

法简便易行,结果准确,重现性好,可适于测定冬虫夏草及其替代物中腺苷和虫草素的含量。

[参考文献]

- [1] J S Zhu, G M Halpern, K Jones. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. *J Altern Complement Med*, 1998, 4(3):289.
- [2] J S Zhu, G M Halpern, K Jones. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: part . *J Altern Complement Med*, 1998, 4(4):429.
- [3] 中国药典. 2000. 86.
- [4] 吴洪臻,董新红,马德恩,等. 冬虫夏草及其代用品有效成分比

较. 中草药, 2000, 31(8):576.

- [5] 陈明,张荣. 冬虫夏草中核苷及其碱基含量测定方法的研究. 中成药, 1995, 17(4):40.
- [6] 吴春敏,叶榕平. HPLC 法测定冬虫夏草中腺苷的含量. 中草药, 1999, 30(9):658.
- [7] 李雪芹,王雁,包天桐. 反相高效液相色谱法测定人工冬虫夏草中腺苷的含量. 中国中药杂志, 1999, 24(1):12.
- [8] 李绍平,李萍,季晖,等. 天然与发酵培养冬虫夏草中核苷类成分的含量及其变化. 药学报, 2001, 36(6):436.
- [9] LI S P, LI P, DONG T X Tina, et al. Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *cordyceps mycelia* by *Capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2001, 22:144.

Determination of adenosine and cordycepin in *Cordyceps sinensis* and *C. militaris* with HPLC-ESI-MS

HUANG Lai-fang¹, GUO Fang-qiu¹, LIANG Yi-zeng¹, CHEN Ben-mei²

- (1. Research Center of Modernization of Chinese Herbal Medicines, College of Chemical and Chemical Engineering, Changsha 410083, China;
2. Analytical Testing Center of Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410083, China)

[Abstract] **Objective:** HPLC-ESI-MS to establish a method for simultaneous determination of adenosine and cordycepin in *Cordyceps sinensis* and *C. militaris*. **Method:** HPLC-ESI-MS method. An electrospray ionization (ESI) interface and selective ion monitoring (SIM) mode were used. The analytical column was a 2.0 mm ×150 mm Shimadzu VP-ODS column and the mobile phase was water (94%), methanol (5%) and formic acid (1%). 2-Chloroadenosine was used as internal standard for this assay. **Result:** The regression equations and coefficient were $Y = 0.1346X + 0.00129$ ($r = 0.9984$) for adenosine, $Y = 0.2164X + 0.0215$ ($r = 0.9991$) for cordycepin. The linear range was 0.5 ~ 124.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.5 ~ 136.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for adenosine and cordycepin, respectively. The average recoveries of adenosine and cordycepin were 95.8% and 98.1%, respectively. **Conclusion:** This method is highly sensitive, fast and selective, which can be used for the determination of nucleosides in *C. sinensis* and its substitutes. This method can also be applied for the quality control of above herbs.

[Key words] HPLC; ESI; MS; *Cordyceps sinensis*; *Cordyceps militaris*; nucleosides

[责任编辑 李 禾]

GC-MS 建立石菖蒲挥发油特征指纹图谱方法学研究

魏 刚*, 方永奇, 刘东辉, 林双峰

(广州中医药大学 第一附属医院 实验中心, 广东 广州 510405)

[摘要] **目的:**建立石菖蒲挥发油 GC-MS 分析色谱条件,初步拟定挥发油指纹特征图谱指标成分群。**方法:**采用 GC-MS 法分析 10 批石菖蒲挥发油化学成分。**结果:**在进样口温度 250℃,接口温度 230℃,载气流速 1.3 mL·min⁻¹,柱压 80 kPa,电离电压 1.4 kV,升温速率 3℃·min⁻¹的色谱条件下,石菖蒲挥发油主成分可达到较好分离;挥发油主要含有甲基丁香酚(2.13%)、顺式甲基异丁香酚(4.48%)、反式甲基异丁香酚(0.82%)、 γ -细辛醚(4.51%)、 β -细辛醚(66.15%)、 α -细辛醚(6.35%)等 6 个特征成分;以此 6 个主要共有峰为评价指标,GC-MS 色谱条件的精密性、稳定性、重现性良好。**结论:**方法准确可靠,重复性好,可用于石菖蒲挥发油指纹图谱的研究。

