

$\mu\text{g}/\mu\text{L} \times 12 \mu\text{L}$ 、 $1.8(0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 18 \mu\text{L}) \mu\text{g}$, 根据标准曲线计算甾类化合物的含量, 计算相对标准偏差。

1.2.8 加样回收率试验 分别取 4 份已知六种甾类化合物含量的供试液, 其中 1 份作为空白, 另外 3 份分别加入经过称量的甾类化合物标准品 0.2 mg , 超声溶解, 分别过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 滤液分别进行 UPLC 试验。按外标法计算加样回收率。

1.2.9 样品测定 分别取 3 份制备的样品溶液进行 UPLC 测定。

2 结果与讨论

2.1 甾类化合物的标准曲线

各甾类化合物的回归方程及相关系数见表 1。结果表明, 6 种甾类化合物在 $0.3 \sim 1.6 \mu\text{g}$ 的范围内与峰面积呈良好的线性关系。

表 1 甾类化合物标准品的保留时间、标准曲线、相关系数和线性范围

Table 1 Retention time reproducibilities, regression equations, correlation coefficients (γ), and linearity ranges of steroids

化合物	保留时间/min ($n=5$)	标准曲线	相关系数 γ	线性范围/ μg
白桦脂醇	$1.39 \pm 4.52 \times 10^{-3}$	$y = (14.85x + 0.11) \times 10^5$	0.999 7	0.3~1.6
麦角甾醇	$5.44 \pm 3.57 \times 10^{-2}$	$y = (15.80x + 0.32) \times 10^5$	0.999 8	0.3~1.6
羊毛甾醇	$6.85 \pm 3.45 \times 10^{-2}$	$y = (137.23x - 0.16) \times 10^4$	0.999 6	0.3~1.6
胆甾醇	$7.74 \pm 3.94 \times 10^{-2}$	$y = (159.42x + 0.17) \times 10^4$	1	0.3~1.6
豆甾醇	$8.95 \pm 3.98 \times 10^{-2}$	$y = (179.68x + 0.86) \times 10^4$	1	0.3~1.6
谷甾醇	$10.38 \pm 5.76 \times 10^{-2}$	$y = (159.41x + 0.24) \times 10^4$	1	0.3~1.6

2.2 精密度

本实验中各甾类化合物分析的日内相对标准偏差和日间相对标准偏差分别为 $0.10\% \sim 0.33\%$ (见表 2) 和 $0.07\% \sim 1.66\%$ (见表 3), 表明该方法精密度较好。

表 2 测定方法的日内精密度

Table 2 Precision of the method for intraday assays

化合物	出峰时间/min ($n=5$)	峰面积/ ($\text{mAU} \cdot \text{min}$)	相对标准偏差 RSD/%
白桦脂醇	$1.38 \pm 3.92 \times 10^{-2}$	$(215.05 \pm 0.23) \times 10^4$	0.11
麦角甾醇	$5.46 \pm 3.57 \times 10^{-2}$	$(147.36 \pm 0.49) \times 10^4$	0.33
羊毛甾醇	$6.88 \pm 2.63 \times 10^{-2}$	$(139.99 \pm 0.15) \times 10^4$	0.11
胆甾醇	$7.73 \pm 4.02 \times 10^{-3}$	$(144.44 \pm 0.18) \times 10^4$	0.12
豆甾醇	$8.95 \pm 3.27 \times 10^{-3}$	$(191.12 \pm 0.34) \times 10^4$	0.18
谷甾醇	$10.48 \pm 3.92 \times 10^{-2}$	$(94.96 \pm 0.10) \times 10^4$	0.10

表 3 测定方法的日间精密度

Table 3 Precision of the method for inter-day assays

化合物	出峰时间/min ($n=5$)	峰面积/ ($\text{mAU} \cdot \text{min}$)	相对标准偏差 RSD/%
白桦脂醇	$1.38 \pm 4.52 \times 10^{-3}$	$(215.10 \pm 0.15) \times 10^4$	0.07
麦角甾醇	$5.44 \pm 3.55 \times 10^{-2}$	$(147.29 \pm 0.31) \times 10^4$	0.21
羊毛甾醇	$6.88 \pm 5.57 \times 10^{-2}$	$(139.68 \pm 0.30) \times 10^4$	0.21
胆甾醇	$7.73 \pm 7.32 \times 10^{-2}$	$(144.37 \pm 0.19) \times 10^4$	0.13
豆甾醇	$8.94 \pm 5.16 \times 10^{-2}$	$(191.07 \pm 0.71) \times 10^4$	0.37
谷甾醇	$10.37 \pm 7.73 \times 10^{-2}$	$(95.71 \pm 1.59) \times 10^4$	1.66

2.3 准确度

本实验中各甾类化合物的准确度分别 97.61%

(RSD, 0.94%), 99.83% (RSD, 1.36%), 99.39% (RSD, 0.87%), 96.26% (RSD, 1.96%), 98.74% (RSD, 0.90%) 和 101.62% (RSD, 0.65%), 表明该方法准确度较好。

