

冬虫夏草水提取过程中腺苷转化途径研究

钱正明¹ 甄达明¹ 李文庆¹ 李文佳¹ 孙敏甜¹ 杨丰庆² 向 丽³

(1 广东东阳光药业有限公司, 东莞, 523850; 2 重庆大学化学化工学院, 重庆, 400030; 3 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700)

摘要 目的:通过比较分析不同条件下冬虫夏草中7个核苷类成分的含量变化,探究冬虫夏草药材在水提过程中腺苷的转化途径。方法:首先建立冬虫夏草中7个核苷类成分(三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷、腺苷、肌苷、次黄嘌呤和腺嘌呤)的高效液相定量分析方法,并用所建立的分析方法比较不同提取方法和水提取添加对照品前后各相关成分的含量。结果:发现不同提取方法对冬虫夏草腺苷含量具有显著影响,冬虫夏草在室温水提取条件下腺苷酸(三磷酸腺苷、二磷酸腺苷和单磷酸腺苷)可以转化为腺苷,腺苷可以转化为肌苷。结论:研究结果说明了冬虫夏草在水提过程中的腺苷转化途径,为冬虫夏草腺苷类成分的质量控制提升提供数据支持。

关键词 冬虫夏草;腺苷;转化途径;高效液相

Adenosine transformation pathway during water extraction of Chinese Cordyceps

Qian Zhengming¹, Zhen Daming¹, Li Wenqing¹, Li Wenjia¹, Sun Mintian¹, Yang Fengqing², Xiang Li³

(1 Sun Shine Lake Pharm Co., Ltd, Dongguan 523850, China; 2 School of Chemistry Chemical Engineering, Chongqing 400030, China; 3 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To clarify the transformation pathway of adenosine during water extraction of Chinese Cordyceps. A HPLC method for simultaneous determination of seven nucleosides (adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, adenosine monophosphate, adenosine, inosine, hypoxanthine and adenine) in Chinese Cordyceps was developed. By comparing the change of nucleosides' contents before and after adding of standards, it was found that adenylate (adenosine triphosphate / adenosine diphosphate / adenosine monophosphate) can be transformed into adenosine, and adenosine can be transformed into inosine at room temperature water extraction condition.

Key Words Chinese Cordyceps; Adenosine; Transformation pathway; HPLC

中图分类号:R282 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.002

冬虫夏草为传统名贵中药材,分布在我国青藏高原高海拔地区,其主产区包括西藏自治区、青海省和四川省,同时云南省和甘肃省也有小部分高原地区出产冬虫夏草^[1]。早在公元8世纪《月王药诊》记载其能“治肺部疾病”^[2],现代研究表明冬虫夏草具有抗肿瘤、免疫调节、抗炎、抗衰老等活性^[3-4],核苷、多糖、甾醇、蛋白、多肽等物质为其活性成分,其中核苷类成分是冬虫夏草的重要活性物质之一,具有提高免疫、调节心律失常、促进血液循环等多种功效^[5-8],并被广泛运用于冬虫夏草的质量控制研究,自2000年版《中华人民共和国药典》起就采用腺苷作为其药材含量测定的指标^[9-12]。

前期很多学者对冬虫夏草核苷类成分分析研究进行了报道,采用了各种现代化分析手段,包括:薄层色谱法、高效液相色谱法和高效毛细管电泳法^[13-15]。通过比较前期发表结果,发现不同提取方法所测得的冬虫夏草腺苷含量差异较大,含量高的

达0.05%,含量低的只有0.01%^[16-17]。杨丰庆等通过离子对色谱法对不同提取方法冬虫夏草的核苷类成分进行了比较分析,从分析结果推测出冬虫夏草核苷酸、核苷之间存在着转化的现象^[18]。但对于冬虫夏草样本中腺苷的转化路线尚未全面展开,需进一步实验的验证。本研究在前期实验结果的基础上,建立了和腺苷相关的7种核苷类成分的定量方法,并通过比较对照品添加前后各成分的变化,阐明冬虫夏草在提取过程中腺苷转化的途径,为其质量控制提供科学依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器 Agilent1260型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);XS204型电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司);XS205型电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司);3K15型离心机(西格玛奥德里奇有限公司);KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HWS24型电热恒温水浴锅(上

