

虫草属核苷类成分分析方法的研究进展

宗时宇, 浦益琼, 张彤, 王冰*

(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 为加强对虫草属核苷类化合物的研究开发,对国内外近15年虫草属核苷类成分的多种检测方法进行综述。以虫草属核苷为研究对象,对HPLC测定法、毛细管电泳法及薄层色谱扫描法等3种检测方法进行整理,并将HPLC法按不同检测器进行分类对比。HPLC法用于核苷类成分的定性、定量分析,具有灵敏度高、分离速度快和分离效率高的特点,其中,LC-MS检测方法适应性广、分离能力强、检测限低,此外,还可以提供每一个组分丰富的结构信息和相对分子质量。LC-MS检测方法在核苷类成分检测中越来越广泛的应用,它不仅局限于虫草属核苷类成分含量测定的目的,更有利于研究人员从分子水平上开展对虫草属核苷或其他含有核苷药材的深入研究。

[关键词] 虫草属; 核苷类; 高效液相色谱; 分析方法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0219-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015160219

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150702.1014.009.html>

[网络出版时间] 2015-07-02 10:14

Analytical Methods of *Cordyceps* Nucleosides ZONG Shi-yu, PU Yi-qiong, ZHANG Tong, WANG Bing*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] In order to strengthen the research and development of *Cordyceps* nucleosides, multiple detection methods adopted for *Cordyceps* nucleosides at home and abroad were reviewed. Three detection technologies used in the analysis of *Cordyceps* nucleoside were selected, including high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) and thin layer chromatography scanning (TLCs) method. According to different detectors, HPLC was also classified and compared. The HPLC method is usually applied in the qualitative and quantitative analysis of nucleosides, with a high sensitivity, quick separation and high separation efficiency. Among them, the LC-MS method features a wider adaptability, strong separation capacity and low detection limit and can provide rich structure and molecular weight information of each component. The LC-MS method has been widely used not only in the detection of *Cordyceps* nucleosides, but also in intensive studies on *Cordyceps* nucleosides or other drugs containing nucleosides at the molecular level.

[Key words] *Cordyceps*; nucleoside; HPLC; analytical methods

虫草属 *Cordyceps* 真菌通常属于子囊菌门 Ascomycota, 子囊菌纲 Ascomycotaetes, 粪壳亚纲 Sordariomycetidae, 肉座菌目 Hypocreales 或麦角菌科 Clavicipitaceae, 是一类非常复杂且有经济意义的真菌类群, 广泛分布于世界各地^[1]。研究发现, 虫草属真菌在自然界中发挥着十分重要的作用, 它们不仅可以维持森林生态平衡, 作为害虫防治的杀虫剂, 同时还能产生多种生物活性物质, 具有抗疲劳、延缓衰老、抗癌、增强常压耐缺氧能力、抗肾损伤、抗病原微生物、解毒、抗菌、免

疫调节、镇静和镇痛作用等^[2-3]。因此, 加强对虫草属药材的研究开发是非常重要的^[4]。

核苷类 (nucleoside) 化合物广泛存在于虫草属的真菌类群中, 是虫草重要的生物活性成分。有研究发现, 核苷类化学成分除具有抗癌、抗菌和抗病毒等生物活性外, 对人体的代谢、免疫、心血管、肝、肾及神经系统等都发挥着重要的生物作用^[5]。核苷类化合物包括腺苷 (adenosine), 腺嘌呤 (adenine), 虫草素 (cordycepin) (3'-脱氧腺苷, 3'-

[收稿日期] 20141120(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303233); 新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-10-0944)

[第一作者] 宗时宇, 在读硕士, 从事中药微粒给药系统研究, Tel:021-51322685, E-mail: zongsy114@163.com

[通讯作者] *王冰, 博士, 副教授, 从事中药纳米给药系统研究, Tel:021-51323123, E-mail: annabel_cn@163.com

deoxyadenosine), 尿苷 (uridine), 鸟苷 (guanosine), 鸟嘌呤 (guanine), 胞苷 (cytidine) 等, 其中, 腺苷在《中国药典》2010 年版一部中被定为发酵虫草菌粉的含量测定项目, 规定其含量不得少于 0.010%^[6]。已有相关综述, 大多仅就冬虫夏草或蛹虫草等一种药材的含量测定、化学成分或药理作用进行综述^[7-11], 而依据 HPLC 不同检测器, 以虫草属核苷为研究对象, 对不同分析方法进行分类详述及列表对比的研究综述还未见报道。因此, 本文综述了国内外近 15 年来虫草属核苷类成分的 HPLC 测定法、毛细管电泳法及薄层色谱扫描法等 3 种检测方法, 并将 HPLC 法按不同检测器进行分类对比, 为虫草属药材中核苷类成分的测定方法建立提供借鉴。