[收稿日期] 2003-01-25

[通讯作者] *魏刚, Tel: (020) 36591740, E-mail: weigang021@163.com

[关键词] 石菖蒲;挥发油;指纹图谱;指标成分群; β -细辛醚;GC-MS

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2004)08-0764-05

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎,具有化湿开胃、开窍豁痰、醒神益智之功效。年作者采用 GC-MS 法对大量石菖蒲挥发油样品进行分析时,发现石菖蒲挥发油主要含有甲基丁香酚、顺式甲基异丁香酚、反式甲基异丁香酚、 γ -细辛醚、 β -细辛醚、 α -细辛醚等 6 个特征成分,出峰先后及其相对含量极具特征性^[1],易于辨识。在此分析基础上,拟采用 GC-MS 进一步建立石菖蒲挥发油的特征指纹图谱,报道如下。

1 仪器与试剂

岛津 GCMS-QP5000 型气相色谱质谱联用仪;10 批次石菖蒲购于广东省药材公司、广州市药材公司、广州市荔湾药材公司,经作者鉴定均为天南星科植物石菖蒲 *A. tatarinowii* 的干燥根茎;针筒式微孔滤膜过滤器由天津市腾达过滤器厂生产;乙醚、无水乙醇等试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 供试液配制 取石菖蒲挥发油样品 1.0 mL 分别加入乙醚 5,10,15,20 mL 进样 1.0 μ L 分析,结果显示以加入 15~20 mL 乙醚分离效果理想。

2.2 色谱条件比较筛选

2.2.1 升温程序 取 3 批石菖蒲挥发油样品各 1.0 mL 加入乙醚 15 mL,分别在 12,8,6,5,4,3,2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 不同升温程序下进样分析,结果显示以 4,3

$^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 2 种升温程序为宜;另取 3 批次石菖蒲挥发油进样分析,从 γ -细辛醚、 β -细辛醚、 α -细辛醚等主要成分各自分离效果来看,以 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 为好。最终确定升温程序为:柱始温 60 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升到 220 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,可达到较好分离。

2.2.2 电离电压 在确定升温条件下进样分析,对 1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0 kV 6 种不同电离电压进行比较,结果显示:电离电压在 1.0~1.6 kV γ -细辛醚、 β -细辛醚、 α -细辛醚等主要成分相对含量稳定;在 1.8~2.0 kV β -细辛醚相对含量明显降低,估计由于离子浓度过强引起积分不完全导致。参照本仪器默认值为 1.5 kV,最终选定电离电压以 1.4 kV 为宜。

2.2.3 柱前压与流速 柱前压的不同导致载气流速的不同,从而引起成分出峰时间的改变。4 种不同柱前压 120,100,80,60 kPa 对应的流速分别为

CM2.0,1.6,1.3,1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果显示柱前压为 120~100 kPa 时,由于流速较快,导致 β -细辛醚与之后的一个峰分离欠佳,综合比较,80 kPa 较 60 kPa 为宜。

2.2.4 接口温度(离子源温度) 在 3 种不同接口温度 200,230,250 $^{\circ}\text{C}$ 下进行分析,主成分相对含量几无差别,确定以 230 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。

2.2.5 进样口温度 在 3 种不同进样口温度 200,230,250 $^{\circ}\text{C}$ 下进行分析,主成分相对含量几无差别,考虑到进样口温度比样品分析最高温度约高 20 $^{\circ}\text{C}$,确定以 250 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。

