



钱正明, 周妙霞, 方琼谜, 温宝庆, 李文佳, 吕根品, 李文庆. 基于核壳型亲水作用色谱技术同时测定冬虫夏草中核苷和糖醇类成分的含量 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 491–498.

基于核壳型亲水作用色谱技术同时测定冬虫夏草中核苷和糖醇类成分的含量

钱正明^{1,2}, 周妙霞³, 方琼谜³, 温宝庆³, 李文佳³, 吕根品^{2*}, 李文庆^{3*}

(1. 暨南大学药学院, 广州 510632; 2. 乳源东阳光药业有限公司, 广东韶关 512721;

3. 东莞市东阳光冬虫夏草研发有限公司, 广东东莞 523850)

摘要: 核苷和糖醇类成分是冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 中两类重要的活性成分, 常被作为冬虫夏草质量的评价指标。本研究采用核壳型亲水作用色谱柱技术, 建立同时测定冬虫夏草中核苷和糖醇类成分含量的快速液相色谱分析方法。结果表明, 在 8 min 内尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇均实现基线分离, 且各成分线性关系良好, 日内精密度、日间精密度和重复性均小于 3%, 平均回收率在 99.0% ~ 106.1%, 供试品溶液在 24 h 内稳定。20 批冬虫夏草的尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇含量与文献报道结果基本一致。本研究建立的方法快速、准确、可靠, 可用于冬虫夏草核苷和糖醇类成分的同时测定。

关键词: 冬虫夏草; 核苷; 糖醇; 核壳型亲水作用色谱; 同时测定

中图分类号: Q966; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 02-0491-08

Simultaneous determination of nucleosides and sugar alcohols in *Ophiocordyceps sinensis* by core-shell hydrophilic interaction liquid chromatography

QIAN Zheng-Ming^{1,2}, ZHOU Miao-Xia³, FANG Qiong-Mi³, WEN Bao-Qing³, LI Wen-Jia³, LV Gen-Pin^{2*}, LI Wen-Qing^{3*} (1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Ruyuan HEC Pharm Co., LTD., Shaoguan 512721, Guangdong Province, China; 3. Dongguan HEC Cordyceps R & D Co., LTD., Dongguan 523850, Guangdong Province, China)

Abstract: Nucleosides and sugar alcohols, two important active components in *Ophiocordyceps sinensis*, were often employed as quality control markers. In this study, a rapid HPLC method for simultaneous determination of nucleosides and sugar alcohols in *O. sinensis* by core-shell hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) was developed. The results showed that uridine, adenosine, inosine, guanosine and mannitol were well separated in 8 min. The calibration curves of the investigated compounds showed good linearity. The RSD of precision, repeatability and stability were all less than 3%. The average recoveries ranged from 99.0% to 106.1%. Compared with previous reports, the contents of uridine, adenosine, inosine, guanosine and mannitol in *O. sinensis* samples were consistent. The developed method was rapid, accurate and reliable for the simultaneous determination of nucleosides and sugar alcohols in *O. sinensis*.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; nucleoside; sugar alcohol; core-shell hydrophilic interaction liquid; simultaneous determination

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1706101)

作者简介: 钱正明, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为中药质量评价, E-mail: qianzhengming1982@126.com

* 共同通讯作者 Author for correspondence: 李文庆, 硕士, 高级制药工程师, 主要研究方向为中药质量评价研究, E-mail: liwenqing61@163.com; 吕根品, 本科, 高级工程师, 主要研究方向为化学研究, E-mail: dyglee@163.com

收稿日期 Received: 2021-06-21; 接受日期 Accepted: 2021-07-09

冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 是指由冬虫夏草菌侵染蝙蝠蛾科昆虫幼虫而形成的幼虫尸体与真菌子座复合体 (邱雪红等, 2016; 韩日畴等, 2019), 最早出现于《月王药诊》, 性味甘平, 归肺、肾经, 具有补肾益肺、止血化痰的功效 (李皓翔等, 2020)。冬虫夏草中含有多种化学成分, 包括核苷、糖醇、甾醇等 (钱正明等, 2016)。冬虫夏草中主要的核苷类成分为尿苷、腺苷、肌苷和鸟苷, 具有提高免疫力、促进血液循环等功效 (艾中等, 2016)。冬虫夏草中主要的糖醇类成分为甘露醇, 又称虫草酸, 有利尿、镇咳、祛痰等作用 (王泽凤等, 2013)。核苷和糖醇类成分作为冬虫夏草中两类重要的活性物质, 常被作为冬虫夏草质量的评价指标 (钱正明等, 2014; 张萍等, 2016; 李文庆等, 2018)。