1 HPLC 测定法

HPLC 法是常用的核苷类成分的分离和分析技术^[10], 现已广泛用于样品的定性和定量分析中, 具有操作简单、灵敏度高、分离效率高及分析速度快等特点, 测定结果不仅快速、准确, 且重复性好^[11-12]。通常按其所连接检测器的类型, 将 HPLC 法分为 3 类: HPLC-MS 法, HPLC-UV 法和 HPLC-DAD 法。

1.1 HPLC-MS 法 HPLC-MS 联用技术具有高分离能力、高灵敏度、应用范围广和极强的专属性等特点, 是目前较为先进的成分分析技术之一。Yang 等^[13]建立离子对反相液相色谱-质谱法测定虫草中的核苷酸、核苷及其转化物等 16 种成分的含量, 结果这 16 种分析成分的检测限和检出限分别为 0.01 ~ 0.16, 0.04 ~ 0.41 mg·L⁻¹。陈畅等^[14]采用 HPLC 与 MS 法联用对冬虫夏草子座和蒙山九州虫草中核苷类化合物进行研究, 对各组分进行定性和定量分析, 并比较了两种虫草的不同。陆巍杰等^[15]通过液相-质谱联用法定性确认了工业化培育北冬虫夏草与野生冬虫夏草中的核苷类功效成分均为虫草素和腺苷, 流动相为含 0.5% 乙酸的水-甲醇体系。张虹等^[16]建立 LC-ESI-MS 法结合选择离子监测 (SIR) 法分析冬虫夏草中虫草酸、虫草素、尿嘧啶等活性成分, 回收率为 90% ~ 110%。杨钊等^[17]建立 LC-MS-MS 法, 结合多反应检测 (MRM) 模式, 对冬虫夏草及其代用品中腺苷和虫草素的含量进行了测定。黄兰芳等^[18-20]采用 HPLC-MS 法测定了冬虫夏草及其代用品中腺苷和虫草素的含量, 结果显示腺苷、虫草素和 2-氯腺苷分离效果良好; 又采用优化的 LC/ESI-MS 法对天然冬虫夏草和蚕蛹虫草中的核苷类组分进行定性定量分析, 该法采用选择性离子检测模式, 各组分在保留时间区域内均没有产生干扰现象具有很高的专属性。Fan 等^[21]建立 HPLC-ESI-MS/MS 法, 简便快速地对天然和培养虫草中核苷、碱基及其类似物进行了定性和定量测定。Zhao 等^[22]采用 HILIC-ESI/MS 法测定了天然虫草中 15 种核苷及其碱基, 并将该法应用于 12 个批次天然虫草的核苷类成分分析。表 1 列举了不同虫草属药材的 HPLC-MS 检测条件。

1.2 HPLC-UV 法 在 HPLC 法中使用紫外检测器是比较传统的检测方法, 目前, 在已报道的核苷类物质的含量测定方法中, 最常见的就是采用 HPLC-UV 法, 其按洗脱方式又分

为梯度洗脱和等度洗脱。

1.2.1 梯度洗脱 顾宇翔等^[23]采用 HPLC 法定量分析了虫草制品中的 8 种核苷及碱基, 成功应用于不同来源的虫草制品中核苷及碱基的测定, 快速、简便。李万芳等^[24]建立了测定北虫草 5 种核苷成分的高效液相色谱定量分析方法, 流动相为甲醇-水梯度洗脱, 条件简便、可行。陈伟等^[25]以甲醇-磷酸二氢钾作为流动相梯度洗脱, 建立了 HPLC 法测定虫草中 11 种有效成分的分析方法, 结果各标准样品的分离度均为优良。张勋等^[26]以 HPLC 法同时测定了长座虫草中 13 种核苷类和碱基类物质, 均于 50 min 内达到基线分离, 且线性关系良好, 平均回收率在 98.4% ~ 107.5%。杨昕等^[27]以尿苷、腺苷、虫草素为主要评价指标, 采用高效液相色谱法测定 9 个厂家 11 批人工蛹虫草样品和 4 种来源天然冬虫夏草中核苷类成分的含量, 结果显示不同产地人工蛹虫草的核苷含量为 0.265% ~ 0.870%, 冬虫夏草核苷含量为 0.168% ~ 0.250%。张薇薇等^[28]对北虫草中 4 种核苷类成分的含量进行测定, 并确定了其含量测定指标成分及限量标准。罗珊珊等^[29]用 HPLC 法对九州虫草中的核苷类活性成分进行了检测, 结果重现性好, 回收率高。李进等^[30]采用 HPLC 法测定了青海冬虫夏草中腺苷、鸟苷、肌苷、尿苷和虫草素 5 种成分的含量, 结果各成分的线性关系与分离度均良好。雷宁等^[31]采用 HPLC 法分析了不同来源的天然虫草与人工虫草中主要核苷类成分的含量差异, 结果人工虫草的核苷类成分含量较天然虫草高。江宝红等^[32]采用 HPLC 法测定蛹虫草中虫草素、腺苷和尿苷含量, 平均回收率分别为 100.05%, 99.74%, 99.98%。梁洪卉等^[33]采用 HPLC-UV 分析法, 以磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相, 检测冬虫夏草中主要核苷类物质, 均能达到完全分离, 且峰形好。武为宝等^[34]建立 HPLC-UV 法测定皖产古尼虫草中核苷和碱基成分含量, 比较了其与自然冬虫夏草核苷和碱基成分的同异。郭亚东等^[35]也采用 HPLC-UV 法, 对冬虫夏草中腺苷的含量进行了测定, 结果腺苷与其他成分的分度度良好, 重复性好。表 2 列举了不同虫草属药材的 HPLC-UV 梯度洗脱法检测条件。

