

[综 述]

## 冬虫夏草中核苷类化学成分的含量测定研究进展

周惠燕<sup>1</sup>, 陈 珏<sup>2</sup>, 许丽丽<sup>1</sup>

(1. 浙江医药高等专科学校药理学系, 浙江 宁波 315100; 2. 浙江大学宁波理工学院生物与化学工程学院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 通过检索、阅读文献, 分析与归纳文献内容, 综述近年来冬虫夏草中核苷类物质的含量测定研究进展。包括 HPLC 法、毛细管电泳法、薄层色谱扫描法, 以上含量测定方法各有特点, 均可用于冬虫夏草中核苷类物质的含量测定。

关键词: 冬虫夏草; 核苷; 含量测定; HPLC; 毛细管电泳; 薄层色谱扫描

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)11-1955-06

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Brek.) Sacc. 寄蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体, 主产于西藏、青海、四川、云南等海拔 4 000 ~ 5 000 m 的高山草甸土中, 系我国特产名贵中药。冬虫夏草中含有的化学成分有核苷类、多糖类、甘露醇、氨基酸等<sup>[1-2]</sup>, 其中的核苷类具有明显的药理活性, 具有改善心脑血管循环<sup>[3]</sup>、防止心律失常<sup>[4]</sup>、抑制神经递质释放和调节腺苷酸环化酶活性等作用<sup>[5]</sup>。目前已从冬虫夏草中分得核苷类物质包括腺嘌呤、腺苷、3'-脱氧腺苷(虫草素)、尿嘧啶、尿苷、鸟嘌呤、鸟苷、次黄嘌呤、胸腺嘧啶等成分<sup>[6-11]</sup>, 各核苷类物质在冬虫夏草中含量甚微, 且化学结构相似, 很难被分离, 常规方法难以定量。目前, 核苷类成分的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(CE)、薄层色谱扫描法(TLC)等, 但未见有关核苷类成分含量测定方法综述报道。为此本文对冬虫夏草中核苷类化学成分的含量测定做一综述, 为今后冬虫夏草及代用品中核苷类物质的研究提供参考。

### 1 HPLC 法

#### 1.1 液-质联用(HPLC-MS)法

黄兰芳<sup>[12-14]</sup>等建立了用 HPLC-MS 法测定冬虫夏草及代用品中腺苷和虫草素的方法。样品处理方法为: 用甲醇为提取溶剂, 加入内标 2-氯腺苷贮备液, 经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 滤液即为供试液。色谱条件如下: 色谱柱为 Shimadzu VP-ODS 色谱柱 (2.0 mm  $\times$  150 mm 5  $\mu\text{m}$ ), 色谱柱前用 Waters C<sub>18</sub> 小柱保护; 流动相为水-甲醇-甲酸 (94 : 5 : 1); 温度为室温, 体积流量 0.2 mL/min; 质谱检测条件如下:

离子化方式为电喷雾离子化(ESI); 离子极性为正离子; 选择性离子检测  $m/z$  为腺苷 268  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、虫草素 252  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; 2-氯腺苷(内标, IS) 302  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。ESI 源温度 380  $^{\circ}\text{C}$ , 脱溶剂和加热块温度分别为 250  $^{\circ}\text{C}$  和 200  $^{\circ}\text{C}$ , 源电压 +4.0 kV, 检测电压 1.5 kV, 脱溶剂电压 -18 V, Q-阵列偏转电压 45 V, 雾化气( $\text{N}_2$ ) 流速为 4.5 L/min。结果, 通过以上优化的色谱条件和 ESI-MS 条件, 腺苷、虫草素和 2-氯腺苷分离良好, 腺苷线性范围 0.5 ~ 124.5 mg/L,  $r = 0.9984$ , 加样回收率为 95.8%; 虫草素线性范围 0.5 ~ 136.5 mg/L,  $r = 0.9991$ , 加样回收率为 98.1%。

本法中由于使用选择性离子检测模式, 在腺苷和虫草素保留时间区域内没有干扰, 待测成分分离效果优于其它方法, 故本法有很高的专属性。该方法准确、灵敏、快速、简单和选择性好, 可用于冬虫夏草及其代用品中腺苷和虫草素的分析及质量控制。

