

长座虫草子实体和菌丝体中碱基和核苷类物质的 HPLC 分析

张 勋¹ 程文明^{1,2} 李春如³ 吴 昆¹ 陆维丽¹ 李 俊¹

摘要 建立高效液相色谱法同时测定长座虫草中 13 种核苷和碱基类物质,色谱条件为:TSKgel ODS-100V 色谱柱(250 mm×4.6 mm 5 μm),以甲醇-0.01 mol/L KH₂PO₄ 水溶液系统为流动相,梯度洗脱,流速 1 ml/min,检测波长 260 nm,柱温 20 ℃。13 种成分在 50 min 内均达到基线分离,线性关系良好($r \geq 0.999$ $n=8$);平均回收率在 98.4%~107.5% (RSD<2.0% $n=5$)。结果表明长座虫草子实体中胞嘧啶、次黄嘌呤含量相对较高;菌丝体中尿嘧啶、鸟苷、腺苷含量较高,尿苷在菌丝体和子实体中含量均较高。

关键词 长座虫草;高效液相色谱;核苷;碱基;提取;含量测定

中图分类号 R 284.1;R 931.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1283-04

2014-05-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30570004);天然药物活性组分与功效国家重点实验室资助项目(编号:SKLNMKF201416);安徽省自然科学基金(编号:090413105)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,安徽天然药物活性研究省级重点实验室,安徽省天然药物活性成分工程技术研究中心,合肥 230032

²天然药物活性组分与功效国家重点实验室(中国药科大学),南京 210009

³安徽农业大学林学院,安徽省微生物防治重点实验室,合肥 230036

作者简介:张 勋,男,硕士研究生;

程文明,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:chengwm919@hotmail.com

李春如,男,教授,责任作者,E-mail:chunruli@hotmail.com

长座虫草(*Ophiocordyceps longissima*)是寄生于同翅目蝉若虫上的一种重要的虫生真菌,1963年,首次在日本发现并命名。1999年,李春如等^[1]在国内首次采到此虫草,经鉴定,其无性型为长座被毛孢 *Hirsutella longissima*,并成功培育出未成熟的子座和孢梗束。目前有关长座虫草的研究尚集中在生态学 and 培养方法方面^[2],对化学成分研究少见报道。虫草含有多种有效成分,包括核苷、多糖、甾醇、肽类、有机酸等,具有抗肿瘤、抗氧化抗炎、神经系统、心血管系统、免疫调节等多种药理作用^[3-5]。核苷类物质为虫草中主要活性成分之一,其检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、毛细管电泳法、薄层色谱扫描法等^[6-7]。HPLC 法为最常见的核苷测定方法,但采用 HPLC 对 13 种核苷和碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷、β-胸苷、肌苷、虫草素)同时测定尚属首次。该研究对长座虫草子实体及菌丝体中 13 种核苷和碱基同时进行分析,为建立和提升长座虫草及其制品的质量控制方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);KQ-500E 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP211D 型电子天平(十万分

tioning group (Group SASP); DMSO plus sufentanil postconditioning group (Group DSSP); SAHA group (Group SA). Both measurement of plasma concentration of cardiac troponin I (cTnI) and calculation of IS/AAR were accomplished. **Results** In group NDM-SP, NDM-SASP and NDM-DSSP, the IS/ARR and plasma concentrations of cTnI significantly decreased compared with group NDM-I/R ($P < 0.05$). There was no statistical significance among groups of DM-I/R, DM-SP, DM-DSSP and DM-SA in the IS/ARR and plasma concentrations of cTnI ($P > 0.05$), while adding the intervention of sufentanil postconditioning to group DM-SP brought down indexes mentioned above dramatically ($P < 0.05$). **Conclusion** In the case that SAHA could restore the cardioprotective effects of sufentanil postconditioning which were once blocked due to T2DM, there might exist links between the mechanism of this obstruction and modification of histone acetylation/deacetylation.