1.2.2 等度洗脱 利用 HPLC-UV 等度洗脱法测定冬虫夏草中核苷类含量, 又可分为含磷酸盐缓冲液流动相及不含磷酸盐缓冲液流动相体系。在进行测定时, 核苷类成分在流动相含有磷酸盐缓冲液的体系中, 分离时间短, 保留时间较为合理, 但当测定多个核苷类成分时, 则与杂质的分离度不够高; 而在流动相不含磷酸盐缓冲液的体系中, 核苷类成分的分离时间和保留时间相对较长, 且峰形易扩散, 但分离度相对较高, 由于该分离系统中不含盐, 又减少了对色谱柱的损伤^[36]。

夏文娟等^[37]以 HPLC 法测定了 13 个不同产地的优质冬虫夏草中腺苷含量, 结果不同产地虫草中腺苷含量为 142.5 ~ 396.6 μg·g⁻¹, 藏草中的含量高于川草; 而在川草中, 炉草含量又高于滇草, 灌草腺苷含量最低。吴洪臻等^[38]采用反相高效液相色谱法, 以甲醇-水 (15:85) 为流动相, 明显比较出冬虫夏草及其代用品 3 种药材中虫草素、腺苷、N6-

表 1 冬虫夏草及同属药材的 HPLC-MS 检测条件比较

Table 1 Comparison for HPLC-MS detection conditions between *Cordyceps sinensis* and congener herbs

柱型号	流动相	检测限 /mg·L ⁻¹	线性范围 /mg·L ⁻¹	测定结果	文献 来源
ZORBAXSB-Aq (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-水梯度洗脱	腺苷:0.03 尿苷:0.16 鸟苷:0.06	腺苷:0.553 ~ 8.850 尿苷:0.328 ~ 10.500 鸟苷:0.422 ~ 6.750	各化合物都能得到很好的分离, 线性关系良好, 整体回收率为 81.5% ~ 120.2%	[13]
YWG-C ₁₈ (20 mm × 15 mm, 5 μm)	乙腈-水梯度洗脱	-	均为 12.5 ~ 150	冬虫夏草和蒙山九州虫草中的核苷类成分存在差异, 冬虫夏草中缺少具有活性的 2'-脱氧腺苷	[14]
Xterra ^R C ₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm)	10 mmol·L ⁻¹ 的醋酸氨水溶液-甲醇梯度洗脱	尿嘧啶:0.072 腺苷:0.050 虫草素:0.065	尿嘧啶:1.41 ~ 20.0 腺苷:0.22 ~ 22.0 虫草素:0.64 ~ 64.0	虫草酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、腺嘌呤、腺苷、虫草素的定性离子分别为 183, 111, 137, 265, 136, 268, 252, 回收率 90% ~ 110%	[16]
Waters XTerra ^R MS C ₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)	水-甲醇-甲酸 (89:10.5:1)	腺苷:0.44 虫草素:0.31	二者线性范围均为 0.005 ~ 1.0	腺苷和虫草素的加样回收率分别为 98.12%, 97.94%, 该方法灵敏、选择性好、快速	[17]
Shimadzu VP-ODS C ₁₈ (2.0 mm × 150 mm, 5 μm)	水-甲醇-甲酸 (94:5:1)	腺苷:0.1 虫草素:0.1	腺苷:0.5 ~ 124.5 虫草素:0.5 ~ 136.5	腺苷和虫草素加样回收率分别为 95.8%, 98.1%。该方法简便易行, 结果准确, 重复性好	[18]
Shimadzu VP-ODS C ₁₈ (2.0 mm × 150 mm, 5 μm)	水-甲醇-甲酸 (85:14:1)	腺苷:0.1 虫草素:0.1	腺苷:0.5 ~ 128.5 虫草素:0.5 ~ 131.5	各组分在保留时间区域内没有干扰, 分离效果好, 线性关系良好, 加样回收率在 94.0% ~ 105.0%	[19]
Shimadzu VP-ODS C ₁₈ (2.0 mm × 150 mm, 5 μm)	水-甲醇-甲酸 (86.5:12:1.5)	腺苷:0.2 尿苷:1.0 腺嘌呤:0.6	腺苷:1.0 ~ 125.0 尿苷:4.0 ~ 115.0 腺嘌呤:2.0 ~ 140.0	线性关系好, 腺苷、尿苷、腺嘌呤的回收率在 96.6% ~ 103.2%	[20]
ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)	5 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵水溶液-甲醇梯度洗脱	腺苷:0.007 2 尿苷:0.001 4 鸟苷:0.000 7	腺苷:0.1101 ~ 3.525 0 尿苷:0.046 0 ~ 1.471 8 鸟苷:0.046 3 ~ 1.484 3	具有良好的线性, 选择性, 精密程度, 及回收率, 分析时间较短, 检测限和定量限均在 μg·L ⁻¹ 的范围内	[21]
Waters Xbridge TM BEH Amide (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)	10 mmol·L ⁻¹ 醋酸铵-乙腈梯度洗脱	腺苷:0.000 6 尿苷:0.001 5 鸟苷:0.007 5	腺苷:0.010 ~ 5.000 尿苷:0.010 ~ 1.000 鸟苷:0.050 ~ 10.000	具有良好的线性, 重复性和回收率, 并成功地应用于从中国不同地区采集的 12 个批次的天然虫草核苷类成分的分析	[22]