冬虫夏草核苷类成分的分析方法主要是高效液相色谱法, 且以反相色谱法的使用最为广泛 (艾中等, 2016)。为了增加核苷类成分的保留, 获得理想的分离效果, 通常需要选用能够耐受纯水的特殊色谱柱, 使用高比例的水相, 甚至是 100% 水相进行分析 (商国举等, 2015; 咎珂等, 2017; 2018)。糖醇类化合物比核苷类成分的极性更强, 在反相色谱柱上基本没有保留, 常用的分析方法包括高效阴离子交换色谱或亲水作用色谱。亲水作用色谱是以亲水固定相及含有 60% 以上非

质子有机溶剂 (通常为乙腈) 的水为流动相的色谱模式 (郭志谋等, 2009; 李瑞萍等, 2014; Marrubini *et al.*, 2018)。前期有研究者运用亲水作用色谱技术同时分析虫草类样本中核苷及糖醇成分, 但洗脱时间为 60 min, 平衡色谱柱为 35 min, 总耗时长达 95 min (Wang *et al.*, 2009)。

核壳型填料也称为表面多孔型填料, 填料的结构为实心内核和多孔壳外层 (Ali *et al.*, 2012; Gumustas *et al.*, 2019), 既能保持小粒径填料高效快速分离的优势, 又能降低背压, 在快速分析中表现出优越的分离性能 (夏红军等, 2020)。随着核壳型色谱柱的固定相类型日益丰富, 核壳型亲水作用色谱在极性化合物分析的应用也日益增多 (Zhang *et al.*, 2019; Ares *et al.*, 2020)。

本研究采用核壳型亲水作用色谱, 实现了冬虫夏草中核苷和糖醇类活性成分的快速同时分析, 将有助于提升冬虫夏草产业化质量评价和质控水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

冬虫夏草样品收集自湖北省、四川省、青海省和西藏自治区, 经鉴定为冬虫夏草 (表 1)。

表 1 冬虫夏草样品来源表

Table 1 Origin of *Ophiocordyceps sinensis* samples

编号 No.	来源 Origin	编号 No.	来源 Origin
S1	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S11	四川甘孜 Ganzi, Sichuan
S2	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S12	四川甘孜 Ganzi, Sichuan
S3	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S13	四川甘孜 Ganzi, Sichuan
S4	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S14	西藏林芝 Linzhi, Tibet
S5	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S15	西藏山南 Shannan, Tibet
S6	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S16	西藏那曲 Naqu, Tibet
S7	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S17	西藏山南 Shannan, Tibet
S8	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S18	西藏山南 Shannan, Tibet
S9	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S19	青海黄南 Huangnan, Qinghai
S10	湖北宜昌 Yichang, Hubei	S20	青海果洛 Guoluo, Qinghai

1.1.2 主要仪器

高效液相色谱仪 (1260 II 型, 美国安捷伦科技有限公司); 蒸发光散射检测器 (1260 II 型, 美国安捷伦科技有限公司); 十万分之一电子分析天平 (XS 205 型, 美国梅特勒-托利多仪器有限公司); 恒温水浴锅 (HH-S28 型, 常州天宏实验仪器厂); 超纯水制备系统 (Milli-Q, 德国默克密理博公司)。

1.1.3 主要试剂

甲醇 (分析纯) (西陇科学股份有限公司); 乙腈 (色谱纯) (美国斯百全公司); 乙酸铵、乙酸 (色谱纯) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 尿苷 (99.7%) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 腺苷 (99.4%) (武汉远成化工有限公司); 肌苷 (98.6%) (中国食品药品检定研究院); 鸟苷 (99.0%) (美国赛默飞世尔科技公司); 甘露醇 (99.1%) (中国食品药品检定研究院)。

1.2 方法

1.2.1 对照品储备液的制备

准确称取甘露醇、尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷对照品, 用 90% 甲醇溶解, 配制得 4.75 mg/mL 的甘露醇对照品储备液; 含尿苷、腺苷、肌苷和鸟苷分别为 96.76、102.03、97.71 和 86.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的核苷混合对照品储备液。

1.2.2 供试品溶液的制备

称取冬虫夏草粉末 (过三号筛) 0.2 g, 加入 90% 甲醇 10 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 90% 甲醇补足减失的重量, 过滤即得。

