

金银花 HPLC 指纹图谱 . 中药材, 2007, 30 (10): 1203-1206.

[3] 黄雄, 李松林, 李萍, 等 . HPLC 法同时测定金银花中 8 种黄酮的含量 . 药学报, 2005, 40 (3): 285-288.

[4] 黄雄, 李萍, 张重义, 等 . HPLC 同时分析金银花中绿原酸和黄酮类成分的方法建立及其应用 . 中国药理学杂志, 2005, 40 (10): 781-782.

(2008 - 01 - 02 收稿)

冬虫夏草及其类似品的 HPLC 指纹特征分析

赖宇红, 阮桂平, 谢友莲, 陈浩桢
(广东省药品检验所, 广东广州 510180)

摘要 目的: 研究冬虫夏草及其类似品的 HPLC 指纹特征分析方法。方法: 对冬虫夏草及其类似品共 13 个样本进行 HPLC 测定, 结果分别采用相似度评价和采用轮廓图、雷达图、星座图等方法进行多变量二维平面比对分析。结果: 相似度分析可综合量化样本的相似程度, 轮廓图、雷达图、星座图等图示则能直观展示品种间的分类和特点。结论: 相似度分析和轮廓图、雷达图、星座图等多变量图示的综合应用更加有利于指纹图谱的评判和指纹特征解析。

关键词 冬虫夏草; HPLC; 指纹图谱; 轮廓图; 雷达图; 星座图

中图分类号: R282.71 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454 (2008) 08-1142-04

Study on HPLC Fingerprint Characteristic Analysis of *Cordyceps sinensis* and Its Similar Products

LAI Yu-hong, Ruan Gui-ping, Xie You-lian, Chen Hao-an
(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

Abstract Objective: To study on HPLC fingerprint characteristic analysis of *Cordyceps sinensis* and its similar products. Methods: To determine 13 samples of *Cordyceps sinensis* and its similar products by HPLC, and analyze the HPLC results with similar appraisal method and graphical methods of multivariate sample in two dimensional plane such as the methods of profile, radar chart and constellation graph. Results: The similar appraisal method might synthesize the similar degree in quantification, while the graphical methods such as profile graph, radar chart and constellation graph could show more details about the classification and the characteristic of varieties directly. Conclusions: We recommend the combined application of similar appraisal method and the graphical methods due to its advantages on the judgment and characteristic analysis of fingerprint.

Key words *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; HPLC; Fingerprint; Profile graph; Radar chart; Constellation graph

冬虫夏草是我国传统名贵野生中药材。随着人民生活水平的不断提高, 自我保健意识的增强, 对冬虫夏草的需求量越来越大, 逐渐造成野生资源的匮乏。为了扩大药源, 人们一方面致力于冬虫夏草的人工培养研究, 另一方面则着手寻找并研究其类似品, 主要有亚香棒虫草、凉山虫草、蝉花等。为解决天然虫草来源紧张问题, 以人工发酵培养虫草菌丝体已获成功, 数种人工虫草产品已投入市场。冬虫夏草的类似品虽然被认为有相似的功效, 但作为替代品, 价格上远远不及天然虫草。因此, 本研究收集了冬虫夏草正品、分枝虫草、亚香棒虫草、凉山虫草、人工培植虫草花等 13 份样品, 分析它们的 HPLC 指

纹图谱, 用相似度软件评价色谱的整体相似性, 并尝试分别以轮廓图、雷达图、星座图^[1-4]在二维平面上直观表达多个已知特征峰的绝对含量特点、相对比例特点和分类结果, 为深入研究提供线索。

1 实验部分

1.1 实验药材 1#、2#、3# 样, 购自广州清平市场, 经鉴定为冬虫夏草正品, 即麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体, 三份样品的虫体大小有差异。4# 样由湖南常德药检所收购, 虫体与菌种均未获鉴定, 子座分枝明显, 故暂称为“分枝虫草”。5# 样由湖南药检所收购自长沙地区,

基金项目: 广东省中医药管理局资助项目 (102097); 广州市科技局资助项目 (2007Z2-E5061)

作者简介: 赖宇红 (1969-), 女, 副主任中药师, 从事药品、保健食品检验和质量控制研究; Tel: 020-81853845, Email: laiyuhong@gd-da.gov.cn.