甲基腺苷等有效成分含量存在明显区别。申进文等^[39]也建立了 HPLC-UV 法检测人工蛹虫草中 4 种主要核苷成分, 整个测定过程时间短, 在 20 min 以内即可完成, 精密性、重复性及回收率均良好。张莉等^[40]用 RP-HPLC 法测定了 2 批蛹虫草的腺苷含量, 结果 2 批蛹虫草中腺苷的平均含量分别为 348.8, 312.7 μg·g⁻¹ RSD 分别为 2.27%, 3.49% (n=4)。陈娇领等^[41]用 HPLC 法测定了虫草中核苷及碱基含量, 以甲醇-水为流动相, 方法灵敏、重复性好。陈安徽等^[42]利用反相高效液相色谱法对古尼拟青霉小孢变种 RCEF0864 菌丝体和发酵液中核苷类化学成分进行分析, 结果表明古尼拟青霉小孢变种 RCEF0864 菌丝体中主要含有胞苷、尿苷、鸟苷、肌苷、环磷腺苷和腺苷等 6 种。李瑞雪等^[43]同样采用反相高效液相色谱法对蝉拟青霉 RCEF1081, 蛹草拟青霉 RCEF0845, 戴氏绿僵菌 RCEF0772, 长座被毛孢 RCEF0717

菌丝体中主要核苷类化学成分进行了比较分析。陆巍杰等^[44]利用 HPLC 法快速测定了北冬虫夏草和几种常见食用菌中腺苷和虫草素的含量, 线性关系良好。吴春敏等^[45]用 HPLC 法测定了冬虫夏草及其虫体、子座中腺苷的含量, 虽然尿苷与尿嘧啶无法分离, 但均可以作为杂质并入到杂质峰中, 样品中的腺苷仍可与杂质峰完全分离, 保留时间也较为适宜。表 3 列举了不同虫草属药材的 HPLC-UV 等度洗脱的检测条件。

1.3 HPLC-DAD 法 二极管阵列检测器 (DAD), 是传统紫外检测器基于光电二极管阵列技术的新型检测器。DAD 检测能同时接收样品在整个光谱区的的信息, 在色谱峰流出时进行快速扫描并采集信号, 得到色谱-光谱的三维图, 根据组分的保留时间和光谱两方面信息, 进行定性及定量分析。因此, 利用 DAD 检测可以避免普通紫外检测器仅基于组分保

表 2 冬虫夏草及同属药材的 HPLC-UV 梯度洗脱检测条件比较

Table 2 Comparison for HPLC-UV gradient elution detection conditions between *Cordyceps sinensis* and congener herbs