#### 1.2 HPLC-DAD 法

目前对冬虫夏草核苷类物质进行 HPLC 法测定时一般采用紫外检测器, 以保留时间定性。但对于成分复杂的样品来说, 往往可能有不同的物质在同一时间或极相近的时间出峰, 因而只用保留时间定性可能会造成分析错误, 因此定性能力弱。而应用二极管阵列检测器(DAD) 可以在线扫描样品的光谱图, 通过样品峰的光谱图与标准品光谱图比较, 可以判断它们是否为同一物质, 即能够鉴定色谱峰的纯度, 分辨重叠峰, 得到各组分的纯色谱和光谱曲线, 从而根据组分的保留时间和光谱两方面信息, 可用于定性及定量。

收稿日期: 2010-12-7

作者简介: 周惠燕(1978—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然产物的研究。Tel: (0574) 88222793, E-mail: zhouhy@mail.zjpc.net.cn

宋江峰等<sup>[15]</sup>用 HPLC-DAD 法测定了北冬虫夏草中虫草素的含量。样品处理方法为:以水为提取溶剂超声提取,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,滤液用于 HPLC-DAD 分析。色谱条件如下:色谱柱为 Ec-plise XDB C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ );流动相为流动相为水-甲醇-甲酸(94:5:1);体积流量 0.8 mL/min;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长:260 nm。结果虫草素的平均保留时间为 3.51 min,通过北冬虫夏草样品峰的光谱图与虫草素标准品光谱图比较,两者光谱图相似度为 990.371,可以判断为同一物质。虫草素线性范围 20~200  $\mu\text{g/L}$   $r=0.9993$ ,平均回收率为 100.8%。

龚范等<sup>[16]</sup>也利用 HPLC-DAD 法测定了冬虫夏草中腺苷和尿苷的含量,经典的一维 HPLC 法紫外检测器检测,一般选择待测组分的最大吸收或附近波长进行分析且基于组分保留时间来定性,且对没有完全分开的组分色谱峰常用垂直分割法等作近似处理。而本研究用二维 HPLC-DAD 联用色谱,在一段波长内检测组分,然后借助直观推导式演进特征投影(HELP)法解析所得二维矩阵数据,能够鉴定色谱峰的纯度,分辨重叠峰,得到各组分的纯色谱和光谱曲线,从而根据组分的保留时间和光谱两方面信息定性。在此基础上,再用总体积分法进行定量,因此利用 DAD 检测可以避免常规一维色谱一般仅基于组分保留时间定性的不足甚至错误判断,其定性结果的可靠性大大加强。

### 1.3 HPLC-UV 法

在已经报道的 HPLC 法测定冬虫夏草中核苷类物质的含量测定方法中,最常见的就是使用普通紫外检测器在 260 nm 波长处检测。根据流动相的洗脱方法不同可分为梯度洗脱和等度洗脱。

#### 1.3.1 梯度洗脱

毛新亮等<sup>[17]</sup>建立了 HPLC 法同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素、肌苷的含量测定方法。样品处理方法为:以蒸馏水超声提取,进样前,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。色谱条件如下:流动相为甲醇(A)与水(B),采用梯度洗脱,洗脱程序为 0~5 min 2% A; 5~10 min 2%~12% A; 10~12 min 12%~15% A; 12~30 min 15% A; 色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm 5  $\mu\text{m}$ ),体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 260 nm;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。结果腺苷、虫草素、肌苷与其它成分得到了很好的分离,分离度均  $>1.5$ ,且有较为合理的保留时间,约为 13~22 min。腺苷在 0.200 8~1.004  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良

好  $r=0.9987$ ;虫草素在 0.202 2~1.011  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良好  $r=0.9992$ ;肌苷在 0.201 4~1.007  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良好  $r=0.9994$ 。本实验对流动相进行了优化,当采用等度洗脱时各峰分离度较差,或峰完全分离时时间过长;而使用梯度洗脱时既缩短了分离时间,各组分又达到基线分离,是一种较好的流动相系统,且该流动相系统也可用于冬虫夏草指纹图谱研究。

王尊生等<sup>[18]</sup>报道了 HPLC 法同时测定虫草发酵粉中腺嘌呤、腺苷、3-脱氧腺苷、尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤的含量,采用的也是梯度洗脱法,流动相为甲醇(2%~10%)-水梯度洗脱。

