

虫草类产品中 5 种核苷类成分的测定及蛹虫草质量分析

李赫宇¹, 于滢慧¹, 张东星¹, 陈旻君², 晏仁义^{1*}, 於洪建¹

1. 天津益倍生物科技集团有限公司, 天津 300457

2. 尚赫(天津)科技开发有限公司, 天津 300384

摘要: 目的 建立 HPLC 法对 4 种常见虫草类样本[蛹虫草、发酵虫草菌粉(Cs-4)、中华被毛孢和冬虫夏草]中尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 N6-(2-羟乙基)-腺苷 5 种核苷类成分进行含量测定, 比较成分差异, 确定蛹虫草的特征成分, 为控制蛹虫草及其提取物的质量提供科学依据。方法 采用岛津 ODS-3 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水进行梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 30 ℃。结果 蛹虫草样品均含有尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 N6-(2-羟乙基)-腺苷, 而 CS-4、中华被毛孢和冬虫夏草中未检测到虫草素和 N6-(2-羟乙基)-腺苷。供试品制备方法对核苷类成分的影响较大, 蛹虫草粉采用 6 种方法制备供试品溶液, 发现用水超声提取 180 min 获得的尿苷、鸟苷和腺苷的含量最高, 且在 24 h 内稳定。虫草素性质稳定, 而 N6-(2-羟乙基)-腺苷对热和酸都不太稳定; 其中 4 种制备方法测得的虫草素和 N6-(2-羟乙基)-腺苷含量一致。结论 为蛹虫草及其提取物的质量分析提供了依据, 以特征成分虫草素和 N6-(2-羟乙基)-腺苷为指标可更好地对蛹虫草及其提取物的质量进行控制。

关键词: 蛹虫草; 发酵虫草菌粉; 中华被毛孢; 冬虫夏草; 尿苷; 鸟苷; 腺苷; 虫草素; N6-(2-羟乙基)-腺苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5410-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.028

Quantitative analysis of five nucleosides in *Cordyceps* by HPLC and quality control of *Cordyceps militaris*

LI He-yu¹, YU Ying-hui¹, ZHANG Dong-xing¹, CHEN Min-jun², YAN Ren-yi¹, YU Hong-jian¹

1. Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China

2. Sunhope (Tianjin) Science and Technology Development Co., Ltd., Tianjin 300384, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of uridine, vernine, adenosine, cordycepin, and N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine in *Cordyceps* (*Cordyceps militaris*, Cordyceps Fungus Powder CS-4, *Hirsutella sinensis*, and *C. sinensis*), and determine the characteristic components of *C. militaris* to provide the scientific basis for quality control of *C. militaris* and its extract. **Methods** HPLC was performed on Inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase A (acetonitrile) and B (water) for gradient elution. The flow rate was 0.8 mL/min, detection wavelength was 260 nm, and column temperature was 30 ℃. **Results** All mentioned five nucleosides can be detected from *C. militaris*. However, cordycepin and N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine were undetected in the other three *Cordyceps* species. The sample preparation method of *C. militaris* has a great effect on the content of nucleosides. The content of uridine, vernine and adenosine was the highest in samples prepared by ultrasonic extraction 180 min. Cordycepin was stable form six sample preparation methods, and N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine was unbearable to heat and acid. The contents of cordycepin and N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine were the same in four preparation methods. **Conclusion** This experiment provides a basis for the quality analysis of *C. militaris* and its extracts. Cordycepin and N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine can be used as markers for the quality control of *C. militaris* and its extracts.

Key words: *Cordyceps militaris* (L.) Link; Cordyceps Fungus Powder; *Hirsutella sinensis*; *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; uridine; vernine; adenosine; cordycepin; N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine; HPLC

收稿日期: 2018-04-03

作者简介: 李赫宇(1982—), 男, 高级工程师, 从事植物成分创新运用工作。Tel: (022)25320448 E-mail: liheyu@vip.188.com

*通信作者 晏仁义(1982—), 男, 副研究员, 从事植物成分创新运用工作。Tel: (022)25320448 E-mail: yanrenyi@ubasio.com