1.2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC (4.6 mm \times 50 mm \times 2.7 μm); 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (pH5.5); 流动相 B 为 100 mmol/L 乙酸铵溶液 (pH5.5) - 乙腈 (5:95); 洗脱梯度为 0~6 min, 100% B; 6~8 min, 100%~95% B; 流速为 1.2 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 2 μL (S15 和 S16 样本核苷测定为正常进样, 甘露醇测定为稀释一倍后进样); 紫外检测波长 260 nm。蒸发光散射检测器: 蒸发温度为 45 $^{\circ}\text{C}$; 雾化温度为 45 $^{\circ}\text{C}$; 气体流量为 1.80 L/min。

1.2.4 计算方法

用紫外检测器测定核苷类成分, 由峰面积与质量浓度之间的线性方程计算核苷类成分的质量浓度; 用蒸发光散射检测器测定糖醇类成分, 由

峰面积和质量浓度分别进行对数转换后所得的线性方程计算糖醇类成分的质量浓度; 根据供试品称样量及稀释倍数, 进而求得供试品中核苷类成分和糖醇类成分的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性考察

取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液各 1 份, 按“1.2.3”项下色谱条件进行分析。结果显示, 8 min 内待测成分尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇均实现基线分离 (分离度大于 1.5), 空白溶液在目标峰位置无干扰, 供试品与对照品的目标峰保留时间一致, 表明方法具有良好的专属性。空白溶液、对照品溶液和供试品溶液的色谱图见图 1。

2.1.2 线性考察

精密量取移取“1.2.1”项下甘露醇对照品储备液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 和核苷混合对照品储备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用 90% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得系列浓度的甘露醇和核苷混合对照品溶液。按“1.2.3”项下色谱条件分析, 用紫外检测器检测核苷类成分, 以峰面积对质量浓度作函数, 用蒸发光散射检测器检测糖醇类成分, 以峰面积对数值对质量浓度的对数值作函数, 分别绘制标准曲线并进行线性回归。结果显示, 5 种成分的线性相关系数均大于 0.999, 表明 5 种成分在表 2 所示的范围具有良好的线性关系 (表 2)。

2.1.3 检测限和定量限考察

取“1.2.1”项下对照品储备液分别用 90% 甲醇经逐级稀释后, 按“1.2.3”项下的色谱条件分析。测得信噪比为 3 时, 对照品稀释液的质量浓度为检测限; 测得信噪比为 10 时, 对照品稀释液的浓度为定量限, 结果见表 2。

2.1.4 精密度考察

取混合对照品溶液 1 份, 按“1.2.3”项下的色谱条件分析, 同一日内连续进样 6 针, 尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇的峰面积 RSD 值 ($n=6$) 分别为 0.7%、0.5%、1.8%、0.7% 和 1.3%, 表明仪器日内精密度良好。连续三日, 每日进样 2 针, 尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇的峰面积 RSD 值 ($n=6$) 分别为 1.3%、1.1%、1.1%、1.8% 和 2.3%, 表明仪器日间精密度良好。