为麦角菌科真菌亚香棒虫草菌 *Cordyceps hawkesii* Gray 寄生在磷翅目昆虫的子座及幼虫尸体的复合体。6# 7# 样,由四川省药检所购自荷花市场,经鉴定为凉山虫草,为麦角菌科真菌凉山虫草菌 *Cordyceps liangshanensis* Zang Liuet Hu. Sp. Nov 寄生在磷翅目昆虫的子座及幼虫尸体的复合体。8~13# 样为人工培植虫草花,购自广州清平市场,其中 8# 9# 12# 13# 样呈长棒状、长条形或针状,长 2~5 cm; 10# 11# 样呈片状,多枝叶片状,或不规则片状,长 2~8 cm。

1.2 仪器与对照品 Agilent 1100 HPLC 仪;各对照品均由中国药品生物制品检定所提供:虫草素(858-200202)、尿嘧啶(00469-200401)、腺嘌呤(886-200001)、尿苷(887-200001)、腺苷(879-200001);乙腈为色谱纯。

1.3 供试液制备与测定条件^[5-8]

1.3.1 供试液制备:取供试品粉末 0.2 g,加石油醚 20 ml 加热回流提取 30 min,滤过,滤液水浴(50)蒸干,残渣加乙醇溶解并定容至 5.0 ml,微孔滤膜滤过(0.45 μm),取续滤液,作为脂溶性部位供试液。取滤渣烘干石油醚,精密加入超纯水 20 ml,称定重量,加热回流提取 30 min,放冷,用超纯水补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜滤过(0.45 μm),取续滤液,作为水溶性部位供试液。

1.3.2 脂溶性成分 HPLC 测定条件:色谱柱:ODS-2(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(95:5);流速:1.0 ml/min;柱温:25 ;进样室温度:20 ;检测波长:275 nm。色谱图见图 1。

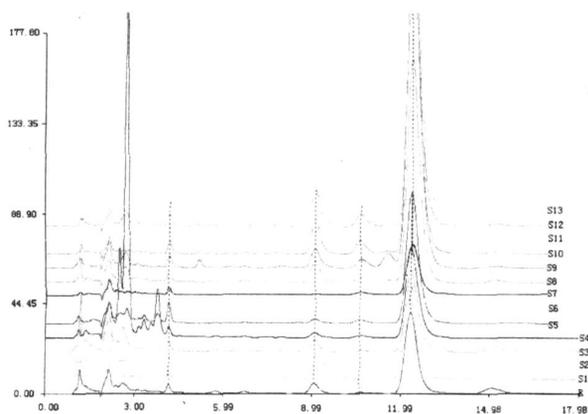


图 1 冬虫夏草及其类似品脂溶性部位 HPLC 图谱

1.3.2 水溶性成分 HPLC 测定条件:色谱柱:Dikma Diamonsil(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:A:乙腈、B:水,梯度见表 1;流速:1.0 ml/min;柱温:35 ;进样室温度:20 ;检测波长:260 nm。不同来源虫草的水溶性成分色谱图差距较大。

表 1 冬虫夏草及其类似品的水溶性成分的 HPLC 洗脱梯度

时间 (min)	0	3	18	21	23	24	30
A (%)	2	2	15	95	95	2	2
B (%)	98	98	85	5	5	98	98

2 数据分析

2.1 相似度分析 本文采用国家药典委员会于 2004 年发布的相似度软件,先以三批天然冬虫夏草的 HPLC 指纹图谱生成对照模板,再将 13 份样品的 HPLC 图谱分别与之匹配计算。结果见表 2。