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 又名北冬虫夏草, 是蛹虫草真菌以虫蛹为寄主或在人工培养基上培养形成的子实体^[1-2]。冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc. 为冬虫夏草真菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上形成的子座和幼虫尸体的干燥复合体^[3]; 发酵虫草菌粉 (CS-4) 为蝙蝠蛾拟青霉菌通过液体深层培养技术生产的菌丝体^[4]。文献报道核苷成分如尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6-(2-羟乙基)-腺苷 (以下简称 *N*6) 等为虫草类药材的主要功效成分^[5-7], 蛹虫草、CS-4 和冬虫夏草功效相似, 都具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老等功效, 因此被认为是冬虫夏草的平价替代品之一^[8]。

关于虫草类产品中核苷类成分的提取方式和质量分析有较多的报道^[9-10]。《中国药典》2015 年版中以 90% 甲醇加热回流 30 min 制备冬虫夏草的供试品溶液, 规定腺苷含量不得少于 0.01%^[11]; 《保健食品检验与评价技术规范 (2003 版)》中对冬虫夏草类保健品中腺苷的检测是以 60% 乙醇水超声提取 10 min^[12]。农业行业标准《虫草制品中虫草素和腺苷的测定高效液相色谱法》中以超纯水超声 180 min^[13]; 除了上述提取方法外, 还有以 20% 甲醇水为提取溶剂, 超声 30 min^[14]; 超纯水为提取溶剂, 超声 30 min 再加入磷酸振摇; 以沸水为提取溶剂超声 30 min; 以 0.5% 磷酸水为提取溶剂, 超声 30 min^[15]等多种提取方式, 由于提取方式的不同, 冬虫夏草中腺苷含量具有明显差异, 高的在 0.05%, 而低的只有 0.01%^[16-17]。蛹虫草没有统一的分析方

法和控制指标, 并且不同文献报道的腺苷含量数据相差较大。同时, 选用的质量控制指标也不完全相同, 有的只以腺苷为指标, 有的以腺苷和虫草素为指标。因此, 开发出一种有效可靠的方法对蛹虫草进行质量控制, 具有重要意义。本实验采用 HPLC 法建立蛹虫草的分析方法, 为全面评价蛹虫草的品质提供有效的方法和科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (包括 e2695 四元泵, 2998 PDA 检测器, Empower 3.0 工作站); 岛津 ODS-3 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 十万分之一电子分析天平 (Mettler Toledo); KQ-500V 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); TDZ4-WS 台式低速离心机 (湘仪有限公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈均为色谱纯 (天津康科德有限公司); 水为超纯水。对照品尿苷 (批号 887-200202)、鸟苷 (批号 111977-201501)、腺苷 (批号 110879-200202) 和虫草素 (批号 110858-201503) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%; *N*6 购自上海同田生物技术股份有限公司, 批号为 17071122。冬虫夏草购自同仁堂药店, 经笔者鉴定为冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc., 实验室打粉保存; 蛹虫草、CS-4、中华被毛孢菌粉购自不同的厂家, 其中蛹虫草包括子实体粉、子实体提取物和子实体 (课题组自制)。具体样本信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Samples information

类别	编号	厂家及批号	类别	编号	厂家及批号
蛹虫草	1	厂家 A (JCYCC17022301)	蛹虫草	20	厂家 G (SHYY)
	2	厂家 A (JCYCC16120701)		21	厂家 G (TJNKY)
	3	厂家 A (JCYCC17011401)		22	厂家 H (BSZ20170602)
	4	厂家 B (BZ20170629)		23	厂家 H (BSZ20150610)
	5	厂家 B (BZ20170301)		24	厂家 H (BSZ20160301)
	6	厂家 B (BZ20170622)		25	厂家 H (BSZ20160302)
	7	厂家 B (BZ20170705)		26	厂家 I (SH-201701)
	8	厂家 B (BZ20170505)		27	厂家 J (YB-001)
	9	实验室自制 (BZ20170622)		28	厂家 K (BSZ20170314, 提取物)
	10	实验室自制 (BZ20170629)	CS-4	29	厂家 K (BSZ Cs-4)
	11	厂家 C (HS20170612)		30	厂家 L (JC Cs-4)
	12	厂家 D (WYT201710001)		31	厂家 M (WYT1701004)
	13	厂家 D (WYT201710002)		32	厂家 N (BSZ-1, 提取物)
	14	厂家 E (SH-1)		33	厂家 N (BSZ-2, 提取物)
	15	厂家 E (SH-2)		34	厂家 N (BSZ-3, 提取物)
	16	厂家 F (QJ-1)	冬虫夏草	35	厂家 O (TJXD, 粉末)
	17	厂家 F (QJ-2)		36	实验室自制 (TRT-1)
	18	厂家 F (QJ-3)		37	实验室自制 (TRT-2)
	19	厂家 F (QJ-4)	中华被毛孢	38	厂家 P (JC-BM)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为岛津 ODS-3 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) 和超纯水 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 2.5% A; 10~15 min, 2.5%~7% A; 15~30 min, 7% A; 30~30.1 min, 7%~2.5% A; 30.1~40 min, 2.5% A; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长为 260 nm; 柱温 30 ℃; 进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取适量的尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 N6 对照品, 置于 20 mL 量瓶中, 加入 20% 甲醇水溶解, 并稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 51.20、51.80、102.20、99.40、98.20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 水超声提取 精密称取样品 (样品 4) 0.2 g 置于 25 mL 具塞三角瓶中, 加入 20 mL 超纯水摇匀, 称定质量, 超声提取 180 min, 放冷后以超纯水补足质量, 摇匀后取 10 mL 溶液于离心管中 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 置于样品瓶中, 即得^[13]。