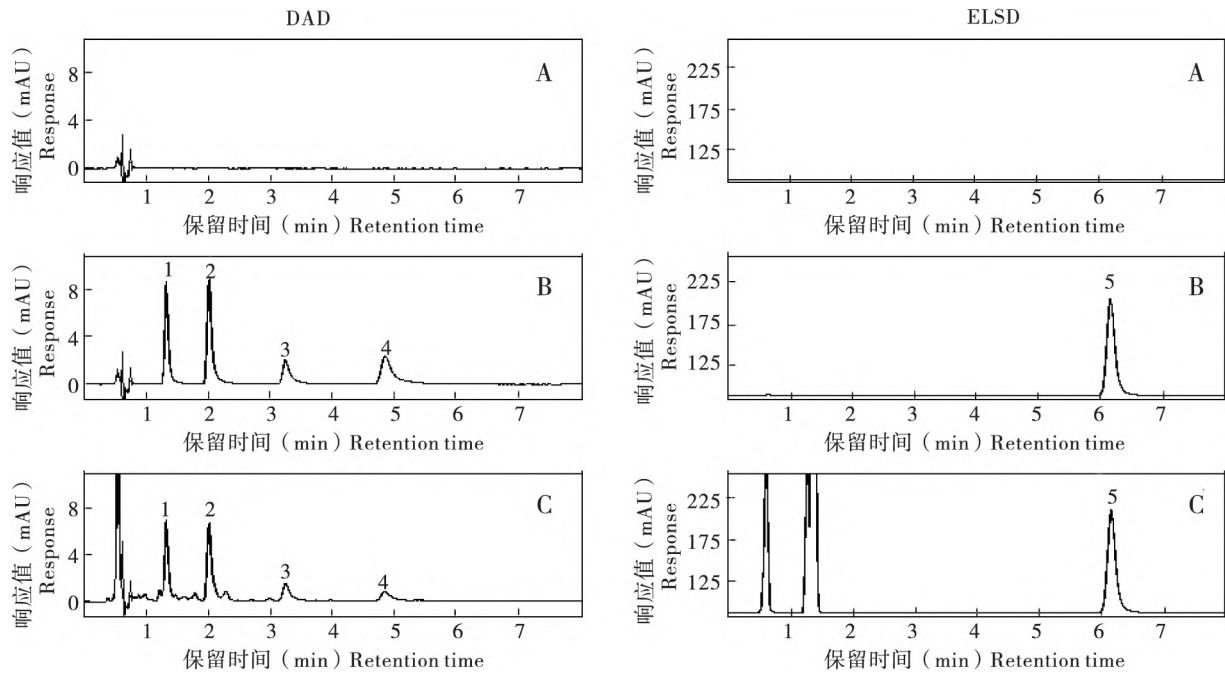


图1 空白溶液 (A)、对照品溶液 (B) 和样品 (C) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution (A), reference substances (B) and sample (C)

注: 1, 尿苷; 2: 腺苷; 3, 肌苷; 4, 鸟苷; 5, 甘露醇。Note: 1, Uridine; 2, Adenosine; 3, Inosine; 4, Guanosine; 5, Mannitol.

表2 对照品的线性、检测限和定量限考察结果

Table 2 Calibration curves, limit of detection and limit of quantification for the nucleosides and sugar alcohols standards

分析物 Analytes	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$) Liner ranger	线性方程 Calibration curve	相关系数 Correlation coefficient values	检测限 ($\mu\text{g/mL}$) Limit of detection	定量限 ($\mu\text{g/mL}$) Limit of quantification
尿苷 Uridine	0.96 ~ 19.21	$y = 3.8397x + 0.1787$	1.0000	0.08	0.24
腺苷 Adenosine	1.02 ~ 20.38	$y = 5.0882x + 0.2660$	0.9999	0.08	0.24
肌苷 Inosine	0.98 ~ 19.52	$y = 1.9455x - 0.0705$	0.9999	0.24	0.98
鸟苷 Guanosine	0.87 ~ 17.33	$y = 3.7046x - 1.1487$	0.9996	0.22	0.87
甘露醇 Mannitol	237.42 ~ 2 374.19	$y = 1.8575x - 3.1116$	0.9998	59.35	118.71

2.1.5 重复性考察

取同一批次的冬虫夏草粉末 (S3) 6 份, 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2.3”项下的色谱条件分析。结果显示, 样品中尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇的平均含量 ($n=6$) 分别为 0.042%、0.032%、0.035%、0.013% 和 10.4%, RSD 值分别为 1.9%、1.8%、1.9%、3.2% 和 2.2%, 表明方法具有良好的重复性。

2.1.6 准确度考察

精密量取已知含量的冬虫夏草粉末 (S3) 6 份, 每份 0.1 g, 置于圆底烧瓶, 精密加入混合

对照品溶液 (含尿苷、腺苷、鸟苷、肌苷和甘露醇) 10 mL, 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2.3”项下的色谱条件分析。结果显示, 样品中尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇的平均回收率 ($n=6$) 分别为 99.2%、105.0%、106.1%、99.0% 和 99.7%, RSD 值分别为 2.2%、2.5%、1.9%、2.7% 和 1.2% (表3)。

2.1.7 稳定性考察

取冬虫夏草粉末 (S3) 1 份, 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2.3”项下的色谱条件分析, 分别于 0、2、4、8、12、16 和 24 h 进

样分析。结果显示, 样品中尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇的峰面积 RSD 值分别为 0.8%、1.0%、1.8%、2.1% 和 2.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2 样品测定

收集不同产地的冬虫夏草样品, 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2.3”项下的色谱条件分析, 结果见表 4。