表 2 冬虫夏草及其类似品的 HPLC 指纹图谱相似度计算结果

编号	样品名称	相似度	
		脂溶性部位	水溶性部位
1#	冬虫夏草	1.000	0.979
2#	冬虫夏草	1.000	0.998
3#	冬虫夏草	1.000	0.983
4#	分枝虫草	0.979	0.884
5#	亚香棒虫草	0.994	0.956
6#	凉山虫草	0.992	0.796
7#	凉山虫草	0.993	0.853
8#	人工培植虫草花(细条)	0.997	0.459
9#	人工培植虫草花(细条)	0.995	0.266
10#	人工培植虫草花(片状)	0.996	0.438
11#	人工培植虫草花(片状)	0.997	0.413
12#	人工培植虫草花(细条)	0.997	0.397
13#	人工培植虫草花(细条)	0.995	0.281

在多元统计分析中,多变量在二维平面图示为综合评价多指标的方法之一。本文以冬虫夏草及其类似品中虫草素、腺苷、尿苷、腺嘌呤、尿嘧啶 5 个成分的含量为变量,选取轮廓图、雷达图、星座图等 3 种图示方式进行了比较研究。

2.2 轮廓图特征^[1,2] 用 5 个平行的纵坐标分别代表虫草素、腺苷、尿苷、腺嘌呤、尿嘧啶 5 个变量,每份样品按各个变量的大小分别在坐标上一一标示出点,依次连接起来得到折线,该折线就代表了这份样品的轮廓特征。采用 Microsoft Excel 软件中“数据点折线图”方式绘图,结果见图 2。

2.3 雷达图特征^[1-3] 在圆周上作 5 等分,由圆心连接这 5 个点,得到 5 个辐射状的半径,按顺时针依次作为虫草素、腺苷、尿苷、腺嘌呤、尿嘧啶 5 个变量的坐标轴,每份样品按各个变量的大小分别在坐标

上一—标示出点,依次连接起来组成 5 边形,得到冬虫夏草及其类似品已知水溶性成分的雷达图。用 Microsoft Excel 软件中“雷达图”方式绘图。由于各坐标轴的最大值分别参照各变量的最大值设定,因此雷达图能直观反映各个变量在群体中的相对位置。结果见图 3。