表 4 测定方法的准确度

Table 4 Accuracy of the method

化合物质量/ μg	进样量/ μg	测量值/ μg	准确度/%	均值 $\pm$ 标准偏差/%	相对标准偏差 RSD/%
白桦脂醇	0.6	$0.60 \pm 1.39 \times 10^{-2}$	98.11 ± 2.32	97.61 ± 0.92	0.94
	0.9	$0.88 \pm 2.57 \times 10^{-2}$	98.18 ± 2.85		
	1.2	$1.16 \pm 3.59 \times 10^{-2}$	96.55 ± 2.99		
麦角甾醇	0.6	$0.56 \pm 1.89 \times 10^{-2}$	97.79 ± 1.44	99.83 ± 1.36	1.36
	0.9	$0.95 \pm 1.20 \times 10^{-2}$	100.24 ± 0.80		
	1.2	1.34 ± 0.13	101.46 ± 1.09		
羊毛甾醇	0.6	$0.60 \pm 6.70 \times 10^{-3}$	99.89 ± 1.12	99.39 ± 0.87	0.87
	0.9	$0.90 \pm 3.06 \times 10^{-3}$	99.91 ± 0.34		
	1.2	1.18 ± 0.14	98.39 ± 0.96		
胆甾醇	0.6	$0.59 \pm 5.13 \times 10^{-3}$	98.34 ± 0.86	96.26 ± 1.89	1.96
	0.9	$0.86 \pm 7.30 \times 10^{-3}$	95.80 ± 0.81		
	1.2	$1.07 \pm 3.80 \times 10^{-2}$	94.64 ± 11.89		
豆甾醇	0.6	$0.59 \pm 1.28 \times 10^{-3}$	98.97 ± 0.21	98.74 ± 0.89	0.90
	0.9	$0.90 \pm 2.27 \times 10^{-3}$	99.50 ± 0.25		
	1.2	$1.17 \pm 1.78 \times 10^{-2}$	97.76 ± 1.49		
谷甾醇	0.9	$0.91 \pm 2.45 \times 10^{-3}$	100.81 ± 0.27	101.62 ± 0.66	0.65
	1.2	$1.18 \pm 6.15 \times 10^{-3}$	102.61 ± 0.51		
	0.6	$0.63 \pm 1.84 \times 10^{-3}$	101.43 ± 0.31		

2.4 加样回收率

由表 5 可知,各甾类化合物的平均回收率在 96.14%~101.45%之间,表明该方法加样回收率较好。

表 5 样品中甾类化合物的加样回收率($n=5$)

Table 5 Recoveries of steroids components in sample($n=5$)

化合物	样品质量/mg	加入标样量/mg	测得甾类化合物量/mg	回收率/%	RSD/%
白桦脂醇	0.39	0.2	0.59	97.05	2.93
麦角甾醇	0.34	0.2	0.53	98.74	1.82
羊毛甾醇	0.19	0.2	0.38	95.65	1.94
胆甾醇	0.16	0.2	0.36	101.45	2.01
豆甾醇	0.19	0.2	0.39	96.62	3.43
谷甾醇	0.32	0.2	0.52	96.14	2.67

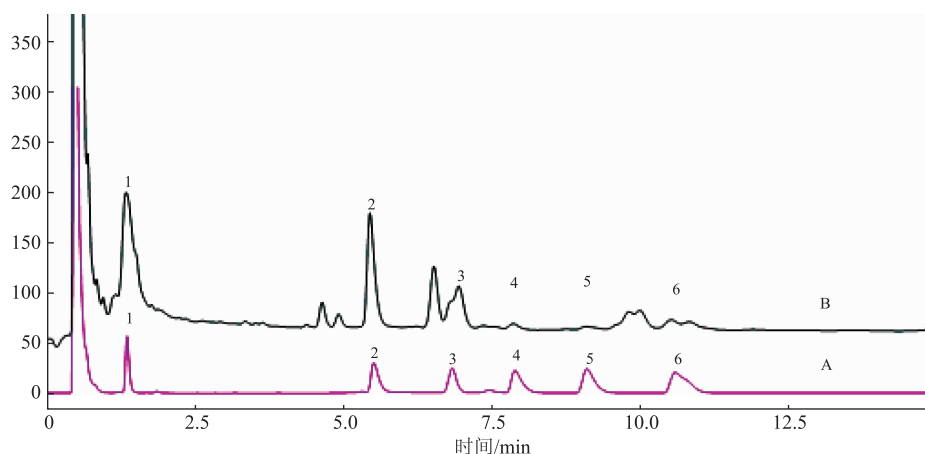
2.5 样品测定

采用 1.2.4 项分析方法获得典型样品的 UPLC 分析图谱见图 1,样品中各甾类化合物质量分数见表 6。

表 6 桦褐孔菌发酵菌丝体甾类化合物的质量分数

Table 6 Contents of steroids in the submerged-cultured mycelia of *Inonotus obliquus* ($n=3$)