表 3 准确度考察结果
Table 3 Result of recovery test

分析物 Analytes	含有量 (mg) Content	加入量 (mg) Spiked	测得量 (mg) Found	回收率 (%) Recovery	平均回收率 (%) Average recovery	相对平均偏差 (%) RSD
尿苷 Uridine	0.0430	0.0402	0.0840	101.8	99.2	2.2
	0.0439	0.0402	0.0837	99.0		
	0.0439	0.0402	0.0840	99.8		
	0.0444	0.0402	0.0837	97.7		
	0.0434	0.0402	0.0820	95.9		
	0.0447	0.0402	0.0852	100.9		
腺苷 Adenosine	0.0329	0.0367	0.0730	109.5	105.0	2.5
	0.0335	0.0367	0.0717	104.2		
	0.0335	0.0367	0.0722	105.4		
	0.0339	0.0367	0.0722	104.4		
	0.0332	0.0367	0.0703	101.2		
	0.0341	0.0367	0.0728	105.3		
肌苷 Inosine	0.0362	0.0345	0.0718	103.3	106.1	1.9
	0.0369	0.0345	0.0734	105.7		
	0.0369	0.0345	0.0743	108.3		
	0.0373	0.0345	0.0748	108.5		
	0.0365	0.0345	0.0732	106.5		
	0.0375	0.0345	0.0736	104.5		
鸟苷 Guanosine	0.0130	0.0119	0.0253	103.2	99.0	2.7
	0.0133	0.0119	0.0253	101.0		
	0.0133	0.0119	0.0250	98.7		
	0.0134	0.0119	0.0249	96.9		
	0.0131	0.0119	0.0247	97.8		
	0.0135	0.0119	0.0249	96.0		
甘露醇 Mannitol	10.7	10.1	20.9	100.3	99.7	1.2
	10.9	10.1	21.0	99.4		
	10.9	10.1	21.2	101.1		
	11.1	10.1	21.1	99.0		
	10.8	10.1	20.7	97.7		
	11.1	10.1	21.3	100.5		

表 4 不同产地冬虫夏草的核苷和糖醇类成分的含量

Table 4 Contents of nucleosides and sugar alcohols in *Ophiocordyceps sinensis* from different habitats

编号 No.	尿苷 (%) Uridine	腺苷 (%) Adenosine	肌苷 (%) Inosine	鸟苷 (%) Guanosine	甘露醇 (%) Mannitol
S1	0.055	0.019	0.053	0.019	9.0
S2	0.031	0.027	0.026	0.007	10.1
S3	0.042	0.033	0.030	0.013	9.6
S4	0.056	0.029	0.045	0.024	9.8
S5	0.039	0.011	0.030	0.007	9.1
S6	0.064	0.034	0.043	0.025	8.9
S7	0.044	0.038	0.032	0.018	10.1
S8	0.021	0.024	0.017	0.007	9.6
S9	0.022	0.025	0.019	0.006	10.1
S10	0.024	0.026	0.023	0.006	9.9
S11	0.026	0.018	0.006	<0.004	10.7
S12	0.024	0.020	0.012	0.005	10.1
S13	0.029	0.023	0.008	0.005	9.5
S14	0.060	0.038	0.011	0.013	8.9
S15	0.030	0.030	<0.005	0.005	12.3
S16	0.044	0.035	0.006	0.006	12.2
S17	0.060	0.040	0.010	0.006	9.9
S18	0.070	0.037	0.012	0.007	8.7
S19	0.055	0.029	0.011	0.007	10.2
S20	0.055	0.022	0.016	0.009	8.7

3 结论与讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究首次采用核壳型亲水作用色谱柱,实现了冬虫夏草中核苷和糖醇类成分的快速同时分析。陈克盼等(2015)等采用高效液相色谱法同时测定冬虫夏草中5种核苷; Zong *et al.* (2015)采用UHPLC-ESI-MS/MS法同时测定冬虫夏草中13种核苷及碱基;李文庆等(2018)采用HPLC-ELSD法同时测定冬虫夏草中3种甾醇的含量。大部分关于冬虫夏草中多种成分的同时分析的报道是针对化学结构相似的同类化合物,而同时测定两类以上化合物含量的报道相对较少。Wang *et al.* (2009)使用Grace Prevail Carbohydrate ES色谱柱实现了对冬虫夏草中核苷、糖及糖醇等两类以上成分的分析,但分析时间需60 min。本研究在前人的研究基础上进行了优化。首先选择了对核苷和糖醇等强极性化合物有很好保留和分离选择性的亲水作用色谱柱。为提高检测效率,本研究选择了2.7 μm 粒径的核壳柱。该色谱柱的填

