

而铁肥的施用可能会使花期提前并显著增加花球数,应该有利于观赏性的增加。因此,在生产中应结合生产目的及地块条件合理施用微肥。

References

[1] Ma X J, Wan Y L, Tu P F, et al. Introducing plant of *Echinacea purpurea* in Peking [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(10): 590-592.
 [2] Xiao P G. The international popular immunity regulates and its products of *Echinacea* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(1): 46-48.
 [3] Li P, Wu H, Geng S L, et al. Germination and dormancy of seeds in *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae) [J]. *Seed Sci Technol*, 2007, 35(1): 9-20.
 [4] Li P, Ning X P, Wu H. Relation between the structure of medicinal parts and the accumulation of polyphenol of *Echinacea purpurea* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(6): 917-920.
 [5] Liu Z. *Agricultural Chemistry of Microelements* (微量元素的农业化学) [M]. Beijing: Chinese Agriculture Publishing House, 1991.
 [6] Shkolnik M Y. *Trace Elements in Plants* [M]. Amsterdam: Elsevier, 1984.
 [7] Xu J Z, Sheng S J, Yao J F, et al. Regulation on growth and accumulation of total alkaloid in *Leonurus artemisia* by various microfertilizers [J]. *China Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(1): 20-22.
 [8] Tai C, Wu T C, Wang J A. Studies of Mn deficiency on

some physiological effects of wheat Genotypes [J]. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2004, 19(2): 53-56.
 [9] Zhou B J, He X H. *Plant Nutrition* (植物的营养) [M]. Beijing: Chinese Agriculture Publishing House, 1985.
 [10] Zeng G W. *Plant Physiology* (植物生理学) [M]. Chengdu: Chengdu Scientific and Technical University Press, 1998.
 [11] Wang D X, Fu D Y. Availability appraisal of microelements in soils from western of Jilin [J]. *Soils* (土壤), 2002, 2: 86-89.
 [12] Zhu T D, Liu X B, Wang H, et al. *Handbook of Simple Technology in Application of Fertilizers* (简明施肥技术手册) [M]. Beijing: Jindun Publishing House, 2003.
 [13] Wartidimingsih N, Geneve R L. Seed source and quality influence germination in purple coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench.] [J]. *Hort Sci*, 1994, 29(12): 1443-1444.
 [14] He X, Li Q F, Zhao M X, et al. Effects of fertilizer applications on the seed germination of *Elymus sibiricus* and *Agropyron desertorum* [J]. *Acta Agr Sin* (草地学报), 2003, 2(11): 159-162.
 [15] Liang H, Shi W Y, Ma G R, et al. Effects of boron on physiological characteristic of two citrus species [J]. *J Guanxi Agric Biol Sci* (广西农业生物科学), 2005, 2(24): 118-122.
 [16] Lu R K. *Soils-Application of Fertilizers and Plant Nutrition Principles* (土壤-植物营养学原理和施肥) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998.
 [17] Young Y H, Wang Y H, Wu L S, et al. Advances on the study of B-efficiency in plant [J]. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2002, 21(1): 95-100.

人工培养蛹虫草高效液相色谱指纹图谱的初步研究

于荣敏, 叶斌, 宋丽艳*

(暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

摘要:目的 建立人工蛹虫草药材的高效液相色谱指纹图谱。方法 利用 Agilent ZOBAX SB-Aq C₁₈ (250 mm × 4.0 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇 5%~60% 为流动相梯度洗脱, 分析时间 30 min, 检测波长 260 nm, 进样量 1 μL, 体积流量 1.0 mL/min, 对样品超声提取条件以及流动相、检测波长等色谱条件进行了系统优化设计。结果 建立的指纹图谱中有 11 个共有峰, 且方法学考察符合规定的标准, 并以“中药色谱图分析和数据管理系统”软件对 11 个人工蛹虫草样品进行了相似度评价。结论 该法准确简便, 可作为控制人工蛹虫草药材内在质量的有效手段。

关键词: 人工蛹虫草; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1403-03

Primary study on HPLC fingerprint of cultured *Cordyceps militaris*

YU Rong-min, YE Bin, SONG Li-yan

(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprint of cultured *Cordyceps militaris*. **Methods** HPLC Method was used for the determination of *C. militaris* on Agilent ZOBAX SB-Aq C₁₈ column (250 mm × 4.0 mm, 5 μm), and measuring with methanol 5%—60% in 30 min as elution detective wavelength at 260 nm, injection sample of 1.0 μL and flow rate of 1.0 mL/min. The systematic optimized design of the chromatographic conditions, such as supersonic extraction, mobile phase, and detective wavelength as well was carried out. **Results** Fingerprint consisted of 11 common peaks and the result of methodology determination fitted to the related standards. The evaluation of cultured *C. militaris* by systematically comparing chromatograms with a professional analytical software recommended by National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products has been established. **Conclusion** The method is

收稿日期: 2006-12-22

基金项目: 广州市科技计划项目基金资助(2006Z3-E5031)

作者简介: 于荣敏(1955—), 男, 博士, 教授, 研究方向为现代生物技术与中药现代化。 Tel: (020)85220386 E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

* 通讯作者 宋丽艳

accurate, simple, and useful for the quality control of cultured *C. militaris*.