2.3.2 20% 甲醇超声提取 精密称取样品 (样品 4) 0.2 g 置于 25 mL 具塞三角瓶中, 加入 20 mL 20% 甲醇摇匀, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷后以 20% 甲醇补足质量, 摇匀后取 10 mL 溶液于离心管中 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 置于样品瓶中, 即得^[14]。

2.3.3 水超声提取后加入磷酸 精密称取样品 (样品 4) 0.2 g 置于 25 mL 量瓶中, 加入 20 mL 超纯水摇匀, 超声提取 30 min, 放冷后加入磷酸 100 μL, 以超纯水定容至刻度。振摇 3 min, 取 10 mL 溶液于离心管中 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 置于样品瓶中, 即得。

2.3.4 沸水超声提取 精密称取样品 (样品 4) 0.2 g 置于 25 mL 具塞三角瓶中, 加入 20 mL 沸水摇匀, 称质量, 超声提取 30 min, 放冷后以水补足质量。取 10

mL 溶液于离心管中 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 置于样品瓶中, 即得。

2.3.5 90% 甲醇加热回流提取 精密称取样品 (样品 4) 0.2 g 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 90% 甲醇水摇匀, 称定质量, 在 85 ℃ 加热回流提取 30 min, 放冷后以 90% 甲醇水补足质量。取上清液用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 置于样品瓶中, 即得。

2.3.6 0.5% 磷酸水超声提取 精密称取样品 (样品 4) 0.2 g 置于 25 mL 具塞三角瓶中, 加入 20 mL 0.5% 磷酸水摇匀, 称定质量, 超声提取 30 min, 取 10 mL 溶液于离心管中 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 置于样品瓶中, 即得。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、5.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加 20% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别按照“2.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程。将混合对照品逐级稀释, 分别以信噪比为 3 和 10 为标准考察检测限和定量限, 结果见表 2。

2.5 供试品溶液制备方法的选择

采用 6 种方法制备蛹虫草粉供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 得到峰面积, 根据标准曲线计算各核苷成分的质量分数, 见表 3, 色谱图见图 1。由表 3 数据发现, 虫草素对酸、热等稳定性好; N6 在加热回流和酸性条件下可被破坏, 含量下降; 鸟苷、尿苷和腺苷提取过程中可能存在转化, 如三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷在用水或者水含量高的混合试剂超声提取过程中可转化成腺苷^[15]; 本实验发现蛹虫草粉用水超声提取 180 min 时该转化才能完成, 与 NY/T 2116-2012 中的条件一致^[13], 在水超声提取 180 min 腺苷含量最高。同时也发现 20% 甲醇超声提取 180 min 时也能完成以上转化。在酸和加热的条件下制备供试品, 测定鸟苷、尿苷和腺苷的含量, 结果为破坏后残留