海一恒科技有限公司)。

1.2 材料 三磷酸腺苷和二磷酸腺苷对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);单磷酸腺苷对照品(东京化成工业株式会社);腺苷对照品(中国食品药品检定研究院);肌苷、腺嘌呤、次黄嘌呤

对照品(上海融禾医药科技有限公司);对照品化合物结构式见(图1)。甲醇为色谱纯;水为超纯水;其他化学试剂均为国产分析纯。冬虫夏草由东阳光药业研究院提供,经钱正明鉴定为冬虫夏草。

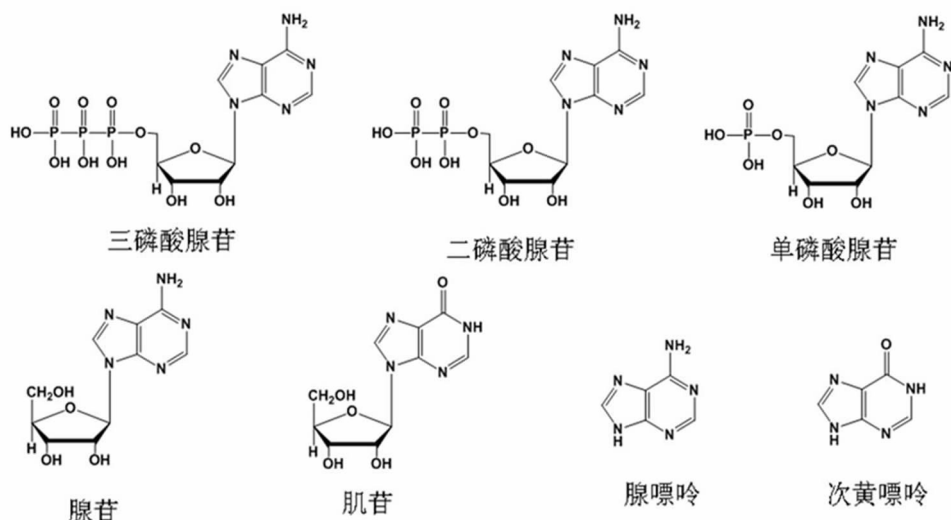


图1 核苷类化合物结构式

2 方法

2.1 对照品溶液配制 分别精密称取三磷酸腺苷 26.15 mg、二磷酸腺苷 27.06 mg、单磷酸腺苷 25.99 mg、腺苷 25.20 mg、肌苷 26.48 mg、次黄嘌呤 25.07 mg 和腺嘌呤 25.15 mg,于 250 mL 容量瓶中,加入超纯水使其溶解并定容至刻度线,摇匀,即得单一对照品溶液。移取各单一对照品溶液适量于 20 mL 容量瓶中,加入超纯水定容至刻度线,摇匀,过 0.45 μm 水系滤膜,即得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 甲醇(90%)回流提取 称取冬虫夏草粉末 0.3 g,精密称定,于 50 mL 梨形瓶中,加入 90% 甲醇 20 mL,密塞,摇匀,称定重量,85 $^{\circ}\text{C}$ 下回流提取 30 min,放冷,再称定重量,用 90% 甲醇补足减失的重量,摇匀,离心,取 1 mL 上清液,吹干,加超纯水 1 mL 复溶,过 0.45 μm 水系滤膜。

2.2.2 沸水超声提取 称取冬虫夏草粉末 0.3 g,精密称定,于 50 mL 三角瓶中,加入沸水 20 mL,密塞,摇匀,室温超声 30 min,离心,取上清液过 0.45 μm 水系滤膜。

2.2.3 室温超声提取 称取冬虫夏草粉末 0.3 g,精密称定,于 50 mL 三角瓶中,加入超纯水 20 mL,密塞,摇匀。室温超声 30 min。加入磷酸 100 μL , 震摇 3 min, 离心, 取上清液过 0.45 μm 水系滤膜。