Key words suberoylanilide hydroxamic acid; type 2 diabetes mellitus; sufentanil

之一,德国 Sartorius 公司)。

1.1.2 试剂与药材 对照品腺嘌呤(批号 131109)、鸟嘌呤(批号 131007)、次黄嘌呤(批号 130923)、尿嘧啶(批号 131020)、胞嘧啶(批号 131016)、胸腺嘧啶(批号 131106)、腺苷(批号 130324)、鸟苷(批号 130109)、肌苷(批号 130107)、胞苷(批号 130325)、尿苷(批号 130311)、 β -胸苷(批号 130226)购于上海融禾医药科技有限公司;虫草素(批号 MUST-12072711)购于成都曼斯特生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯(天津四友精细化学品有限公司);醋酸(批号 T20091120,分析纯,国药集团化学试剂有限公司);甲酸(分析纯,无锡市展望化工试剂有限公司);磷酸二氢钾(分析纯,批号 041209,广州西陇化工有限公司);长座虫草子实体和菌丝体由安徽农业大学李春如教授提供并鉴定。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取腺嘌呤 1.95 mg、鸟嘌呤 1.99 mg、次黄嘌呤 2.19 mg、尿嘧啶 2.01 mg、胞嘧啶 1.97 mg、胸腺嘧啶 1.96 mg、腺苷 2.02 mg、鸟苷 2.06 mg、胞苷 2.00 mg、尿苷 2.06 mg、 β -胸苷 2.04 mg、肌苷 2.15 mg 和虫草素 2.09 mg,置 10 ml 容量瓶中,分别用 0.01 mol/L 的 KH_2PO_4 水溶液定容至刻度(鸟嘌呤除外),鸟嘌呤用 0.1 mol/L 的 HCl 定容至刻度^[8],制得浓度为 0.2 mg/ml 的对照品溶液。分别精密吸取 13 种对照品溶液 1 ml,充分混匀,即得混合对照品溶液,此时溶液浓度约为 0.015 mg/ml。

1.2.2 色谱条件 TSKgel ODS-100V 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.01 mol/L 的 KH_2PO_4 水溶液,流动相 B 为甲醇,检测波长 260 nm,柱温 20 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 ml/min,进样量 20 μl ,梯度洗脱 0~12 min, B 0%~2%;12~23 min, B 2%~5%;23~35 min, B 5%~20%;35~45 min, B 20%;45~55 min, B 20%~0%;55~60 min, B 0%。在此条件下,13 个核苷和碱基成分均在 50 min 内出峰完毕,且分离度和峰形较好。色谱图见图 1。

1.2.3 供试品溶液的配制^[9] 称取长座虫草子实体和菌丝体粉末各 1 g 至圆底烧瓶中,分别加入 20 ml 水,超声提取 2 h,过滤,水洗滤渣 2 次,滤液转移至 50 ml 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得。

1.3 统计学处理 采用 Excel 2010 软件对数据进行处理。

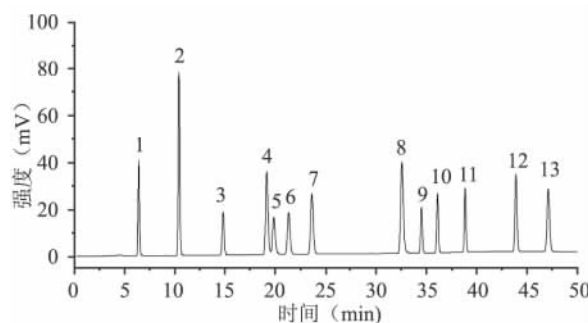


图 1 混合对照品的 HPLC 图

1: 胞嘧啶; 2: 尿嘧啶; 3: 胞苷; 4: 次黄嘌呤; 5: 鸟嘌呤; 6: 尿苷; 7: 胸腺嘧啶; 8: 腺嘌呤; 9: 肌苷; 10: 鸟苷; 11: β -胸苷; 12: 腺苷; 13: 虫草素

2 结果

2.1 线性关系考察 将混合对照品溶液用流动相逐级稀释成 1、2、4、8、16、20、40、100 倍浓度的混合对照品溶液,以 1.2.2 项下条件分别进样 20 μl ,以对照品浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,检测限和定量限分别为信噪比 $S/N = 3$ 和 $S/N = 10$ 。线性方程和相关系数见表 1。