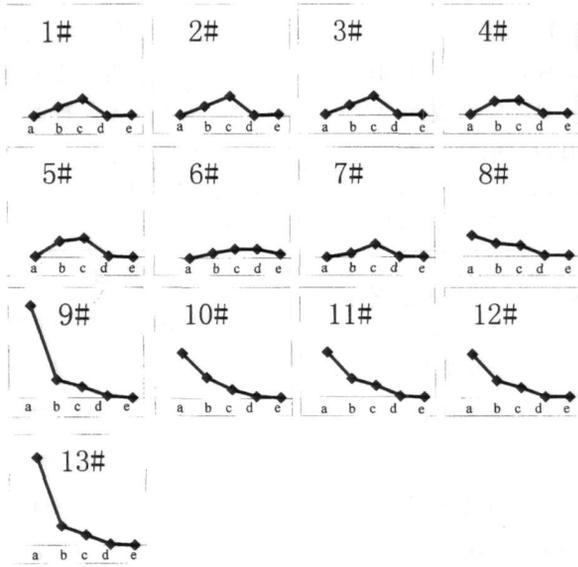


图 2 冬虫夏草及其类似品特征成分轮廓图

a. 虫草素 b. 腺苷 c. 尿苷 d. 腺嘌呤 e. 尿嘧啶

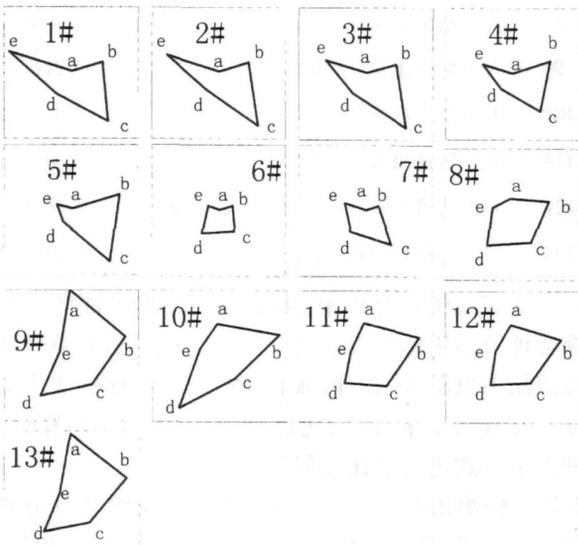


图 3 冬虫夏草及其类似品特征成分雷达图

a. 虫草素 b. 腺苷 c. 尿苷 d. 腺嘌呤 e. 尿嘧啶

2.4 星座图分类^[1,4] 取主要的已知成分虫草素、腺苷、尿苷、腺嘌呤、尿嘧啶,按文献^[1]公式对数据 {_{ij}} 作线性变换,使变换后的 {_{ij}} 落到 [0, 1], 取:

$$X_{ij} = \frac{X_{ij} - X_{minj}}{R_j}$$

$$X_{minj} = \min X_{ij}, 1 \leq j \leq n$$

$$X_{maxj} = \max X_{ij}, 1 \leq j \leq n$$

$$R_j = X_{maxj} - X_{minj}$$

按各成分平均含量的高低取权重,计算得出星座的路径和位置,将数据矩阵用 Microsoft Excel 软件中“折线散点图”方式绘图。结果见图 4。

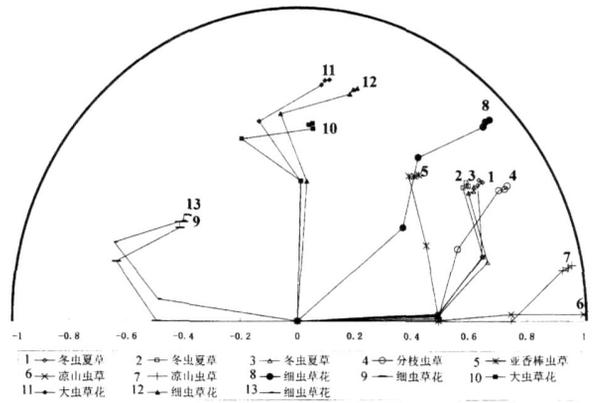


图 4 冬虫夏草及其类似品特征成分星座图

3 结果和讨论

3.1 冬虫夏草及其类似品的 HPLC 指纹特征

3.1.1 脂溶性成分: HPLC 指纹图谱以单一主峰为主,其他小峰面积太小,因此正品与各类似品相似度分析结果除分枝虫草为 0.97,其余全部均不低于 0.99,见表 2。但从绝对含量来看,人工培植虫草花的脂溶性成分主峰峰面积是其余各样品的 2~3 倍以上。

3.1.2 水溶性成分:正品冬虫夏草的指纹图谱高度相似 (>0.98),类似品中亚香棒虫草相似度也较高 (>0.95),而人工培植虫草花的相似度较低 (<0.5)。详见表 2。

3.1.3 水溶性成分指纹图谱中,除已知的虫草素、腺苷、尿苷、腺嘌呤、尿嘧啶成分之外,尚有其他指纹特征峰在人工培植虫草花中的含量非常高,提示需要对这些成分进一步确认与研究。

3.1.4 在所测定样品中,冬虫夏草正品的特征是虫草素含量低、腺嘌呤含量较低、尿苷和尿嘧啶含量高;分枝虫草和亚香棒虫草除尿嘧啶含量偏低外,其余特征与冬虫夏草正品非常相似;凉山虫草则虫草素、腺苷、腺嘌呤、尿嘧啶 4 种成分的含量都比较低;人工培植虫草花则腺苷含量较高、虫草素和腺嘌呤含量从中高到高。以上为不同成分在群体中相对含量的特征,用雷达图表达非常直观。