柱型号	流动相	检测波长 /nm	线性范围 /μg	测定结果	文献来源
Kromasil-C ₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm)	水-甲醇	260	腺苷:0.082 6 ~ 4.14 尿苷:0.073 4 ~ 3.66	精密度和重复性试验 RSD 值均 < 5.0%, 且 8 种组分的回收率为 95.8% ~ 102.5%, 样品含量在 8 h 内稳定	[23]
Promosil-C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	水-甲醇	260	腺苷:368.0 ~ 1 840.0 虫草素:231.2 ~ 1 156.0 尿苷:395.2 ~ 976.0	分别测得加热回流与温热超声提取所得的次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、腺苷和虫草素 5 种核苷总量为 3.588 1, 6.554 6 mg·g ⁻¹ , 色谱峰分离效果好	[24]
TSKgel ODS-100VC ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	KH ₂ PO ₄ -甲醇	260	腺苷:0.003 2 ~ 0.310 8 鸟苷:0.003 2 ~ 0.317 尿苷:0.003 2 ~ 0.317	长座虫草子实体中胞嘧啶和次黄嘌呤含量较高;菌丝体中尿嘧啶、腺苷和鸟苷含量较高,尿苷在子实体和菌丝体中含量均高	[26]
KNAUER Eurospher-100 C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	KH ₂ PO ₄ -甲醇	260	尿苷:0.119 5 ~ 0.478 腺苷:0.117 ~ 0.468 虫草素:0.150 ~ 0.600	分别测得不同产地人工蛹虫草和天然冬虫夏草中的核苷含量为 0.265% ~ 0.870% 和 0.168% ~ 0.250%	[27]
AgilentTC-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	水-甲醇	260	腺苷:0.018 ~ 0.448 6 尿苷:0.021 ~ 0.519 8 腺嘌呤:0.001 1 ~ 0.027	线性关系良好,重复性好,精密度高,回收率均在 95.39% ~ 103.3%, 不同产地的北虫草中各核苷类成分的含量差异较大	[28]
YWG-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	乙腈-水	260	均为 0.125 ~ 5.125	九州虫草子座中所含的核苷类成分最高,且其 3'-脱氧腺苷含量明显高于冬虫夏草,而尿苷和鸟苷略高于冬虫夏草	[29]
Symmetry Shield TM Rp18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	乙腈-水	260	尿苷:331.0 ~ 1 796.0 腺苷:338.0 ~ 1 844.0 虫草素:384.0 ~ 2 110.0	青海不同产地冬虫夏草中尿苷、鸟苷、肌苷、腺苷、虫草素 5 种成分平均回收率分别为 98.72%, 101.48%, 99.74%, 98.46%, 98.09%	[30]
Symmetry Shield Rp18 (3.9 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-水	260	腺苷:80.4 ~ 3 216 虫草素:10.32 ~ 688	人工虫草中腺苷和虫草素的含量普遍高于天然虫草,分离度良好,灵敏度高	[31]
AlltimaC ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-水	260	腺苷:0.103 ~ 1.025 虫草素:0.070 ~ 0.700 尿苷:0.300 ~ 3.005	腺苷、虫草素、尿苷平均回收率分别为 99.74%, 100.05% 及 99.98%, RSD 分别为 1.12%, 1.05%, 1.02%, 各峰均达到基线分离	[32]
Zorbax SB-Aq (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	乙腈-水	260	腺苷:0.003 69 ~ 0.189 72 虫草素:0.003 66 ~ 0.188 48 尿苷:0.003 66 ~ 0.188 55	皖产古尼虫草中尿嘧啶、腺苷、尿苷含量较高,冬虫夏草含肌苷量较高;二者鸟苷、次黄嘌呤、腺嘌呤的含量相近,而在该检测限下,两者均未测得虫草素	[34]
Liechrospher RP-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	乙腈-水	260	腺苷:0.106 ~ 2.12	测得天然冬虫夏草和代用品中腺苷的含量差别不大,平均回收率 98.8%, RSD 4.2%, 重复性良好。	[35]

留时间定性的不足,尤其对于成分较为复杂的样品,大大增强了其测定结果的可靠性。

龚范等^[46]建立 HPLC-DAD 联用色谱法对冬虫夏草虫体

及其子座部分的甾醇与核苷类成分进行了多组分的定性及定量分析。索菲娅等^[47]建立 HPLC 法对 3 个不同来源的新疆细虫草核苷类成分含量进行测定,并与西藏那曲冬虫夏草

表 3 冬虫夏草及同属药材的 HPLC-UV 等度洗脱检测条件比较

Table 3 Comparison of HPLC-UV isocratic elution detection conditions between *Cordyceps sinensis* and congener herbs