表 2 5 种对照品的标准曲线

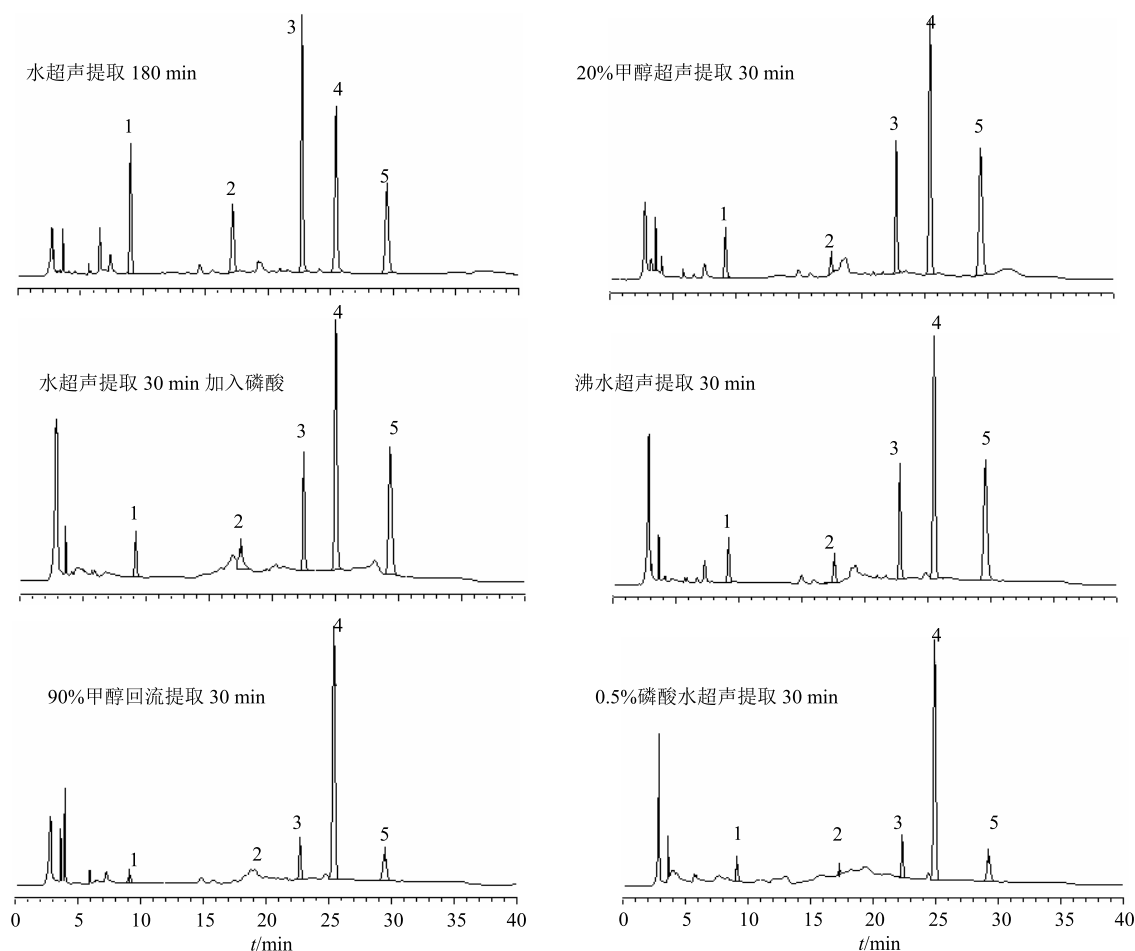
Table 2 Linear equations and limits of quantification for analytes

对照品	线性方程	<i>r</i>	线性范围/μg	定量限/ng	检测限/ng
尿苷	$Y=3\ 050\ 342\ X-650$	1.000 0	0.005~0.512	0.95	0.19
鸟苷	$Y=29\ 813\ 117\ X-1\ 265$	0.999 7	0.005~0.518	1.80	0.36
腺苷	$Y=41\ 232\ 609\ X+2\ 470$	1.000 0	0.010~1.022	0.62	0.19
虫草素	$Y=40\ 580\ 521\ X+2\ 155$	1.000 0	0.001~0.994	0.70	0.28
N6	$Y=33\ 702\ 060\ X+4\ 351$	0.999 9	0.001~0.982	1.28	0.51