2.3 方法学考察

2.3.1 2 h 记录图 取石菖蒲挥发油进样分析,结果表明:60~120 min 没有出峰,提示 60 min 内挥发油成分出峰完全。

2.3.2 精密度试验 取石菖蒲挥发油进样分析,连续进样 5 次。结果表明:6 个指标成分保留时间的相对标准偏差均小于 0.2%,相对含量除 γ -细辛醚的相对标准偏差为 7.1% 外,其余均小于 5%,提示精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取石菖蒲挥发油进样分析,分别在 1,2,4,24,48,120 h 进样 6 次。结果表明:6 个指标成分保留时间的相对标准偏差均小于 0.3%,相对含量的相对标准偏差均小于 5%,提示 120 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.3.4 重复性试验 取同一批次石菖蒲 5 份分别提取挥发油后,进样分析。结果表明:6 个指标成分保留时间的相对标准偏差均小于 0.3%,相对含量除 γ -细辛醚的相对标准偏差为 6.3% 外,其余均小于 5%,提示重复性良好。

2.4 样品检测

2.4.1 样品制备与检测 取石菖蒲饮片适量,加 8 倍量水,按《中国药典》挥发油测定甲法收集挥发油,适量乙醚萃取,挥干乙醚收取挥发油,备用。每批次挥发油取 1 mL 加入 15 倍量乙醚溶解,针筒式微孔滤膜过滤,取 1.0 μ L 进样分析,总离子流图见图 1。通过计算机自动检索与标准图谱对照,鉴定了其中 58 个化合物,有 13 个共有峰。