柱型号	流动相	检测波长 /nm	线性范围 /μg	测定结果	文献 来源
Amethyst C ₁₈ -H (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	水-甲醇(85:15)	260	各成分线性范围均为 0.005 ~ 2.0	检测快速、简便,整个分析过程在 18 min内完成,且各组线性相关系数 均高于 0.995,线性关系良好,重复性、 精密度及回收率也均良好	[39]
Kromasil-C ₁₈ (3.9 mm × 250 mm, 5 μm)	水-甲醇(90:10)	260	腺苷:0.080 32 ~ 0.401 60	2 批蛹虫草中腺苷平均含量分别为 348.8, 312.7 μg · g ⁻¹ , RSD 分别为 2.27% 和 3.49% (n=4)	[40]
YWG-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	水-甲醇(88:12)	254	腺苷:0.272 7 ~ 27.27 尿苷:0.109 ~ 10.90 腺嘌呤:0.327 ~ 32.70	分离效果较好,且峰形对称,各组分 在 14 min 内达到较好的分离,最小检测 量达 10 ng,重复性好	[41]
Waters Spherisorb-ODS2 C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	KH ₂ PO ₄ -甲醇 (90:10)	254	尿苷:0.216 ~ 7.876 腺苷:0.2 ~ 8.0	古尼拟青霉小孢变种 RCEF-0864 发 酵液中主要含有尿苷、胞苷、胸苷、肌 苷、环磷腺苷和腺苷等 6 种核苷类物质	[42]
Waters Spherisorb-ODS2 C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	KH ₂ PO ₄ -甲醇 (85:15)	260	腺苷:0.2 ~ 8.0 虫草素:0.1 ~ 2.5 尿苷:0.216 ~ 7.876	蝉拟青霉中虫草素和鸟苷的含量较 高,尿苷和肌苷在长座被毛袍中的含量 相对较高,戴氏绿僵菌中胸苷和腺苷含 量较高	[43]
Welch Material XB-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	水-甲醇(85:15)	258	腺苷:0.023 ~ 0.464 虫草素:0.030 ~ 0.600	腺苷、虫草素平均加样回收率分别为 98.97%, 99.15%, 色谱峰分离良好,且 无杂质峰干扰	[44]
μBondapak C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 10 μm)	磷酸缓冲液(pH 6.5)-甲醇(85:15)	260	腺苷:0.2 ~ 1.0	腺苷与杂质峰完全分离,保留时间也 较为适宜,回收率为 104.5%	[45]

作对比,结果表明,新疆细虫草中腺苷、尿苷、鸟苷、肌苷、尿嘧啶和腺嘌呤的含量都低于冬虫夏草。宋江峰等^[48]以水-甲醇-甲酸(94:5:1)为流动相,在 260 nm 波长处,采用 HPLC-DAD 法对北冬虫夏草中虫草素的含量进行了测定,结果显示:虫草素平均保留时间为 3.51 min,平均回收率为 100.8%。宋丽艳等^[49]也用 HPLC-DAD 法测得了人工蛹虫草中主要活性成分虫草素,其含量为 0.019 7%。

2 其他检测方法

2.1 毛细管电泳法 除 HPLC 法外,毛细管电泳法(CE 或 HPCE)作为一种经典电泳技术与现代微柱分离有机结合的新兴分离分析技术,也已被用于生物及医药领域,与传统的分离方法相比,CE 具有高效、快速、灵敏、样品用量少等特点,现已广泛应用于核苷类、蛋白质、糖类及核酸等多种物质的分离。

凌建亚等^[50]首次报道了采用毛细管区带电泳检测九州虫草子座中虫草素的存在,电泳缓冲液为 0.025 mol · L⁻¹ 硼砂溶液(pH 9.4),检测波长 258 nm,分离电压:20 kV,测得虫草素和腺苷的含量分别为 1 451.5, 1 656.6 μg · g⁻¹,并初步确定了部分核苷及相关碱基特征峰。李绍平等^[51]采用有效长度为 50 cm 的 Beckman 无涂层毛细管,以 0.2 mol · L⁻¹ 的硼酸为缓冲液,检测波长 254 nm,分离电压:20 kV,测定了

天然和人工冬虫夏草中核苷类成分的含量,结果腺苷、尿苷和鸟苷的平均回收率分别为 97.0%, 97.1% 和 98.4%, RSD 分别为 0.72%, 0.62% 和 0.67% (n=6); 该法快速简便,样品用量少,灵敏度高。刘玉军等^[52]也报道了采用未涂层熔硅弹性石英毛细管,有效长度 50 cm,分离电压 20 kV,检测波长 258 nm,以 pH 为 9.0 的 0.05 mol · L⁻¹ 硼砂-硼酸(8:2)作为缓冲体系,对冬虫夏草中虫草素、腺苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、次黄苷及次黄嘌呤等 9 个核苷及碱基类成分进行测定,结果各成分在 15 min 内均达到了基线分离。

2.2 薄层色谱扫描法 赵雪梅等^[53]采用薄层色谱扫描法对泰山虫草菌丝体与天然冬虫夏草中多种核苷类成分的含量进行了测定,吸附剂为硅胶,展开剂为三氯甲烷-甲醇-异丙醇-乙酸乙酯-浓氨水(8:3:3:3:0.9),在波长 254 nm 处扫描,结果测得了腺苷、尿苷、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤等 4 个成分的含量。黄红兵等^[54]也采用此方法,以苯-醋酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓氨试液(6:3:1.5:1.5:0.5)为展开剂,测得虫草口服液中腺苷的含量为 0.166%。