表 3 不同供试品制备方法测得核苷的质量分数

Table 3 Mass fractions of nucleosides by different sample preparation methods

制备方法	尿苷/%	鸟苷/%	腺苷/%	虫草素/%	N6/%
水超声提取 180 min	0.159 2	0.101 8	0.215 9	0.206 9	0.184 1
20%甲醇超声提取 30 min	0.044 4	0.017 5	0.082 3	0.204 7	0.182 1
水超声提取 30 min 加入磷酸	0.039 9	0.037 7	0.075 7	0.206 1	0.180 6
沸水超声提取 30 min	0.036 9	0.026 4	0.068 2	0.208 9	0.181 8
90%甲醇回流提取 30 min	0.009 4	未检测到	0.024 8	0.212 5	0.039 4
0.5%磷酸水超声提取 30 min	0.020 7	0.006 3	0.024 8	0.204 3	0.039 2



1-尿苷 2-鸟苷 3-腺苷 4-虫草素 5-N6, 下同
1-uridine 2-vernine 3-adenosine 4-cordycepin 5-N6, same as below

图 1 不同制备方法样品 (样品 4) 的色谱图

Fig. 1 HPLC of samples from different preparation methods

的量,所有样本中的含量都极低,这一点也和文献报道吻合^[4,19]。基于以上原因,本实验选择“2.3.1”项和“2.3.2”项的方法制备供试品溶液,其中“2.3.1”项方法可以同时测定蛹虫草粉中 5 个核苷成分含量;“2.3.2”项的方法可以测定蛹虫草粉中特征成分虫草素和 N6 的含量。

2.6 精密度试验

取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.1”项

下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,求算 RSD。结果显示,尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 N6 峰面积 RSD 分别为 0.75%、1.10%、1.19%、1.19%和 1.23%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一蛹虫草粉供试品溶液(4 号样品),按“2.1”项下色谱条件分别于分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,结果表明按“2.3.1”项方法

制备供试品溶液,尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6 峰面积的 RSD 分别为 2.77%、2.14%、3.33%、0.28% 和 0.26%,说明供试品溶液在 24 h 稳定性良好。

精密吸取同一蛹虫草粉供试品溶液(4 号样品),按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,计录峰面积。结果表明按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6 峰面积的 RSD 分别为 43.37%、37.25%、27.69%、2.05% 和 0.28%;尿苷、鸟苷和腺苷的峰面积随着时间增加而大;而虫草素和 *N*6 在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批蛹虫草粉样品(4 号样品)6 份,按“2.3.1”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。计算尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6 质量分数的 RSD 分别为 2.96%、1.96%、1.17%、0.57% 和 0.23%,表明重复性良好。

精密称取同一批蛹虫草粉样品(4 号样品)6 份,按“2.3.2”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。计算虫草素和 *N*6 质量分数的 RSD 分别为 0.57% 和 0.23%,表明重复性良好。而尿苷、鸟苷和腺苷质量分数的 RSD 大于 10%,重复性差。

2.9 加样回收率试验

取蛹虫草粉样品(4 号样品)6 份,每份 0.1 g,精密称定,分别精密加入 20 mL 一定量的尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6 对照品溶液,按“2.3.1”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率。尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6 的平均回收率分别为 103.55%、96.33%、96.77%、99.27% 和 97.45%,RSD 值均小于 2.3%,表明本方法回收率良好。

取蛹虫草粉样品(4 号样品)6 份,每份 0.1 g,精密称定,分别精密加入 20 mL 一定量的虫草素和 *N*6 对照品溶液,按“2.3.2”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率。虫草素和 *N*6 的平均回收率分别为 102.67% 和 101.55%,RSD 值均小于 2.1%,表明本方法回收率良好。

2.10 样品测定

根据以上建立的方法,分别采取“2.3.1”和“2.3.2”2 种方法制备供试品溶液,其中“2.3.1”项制备方法供试品溶液测定 5 个核苷的含量,“2.3.2”

制备供试品溶液测试虫草素和 *N*6 的含量。每批样本分别制备 3 份供试品。按照“2.1”项下色谱条件进行测定,得到峰面积,根据标准曲线计算各核苷成分的质量分数,结果见表 4。

比较蛹虫草、CS-4 和冬虫夏草图谱,发现蛹虫草含有尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 *N*6 5 种成分,而虫草菌丝体和冬虫夏草不含虫草素和 *N*6,见图 2。