表 1 13 种化合物的线性方程和相关系数

化合物	线性方程	r 值	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	检测限 (ng/ml)	定量限 (ng/ml)
胞嘧啶	$Y = 52\,196X + 3\,589.4$	0.999 7	0.15 ~ 15.15	2.31	7.62
尿嘧啶	$Y = 108\,810X + 8\,397.2$	0.999 7	0.15 ~ 15.46	1.24	4.08
胞苷	$Y = 33\,596X + 2\,939.9$	0.999 8	0.15 ~ 15.38	4.85	16.00
次黄嘌呤	$Y = 72\,926X + 5\,192.4$	0.999 6	0.04 ~ 16.85	10.54	34.77
鸟嘌呤	$Y = 40\,114X + 2\,428.9$	0.999 4	0.15 ~ 15.31	9.53	31.46
尿苷	$Y = 41\,926X + 2\,806.4$	0.999 8	0.16 ~ 15.85	4.92	16.23
胸腺嘧啶	$Y = 64\,016X + 5\,207.2$	0.999 6	0.15 ~ 15.08	4.69	15.46
腺嘌呤	$Y = 100\,851X + 5\,796.1$	0.999 7	0.15 ~ 15.00	9.39	31.00
肌苷	$Y = 29\,236X + 3\,077.7$	0.999 3	0.17 ~ 16.54	5.15	17.00
鸟苷	$Y = 39\,089X + 2\,761.7$	0.999 5	0.16 ~ 15.85	4.92	16.23
β -胸苷	$Y = 42\,089X + 2\,851.1$	0.999 5	0.16 ~ 15.69	4.85	16.00
腺苷	$Y = 62\,169X + 6\,009.6$	0.999 0	0.16 ~ 15.54	2.47	8.15
虫草素	$Y = 62\,071X + 6\,874.8$	0.999 0	0.16 ~ 16.08	2.54	8.38

2.2 精密度实验 取混合对照品溶液,依 1.2.2 项下色谱条件测定,连续进样 6 次,每次进样 20 μl ,记录峰面积,计算 13 种成分的峰面积相对标准偏差(RSD)。结果胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、 β -胸苷、腺苷、虫草素的 RSD 分别为 0.85%、1.07%、0.98%、0.73%、1.12%、1.40%、1.20%、1.72%、1.57%、0.86%、1.54%、1.21%、1.27%,表明该方法精密度

良好。

2.3 稳定性实验 按 1.2.3 项下配制供试品溶液, 分别于配置后 0、3、6、12、24 h 进样 20 μ l, 记录峰面积, 计算 13 种成分的峰面积 RSD。结果胞嘧啶、尿嘧啶、胞苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、 β -胸苷、腺苷、虫草素的峰面积 RSD 分别为 1.43%、1.01%、0.78%、1.12%、1.54%、1.27%、1.33%、1.57%、1.61%、1.10%、1.51%、0.90%、0.81%。表明该方法在 24 h 内稳定。

2.4 重复性实验 精密称取长座虫草子实体粉末 5 份, 每份 0.2 g, 按 2.3 项下方法配制供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件测定, 计算各成分含量。结果 13 种碱基和核苷的含量 RSD 值均小于 2.0%。表明该方法重复性良好。

2.5 加样回收率实验 取已知含量的长座虫草子实体粉末 5 份, 每份 0.2 g, 精密称定, 分别加入 13 种对照品溶液适量, 按 1.2.3 项下方法制成加样供试品溶液, 按 1.2.2 项下色谱条件测定, 计算各对照品的平均加样回收率和 RSD。结果表明 13 种物质的回收率良好, 见表 2。

2.6 含量测定 精密称取长座虫草子实体和菌丝体粉末, 按 1.2.3 项下方法制成供试品溶液, 按照 1.2.2 项下色谱条件进行测定, 计算各成分含量, 结果见表 3, 色谱图见图 2。