料由1.7 μm 直径的实心内核和0.5 μm 厚的多孔层组成,这种结构提供了较短的传质路径,减少了轴向扩散,从而使分析速度更快(岳焕新等,2016)。在流动相优化方面,研究发现,随流动相中乙腈的比例增加或缓冲盐浓度的增加,核苷和糖醇类成分的保留增强,当初始流动相乙腈比例为95%,乙酸铵浓度为5 mmol/L时,可确保4种核苷和甘露醇的分离效果及峰型最优。通过色谱条件的优化,本研究所建立的分析方法可在8 min内完成冬虫夏草中尿苷、腺苷、肌苷、鸟苷和甘露醇的测定,与已有报道相比,分析速度更快,更适合在产业化生产中应用。

3.2 提取条件的确定

冬虫夏草中核苷类成分的提取溶剂主要有水、甲醇或一定浓度的甲醇水溶液(Lan *et al.*, 2004; 毛新亮等,2009; 周菊峰等,2009; 咎珂等,2018)。钱正明等(2016)研究发现,在室温水超声提取的条件下,冬虫夏草水溶液中存在腺苷酸向腺苷、腺苷向肌苷转化的现象,使用沸水或90%甲醇提取可抑制该转化。而糖醇类成分通常使用水作为提取溶剂(林慧等,2013; 李文庆等,2018; 钱正

明等,2019)。为避免核苷酸、核苷之间的转换问题,本研究采用90%甲醇作为提取溶剂。另外比较了90%甲醇和水对甘露醇的提取效果。结果表明,使用90%甲醇和水提取的甘露醇含量分别为10.3%和10.6%,二者基本一致。此外,本研究还对提取时间进行确认,回流提取30 min和60 min的含量一致,说明回流提取30 min已经能确保目标成分提取完全。

3.3 测定结果分析

钱正明等(2015,2016)测得冬虫夏草中尿苷含量为0.037%~0.065%,腺苷含量为0.021%~0.034%,肌苷含量为0.006%~0.023%,鸟苷含量为0.005%~0.015%。王泽凤等(2013)测定冬虫夏草中甘露醇含量为10.2%~12.3%;李文庆等(2018)测定42批冬虫夏草的甘露醇含量为6.16%~14.14%。本次实验测定了20批冬虫夏草,除个别样本的肌苷和鸟苷低于定量限外,其余样本的尿苷含量为0.021%~0.070%,腺苷含量为0.011%~0.040%,肌苷含量为0.006%~0.053%,鸟苷含量为0.005%~0.025%,甘露醇含量为8.7%~12.3%,该范围与文献报道的结果一致。20批冬虫夏草的腺苷含量均符合2020年版《中国药典》中冬虫夏草质量标准不低于0.010%的要求(国家药典委员会,2020)。

本研究建立了一种可以快速同时分析冬虫夏草中核苷和糖醇类成分的方法。方法学考察显示,该法具有良好的专属性、线性、灵敏度、精密度、准确度和溶液稳定性,20批不同来源的样品检测结果进一步确认了其实用性。本研究所建立的方法可以快速、准确地同时测定冬虫夏草中两类重要的活性成分,为冬虫夏草产业化质量评价提供了参考。

参考文献 (References)