尹小武等<sup>[19]</sup>也采用梯度洗脱法测定了冬虫夏草中腺苷和虫草素的含量。经过多次试验,采用 3 种不同的流动相,不同的洗脱程序对标准品及样品进行了反相高效液相色谱分析,分别为:0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)-甲醇=87:13 等度洗脱;0.005 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -甲醇二元梯度洗脱及乙腈-水梯度洗脱。其中以乙腈-水为流动相的色谱条件实现了腺苷和虫草素的完全分离,腺苷和虫草素标准品保留时间合理,分别为 12.367、13.567 min,色谱图可见基线平稳,峰形尖锐,供试品中其它杂质峰对两个主峰测定无干扰,结果可信。

顾振宇等<sup>[20]</sup>在用高效液相色谱法测定冬虫夏草中虫草素含量时曾尝试用 pH 6.5 的磷酸盐(体积比 85:15)等度洗脱,但是虫草素的分离效果不好,无法定性。但是采用乙腈和水梯度洗脱的方法,虫草素的分离效果好。他们采用的色谱条件为:色谱柱为汉邦 C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm  $\times$  250 mm 5  $\mu\text{m}$ ),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测器为二极管阵列紫外检测器(DAD),检测波长 260.4 nm;流动相为乙腈(A)与水(B),采用梯度洗脱,体积流量 0.8 mL/min。该流动相可避开盐溶液对仪器和色谱柱损伤较大的缺点,从而建立了 1 种新的分离、测定虫草素的快速、简便的方法;李进等<sup>[21]</sup>也报告了采用反相高效液相色谱法以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱测定青海产冬虫夏草中尿苷、鸟苷、肌苷、腺苷、虫草素 5 种成分的含量,结果 5 种成分分离度良好;线性关系良好;郭亚东等<sup>[22]</sup>也报告了以乙腈-水(含 1.2% 甲酸)为流动相进行梯度洗脱测定了冬虫夏草中腺苷的含量,腺苷和其它物质分离度良好,结果可靠,重复性好。

#### 1.3.2 等度洗脱

在等度洗脱法进行 HPLC 测定冬虫夏草中核苷类物质的含量方法中,主要有两种流动相系统,一种

为含磷酸盐缓冲液的流动相,一种为不含磷酸盐缓冲液的流动相。此类文献报道较多,分别见表 1 和表 2。

表 1 流动相含磷酸盐缓冲液

| 作者                    | 色谱柱                         | 流动相                                                                                                | 测定成分   |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 陈玉婷 等 <sup>[23]</sup> | Diamonsil C <sub>18</sub>   | 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5)-甲醇 (87:13)<br>0.06 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇-四氢呋喃 (150:10:1.5)<br>0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (90:10) | 腺苷     |
| 范志华 等 <sup>[24]</sup> | ODS Hypersil                | 1% 四氢呋喃的磷酸盐缓冲液                                                                                     | 腺苷     |
| 俞青芬 <sup>[25]</sup>   | Kromasil C <sub>18</sub>    | 0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (90:10)                                                                        | 腺苷     |
| 李跃辉 等 <sup>[26]</sup> | Polaris C <sub>18</sub>     | 0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (90:10)                                                                        | 腺苷     |
| 张洁 等 <sup>[27]</sup>  | Shim-pack CLC-ODS           | 0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (90:10)                                                                        | 尿嘧啶    |
| 陈博 等 <sup>[28]</sup>  | Spherisorb C <sub>18</sub>  | 0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (90:10)                                                                        | 腺苷、尿苷  |
| 夏文娟 等 <sup>[29]</sup> | ECONOSPHERE C <sub>18</sub> | 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5)-甲醇 (17:3)                                                                          | 腺苷     |
| 李雪芹 等 <sup>[30]</sup> | Dupont C <sub>18</sub>      | 甲醇-0.06 mol/L 磷酸二氢钾-四氢呋喃 (10:150:1.5)                                                              | 腺苷     |
| 陈仕江 等 <sup>[31]</sup> | ECONOSPHERE C <sub>18</sub> | 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5)-甲醇 (17:3)                                                                          | 腺苷     |
| 谭之磊 等 <sup>[32]</sup> | TSK-GEL ODS-400S            | 0.02 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (80:20)                                                                        | 腺苷     |
| 姜丽霞 等 <sup>[33]</sup> | ODS Hypersil                | pH 6.8 磷酸二氢钾-甲醇-四氢呋喃 (99:1)                                                                        | 腺苷、腺嘌呤 |
| 吴春敏 等 <sup>[34]</sup> | Bondapak                    | 0.01 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (85:15)                                                                        | 腺苷     |
| 颜栋林 <sup>[35]</sup>   | Agilent TC-C <sub>18</sub>  | 0.01 mol/L 磷酸二氢钾-乙醇 (92:8)                                                                         | 腺苷     |
| 许勇 等 <sup>[36]</sup>  | Thermo ODS-HYPERSIL         | 0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (85:15)                                                                        | 腺苷     |