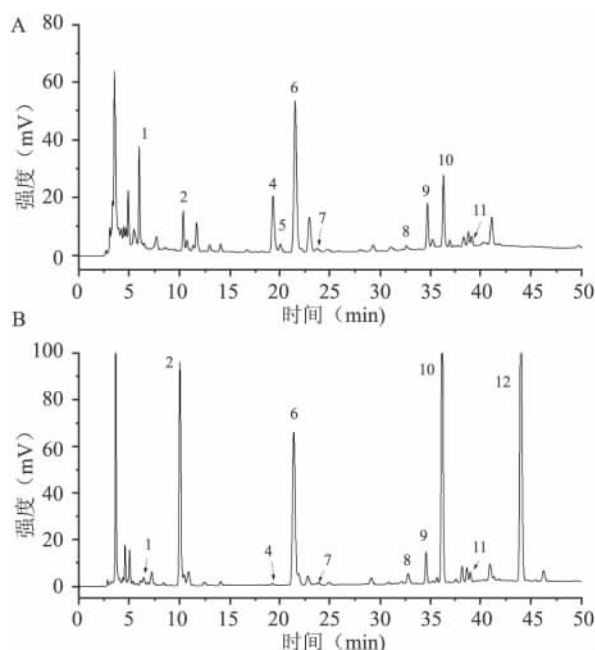


图2 子实体和菌丝体 HPLC 图

A: 子实体; B: 菌丝体; 1: 胞嘧啶; 2: 尿嘧啶; 3: 胞苷; 4: 次黄嘌呤; 5: 鸟嘌呤; 6: 尿苷; 7: 胸腺嘧啶; 8: 腺嘌呤; 9: 肌苷; 10: 鸟苷; 11: β -胸苷; 12: 腺苷; 13: 虫草素

表2 13种化合物的加样回收率($n=5$)

化合物	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
胞嘧啶	0.280	0.276	0.568	104.51	2.25
尿嘧啶	0.056	0.060	0.287	101.71	1.59
胞苷	—	0.550	0.552	99.73	1.75
次黄嘌呤	0.223	0.219	0.451	104.01	1.61
鸟嘌呤	0.050	0.050	0.099	99.97	1.18
尿苷	1.176	1.160	2.342	100.51	3.69
胸腺嘧啶	0.112	0.118	0.229	99.59	1.03
腺嘌呤	0.010	0.019	0.030	102.32	1.54
肌苷	0.343	0.344	0.686	99.70	1.90
鸟苷	0.428	0.412	0.871	107.47	1.13
β -胸苷	0.031	0.041	0.071	98.69	1.35
腺苷	—	0.501	0.514	102.80	0.90
虫草素	—	0.570	0.561	98.38	1.61

“—”表示未检测出

表3 长座虫草子实体和菌丝体 13 种化合物的平均含量($n=5$)

化合物	菌丝体(mg/g)	子实体(mg/g)
胞嘧啶	0.017	0.252
尿嘧啶	0.556	0.060
胞苷	—	—
次黄嘌呤	0.005	0.224
鸟嘌呤	—	0.052
尿苷	0.965	1.182
胸腺嘧啶	0.010	0.011
腺嘌呤	0.053	0.010
肌苷	0.389	0.301
鸟苷	2.114	0.336
β -胸苷	0.044	0.030
腺苷	1.496	—
虫草素	—	—

“—”表示未检测出

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 核苷和碱基为水溶性物质, 对核苷类提取一般选用水、甲醇和乙醇等溶剂^[10]。本实验考察了不同提取溶剂, 对核苷和碱基类成分提取的影响。采用水、20% 甲醇、50% 甲醇、60% 甲醇、75% 甲醇、甲醇做溶剂, 结果表明随着甲醇的浓度增大, 核苷和碱基的总量有明显下降趋势, 所以选择水作为提取溶剂。