2.2.4 添加核苷室温超声提取 称取冬虫夏草粉末 0.3 g,精密称定,于 50 mL 三角瓶中,加入超纯水 19 mL,再添加 1 mL 核苷单一对照品溶液,密塞,摇匀,室温超声 30 min。加入磷酸 100 μL , 震摇 3 min, 离心, 取上清液过 0.45 μm 水系滤膜。

2.3 色谱条件 Welch AQ-18 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相 A 为 0.05 mol $\cdot$ L $^{-1}$ KH $_2$ PO $_4$ -K $_2$ HPO $_4$ 溶液 (pH 5.8), 流动相 B 为 0.05 mol $\cdot$ L $^{-1}$ KH $_2$ PO $_4$ -K $_2$ HPO $_4$: 甲醇 = 9:1 溶液 (pH 5.8), 梯度洗脱: 0 ~ 14 min, 0% B; 14 ~ 25 min, 0% ~ 25% B; 25 ~ 35 min, 25% ~ 90% B; 35 ~ 40 min, 90% ~ 100% B; 40 ~ 55 min, 100% B; 检测波长 260 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 流速 0.6 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 进样体积 5 μL 。

2.4 方法学验证 精密度实验: 取混合对照品溶液, 连续进样 5 次, 按“2.3”项下色谱条件进行分析, 记录峰面积, 计算 RSD。重复性实验: 精密称取同一冬虫夏草样品 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 按“2.3”项下色谱条件进行分析, 计算各成分含量的 RSD 值。稳定性试验: 精密吸取同一样品供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 计算峰面积 RSD 值。准确度实验: 在空白溶液中加入混合对照品, 按“2.3”项下色谱条件进行分析, 测定各成分峰面积, 计算平均回收率及 RSD 值。核苷标准曲线和定量限: 取含 7 种核苷混合对

照品溶液的系列稀释液,按“2.3”项下色谱条件各进样,记录峰面积,以峰面积数值(Y)对浓度(X, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行线性回归,得到三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、次黄嘌呤、单磷酸腺苷、腺嘌呤、肌苷和腺苷的标准曲线,同时以信噪比约为10的对照品溶液浓度为定量限。

3 结果与讨论

3.1 分析条件优化 本研究组前期已成功建立了多个冬虫夏草核苷类成分分析方法^[19-21],但前期发表的分析方法对本次实验中的核苷酸类化合物分离效果较差。因此在前期实验结果的基础上对分析方法又进行了优化。首先在前期文献方法上比较了不同流动相对化合物分离的影响,包括乙腈-水溶液系统、乙腈-乙酸铵溶液系统和甲醇-磷酸盐溶液系统,结果显示乙腈-水溶液系统无法将7种物质分开,乙腈-乙酸铵溶液系统对ATP化合物的保留能力太弱,而甲醇-磷酸盐溶液系统对ATP保留能力强且7种化合物能达到基线分离,因此选择了乙腈-磷酸盐溶液系统作为流动相系统。然后比较了不同色谱柱的分离情况,包括:HILIC色谱柱、不同厂家的AQ色谱柱对7种化合物分离,结果显示月旭AQ色谱柱对所分析的核苷类化合物具有较好的分离度,因此选择月旭AQ色谱柱作为分离色谱柱。此外,对色谱分离的柱温也进行了比较,结果发现25℃和30℃对化合物色谱分离影响不大,因此采用25℃作为分析柱柱温。检测波长综合考虑前期文献报道核苷类化合物检测波长,选择了260nm作为检测波长^[14,18,21]。

3.2 方法学验证 按“2.4”项下方法进行方法学验证,结果见表1和表2,标准曲线相关系数均符合要求,结果如表1所示,各成分的精密密度 $RSD < 2\%$,重复性 $RSD < 10\%$,回收率 $98\% \sim 102\%$ ($RSD < 2\%$),12h内稳定性 $RSD < 10\%$ 。方法学验证结果说明该法稳定可靠,可用于冬虫夏草中腺苷及其相关成分的含量测定。