甾类化合物	质量分数/(mg/g)
白桦脂醇	3.26±0.06
麦角甾醇	3.83±0.07
羊毛甾醇	0.98±0.03
胆甾醇	0.32±0.02
豆甾醇	0.14±0.01
谷甾醇	0.48±0.08



A:混标;B:桦褐孔菌发酵菌丝体;1:白桦脂醇;2:麦角甾醇;3:羊毛甾醇;4:胆甾醇;5:豆甾醇;6:谷甾醇

图 1 桦褐孔菌发酵菌丝体甾类化合物的 UPLC 分析图谱

Fig. 1 UPLC chromatograms of samples of the submerged-cultured mycelia of *Inonotus obliquus*

3 结 语

采用 UPLC 法对桦褐孔菌发酵菌丝体中白桦脂醇、麦角甾醇、羊毛甾醇、胆甾醇、豆甾醇和谷甾醇进行测定,在 12 min 内即可同时完成 6 种甾类化合

物的准确测定。该方法在保证含量测定结果准确的前提下,提高了色谱峰的分离度,节省了分析时间,减少了试剂损耗及废液处置费用,较大地提高了分析效率。

参考文献:

- [1] 黄伟,陆震鸣,耿燕,等. 桦褐孔菌菌丝体及甾类化合物的发酵条件优化[J]. 菌物学报,2012,31(6):909-916.
HUANG Wei,LU Zhenming,GENG Yan,et al. Optimization of submerged fermentation condition for production of mycelial biomass and steroids by *Inonotus obliquus*[J]. *Mycosystema*,2012,31(6):909-916.(in Chinese)
- [2] 高雪丽,高愿军,吴光辉. 桦褐孔菌功能特性的研究进展[J]. 食品与机械,2006,22(5):126-131.
HAO Xueli,GAO Yuanjun,WU Guanghui. Review on function property of *Inonotus obliquus* [J]. *Food & Machinery*,2006,22(5):126-131.(in Chinese)

- [3] 李东芹,金丹. 桦褐孔菌的作用研究进展[J]. 延边大学医学学报,2011,34(2):154-156.
LI Dongqing, JIN Dan. Progress in research on effects of *Inonotus obliquus* [J]. **Journal of Medical Science Yanbian University**, 2011, 34(2): 154-156. (in Chinese)
- [4] 曾小龙. 桦褐孔菌的化学成分与药理作用研究[J]. 广东教育学院学报, 2007, 27(3): 76-81.
ZENG Xiaolong. A research into the medical effects and chemical components of *Inonotus obliquus* (Fr.) pilat [J]. **Journal of Guang dong Education Institute**, 2007, 27(3): 76-81. (in Chinese)
- [5] Thang P T, Teik L S, Yung C S. Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage [J]. **Burns**, 2001, 27(4): 319-27.
- [6] Sun J E, Ao Z H, Lu Z M, et al. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice [J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2008, 118(1): 7-13.
- [7] Zheng W F, Liu T, Xiang X Y, et al. Sterol composition in field-grown and cultured mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2007, 42(7): 750-756.
- [8] Jorge A R Salvador, Joao F S Carvalho, Marco A C Neves, et al. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds [J]. **Natural Product Reports**, 2013, 30(2): 205-376.
- [9] 朱春玉, 郑方亮, 邵丽杰, 等. 桦褐孔菌子实体与菌丝体三萜化合物提取及活性比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 161-165.
ZHU Chunyu, ZHENG Fangliang, SHAO Lijie, et al. Extraction and Bioactivity of triterpenoids from fruit bodies and mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. **Food Science**, 2012, 33(15): 161-165. (in Chinese)
- [10] 王振河, 霍云凤, 王斌, 等. 桦褐孔菌液体深层培养研究[J]. 菌物学报, 2006, 25(3): 461-467.
WANG Zhenhe, HUO Yunfeng, WANG Bin, et al. Submerged fermentation of *Phaeoporus obliquus* [J]. **Mycosystema**, 2006, 25(3): 461-467. (in Chinese)
- [11] Gao Y, Xu H Y, Lu Z M, et al. 2009. Quantitative determination of steroids in the fruiting bodies and submerged-cultured mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. **Chinese Journal of Chromatography**, 27(6): 745-749.

科 技 信 息

巴西颁布有关肠道营养配方的技术法规草案

2014年12月18日,巴西卫生监督局发布G/SPS/N/BRA/1010号通报,就肠道营养配方中食品添加剂应用的授权许可发布第n 108号技术法规草案(2014年12月8日),该草案确定了授权许可在肠道营养配方中使用的食品添加剂列表及其相应的功能。根据这项技术法规草案,肠道营养配方分为两类:液态和粉末状。从决议发布后,各企业有12个月的调适期,已生产的产品在其标识的有效期限内仍可使用。

[信息来源]厦门WTO工作站. 巴西颁布有关肠道营养配方的技术法规草案 [EB/OL]. (2014-12-23). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=48053>.