表 2 流动相不含磷酸盐缓冲液

| 作者                    | 色谱柱                       | 流动相              | 测定成分   |
|-----------------------|---------------------------|------------------|--------|
| 王海霞 等 <sup>[37]</sup> | Diamonsil C <sub>18</sub> | 水-乙腈-甲醇 (85:2:2) | 腺苷、虫草素 |
| 索菲娅 等 <sup>[38]</sup> | Dikama C <sub>18</sub>    | 水-甲醇 (85:15)     | 腺苷、虫草素 |
| 乔坤云 等 <sup>[39]</sup> | Symmetry C <sub>18</sub>  | 水-乙腈 (93:7)      | 腺苷     |
| 张敏如 等 <sup>[40]</sup> | Shim-pack CLC-ODS         | 水-乙腈 (93:7)      | 腺苷     |
| 卢军 等 <sup>[41]</sup>  | ODS Hypersil              | 水-甲醇 (10:90)     | 虫草素    |
| 卢钢 等 <sup>[42]</sup>  | Dikama C <sub>18</sub>    | 水-甲醇 (15:85)     | 腺苷     |
| 张博 等 <sup>[43]</sup>  | Kromasil C <sub>18</sub>  | 水-乙腈 (95:5)      | 腺苷     |
| 孙倩 等 <sup>[44]</sup>  | Agilent C <sub>18</sub>   | 水-乙腈 (93:7)      | 腺苷     |

在以上两种流动相进行 HPLC 测定时,核苷类物质在含磷酸盐缓冲液的流动相中分离时间较短,保留时间较为合理,基本在 10 min 左右,但在测定

多个核苷类物质时,和杂质分离度不够高;而核苷类物质在不含磷酸盐缓冲液的流动相中分离时间较长,保留时间较长,约 25~40 min,峰形易扩散,但是分离度很好,且因为不含盐,故减少了对色谱柱的损伤。

## 2 毛细管电泳法

毛细管电泳作为一种新兴的高效分析技术,已广泛用于生物及医药领域。在中药鉴定分析方面以其样品预处理简单、分辨率高、快速、样品用量少、操作简便等优点得到广泛使用。由于冬虫夏草中核苷类物质含量甚微,化学结构相似,极性较大,常规方法难于定量。而使用毛细管电泳法可同时测定冬虫夏草中多种核苷类物质进行定量。

阮婧华等<sup>[45]</sup>用毛细管电泳法同时测定了冬虫夏草中多种核苷及其碱基的含量。样品处理方法为:以 20% 乙醇回流提取,进样前,用 0.45 μm 滤膜过滤。电泳分离条件为:石英毛细管柱 (60 cm),有效长度为 45 cm;运行缓冲液为 36 mmol/L 硼砂 + 15 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 8.90);分离温度为 20℃;分离电压 15 kV;测定波长 254 nm;虹吸进样 15 s。结果在毛细管电泳谱图上 7 个成分:内标头孢唑啉钠、腺苷、鸟苷、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶都得到了很好的分离。除了样品提取液中腺嘌呤、胸腺嘧啶 2 个成分含量在检测限以下,测定了腺苷、鸟苷、尿嘧啶、次黄嘌呤的含量分别为 0.30%、0.28%、0.14% 和 0.05%。

李绍平等<sup>[46]</sup>探讨了毛细管电泳法测定天然和人工冬虫夏草中腺苷、鸟苷和尿苷等核苷含量的可行性。采用 Beckman P/ACE System 5010 高效毛细管电泳仪,Beckman 无涂层毛细管 (57 cm × 75 μm,有效长度 50 cm),自动压力 (586 kPa) 进样 6 s,检测波长 254 nm,电压 20 kV,温度 20℃,运行缓冲液为 0.2 mol/L 硼酸。进样前,毛细管分别以 1 mol/L 氢氧化钠溶液和运行缓冲液冲洗 5 min。结果该法平均回收率腺苷为 97.0%,鸟苷为 98.4%,尿苷为 97.1%;RSD 分别为 0.72%,0.67%,0.62% (n = 6)。该法快速简便,灵敏度高,重现性好。