3 结语

核苷类成分是维持生物细胞生命活动的基本组成元素,具有多种生物活性及广泛用途,其主要分布在低等植物菌类^[55],动物药和海洋生物中,在当前使用的抗病毒类药物

中,有将近 50% 的药物是核苷类,许多抗肿瘤药物也是核苷类^[56]。因此,对核苷类成分进行研究开发具有广阔的前景。

目前,国内对虫草属真菌中的核苷类成分研究较为深入,为了能够最大限度的开发和利用其中的核苷类生物活性物质,需要依靠精确、高效的检测技术。HPLC 法是当前较为常用的核苷类成分的定性、定量分析技术,具有检测灵敏度高、分离速度快和分离效率高的特点,测定结果快速、准确、重复性好,但成本较高。毛细管电泳法也可用于定性定量分析,其精密度高、成本低,但分离能力较弱,重复性差,对样品条件要求较高。薄层色谱扫描法与前两种方法相比,没有前两种方法灵敏、简便、准确,精密度好,可用于化学成分的粗略测定。

随着联用技术的日趋成熟,LC-MS 检测方法日益显现出其优越性能,可以弥补传统 UV 检测的不足,适应性广、分离能力强、检测限低,此外,还可以提供每一个组分丰富的结构信息和相对分子质量,使研究人员从分子水平上得以开展对虫草属核苷或其他含有核苷药材的深入研究,而不仅仅局限于含量测定的目的。

[参考文献]

[1] Krik P M, Cannon P F, David J C, et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi [M]. 9th ed. Wallingford; CAB International, 2001.

[2] 宋斌,林群英,李泰辉,等. 中国虫草属已知种类及其分布[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 10-26.

[3] 李小刚,肖建辉. 虫草类真菌抗血栓作用的研究现状与展望[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3246-3250.

[4] 梁宗琦. 我国虫草属真菌研究开发的现状及思考[J]. 食用菌学报, 2001, 8(2): 53-62.

[5] 张雪梅,杨丰庆,夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 277-282.

[6] 李静,朱静毅. 核苷类化合物含量测定方法的研究进展[J]. 天津药学, 2013, 25(6): 53-55.

[7] 刘彦威,刘娜,刘利强. 冬虫夏草有效成分的研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(3): 51-53.

[8] 樊慧婷,林洪生. 蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(15): 2549-2551.

[9] 郑庆委,康冀川. 蚕蛹虫草人工培育及药理作用研究进展[J]. 贵州大学学报, 2006, 23(1): 73-76.

[10] Zhao J, Xie J, Wang L Y, et al. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014 (87): 271-289.

[11] 宁美英,李青山,刘玉明,等. 冬虫夏草的化学成分分析测定方法[J]. 山西医科大学学报, 2000, 31(6): 548-550.

[12] 邹秦文,肖新月,林瑞超,等. 冬虫夏草液体深层发酵菌丝体相关制剂的研究现状[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 680-687.

[13] Yang F Q, Li D Q, Feng K, et al. Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in *Cordyceps* by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(34): 5501-5510.

[14] 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[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(5): 260-263.

[15] 陆巍杰,唐永范,唐亮,等. 北冬虫夏草、冬虫夏草及食用菌中核苷类功效成分的比较研究[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(5): 260-263.

[16] 张虹,吴雪美. 高效液相色谱-质谱联用法分析冬虫夏草及其功能食品中的活性成分[J]. 中国食品学报, 2007, 7(5): 113-120.

[17] 杨钊,迟少云,张春辉,等. 冬虫夏草及其代用品中腺苷和虫草素的 LC-MS-MS 定量分析研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 2018-2020.

[18] 黄兰芳,郭方迺,梁逸曾,等. HPLC-ESI-MS 测定冬虫夏草和蚕蛹虫草中腺苷和虫草素含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 762-764.

[19] 黄兰芳. 联用色谱在中药和生物样本中活性成分的分析方法及其应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2004: 1-99.

[20] Huang L F, Wu M J, Sun X J, et al. Simultaneous determination of adenine, uridine and adenosine in *cordyceps sinensis* and its substitutes by LC/ESI-MS [J]. J Cent South Univ Technol, 2004, 11(3): 295-299.

[21] Fan H, Li S P, Xiang J J, et al. Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) [J]. Anal Chim Acta, 2006, 567(2): 218-228.

[22] Zhan H Q, Wang X, Li H M, et al. Characterization of nucleosides and nucleobases in natural *Cordyceps* by HILIC-ESI/TOF/MS and HILIC-ESI/MS [J]. Mol, 2013, 18(8): 9755-9769.

[23] 顾宇翔,王尊生,李素霞,等. HPLC 分析虫草发酵制品中多种核苷及碱基[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 953-957.

[24] 李万芳,宋健,石俊英. 北虫草核苷类成分提取方法与含量测定研究[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(4): 342-344.

[25] 陈伟,黄开华,付婷忠,等. 草制品中核苷类有效成分分析方法研究[J]. 天津农业科学, 2011, 17(1): 37-39.