Key words: cultured *Cordyceps militaris* (L.) Link; HPLC; fingerprint

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 又名北冬虫夏草、北虫草,与传统名贵中药冬虫夏草同属异种。核苷类化合物为蛹虫草中的主要活性成分,如所含虫草素是一种核苷类抗菌素^[1],对多种肿瘤生长具有抑制作用,而且其量明显高于冬虫夏草^[2,3];腺苷具有改善心脑血管血液循环^[4]等药理活性。本实验利用 HPLC 方法,初步建立了人工蛹虫草 HPLC 指纹图谱,并对其方法学进行了初步考察,现报道如下。

1 仪器与试剂

美国安捷伦高效液相色谱仪(配备 G1311A 四元混合梯度输液泵、G1313A 自动进样器、G1315B 光电二极管阵列检测器),Agilent Instrument 色谱工作站。Agilent ZOBAX SB-Aq C₁₈(250 mm×4.0 mm, 5 μm)不锈钢柱。法国 Millipore Milli-QA10 超纯水净化系统。日本 Eyela N-1000 旋转蒸发器,配备 SB-1000 电子水浴锅, A-3S 真空泵。Acculab ALC-110.4 电子分析天平。飞鸽 TDL80-2B 离心机。KQ-250B 超声波清洗器。甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 TEDIA 公司)。

人工蛹虫草药材来自中国 6 个省份的不同生产厂家(表 1),所有原药材均由暨南大学天然药物化学与生药学教研室于荣敏教授鉴定。虫草素、尿苷和腺苷对照品均购自中国药品生物制品检定所。

表 1 人工蛹虫草药材来源

Table 1 Source of *C. militaris* raw materials

样品号	来源	样品号	来源
1	辽宁省沈阳市	7	江苏省东台市
2	辽宁省沈阳市	8	江苏省东台市
3	北京	9	广东省江门市
4	北京	10	广东省新会市
5	内蒙古呼和浩特市	11	广东省新会市
6	山东省菏泽县		

2 方法与结果

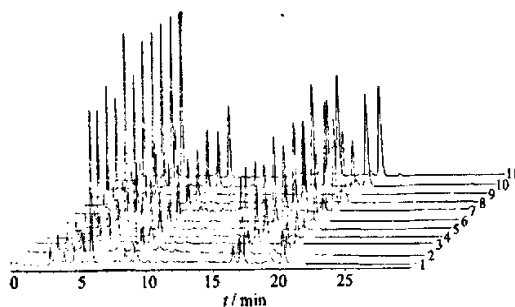
2.1 供试品的制备:称取人工蛹虫草干燥粉末 1.0 g,加水 20 mL,超声提取 0.5 h,滤过,同法重复一次。提取液(滤液)合并后减压蒸干,50%甲醇溶解并定容至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液,备用。11 个批号的样品均按照上述方法处理。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取虫草素、腺苷、尿苷对照品适量分别置于 5 mL 量瓶中,以 50%甲醇定容至刻度,分别配成质量浓度为 1.028、1.318、1.184 mg/mL 的对照品储备液。再用 0.45 μm 微孔

滤膜滤过,备用。

2.3 色谱条件:色谱柱为 Agilent ZOBAX SB-Aq C₁₈(250 mm×4.0 mm, 5 μm),流动相:甲醇 5%~60%,分析时间:30 min,体积流量:1.0 mL/min,紫外检测波长 260 nm,进样量 1.0 μL。

2.4 HPLC 指纹图谱的分析测定:按照“2.1”项下的方法同时制备 11 个样品的供试品溶液,以“2.3”项下的色谱条件进行分析测定,得到 11 个样品的指纹图谱(图 1)。



1~11-样品 1~11 见表 1

1-11-Sample 1-11 see Table 1

图 1 来自 11 个产地的人工蛹虫草的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of cultured *C. militaris* from 11 habitats

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取同一批次供试品,连续进样 5 次,记录色谱图。结果表明:各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积比值无明显变化,共有指纹峰的相对保留时间的 RSD 在 0.2%~0.8%,共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.7%~1.5%,符合指纹图谱标准,精密度良好。

2.5.2 重现性试验:取同一批次供试品,按“2.1”项方法平行制备人工蛹虫草供试液 5 份,在高效液相色谱仪上进样分析,记录色谱图。结果表明:各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积比值无明显变化,共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.2%~0.8%,共有峰相对峰面积的 RSD 在 1.4%~2.5%,符合指纹图谱标准,重现性良好。