3.2 色谱条件和色谱柱 在流动相系统的选择中, 先后试用了 2 种有机相: 甲醇和乙腈; 3 种水相: 2% 醋酸水溶液、2% 甲酸水溶液、0.01 mol/L 的 KH_2PO_4 水溶液。水相使用醋酸和甲酸时, 13 种物质分离度不佳, 尤其是次黄嘌呤和鸟嘌呤。使用甲醇-0.01 mol/L 的 KH_2PO_4 水溶液系统时, 所有物质达到基线分离。选择色谱柱时, 比较了 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)和 TSK-gel ODS-100V 亲水反相柱。结果显示成分在 TSK-

gel ODS-100V 柱上的分离效果和峰型更好,又考虑到核苷和碱基的色谱条件,需要用到 100% 水相作为流动相,而纯水相对普通 ODS 柱损伤较大,减少使用寿命,故选择亲水柱^[11]。

3.3 含量测定结果 结果表明长座虫草子实体和菌丝体中都未检测出胞苷和虫草素。子实体中胞嘧啶和次黄嘌呤含量相对较高;菌丝体中尿嘧啶、鸟苷和腺苷含量较高,尿苷在菌丝体和子实体中含量均较高,且含量差别不大。菌丝体中鸟苷含量是子实体中含量的 6~7 倍,腺苷在菌丝体中含量较高,但在子实体中未检出。长座虫草菌丝体中碱基和核苷类物质的整体含量高于子实体。

本实验对长座虫草子实体及菌丝体中 13 种核苷和碱基类成分进行首次分析,该方法简便、快速、准确,重复性好,可以为建立长座虫草及其制品的质量控制标准提供参考依据。

参考文献

- [1] 李春如,樊美珍. 被毛孢属一新种——长座虫草的无性型[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 29-34.
- [2] Sung G H, Shrestha B, Han S K et al. Growth and cultural characteristics of ophiocordyceps longissima collected in Korea [J]. Mycobiology, 2011, 39(2): 85-91.
- [3] 傅 岗,陈作红. 虫草属真菌化学成分及药理作用研究进展[J]. 生命科学研究, 2004, 8(1): 1-4.
- [4] Das S K, Masuda M, Sakurai A, et al. Medicinal uses of the mushroom Cordyceps militaris: Current state and prospects [J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 961-8.
- [5] 崔宏福,刘乾中,应燕红. 虫草菌粉对兔矽肺纤维化早期干预作用的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(10): 1201-4.
- [6] 毛新亮,郑国栋. 反相高效液相色谱法同时测定冬虫夏腺苷、虫草素、肌苷含量方法的研究[J]. 中南药学, 2009, 7(12): 895-7.
- [7] 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(11): 1955-60.
- [8] 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): 218-8.
- [9] Guo F Q, Li A, Huang L F et al. Identification and determination of nucleosides in Cordyceps sinensis and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(3): 623-30.
- [10] 李万方,宋 健. 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): 342-4.
- [11] Cao X W, Li J, Chen S B et al. Simultaneous determination of nine nucleosides and nucleobases in different Fritillaria species by HPLC-diode array detector [J]. J Sep Sci, 2010, 33(11): 1587-94.

Determination of thirteen nucleosides and nucleobases in the fruiting body and mycelium of *Ophiocordyceps longissima* by HPLC

Zhang Xun¹, Cheng Wenming^{1,2}, Li Chunru³, et al

(¹ Anhui Provincial Key Laboratory of Bioactivity of Natural Product, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³ Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract An HPLC method was established for simultaneous determination of 13 nucleosides and nucleobases in *Ophiocordyceps longissima*. The separation was performed on a TSK gel ODS-100V column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using gradient elution with an aqueous potassium dihydrogen phosphate-methanol solution at 260 nm. The flow rate was 1.0 ml/min and column temperature was 20 °C. Thirteen nucleosides and nucleobases were analyzed within 50 min. The calibration curves showed good linear relationship ($r \geq 0.999 0$, $n = 8$) and the method exhibited excellent accuracy with a recovery of 98.4 to 107.5% (RSD < 2.0%, $n = 5$). Higher content of cytosine and hypoxanthine were detected in the fruiting body. The contents of adenosine, uracil, guanosine were relatively rich in mycelium of *Ophiocordyceps longissima*. Uridine was abundant both in fruiting body and mycelium of *Ophiocordyceps longissima*.

Key words *Ophiocordyceps longissima*; HPLC; nucleosides; nucleobases; extract; determination