根据测定结果发现几份疑似伪劣、掺假样品(图 3):蛹虫草粉(样本 15、21)中腺苷含量为虫草素含量的 3 倍以上,可能是 CS-4 和蛹虫草粉混合品,或者是蛹虫草粉添加腺苷,有待进一步验证;蛹虫草粉(样本 19)色谱图在 17~28 min 基线不平,明显有其他不明物质,提示可能掺杂有不明成分。冬虫夏草粉(样本 35)色谱图和样本 15 的色谱类似,提示其不是纯冬虫夏草粉末。

3 讨论

3.1 蛹虫草、CS-4 和冬虫夏草之间成分的区别

与大部分文献报道的结果一致,少数几篇文献报道冬虫夏草中含有虫草素,有人指出可能是研究者物种鉴定出现错误或者滥用虫草这个词导致的结果混乱^[18]。同时,本实验说明虫草素和 *N*6 为蛹虫草的特有成分,以此为指标可以较好控制蛹虫草及其提取物的质量。

蛹虫草提取物、Cs-4 粉、Cs-4 提取物、冬虫夏草按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液测定尿苷、鸟苷和腺苷 24 h 的稳定性,发现其质量分数的 RSD 值分别为 0.45%、2.87%、0.15%;0.31%、0.51%、0.20%;0.32%、0.41%、0.12%;6.56%、7.73% 和 5.69%。分析原因,可能是蛹虫草提取物、CS-4 粉、Cs-4 提取物在制备过程中有长时间的加热,尿苷、鸟苷和腺苷已经完成转化或被破坏,达到一个稳定状态。冬虫夏草样本出现较稳定状态可能和样本存放了 5 年时间有关。蛹虫草粉的加工过程对成分的转化或破坏不明显。

3.2 蛹虫草质量控制的思考

蛹虫草及其制品没有统一的标准,目前多以腺苷、多糖和甘露醇作为检测指标。测定腺苷时参考的方法也是多种多样。本实验分析发现一些参照的方法不一定适合蛹虫草中的腺苷的测定。本实验为蛹虫草的质量控制提供了思路。既可以采用“2.3.1”项方法制备供试品溶液测定 5 个核苷的含量,也可以采用“2.3.2”项方法制备供试品溶液测试虫草素和 *N*6 的含量。根据市场样本测定结果可以将蛹虫

表 4 各样本中指标成分含量测定的结果 ($n=3$)Table 4 Quantitative determination results of nucleosides in samples ($n=3$)