杨更亮等<sup>[47-48]</sup>报道了毛细管电泳法测定冬虫夏草中腺苷、腺嘌呤和尿嘧啶的方法。采用 15 mmol/L 硼砂 + 14 mmol/L 磷酸二氢钠 + 体积分数 5% 甲醇 (pH 值为 9.50) 作为缓冲体系,在电压为 18 kV 和检测波长为 254 nm 的条件下,冬虫夏草菌丝提取液中的有效成分实现了基线分离。定量分析表明,各有效成分的峰面积与质量浓度呈较好的线性

关系( $r \geq 0.9985$ )此外,他们还研究了缓冲溶液的 pH 值、浓度及有机改性剂对有效成分迁移行为的影响。

刘玉军等<sup>[49-50]</sup>也报道了快速测定冬虫夏草中虫草素、腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、鸟苷、尿苷、次黄苷 9 个核苷及碱基类成分的高效毛细管区带电泳法,采用 pH 值为 9.0 的 0.05 mmol/L 硼砂-硼酸(8:2)作为缓冲体系,分离电压 20 kV,温度 20 ℃,结果冬虫夏草中上述 9 个核苷及碱基类成分在 15 min 内达到基线分离。

毛细管电泳法操作简便,实验消耗低,高效而快速,可以同时测定冬虫夏草中多个核苷类化合物,可以成为冬虫夏草中核苷类物质检测的一种简便、价廉有效的分析方法。

### 3 薄层色谱扫描法

赵雪梅等<sup>[51]</sup>以薄层色谱扫描法测定了泰山虫草菌丝体与天然冬虫夏草中多种核苷类物质的含量。方法如下:采用双波长薄层扫描法,其薄层色谱条件为 GF<sub>254</sub> 硅胶板活化后以定量毛细管每隔 1 cm 点样,展开剂为三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-异丙醇-浓氨水(8:3:3:3:0.9),展开约 7.5 cm;用薄层扫描仪在 254 nm 处扫描积分,以  $R_f$  值定性,以峰高  $h$  定量。结果测得了腺苷、尿苷、次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷 4 个成分的含量。

刘静明等<sup>[52]</sup>建立了薄层色谱扫描法测定冬虫夏草中核苷类物质的含量测定方法。薄层色谱条件为硅胶 GF<sub>254</sub> 加含 0.3% CMC 的 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液调匀铺板,放置过夜自然干燥,以三氯甲烷-乙酸乙酯-异丙醇(8:2:6:0.5)为展开剂;扫描条件为反射法锯齿扫描, $\lambda_s = 260$  nm, $\lambda_R = 400$  nm,狭缝 1.25 mm × 1.25 mm,灵敏度 × 1,扫描速度 20 mm/min,纸速 20 mm/min,仪器线性 SX = 7。结果同时测得了天然虫草及蛹虫草菌丝中腺苷、腺嘌呤、尿苷、尿嘧啶、虫草素 5 个成分的含量。

陈明等<sup>[53]</sup>以薄层色谱扫描法分析了冬虫夏草中腺苷、腺嘌呤、尿苷、尿嘧啶等 4 种成分。经过筛选与反复比较,以 0.05 mol/L 磷酸氢二钠制备的硅胶 GF254 薄层,用三氯甲烷-乙酸乙酯-异丙醇-水(8:2:6:0.4~0.8)混合溶剂 10 mL 中加浓氨水 2 滴,上行法展开,结果最好,不仅斑点集中,测定的 4 组分  $R_f$  值适宜,而且可将虫草已知的 5 种核苷、碱基与其它杂质分开。层析后进行反射式单波长锯齿扫描斑点,在(260 ± 1) nm 处有大吸收,400 nm 吸收最小。扫描条件:样品波长 260 nm,参考波长

400 nm,狭缝 1.25 mm × 1.25 mm,灵敏度 × 1,纸速 20 mm/min,扫描速度 20 mm/min。反射法锯齿扫描。结果测得了腺苷和尿苷 2 种成分的含量,加样回收率分别为 98.08% 和 97.78% ( $n = 8$ ),而样品中腺嘌呤和尿嘧啶的含量为微量或未检出。

李楠等<sup>[54]</sup>也以薄层色谱扫描法测定了冬虫夏草中虫草素的含量。样品用石油醚脱脂后,用乙醇提 72 h 后,用 GF254 板层析,展开剂为三氯甲烷-甲醇,定位后,薄层扫描分析。