2.4.2 主成分与图谱特征分析 由 10 批次挥发油

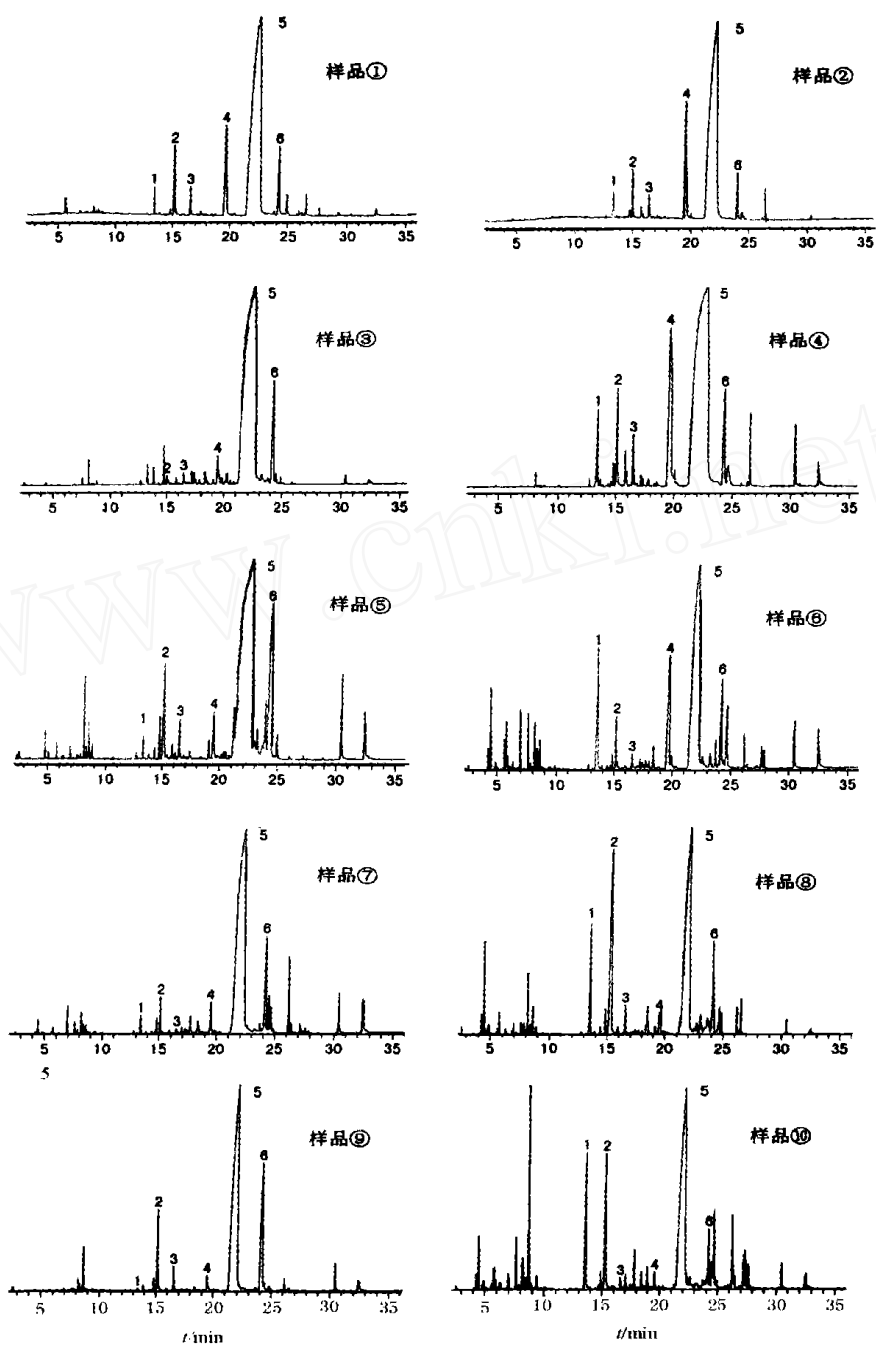


图 1 10 批次石菖蒲挥发油 GC-MS 总离子流量图

总离子流图可见,石菖蒲挥发油主要含有甲基丁香酚、顺式甲基异丁香酚、反式甲基异丁香酚、 γ -细辛醚、 β -细辛醚、 α -细辛醚等 6 个特征成分,以上成分平均占有挥发油总量的 84.45%,其出峰先后及其相对含量构成了石菖蒲挥发油的特征指纹图谱,见表 1,图 2。为利于辨析,将以上 6 个成分分为 2 组,其中甲基丁香酚、顺式甲基异丁香酚、反式甲基异丁香酚三者互为同分异构体(分子式 $C_{11}H_{14}O_2$,分子量 178)

构成第 1 组, γ -细辛醚、 β -细辛醚、 α -细辛醚三者也互为同分异构体(分子式 $C_{12}H_{16}O_3$,分子量 208)构成第 2 组,2 组峰均以中间峰(顺式甲基异丁香酚、 β -细辛醚)为高。

3 结论

3.1 本研究所建立 GC-MS 分析色谱条件为,GC: DB-1 石英毛细管色谱柱,样口温度 250,接口温度 230,载气为氦气,流速 $1.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱压 80

表 1 10 批次石菖蒲挥发油主要特征成分

峰号	化学成分	批次相对含量/ %									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	甲基丁香酚 methyleugenol	0.86	1.00	-	1.61	0.21	5.37	0.49	4.70	0.08	7.02
2	顺式-甲基异丁香酚 cis-methylisoeugenol	3.54	2.06	0.24	3.16	3.19	1.63	1.21	16.86	5.26	7.68
3	反式-甲基异丁香酚 trans-methylisoeugenol	1.12	0.86	0.45	1.31	1.01	0.47	0.20	1.18	1.19	0.44
4	γ -细辛醚 γ -asarone	7.78	11.02	1.46	9.57	2.17	9.03	1.68	0.86	0.83	0.69
5	β -细辛醚 β -asarone	76.64	77.33	82.24	69.24	62.61	54.49	72.12	49.89	68.33	48.64
6	α -细辛醚 α -asarone	3.87	2.65	6.47	3.66	12.15	5.05	6.35	4.38	15.85	3.03
合计		93.81	94.92	90.86	88.55	81.34	76.04	82.05	77.87	91.54	67.50

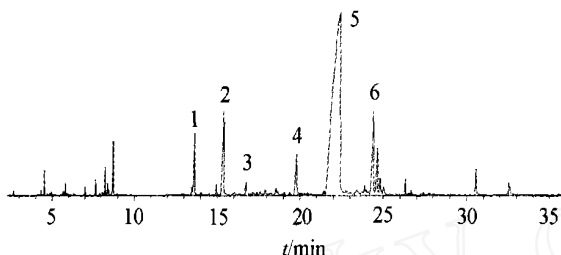


图 2 石菖蒲挥发油 GC-MS 总离子流图
(指纹特征图谱)