样品编号	水超声提取 180 min					20%甲醇超声提取 30 min	
	尿苷/%	鸟苷/%	腺苷/%	虫草素/%	N6/%	虫草素/%	N6/%
1	0.094 1	0.075 3	0.310 4	0.309 5	0.143 7	0.346 0	0.158 0
2	0.092 1	0.070 7	0.282 6	0.329 4	0.145 0	0.329 1	0.150 7
3	0.093 8	0.075 6	0.320 0	0.326 7	0.144 1	0.340 8	0.156 0
4	0.159 2	0.101 8	0.215 9	0.206 9	0.184 1	0.211 8	0.179 6
5	0.071 8	0.062 0	0.152 3	0.195 8	0.133 0	0.194 3	0.135 8
6	0.118 1	0.105 3	0.189 6	0.284 6	0.090 9	0.282 8	0.096 8
7	0.114 1	0.100 9	0.184 0	0.210 7	0.142 0	0.216 2	0.151 2
8	0.075 9	0.085 2	0.172 0	0.129 4	0.097 8	0.130 5	0.110 9
9	0.049 0	0.047 2	0.130 2	0.169 2	0.053 9	0.187 4	0.067 3
10	0.118 3	0.098 1	0.214 1	0.171 5	0.109 8	0.155 0	0.115 5
11	0.171 8	0.112 0	0.175 5	0.382 4	0.280 6	0.391 0	0.285 9
12	0.132 3	0.113 9	0.211 4	0.175 1	0.142 8	0.180 1	0.157 9
13	0.148 6	0.126 0	0.214 8	0.175 5	0.139 0	0.184 2	0.147 5
14	0.191 8	0.144 4	0.211 0	0.318 1	0.225 2	0.353 2	0.237 3
15	0.134 4	0.091 5	0.183 9	0.052 8	0.080 3	0.069 8	0.096 3
16	0.307 6	0.155 3	0.191 9	0.376 3	0.200 5	0.371 5	0.202 2
17	0.142 4	0.072 3	0.151 0	0.185 6	0.128 4	0.185 4	0.111 4
18	0.171 6	0.121 1	0.221 0	0.154 3	0.139 7	0.153 2	0.138 7
19	0.142 0	0.125 9	0.120 3	0.067 8	0.178 6	0.060 9	0.181 2
20	0.128 6	0.060 3	0.140 8	0.157 0	0.125 9	0.173 3	0.114 2
21	0.182 7	0.150 8	0.221 5	0.030 0	0.073 9	0.033 7	0.078 5
22	0.173 6	0.117 8	0.169 9	0.157 5	0.107 8	0.161 6	0.116 1
23	0.043 4	0.012 7	0.050 9	0.163 7	0.065 4	0.160 1	0.064 4
24	0.170 5	0.118 6	0.222 1	0.295 7	0.155 7	0.271 4	0.151 8
25	0.172 6	0.123 7	0.225 3	0.295 2	0.155 6	0.273 5	0.154 5
26	0.092 9	0.089 5	0.175 8	0.237 3	0.136 2	0.238 1	0.136 8
27	0.257 6	0.209 8	0.270 9	0.204 7	0.269 4	0.210 4	0.260 0
28	0.195 8	0.131 1	0.248 9	0.487 9	0.333 1	0.407 0	0.218 7
29	0.273 6	0.233 6	0.301 0	—	—	—	—
30	0.068 3	0.044 5	0.285 5	—	—	—	—
31	0.458 1	0.262 6	0.263 9	—	—	—	—
32	0.367 7	0.293 0	0.624 8	—	—	—	—
33	0.927 4	0.647 2	0.815 5	—	—	—	—
34	0.344 4	0.284 4	0.598 5	—	—	—	—
35	0.152 5	0.148 3	0.125 4	0.029 6	0.022 2	0.043 3	0.018 9
36	0.111 0	0.120 5	0.056 8	—	—	—	—
37	0.065 4	0.064 0	0.065 4	—	—	—	—
38	0.028 7	0.026 8	0.598 1	—	—	—	—

“—” 未检测到

“—” not detected

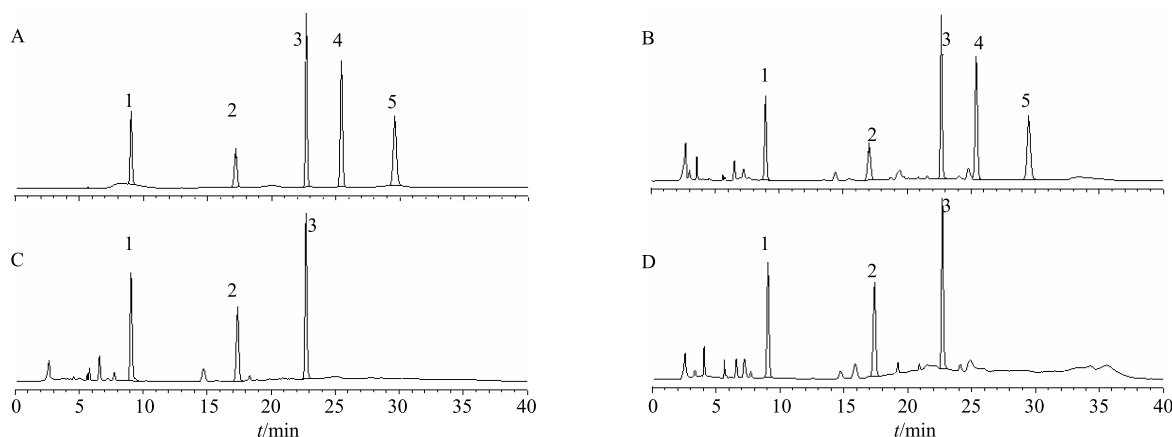


图 2 混合对照品 (A)、蛹虫草 (B)、Cs-4 (C) 和冬虫夏草 (D) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of mixed reference substances (A), *C. militaris* (B), CS-4 (C), and *C. sinensis* (D)