薄层色谱扫描法测定冬虫夏草中核苷类化合物的含量仪器设备要求简单,操作简便快速,可同时分析多个结构相近的化合物,但是灵敏度比较低。

### 4 结 语

本文综述和比较了近年来冬虫夏草中核苷类物质含量测定的常用方法。包括 HPLC/ESI-MS 法、HPLC-DAD 法、HPLC-UV 法、毛细管电泳法、薄层色谱扫描法,这些方法各有特点。在 HPLC 法中,如选用 MS 或 DAD 检测器,方法的专属性强,灵敏度高、选择性好,但是检测设备昂贵;流动相如选用甲醇-水或乙腈-水的梯度洗脱,则待测成分的分离度较好,且分离时间合适;HPLC 的缺点是由于柱效的局限,常见于单个或两个成分同时定量,不适合同时测定多种成分。毛细管电泳法的特点是样品预处理简单,分离度佳,同时可测定多个成分,特别适合冬虫夏草中结构差异小,含量微小的多种核苷类物质的同时定量,较 HPLC 法简便、快速。薄层色谱扫描法的特点是仪器设备要求低,操作简便,同时可测定多个成分的含量,但是方法的灵敏度和重现性不及前两者。笔者认为可根据研究中不同的需要以及所具备的仪器条件选择以上的测定方法。由于冬虫夏草药材的昂贵性以及特殊的生物活性,在医药领域越来越多的受到重视和追捧,而发展快速、简便、灵敏、准确的活性物质含量测定方法则是研究开发和应用冬虫夏草的基础。

### 参考文献:

- [1] 石 岩,王钢力,秦文杰,等.冬虫夏草的化学成分综述[J].中医研究,2006,19(7):54-56.
- [2] 章伟明,李 进.冬虫夏草化学成分研究进展[J].海峡药学,2008,20(4):67-69.
- [3] Toda N, Kunishi H, Taiyama K, et al. Responses to adenine nucleotide and related compounds of isolated dog cerebral, Coronary and mesenteric arteries[J]. Blood Vessels, 1982, 19(5): 225-228.
- [4] Pelleg A, Porter R S. The pharmacology of adenosine[J]. Pharmacotherapy, 1990, 10(1): 157-160.