3.1.5 从星座图分类结果看,3 份正品冬虫夏草路径与结果均基本一致;从性状上分,人工培植虫草花有细条和大片两种,但 4 种细条的分成了 3 类,其

中有一类与大片的非常相似。说明人工培植虫草花的内在成分相差较大,成分分析对其质量研究和控制是非常有帮助的。

3.2 关于指纹特征分析方法的探讨

3.2.1 在对中药指纹图的评判中,国家药典委员会于 2004 年发布了相似度软件,使中药色谱指纹图谱有了科学公正的量化评判方法。本研究表明,指纹图谱相似度分析量化合理、客观性好,但存在缺少指纹特征描述的缺陷;如能结合轮廓图、雷达图、星座图等多变量图示分析方法,信息量损失少,特征可视化,可以方便人们直观了解事物、抓住特征。轮廓图、雷达图、星座图利用 Microsoft Excel 软件的计算公式作矩阵变换并绘图等功能,可方便实现。本文在中药指纹图谱特征研究方法上做了有益的探讨。

3.2.2 本文以冬虫夏草及其类似品的 HPLC 指纹图谱特征数据为例,研究比较了轮廓图、雷达图、星座图等 3 种图示方式,显见分类结果均基本一致,1#、2#和 3#样归为一类,9#和 13#样归为一类,4#、5#样与 1#、2#、3#样较接近。可见在二维层面上表达多变量的特征可使复杂问题的分析简化为图形识别,具综合性、直观性及较高的判别一致性。

3.2.3 由于部分含量很低的组份(腺嘌呤、尿嘧啶)峰面积小,容易受基线扰动使积分误差较大,星座图按平均含量的高低取权重,以降低测定中的不确定度对分类结果的影响。本文轮廓图采用了绝对含量统一坐标,轮廓图的特征与星座图分类结果非常吻合,可见轮廓图能简易有效地表达多变量特征。

3.2.4 轮廓图和星座图将 10#、11#、12#样归为一类,但在雷达图中 10#的形状与 11#、12#样差别较

大,主要是腺嘌呤含量差异有体现;另雷达图表现出冬虫夏草尿嘧啶相对含量较高,在轮廓图和星座图中经过权重调整特征基本损失。可见,权重调整需要非常慎重。

3.3 供试液制备与测定条件的选择 本研究对脂溶性部分和水溶性部分分别用极性相差较大的溶剂提取,同时分别用极性相差较远的流动相测定,可有效避免因成分极性跨度大导致在单一溶剂中提取率低、溶剂转换或溶液放置过程中成分析出溶液变浑浊等造成的结果重现性差的问题。

参 考 文 献

- [1] 方开泰. 多变量的图表示法,实用多元统计分析. 上海:华东师范大学出版社,1989:257-272.
- [2] 周福成. 多指标问题的图分析法. 阜新矿业学院学报,1996,15(3):360-364.
- [3] 付赞,方德英. 雷达图法在综合评价中应用研究. 统计与决策,2007,24:176-178.
- [4] 王延平. 用计算机实现多变量星座图与连结向量图. 计算机与现代化,2007,(4):124-126.
- [5] 李绍平,李萍,季晖,等. RP-HPLC 测定天然与人工冬虫夏草中游离麦角甾醇的含量. 中国现代应用药学杂志,2001,18(4):297-299.
- [6] 陈畅,罗珊珊,史艳秋,等. 液质联用法对两种虫草中核苷类成分的研究. 中国生化药物杂志,2005,26(5):260-263.
- [7] 袁永生,张莉,许效枫,等. 反相高效液相法测定虫草菌粉中核苷类成分的含量. 中国中药杂志,2002,27(10):776-778.
- [8] 龚范,彭源贵,崔卉,等. 联用色谱用于冬虫夏草的化学成分测定. 药学报,1999,34(3):214-217.

(2008-02-21 收稿)

本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊或特别声明需另作处理。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。