表1 标准曲线				
核苷	线性方程	相关系数	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
三磷酸腺苷	$y = 23216x - 167.6$	1.00	0.403 ~ 16.1	0.824
二磷酸腺苷	$y = 29573x - 152.9$	1.00	0.433 ~ 17.3	0.726
次黄嘌呤	$y = 56280x - 19.44$	1.00	0.401 ~ 16.0	0.424
单磷酸腺苷	$y = 41110x - 1644$	1.00	0.416 ~ 16.6	0.762
腺嘌呤	$y = 77437x - 32087$	0.999	0.483 ~ 9.66	0.901
肌苷	$y = 26582x - 320.5$	1.00	0.636 ~ 31.8	0.812
腺苷	$y = 55347x - 3267$	1.00	0.605 ~ 30.2	0.657

表2 精密密度、重复性、稳定性和加样回收率				
核苷	RSD(%)			加样回收率 (%)
	精密密度	重复性	稳定性	
三磷酸腺苷	1.9	—	—	100.5
二磷酸腺苷	1.8	—	—	100.6
次黄嘌呤	0.9	8.4	8.9	99.6
单磷酸腺苷	1.8	—	—	99.3
腺嘌呤	1.8	—	—	101.0
肌苷	1.2	1.6	1.6	99.3
腺苷	0.8	3.3	1.1	100.1

注:“—”低于定量限无法获得数据。

3.3 样品分析 精密称取冬虫夏草样品,按“2.2”项下方法,分别采用沸水超声提取、90%甲醇回流提取和室温超声水提取的方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进行分析,获得冬虫夏草不同提取方法样品色谱图(图2),并采用外标法对相关成分进行测定,结果见表2。

通过比较冬虫夏草不同提取制备样本中的腺苷含量,发现室温超声水提取样本腺苷含量(0.07%)显著高于沸水超声提取样本(0.03%)和90%甲醇回流提取样本(0.03%),由此可以推测在室温超声提取过程中可能有其他成分向腺苷的转化,而在沸水或90%甲醇的条件下该转化途径被抑制。进一步比较室温超声提取样本和沸水超声提取样本中其他成分的含量,发现肌苷含量在室温超声提取样本中(0.06%)比沸水超声提取样本中(0.02%)高,而二磷酸腺苷和单磷酸腺苷仅在沸水超声提取样品含有,因此可以推测在室温超声提取条件下二磷酸腺苷和单磷酸腺苷可能转化为了腺苷和肌苷。

为了进一步验证以上推测,本实验选室温水超声为提取条件,采用添加对照品的方法逐个验证化合物间的转化现象。详细实验结果见表3,通过比较添加三磷酸腺苷冬虫夏草室温超声提取样本和未添加三磷酸腺苷样本中各化合物的含量,发现添加的三磷酸腺苷未被检测到,而腺苷和肌苷的含量有显著的增加,该现象证实了在室温超声水提取的条件下存在三磷酸腺苷转化为腺苷和肌苷的途径。通过添加二磷酸腺苷和单磷酸腺苷对照品的实验,也发现了同样的情况,样本中添加的二磷酸腺苷和单磷酸腺苷均未被检测到,而腺苷和肌苷的含量有显著增加,说明在实验条件下存在着二磷酸腺苷和单磷酸腺苷转化为腺苷和肌苷的途径。通过添加腺苷提取实验,发现样本中腺苷含量和肌苷含量均有明显增加,说明腺苷在实验条件下可以部分转化为肌苷。本实验所得结果(图3)验证了前期文献报道推