- [5] Ribeiro J A. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nerous system[J]. *Pharmacol Toxicol*, 1995, 77(3): 299-302.
- [6] 赵余庆, 于明, 陈立君, 等. 冬虫夏草属真菌化学研究概况[J]. 中草药, 1999, 30(12): 950-953.
- [7] 吕瑞绵, 杨永春, 杨云鹏, 等. 冬虫夏草化学成分的研究[J]. 药学通报, 1981, 16(9): 55-57.
- [8] 徐文豪, 薛智, 马建民. 冬虫夏草水溶性成分—核苷类化合物的研究[J]. 中药通报, 1988, 13(4): 34-36.
- [9] Melling J, Belton F C. Product of pure cordycepin(3'-deoxyadenosine) from *Cordyceps militaris* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1972, 24: 125-130.
- [10] 刘静明, 钟裕容, 杨智, 等. 蛹冬虫夏草化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(10): 32-33.
- [11] 高红. 冬虫夏草菌丝体的化学成分和药理作用[J]. 中华临床医学研究杂志, 2005, 11(12): 1734-1735.
- [12] 黄兰芳, 郭方道, 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.
- [13] 周菊峰, 周芸, 郭方道, 等. LC/ESI-MS 分离和测定冬虫夏草及其代用品的有效成分[J]. 分析科学学报, 2005, 21(2): 194-196.
- [14] 贺云彪, 黄兰芳. 冬虫夏草及其代用品中虫草素的 LC/ESI-MS 定量分析[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 561-564.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 毛新亮, 郝国栋, 张晨, 等. 反相高效液相色谱法同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素、肌苷含量方法的研究[J]. 中南药学, 2009, 7(12): 895-897.
- [18] 王尊生, 顾宇翔, 周丽, 等. 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*) 菌丝体固体发酵粉化学成分的分析[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 331-336.
- [19] 尹小武, 李卓涵, 书畅, 等. 冬虫夏草分离株的分子鉴定及主要活性成分测定[J]. 食用菌, 2009, 5(2): 20-22.
- [20] 顾振宇, 吴雪美, 张虹. 高效液相色谱法测定冬虫夏草中虫草素和虫草酸的含量[J]. 中国食品学报, 2007, 7(3): 144-148.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 陈玉婷, 朱曼萍, 王丹红. HPLC 测定冬虫夏草不同药用部位腺苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 857-858.
- [24] 范志华, 汤卫华, 林霖. HPLC 法测定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量[J]. 现代食品科技, 2007, 23(7): 94-97.
- [25] 俞青芬. HPLC 法测定冬虫夏草菌粉及含片中腺苷的含量[J]. 广西师范大学学报, 2010, 28(2): 65-68.
- [26] 李跃辉, 杨永华, 张水寒, 等. 高效液相色谱法测定冬虫夏草超微饮片腺苷含量[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(10): 985-988.
- [27] 张洁, 李成网. 反相高效液相色谱法测定冬虫夏草等 6 味动物药中尿嘧啶含量[J]. 安徽中医学院学报, 2009, 28(3): 56-58.
- [28] 陈搏, 金瓯. 冬虫夏草及其虫草菌粉中核苷类成分的 HPLC 测定[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(2): 88-90.
- [29] 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.
- [30] 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[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(1): 12-14.
- [31] 陈仕江, 尹定华, 钟国跃. 半野生与野生冬虫夏草化学成分的比较[J]. 中药材, 2003, 26(3): 163-165.
- [32] 谭之磊, 殷海松, 黄皓, 等. 冬虫夏草液态发酵菌丝体中化学成分分析[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 328-331.
- [33] 姜丽霞, 刘放. 冬虫夏草发酵菌丝体中主要核苷类化合物的 HPLC 测定[J]. 中成药, 1993, 15(5): 33-34.
- [34] 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.
- [35] 颜栋林. HPLC 法测定冬虫夏草胶囊中腺苷含量[J]. 药学实践杂志, 2010, 28(4): 293-296.
- [36] 许勇, 王柯, 季申. 高效液相色谱法测定冬虫夏草口服液中腺苷[J]. 中成药, 2011, 33(5): 31-33.
- [37] 王海霞, 高升, 蒙娅, 等. RP-PLC 法测定冬虫夏草发酵液冻干粉中虫草素和腺苷含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(4): 309-312.
- [38] 索娅娅, 苏俊, 姜彦成, 等. 新疆虫草与冬虫夏草中腺苷和虫草素的 HPLC 法测定比较[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 6(3): 65-67.
- [39] 乔坤云, 赵其文, 严淑云, 等. HPLC 测定冬虫夏草菌粉中腺苷含量[J]. 特产研究, 2003, 8(3): 42-43.
- [40] 张敏如, 洪亮, 郭祥高. 液相色谱法测定发酵虫草菌粉和金水宝胶囊中腺苷的含量[J]. 中草药, 1994, 25(2): 77-78.
- [41] 卢军, 刘春宇, 许雁, 等. 冬虫夏草人工培养及有效成分测定[J]. 暨南大学学报, 1996, 17(3): 90-94.
- [42] 卢钢, 孙军, 孙立伟, 等. 微波萃取 HPLC 测定北冬虫夏草中腺苷的新方法研究[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(3): 128-132.
- [43] 张博, 杨黎彬, 李金娟. 高效液相色谱法测定虫草菌粉中腺苷的含量[J]. 光谱实验室, 2011, 28(2): 899-902.
- [44] 孙倩, 张术, 储智勇. 高效液相色谱法测定冬虫夏草口服液中腺苷的含量[J]. 解放军药科学杂志, 2011, 27(1): 72-73.
- [45] 阮婧华, 孙毓庆. 毛细管区带电泳法同时测定冬虫夏草中多种核苷及其碱基成分含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2): 112-114.
- [46] 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.
- [47] 杨更亮, 李海鹰, 刘海燕, 等. 毛细管区带电泳法测定冬虫夏草中的腺苷、腺嘌呤和尿嘧啶[J]. 分析化学, 2002, 30(9): 1081-1084.
- [48] 李海鹰, 杨更亮, 王德先, 等. 毛细管区带电泳测定人工冬虫夏草菌丝中的有效成分[J]. 河北大学学报, 2001, 21(3):

- 287-290.
- [49] 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.
- [50] 郭怀忠,毕开顺,孙毓庆.整体毛细管电泳测定冬虫夏草中胞苷与腺苷的含量[J].中国中药杂志,2009,34(5):304-306.
- [51] 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.
- [52] 刘静明,刘岱,杨立新,等.蛹虫草菌丝与冬虫夏草中核苷类成分的含量测定[J].中国中药杂志,1994,19(10):615-616.
- [53] 陈明.冬虫夏草中核苷及其碱基含量测定方法的研究[J].中成药,1998,17(4):40-41.
- [54] 李楠,宋健国,刘金云,等.蛹虫草与冬虫夏草化学成分比较[J].吉林农业大学学报,1995,17(增刊):80-83.