1. 甲基丁香酚; 2. 顺式-甲基异丁香酚;
3. 反式-甲基异丁香酚; 4. γ -细辛醚;
5. β -细辛醚; 6. α -细辛醚

kPa, 分流比 30:1, 进样量 1.0 μ L, 升温程序: 柱始温 60 $^{\circ}$ C, 保持 1 min, 以 3 $^{\circ}$ C min^{-1} 的速率升到 220 $^{\circ}$ C, 保持 5 min. MS: EI 源 (70 eV), 双灯丝; 质量范围 m/z 40 ~ 450 全程扫描, 扫描间歇 1.0 s.

3.2 以上 10 批次挥发油含共有峰 13 个, 平均含量占 86.99% $\pm$ 7.86%, 可初步拟订为石菖蒲挥发油的指标成分群。其中主要含有甲基丁香酚 (2.13%)、顺式甲基异丁香酚 (4.48%)、反式甲基异丁香酚 (0.82%)、 γ -细辛醚 (4.51%)、 β -细辛醚 (66.15%)、 α -细辛醚 (6.35%) 等 6 个特征成分, 另还有芳樟醇 (0.23%)、樟脑 (0.22%)、 β -松油醇 (0.06%)、冰片 (0.46%)、 δ -愈创木烯 (0.13%)、十六酸 (0.92%)、亚油酸 (0.51%) 等 7 个共有峰。

3.3 以 6 个主要共有峰为评价指标, GC-MS 色谱条件的精密度、稳定性、重现性良好。

4 讨论

4.1 本研究结果表明在 GC-MS 色谱条件中, 升温程序、电离电压、柱前压与流速等因素对组分的分离效果影响明显, 进样口温度以及离子源温度影响较小。尤其是升温程序, 是在比较过 6 批次石菖蒲挥发油的分离效果才最终确定下来的, 提示在指纹图谱的研究中 GC-MS 升温程序应在多批次样品考察的基础上予以制订。

4.2 中药挥发油组分较多, 几十以至上百, 而以为为数不多的相对含量较大的主要特征性成分作为评价指标考察色谱条件的精密度、稳定性、重现性, 是实际可行的选择。由于 GC-MS 常选用石英毛细管色谱柱, 在升温程序确定后, 挥发油各组分保留时间的相对标准偏差均很小, 因此组分的相对含量成为更确切的评价指标。

4.3 石菖蒲挥发油已知的成分达 60 余种^[2], 但其中相对含量较大成分的数目并不多, 主要包括有 β -细辛醚、 α -细辛醚、 γ -细辛醚、细辛醛、榄香素、甲基丁香酚、顺式甲基异丁香酚、反式甲基异丁香酚等成分。本研究结果与以往报道数据^[3,4]基本相符, 提示石菖蒲挥发油的主要成分稳定性强, 具备指纹图谱阐述的可行性。拟进一步针对不同产地, 固定产地不同采收时节进行深入分析, 最终确定挥发油指纹图谱的主要特征成分群及其相对含量, 客观评价石菖蒲的内在质量。

4.4 10 批次样品分析结果还表明, 6 个特征性成分虽然都含有, 但个体差异还是较大, 如 β -细辛醚在 48.64% ~ 82.24%, 甲基丁香酚在 0.08% ~ 7.02%。这种个体差异可能与药材产地以及采收季节不同有关, 为减少这种差异带给制剂成品, 应在大样本分析的基础上, 固定药材的产地与采收时节, 再制定栽培基地药材的指纹图谱, 这是提高中药质量控制水平的可行之路。

【参考文献】

- [1] 魏刚, 方永奇, 吴启端, 等. GC-MS 建立醒神滴鼻液中间产物质量控制标准研究. 中成药, 2001, 23(9): 638.
- [2] 董小萍, 邓放. 石菖蒲质量标准研究进展. 成都中医药大学学报, 2001, 24(1): 60.
- [3] 邵文霞, 刘柏年, 龚伯祥, 等. 石菖蒲挥发油中黄樟醚的分析. 中成药研究, 1984, 6(1): 26.
- [4] 黄远征, 何宗英, 曹延怀, 等. 中国菖蒲属植物根茎挥发油成分分析及其资源的合理利用. 色谱, 1993, 11(5): 267.