测冬虫夏草室温水提取条件下,存在着单磷酸腺苷转化为腺苷,腺苷转化为肌苷的结论^[18]。同时本实

验也发现了在室温水提条件下还存在三磷酸腺苷和二磷酸腺苷向腺苷的转化。

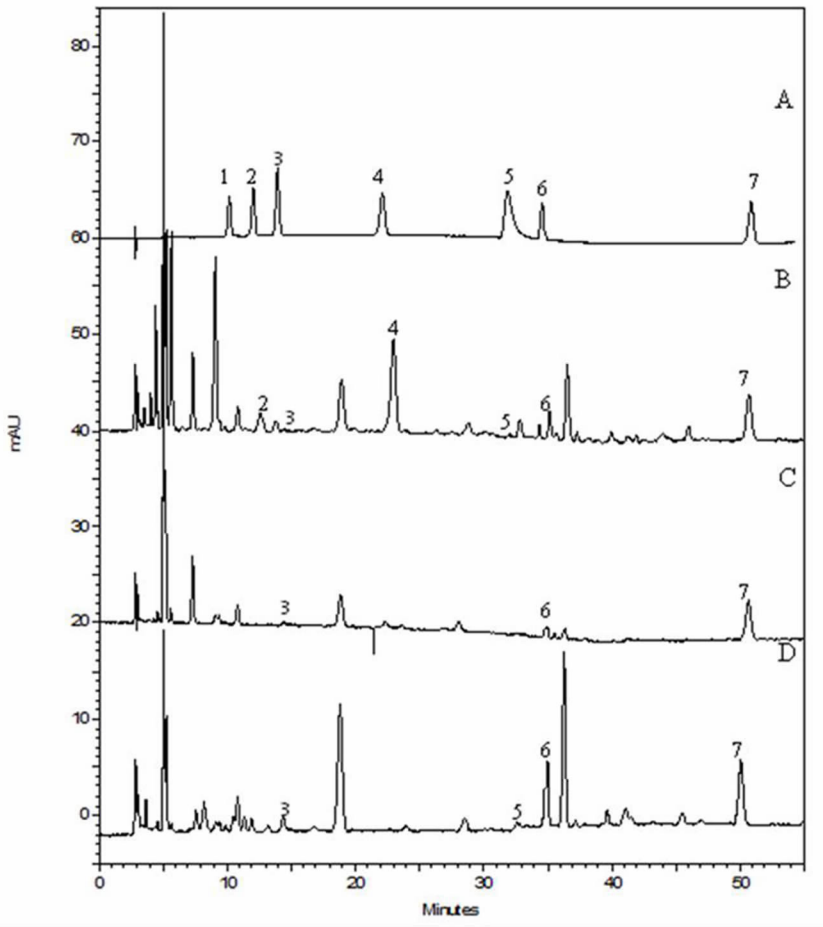


图2 冬虫夏草色谱图

注:A. 混合对照品;B. 冬虫夏草沸水超声提取样品;C. 冬虫夏草甲醇热回流提取样品;D. 冬虫夏草室温水超声样品;1. 三磷酸腺苷;2. 二磷酸腺苷;3. 次黄嘌呤;4. 单磷酸腺苷;5. 腺嘌呤;6. 肌苷;7. 腺苷。