- Ai Z, Qian ZM, Li WJ, et al. Recent advances in the analysis of nucleosides in Chinese *Cordyceps* [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (4): 388-403. [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]
- Ali I, Al-Othman ZA, Nagae N, et al. Recent trends in ultra-fast HPLC: New generation superficially porous silica columns [J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35 (23): 3235-3249.
- Ares AM, Toribio L, Nozal MJ, et al. Simultaneous determination of betaines and other quaternary ammonium related compounds in bee pollen by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 157: 105000.
- Chen KP, Zhao AQ, Wang QQ, et al. HPLC determination of nucleosides in *Cordyceps sinensis* [J]. *China Measurement Testing Technology*, 2015, 41 (9): 56-59. [陈克盼, 赵安权, 王倩倩, 等. HPLC法同时测定冬虫夏草中5种核苷类成分 [J]. 中国测试, 2015, 41 (9): 56-59]
- Gumustas M, Zalewski P, Ozkan SA, et al. The history of the core-shell particles and applications in active pharmaceutical ingredients via liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 2019, 82 (1): 17-48.
- Guo ZM, Zhang XL, Xu Q, et al. Stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography and their applications in separation of traditional Chinese medicines [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2009, 27 (5): 675-681. [郭志谋, 张绣莉, 徐青, 等. 亲水作用色谱固定相及其在中药分离中的应用 [J]. 色谱, 2009, 27 (5): 675-681]
- Huang LF, Wu MJ, Sun XJ, et al. Simultaneous determination of adenine, uridine and adenosine in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by LC/ESI-MS [J]. *Journal of Central South University of Technology*, 2004, 11 (3): 295-299.
- Han RC, Wu H, Tao HP, et al. Research on Chinese *Cordyceps* during the past 70 years in China [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (5): 849-883. [韩日畴, 吴华, 陶海平, 等. 中国冬虫夏草研发70年 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (5): 849-883]
- Li HX, Chen L, Li WJ, et al. Textural research on Chinese *Cordyceps* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2020, 18 (2): 68-73. [李皓翔, 陈铃, 李文佳, 等. 冬虫夏草的本草考证 [J]. 菌物研究, 2020, 18 (2): 68-73]
- Lin H, Yan CR, Xu CX, et al. Simultaneous determination by HPLC-ELSD of ten kinds of sugars and sugar alcohols in foods [J]. *Food Science*, 2013, 34 (12): 286-291. [林慧, 颜春荣, 徐春祥, 等. HPLC-ELSD法同时测定食品中的10种糖和糖醇 [J]. 食品科学, 2013, 34 (12): 286-291]
- Li RP, Yuan Q, Huang YP. Hydrophilic interaction chromatography on silica column: Retention mechanism and its influential factors [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32 (7): 675-681. [李瑞萍, 袁琴, 黄应平. 硅胶色谱柱的亲水作用保留机理及其影响因素 [J]. 色谱, 2014, 32 (7): 675-681]
- Li WQ, Li WJ, Dong CH, et al. Determination of cordycepic acid in cultivated and wild Chinese *Cordyceps* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2018, 16 (2): 102-105. [李文庆, 李文佳, 董彩虹, 等. 冬虫夏草繁育品和野生品虫草酸含量比较 [J]. 菌物研究, 2018, 16 (2): 102-105]
- Li WQ, Sun MT, Li WJ, et al. Simultaneous determination of 3 kinds of sterol in *Cordyceps sinensis* by HPLC-ELSD [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2018, 29 (4): 100-102. [李文庆, 孙敏甜, 李文佳, 等. HPLC-ELSD法同时测定冬虫夏草中3个甾醇的含量 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29 (4): 100-102]
- Mao XL, Zheng GD, Zhang C, et al. Determination of adenosine, cordycepin, and inosine in *Cordyceps sinensis* by RP-HPLC [J]. *Central South Pharmacy*, 2009, 7 (12): 895-897. [毛新亮, 郑国栋, 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]
- Marrubini G, Appelblad P, Maietta M, et al. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review [J]. *Food Chemistry*, 2018, 257: 53–66.
- National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 119. [国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 119]
- Qian ZM, Li WQ, Sun MT, et al. Analysis of chemical compounds in Chinese *Cordyceps* [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (4): 476–490. [钱正明, 李文庆, 孙敏甜, 等. 冬虫夏草化学成分分析 [J]. 菌物学报, 2016, 35 (4): 476–490]
- Qian ZM, Li WQ, Wang CX, et al. Quantitative analysis of nucleosides in four *Cordyceps* genus by HPLC [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41 (13): 2493–2499. [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]
- Qian ZM, Sun MT, Ai Z, et al. Simultaneous determination of three nucleosides in *Cordyceps sinensis* by QAMS [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2015, 50 (15): 1297–1300. [钱正明, 孙敏甜, 艾中, 等. 一测多评法测定冬虫夏草中 3 种核苷的含量 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (15): 1297–1300]