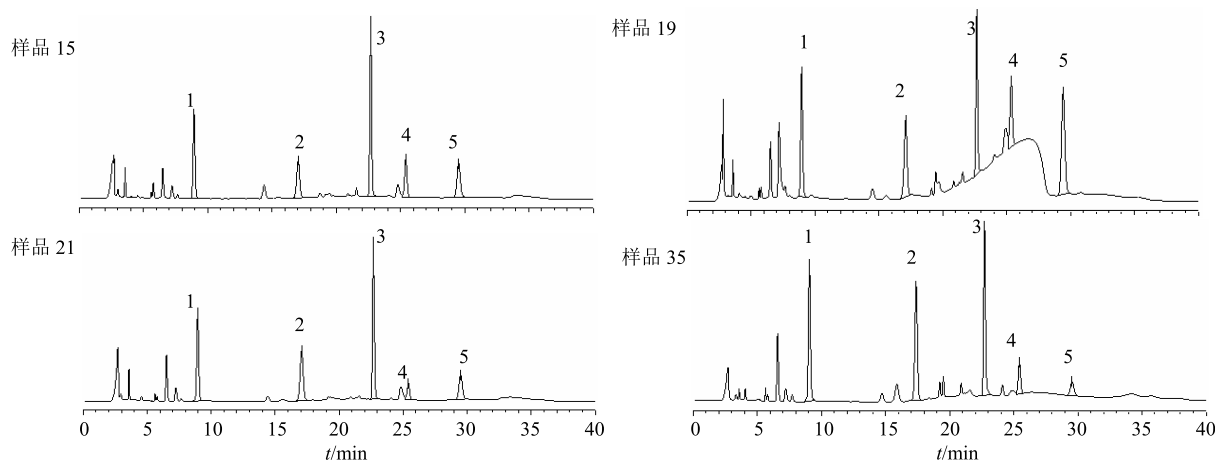


图 3 疑似伪劣、掺假样品的 HPLC 图
Fig. 3 HPLC of suspected fake and adulterated samples

草粉中虫草素和 N6 的含量都定在大于 0.1% 比较合适。

蛹虫草提取物和蛹虫草粉中核苷成分的含量相比没有显著提高, 尤其是尿苷、鸟苷和腺苷的含量, 可能在制备提取物的过程中该类成分被破坏。因此, 从核苷类成分含量的角度看提取物是否为一种合理的产品形式, 是否能对提取工艺进行优化最大限度保留这些成分, 值得进一步研究。

参考文献

- [1] 金田, 宋健, 李洁, 等. 人工培养北虫草高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(2): 153-155.
- [2] 连云岚, 杨中林, 李会君. 人工北虫草指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 510-512.
- [3] 黄彪, 程元柳, 曹秀君, 等. 冬虫夏草及其混淆品

HPLC 指纹图谱研究及共有成分鉴定 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 991-996.

- [4] 钱正明, 李文庆, 王传喜, 等. 高效液相色谱定量分析比较 4 种虫草药材的核苷类成分 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2493-2499.
- [5] 于荣敏, 叶斌, 宋丽艳. 人工培养蛹虫草高效液相色谱指纹图谱的初步研究 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1403-1405.
- [6] 苏颖, 李竞. 人工蛹虫草 HPLC 指纹图谱的建立 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(3): 10-11.
- [7] 廖春丽, 方改霞, 王莲哲, 等. 蛹虫草主要有效成分分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 5050-5052.
- [8] 林群英, 宋斌, 李泰辉, 等. 蛹虫草研究进展 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 154-157.
- [9] 艾中, 钱正明, 李文佳, 等. 冬虫夏草核苷类成分分析研究进展 [J]. 菌物学报, 2016, 35(4): 388-403.
- [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] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003.
- [13] 虫草制品中虫草素和腺苷的测定-高效液相色谱法 (NY/T 2116) [S]. 2012.
- [14] 武彦舒, 周丹蕾, 鄢 丹, 等. 天然虫草与虫草菌丝体的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2212-2214.
- [15] 钱正明, 甄达明, 李文庆, 等. 冬虫夏草水提过程中腺苷转化途径研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11(5): 758-762.
- [16] Feng K, Wang S, Hua D J, *et al*. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the nucleosides assessment of fungal strains isolated from natural *Cordyceps sinensis* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(3): 522-526.
- [17] 陈玉婷, 朱曼萍, 王丹红, 等. HPLC 测定冬虫夏草不同要用部位腺苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 857-858.
- [18] 张 姝, 张永杰, Shrestha B, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望 [J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 577-597.
- [19] 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.