[26] 张勋,程文明,李春如,等. 长座虫草子实体和菌丝体

- 中碱基和核苷类物质的 HPLC 分析[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(9):1283-1286.
- [27] 杨昕, 斯陆勤, 涂秩平, 等. 不同产地人工蛹虫草子实体及冬虫夏草中核苷类成分的比较[J]. 医药导报, 2009, 28(10):1354-1356.
- [28] 张薇薇, 胡永君, 龚韬, 等. 北虫草中核苷类成分的含量测定与质量评价[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 32(3):230-232.
- [29] 罗珊珊, 陈畅, 史艳秋, 等. 九州虫草中核苷类成分的 HPLC 法测定[J]. 中草药, 2005, 36(10):1496-1498.
- [30] 李进, 张文生, 杜树山, 等. RP-HPLC 法测定青海不同产地冬虫夏草中核苷类成分的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(3):67-69.
- [31] 雷宁, 杜树山, 倪雪梅, 等. RP-HPLC 测定天然虫草与人工虫草中核苷类成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(12):948-951.
- [32] 江宝红, 鞠建明, 蔡雪萍, 等. 多指标优选蛹虫草提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):29-32.
- [33] 梁洪卉, 程舟, 杨晓伶, 等. HPLC 定量分析冬虫夏草的主要核苷类有效成分[J]. 中药材, 2008, 31(1):58-60.
- [34] 武为宝, 唐军. 皖产古尼虫草中核苷和碱基成分的 HPLC 分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9):1668-1671.
- [35] 郭亚东, 张萍, 李瑶, 等. 高效液相色谱法测定冬虫夏草及其代用品中腺苷含量[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(9):89-91.
- [36] 周惠燕, 陈珏, 许丽丽. 冬虫夏草中核苷类化学成分的含量测定研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(11):1955-1960.
- [37] 夏文娟, 曾晓英, 袁海龙, 等. 不同产地冬虫夏草腺苷含量的测定[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8):540-542.
- [38] 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研究[J]. 中草药, 2000, 31(8):576-577.
- [39] 申进文, 孙晓萍, 赵旭. 人工蛹虫草核苷类成分超声提取工艺优化及 HPLC 定量分析[J]. 河南农业大学学报, 2011, 45(4):391-394.
- [40] 张莉, 潘金火. 反相高效液相色谱法测定蛹虫草中腺苷含量[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(12):1067.
- [41] 陈娇领, 江正平. HPLC 法测定虫草中核苷及其碱基的含量[J]. 浙江化工, 2003(8):23-24.
- [42] 陈安徽, 胡丰林, 丁婷, 等. 古尼拟青霉小孢变种核苷类成分分析[J]. 食品科学, 2007, 28(6):184-187.
- [43] 李瑞雪, 胡飞, 陈安徽, 等. 4 种虫草无性型真菌中核苷类成分比较分析[J]. 分析与检测, 2007, 33(11):111-114.
- [44] 陆巍杰, 唐永范, 高瑞栋, 等. HPLC 法测定北冬虫夏草和常见食用菌中腺苷和虫草素[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4):313-315.
- [45] 吴春敏, 叶榕平. HPLC 法测定冬虫夏草中腺苷含量[J]. 中草药, 1999, 30(9):658-660.
- [46] 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[J]. 药学学报, 1999, 34(3):214-217.
- [47] 索菲娅, 郭瑞, 虞泓, 等. 新疆细虫草核苷类成分分析[J]. 食用菌学报, 2013, 20(4):55-60.
- [48] 宋江峰, 刘春泉, 李大婧. HPLC-DAD 测定人工北冬虫夏草中虫草素含量[J]. 食品科学, 2008, 29(4):352-354.
- [49] 宋丽艳, 叶斌, 于荣敏, 等. 人工蛹虫草核苷类成分的超声提取工艺优化研究[J]. 中药材, 2007, 30(9):1156-1157.
- [50] 凌建亚, 张长铠, 孙迎节, 等. 毛细管区带电泳检测九州虫草核苷类成分[J]. 分析化学, 2003, 31(1):123.
- [51] 李绍平, 李萍, 季晖, 等. 毛细管电泳法测定冬虫夏草中核苷类的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(2):77-79.
- [52] 刘玉军, 徐芳, 陈波, 等. 毛细管区带电泳法测定冬虫夏草及人工蛹虫草子实体中核苷及碱基成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1):24-29.
- [53] 赵雪梅, 张辉, 苏延友, 等. 泰山虫草菌丝体与天然冬虫夏草化学成分初步分析[J]. 中药材, 2008, 31(12):1828-1830.
- [54] 黄红兵, 江英桥. 虫草口服液的质量标准研究[J]. 中成药, 1999, 21(5):228-229.
- [55] Yuan J P, Zhao S Y, Wang J H, et al. Distribution of Nucleosides and Nucleobases in Edible fungi[J]. Agric Food Chem, 2008, 56(3):809-823.
- [56] 吕爱娟, 吴皓. 中药中核苷类成分的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7):94-97.

[责任编辑 邹晓翠]