- Qian ZM, Sun MT, Zhou JQ, et al. Comparative of cordycepic acid content in different stages of *Cordyceps sinensis* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2019, 30 (5): 1103–1104. [钱正明, 孙敏甜, 周建桥, 等. 冬虫夏草不同生长阶段虫草酸含量比较分析 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (5): 1103–1104]
- Qian ZM, Zhen DM, Li WQ, et al. Adenosine transformation pathway during water extraction of Chinese *Cordyceps* [J]. *World Chinese Medicine*, 2016, 11 (5): 758–762. [钱正明, 甄达明, 李文庆, 等. 冬虫夏草水提取过程中腺苷转化途径研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11 (5): 758–762]
- Qian ZM, Zhou MX, Sun MT, et al. Analysis of nucleosides in different parts of *Cordyceps sinensis* [J]. *World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2014, 16 (11): 2390–2394. [钱正明, 周妙霞, 孙敏甜, 等. 冬虫夏草不同部位核苷类成分比较分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16 (11): 2390–2394]
- Qiu XH, Cao L, Han RC. The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38 (1): 1–23. [邱雪红, 曹莉, 韩日畴. 冬虫夏草的研究进展、现存问题与研究展望 [J]. 环境昆虫学报, 2016, 38 (1): 1–23]
- Shang GJ, Yin WL, Cai ZH, et al. The difference and selection of C₁₈ column in drug analysis [J]. *Drug Evaluation Research*, 2015, 38 (3): 341–344. [商国举, 尹文龙, 蔡振华, 等. 药物分析中 C₁₈ 色谱柱的差异与选择 [J]. 药物评价研究, 2015, 38 (3): 341–344]
- Wang PG, Zhou WL. Rapid determination of cocamidopropyl betaine impurities in cosmetic products by core-shell hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1461: 78–83.
- Wang S, Yang FQ, Feng K, et al. Simultaneous determination of nucleosides, myriocin, and carbohydrates in *Cordyceps* by HPLC coupled with diode array detection and evaporative light scattering detection [J]. *Journal of Separation Science*, 2009, 32: 4069–4076.
- Wang ZF, Zha SH, Zhang H. Determination of the contents of cordycepic acid in *Cordyceps* by HPLC [J]. *Natural Product Research and Development*, 2013, 25: 68–71. [王泽凤, 查圣华, 张宏. HPLC 法测定冬虫夏草中虫草酸的含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 68–71]
- Xia HJ, Liu JW, Bai Q. Research progress on core-shell silica stationary phases for high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38 (4): 372–382. [夏红军, 刘佳玮, 白泉. 核壳型二氧化硅色谱填料的研究进展 [J]. 色谱, 2020, 38 (4): 372–382]
- Yue HX, Xue KP, Jin XQ, et al. Rapid determination of 3 kinds of ginsenosides in *Panax ginseng* by new C₁₈ core-shell column [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7 (7): 2763–2769. [岳焕新, 薛昆鹏, 金小青, 等. 新型 C₁₈ 核壳结构色谱柱快速分析人参中的 3 种皂苷 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (7): 2763–2769]
- Zan K, Cui G, Guo LN, et al. Simultaneous determination of five nucleosides in *Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc. by QAMS [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2018, 38 (4): 630–635. [贻珂, 崔淦, 过立农, 等. 一测多评法同时测定冬虫夏草中 5 个核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (4): 630–635]
- Zan K, Huang LL, Guo LN, et al. Comparative study on specific chromatograms and main nucleosides of cultivated and wild *Cordyceps sinensis* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42 (20): 3957–3962. [贻珂, 黄莉莉, 过立农, 等. 基于特征图谱及多指标成分含量的冬虫夏草野生与人工繁育品比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (20): 3957–3962]
- Zhang P, Zhou YC, Yang M, et al. Determination of cordycepic acid in *Cordyceps sinensis* and fermented *Cordyceps* preparation by HPLC-RID [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36 (9): 1671–1678. [张萍, 周玉春, 杨明, 等. HPLC-RID 测定冬虫夏草及发酵虫草制剂中虫草酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (9): 1671–1678]
- Zhang SQ, Li J, Li L, et al. Fast separation of water-soluble vitamins by hydrophilic interaction liquid chromatography based on submicrometer flow-through silica microspheres [J]. *Food Chemistry*, 2019, 307: 125531.
- Zhou JF, Huang LF, Guo FQ. Rapid simultaneous determination of main nucleosides in *Cordyceps sinensis* with LC-ESI-MS [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34 (18): 2349–2352. [周菊峰, 黄兰芳, 郭方遒. LC-ESI-MS 快速同时测定冬虫夏草中主要核苷类成分 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (18): 2349–2352]
- Zong SY, Han H, Wang B, et al. Fast simultaneous determination of 13 nucleosides and nucleobases in *Cordyceps sinensis* by UHPLC-ESI-MS/MS [J]. *Molecules*, 2015, 20: 21816–21825.