## 中药浸膏粉体吸湿及改性技术研究进展

金慧臻<sup>\*</sup>, 狄留庆<sup>\*</sup>, 汪晶, 吕志阳, 付廷明, 王令充

(南京中医药大学 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心 江苏 南京 210029)

**摘要:** 中药浸膏粉体通常吸湿性强,对中药制剂的成型影响较大,是长期困扰中药药剂生产的难题。本文通过文献研究,结合研究工作实践,分析中药浸膏粉体吸湿的过程与吸湿机制,以及相关影响因素,寻求改善中药浸膏粉体吸湿性的合理方法。

**关键词:** 中药浸膏粉体; 吸湿; 改性技术

中图分类号: R944.2<sup>+</sup>7

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)11-1960-05

中药浸膏粉是中药组方经提取、分离、浓缩、干燥等工艺后所获得的产物,是制备中药片剂、胶囊剂、丸剂等固体制剂的中间物料。中药浸膏粉通常具有较大的吸湿性,一方面,浸膏粉粒之间可以通过机械缠绕、立体效应、静电引力、游离液体、固体桥等作用下相互黏结,使其流动性降低。另一方面,大量吸湿后的浸膏粉引起颜色变化、发生潮解或霉变,甚至成稠浸膏状,不仅影响制剂的成型,甚至影响中药制剂的有效性及安全性。

### 1 浸膏粉体的吸湿性

#### 1.1 吸湿的过程与吸湿机制

通常情况下,当空气湿度小于浸膏粉的临界相对湿度(CRH)时,由于吸湿过程很快达到平衡,所以吸湿性显示不明显,甚至表现为粉体不吸湿;但当周围环境湿度大于CRH时,浸膏粉体会大量吸湿直至饱和。中药浸膏粉体的吸湿过程<sup>[1]</sup>主要分为三个步骤,首先是浸膏粉通过表面或毛细管吸收水分,然后浸膏粉中易溶性成分溶出形成水合物,当吸收的水分足够多时粉体表面发生溶解,粉体间形成液体

桥从而导致黏连。

中药浸膏粉吸湿的可能性机制包括:(1)药物中存在能与水分子中极性羟基形成氢键的极性基团,尤其是其中的活性羟基<sup>[2]</sup>;(2)水分子与中药浸膏粉体之间通过分子间作用力相互吸引,水分子吸附在中药浸膏粉体表面;(3)通过毛细管吸附作用,水分吸附和储存于粉体的孔隙中;(4)由于中药浸膏粉中化学物质通常为无定型态,极易吸湿形成水合物,吸收水分后由无水晶型转变为水合晶型。

#### 1.2 中药浸膏粉体的强吸湿性的主要原因

##### 1.2.1 中药浸膏粉体复杂的多成分体系中存在大量易吸湿的水溶性成分和亲水性成分

中药浸膏粉体强吸湿性体现在CRH低、吸湿速度快、饱和吸湿量高等多个方面。CRH表示亲水性药物吸湿的临界值,根据Elder假说,水溶性药物混合物的CRH约等于各成分CRH的乘积,而与各成分的量无关,即 $CRH_{AB} = CRH_A \times CRH_B$ ( $CRH_{AB}$ 、 $CRH_A$ 和 $CRH_B$ 分别表示A与B物质的混合物、A物质和B物质的临界相对湿度)。由于中药浸膏粉

收稿日期: 2011-08-12

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”项目(2009);江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划[苏教师(2008)30号];江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011-2015);国家科技部863计划(2003AA2Z3247)

作者简介: 金慧臻(1986—),男,硕士研究生,研究方向: 中药新剂型、新技术应用与评价。Tel: (025) 86798226。

<sup>\*</sup> 通信作者: 狄留庆(1964—),男,教授,博士研究生导师,研究方向: 中药新剂型、新技术应用与评价。Tel: (025) 86798226, E-mail: diliuqing928@163.com