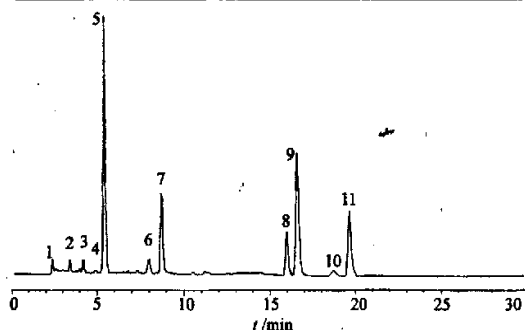
2.5.3 稳定性试验:取同一批次新制备供试品溶液于 0、2、4、8、10、24 h 测定峰面积,记录色谱图。结果显示:各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积比值无明显变化,共有峰相对面积的 RSD 在 0.9%~1.8%,符合指纹图谱标准,稳定性良好。

2.6 指纹图谱相似度分析:本实验依据聚类结果由一类样品中 1、2、3、5、6、9 号样品为标准样品,以其均值作为共有模式,利用中国药品生物制品检定所的《中药色谱图分析和数据管理系统》软件对 11 个不同产地的人工蛹虫草药材的指纹图谱进行了相似度计算,分别以全图谱相关系数法和全图谱夹角余弦法进行了评价(表 2)。结果显示 5 号样品具有最高的相似度,以此作为标准图谱,并以标准品添加法确定了第 1、5、7、9、10、11 号色谱峰分别为鸟苷、次黄嘌呤、腺苷、腺嘌呤和虫草素(图 2)。

表 2 11 个产地的样品指纹图谱的相似度

Table 2 Similarities of fingerprints from 11 habitats

样品号	全图谱相	全图谱夹	样品号	全图谱相	全图谱夹
	关系数法	角余弦法		关系数法	角余弦法
1	0.987	0.993	7	0.904	0.952
2	0.991	0.995	8	0.953	0.975
3	0.992	0.994	9	0.976	0.988
4	0.903	0.951	10	0.896	0.946
5	0.992	0.996	11	0.887	0.943
6	0.987	0.993			



1-鸟苷 5-次黄嘌呤 7-腺苷 9-腺苷
10-腺嘌呤 11-虫草素
1-guanosine 5-hypoxanthine 7-uridine
9-adenosine 10-adenine 11-cordycepin

图 2 人工蛹虫草 5 号样品指纹图谱及其相关色谱峰确认
Fig. 2 Fingerprint of cultured *C. militaris* sample No. 5 and establishment of relative peaks

3 讨论

3.1 流动相的优化:本实验共考察了 4 个不同的流动相系统及梯度,即乙腈-乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 6.86)、甲醇-甲醇-磷酸盐缓冲液(pH 6.86)。全部系统的梯度变化时间均被设置为 30 min。乙腈-水系统以及乙腈-磷酸盐系统的完成出峰时间均较短,得到色谱峰的数目较少,同时其分离度也不如甲醇系统的好,故选择了甲醇系统进行了进一步的优化分析。

3.2 检测波长的优化:本实验分别考察了 240、254 和 260 nm 波长下色谱图的表现情况,计算出峰总面积、峰总高度以及峰总数在检测波长 260 nm 处均达到了最大值,显示出 260 nm 处能获得最佳的分析效果。因此,本实验选择 260 nm 作为实验用检测波长。

3.3 样品提取条件的优化:为获得最佳的人工蛹虫草样品超声提取条件,采用两次超声提取法,并且对超声温度(25、50、75 ℃)、提取液(乙醇体积分数 0%、30%、50%)、超声时间(15、30、45 min)、提取液用量(10、20、30 mL)4 个条件进行了考察,按 2.3 项测定色谱图。

为了充分说明提取条件对样品提取效果的影响,以色谱图中峰总面积均占谱图峰总面积的 90% 以上的 14 个相对强度最大的峰总面积作为优化设计的评价标准。由结果可知:提取液(乙醇体积分数)对提取效果影响最大,超声温度次之,提取液用量再次之,而超声时间最小。故本实验采用的最佳样品提取条件为:1.0 g 干燥样品中加入水 20 mL,室温下超声 30 min,该过程重复提取两次,合并提取液。

4 结论

人工蛹虫草药材及其胶囊剂研究系国家“1035 计划”中的一类新药之一,虽已研制成功,但其技术含量(尤其质量标准)较低。本研究方法建立的指纹图谱可快速鉴别区分不同来源的蛹虫草药材,通过指纹图谱对蛹虫草药材进行综合宏观分析,有利于全面控制药材质量,促进蛹虫草药材及其制剂研制水平和质量控制的全面提高。此外,由于人工蛹虫草新产品的开发越来越受到众多药科技工作者的重视,故本实验也为该药材系列产品的研制开发提供了科学资料。

References:

[1] Suhadolnik. *Nucleoside Antibiotics* [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1970.
[2] Liu J, Yang S J, Yang X, et al. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris* Link [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(3): 111.
[3] Liu M P, Ma S Y, An T Y, et al. Effects of *Cordyceps militaris* on immunological function in mice sarcoma S180 model [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中国医药学报), 1999, 14(1): 25.
[4] Coates V J. *Gas Chromatography* (气相色谱) [M]. New York: Academic Press, 1958.