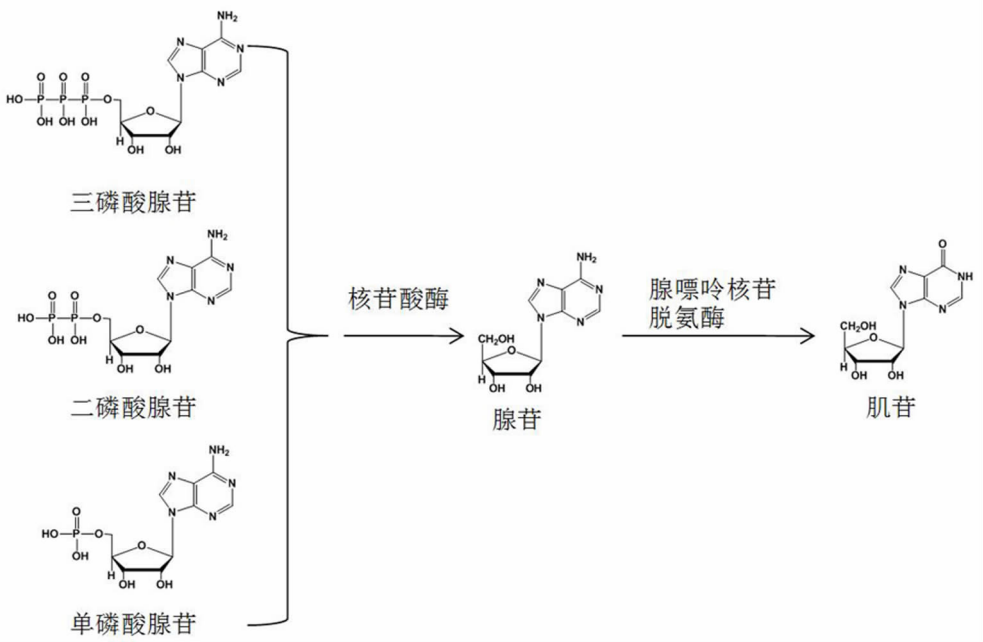


图3 冬虫夏草室温水提取过程中腺苷类成分转化路径图

表3 核苷添加试验冬虫夏草样本中各分析物的含量

实验	加入量(μmol)	含量(μmol)						
		三磷酸腺苷	二磷酸腺苷	单磷酸腺苷	腺苷	肌苷	次黄嘌呤	腺嘌呤
空白	0.000	—	—	—	0.686	0.820	0.213	—
添加三磷酸腺苷	0.780	—	—	—	1.064	1.095	0.207	—
添加二磷酸腺苷	0.780	—	—	—	1.035	1.010	0.231	—
添加单磷酸腺苷	0.780	—	—	—	1.034	1.084	0.238	—
添加腺苷	0.780	—	—	—	1.183	1.231	0.204	—
添加肌苷	0.780	—	—	—	0.707	1.521	0.213	—

注：“—”低于定量限无法准确测定。

4 小结

我们建立了一种同时测定冬虫夏草中7种核苷类成分的分析方法,并采用所建立的分析方法对添加核苷对照品前后的冬虫夏草样本溶液中核苷含量进行比较分析,结果显示在室温水超声提取条件下冬虫夏草水溶液中存在着腺苷酸(三磷酸腺苷、二磷酸腺苷和单磷酸腺苷)向腺苷的转化,腺苷向肌苷的转化,该结果将为冬虫夏草腺苷类成分的质量控制提升提供数据支持。

参考文献

[1]董彩虹,李文佳,李增智,等.我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言[J].菌物学报,2016,35(1):1-16.

[2]黄长胜.冬虫夏草[M].天津:天津科学技术出版社,2009:2.

[3]王林萍,余意,冯成强.冬虫夏草活性成分及药理作用研究进展[J].中国中医药信息杂志,2014,21(7):132-136.

[4]T. B. Ng, H. X. Wang. Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine [J]. Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57: 1509-1519.

[5]Yu L, Zhao J, Li SP, et al. Quality evaluation of Cordyceps through simultaneous determination of eleven nucleosides and bases by RP-HPLC[J]. Journal of Separation Science, 2006, 29(7): 953-958.

[6]Li SP, Li P, Ji H, et al. The nucleosides contents and their variation in natural Cordyceps sinensis and cultured Cordyceps Mycelia[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2001, 10(4): 175-179.

[7]Zhou XW, Gong ZH, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61(3): 279-291.

[8]Pelleg A, Pennock RS, Kutalek SP. Proarrhythmic effects of adenosine: one decade of clinical data[J]. American Journal of Therapeutics, 2002, 9(2): 141-147.

[9]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 86.

[10]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国

医药科技出版社, 2005: 75.

[11]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 106.

[12]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115.

[13]Ma KW, Chau FT, Wu JY. Analysis of the nucleoside content of Cordyceps sinensis using the stepwise gradient elution technique of thin-layer chromatography[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2004, 22(1): 85-91.

[14]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.

[15]Yang FQ, Li S, Li P, et al. Optimization of CEC for simultaneous determination of eleven nucleosides and nucleobases in Cordyceps using central composite design[J]. Electrophoresis, 2007, 28(11): 1681-1688.

[16]Feng K, Wang S, Hua DJ, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the nucleosides assessment of fungal strains isolated from natural Cordyceps sinensis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50: 522-526.

[17]陈玉婷,朱曼萍,王丹红,等. 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.

[18]Yang FQ, Li DQ, Feng K, et al. Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in Cordyceps by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 5501-5510.

[19]钱正明,孙培培,李文庆,等. 冬虫夏草高效液相特征图谱分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(2): 279-283.

[20]Li WQ, Li WJ, Qian ZM, et al. Rapid analysis of polar components in Ophiocordyceps sinensis by conventional liquid Chromatography System[J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(3): 217-221.

[21]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, 15(50): 1297-1300.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)