Study on GC-MS fingerprint analysis in rhizome of volatile oil of *Acorus tatarinowii*

WEI Gang, FANG Yong-qí, LIU Dong-hui, LIN Shuang-feng

(The first Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] Objective : To establish the method of fingerprint analysis on volatile oil in rhizome of *Acorus tatarinowii* by GC-MS, and to study the main characteristic components. **Method :** The main components of 10 samples were determined by GC-MS. **Result :** The injector temperature was 250 . The interface temperature was 230 . The column flow was 1.3 mL min⁻¹. The column pressure was 80 kPa. The detector volt was 1.4 kV. The temperature rate was 3 min⁻¹. And the main characteristic components were composed of the methyleugenol (2.13 %), *cis*-methylisoeugenol (4.48 %), *trans*-methylisoeugenol (0.82 %), γ -asarone (4.51 %), β -asarone (66.15 %), α -asarone (6.35 %). And the RSD of precision and reproducibility and stability was almost in the range of 5 %. **Conclusion :** The method is reliable, accurate and can be used for fingerprint analysis of volatile oil of *Acorus tatarinowii*.

[Key words] *Acorus tatarinowii*; volatile oil; fingerprint; β -asarone; GC-MS

[责任编辑 李 禾]

高效液相色谱法测定飞龙掌血中异茴芹香豆素含量

郝小燕^{1*}, 曹晓红², 梁 妍¹, 沈月毛²

(1. 贵阳医学院 药学院, 贵州 贵阳 550004;

2. 贵州省中国科学院 天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的:用高效液相色谱法对苗药飞龙掌血中异茴芹香豆素含量进行测定。方法:采用 Hypersil C₁₈柱为分析柱,以甲醇-水(70:30)为流动相,检测波长 306 nm。结果:线性范围 0.004 20~0.420 μ g,平均回收率 99.7%, RSD=2.8%。结论:本法简便、准确、重现性好,可用于飞龙掌血中异茴芹香豆素的含量测定。

[关键词] 飞龙掌血;异茴芹香豆素;高效液相色谱法;含量测定

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2004)08-0768-02

飞龙掌血是芸香科飞龙掌血属植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* Lam. 的根或根皮。民间用其水煎剂及药酒治疗跌打损伤,风湿性关节炎及多种痛症、血症。具有活血化瘀、止痛、止血、驱风除湿之功效,是传统的活血化瘀中草药^[1],也是一种苗药。据文献报道^[2]飞龙掌血中异茴芹香豆素具有心血管方面的生理活性,其定量方法有薄层扫描法^[3],但其精密度及重现性不理想。因此,本研究用 HPLC 对飞龙掌血中异茴芹香豆素进行定量分析,精密度高,准确性好,操作简便,可作为飞龙掌血中异茴芹香豆素的定量分析方法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪,包括 HP1100 泵、HP1100 自动进样器、HP1100 紫外-可见检测器、HP1100 柱温箱;HP1100/WIND - 3D 化学工作站;KQ - 250B 型超声波清洗仪。甲醇(色谱纯、分析纯)、超纯水、无水乙醇(优级纯)。

飞龙掌血 *T. asiatica* 的根皮粉碎后作提取用料。药材采自贵阳市孟关,由贵州省中药研究所陈德媛研究员鉴定。异茴芹香豆素对照品是作者从飞龙掌血中分离、纯化得到,经核磁、质谱鉴定为异茴芹香豆素,HPLC 归一化法测定其纯度高于 99.0%。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 精密称取原药粉末 1.00 g,用 50 mL 甲醇浸泡 4 h,用超声波震荡 30 min,滤过,重复

[收稿日期] 2003-03-08

[通讯作者] *郝小燕, Tel: (0851) 6908568, E-mail: haoxiaoyan @vip.163.com

· 768 ·