

皖产古尼虫草中核苷和碱基成分的 HPLC 分析

武为宝 唐军

(安徽省六安市药品检验所 六安 237006)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定皖产古尼虫草中核苷和碱基成分(尿嘧啶、虫草素、腺苷、腺嘌呤、尿苷、次黄嘌呤、肌苷和鸟苷)的含量,并比较其与天然冬虫夏草核苷和碱基成分的异同。方法: 采用 Zorbax SB-Aq(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以水-乙腈为流动相,梯度洗脱,流速为 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 20℃。结果: 尿嘧啶、虫草素、腺苷、腺嘌呤、尿苷、次黄嘌呤、肌苷和鸟苷进样浓度分别在 0.38~191.08, 0.37~188.48, 0.37~189.72, 0.37~190.92, 0.37~188.55, 0.50~168.55, 0.37~190.36, 0.24~125.00 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, R^2 为 0.9998~0.9999; 加样回收率分别为 102.1%, 102.1%, 95.3%, 96.2%, 96.9%, 94.1%, 108.7%, 101.8%, RSD 未超过 2.8%。皖产古尼虫草和冬虫夏草均含有核苷和碱基成分,其中: 皖产古尼虫草含有较高的尿嘧啶、尿苷、腺苷,而冬虫夏草中肌苷含量较高;二者的次黄嘌呤、鸟苷、腺嘌呤的含量相近;在该检测限下,两者均未测得虫草素。结论: 初步认为: 皖产古尼虫草核苷和碱基成分与冬虫夏草具有一定的相似性,但尚有待扩大样本量作进一步的验证。

关键词: 高效液相色谱; 核苷; 碱基; 尿嘧啶; 虫草素; 腺苷; 腺嘌呤; 尿苷; 次黄嘌呤; 肌苷; 鸟苷; 古尼虫草; 冬虫夏草

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1668-04

HPLC determination of nucleosides and bases in natural *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berker. Hook produced in Anhui province

WU Wei-bao, TANG Jun

(Liu'an Institute for Drug Control, Liu'an 237006, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for simultaneous determination of nucleosides and bases including uracil, cordycepin, adenine, adenosine, uridine, hypoxanthine, inosine and guanosine in natural *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berker. Hook produced in Anhui province, and compare the data with those of natural *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. produced in Qinghai province. **Methods:** The HPLC analysis was performed on a Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column using gradient elution with mobile phase of water and acetonitrile. The assay was carried out at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ at 20℃ with the diode-array detection at 260 nm. **Results:** Uracil, cordycepin, adenosine, adenine, uridine, hypoxanthine, inosine and guanosine showed good linearity in the ranges of 0.38~191.08, 0.37~188.48, 0.37~189.72, 0.37~190.92, 0.37~188.55, 0.50~168.55, 0.37~190.36 and 0.24~125.00 μg·mL⁻¹ with R^2 = 0.9998~0.9999, and their average recoveries were 102.1%, 102.1%, 95.3%, 96.2%, 96.9%, 94.1%, 108.7% and 101.8%, respectively, with overall RSD ≤ 2.8%. The analytes except cordycepin were detected in both *C. gunnii* and *C. sinensis*. Both had similar contents of adenine, hypoxanthine and guanosine. But *C. gunnii* contained higher contents of uracil, uridine and adenosine, while *C. sinensis* had rich inosine. **Conclusion:** The results suggested that both *C. gunnii* produced in Anhui province and *C. sinensis* had similar characters of nucleosides and bases, which need confirmation with more data.

Key words: HPLC; nucleosides; bases; uracil; cordycepin; adenine; adenosine; uridine; hypoxanthine; inosine; guanosine; *Cordyceps gunnii*; *Cordyceps sinensis*

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上

的子座和幼虫尸体的干燥复合体^[1],具有广泛的疗效。虫草的药理作用涉及到虫草多糖、氨基酸、核苷等多种活性成分^[2],其中核苷类物质为冬虫夏草的主要活性成分之一,尤以腺苷具有明显的药理作用,因此核苷类已被用作冬虫夏草的质控指标^[3]。由于冬虫夏草生长环境特殊,产量有限,加上近年的过度采集,使得虫草资源更加紧缺。因此寻找冬虫夏草的替代品成了热点问题。

古尼虫草(*Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk. Hook)是一种虫生真菌,1983年被首次报道,后在湖南省浏阳等地发现^[4]。2008年,安徽省六安市金寨县出现大量虫草,当地更是万人空巷,众多村民集体上山挖掘虫草,也吸引大批外地虫草采购者。皖产古尼虫草的化学成分特征至今未有报道。本文建立了HPLC法同时测定皖产古尼虫草中尿嘧啶、虫草素、腺苷、腺嘌呤、尿苷、次黄嘌呤、肌苷和鸟苷8个核苷和碱基成分,并以青海产天然冬虫夏草为参照,比较了皖产古尼虫草的核苷和碱基成分特征。

1 仪器、试剂与样品

Agilent 1100 高效液相色谱仪包括四元泵、自动进样器、在线真空脱气机、二极管阵列检测器(DAD)、柱温箱及工作站;Millipore Milli-Q Plus超纯水制备系统;Buchi 旋转蒸发器;BRANSON 8510E-DTH 超声仪;Beckman Allegra X-15R 型冷冻离心机。

对照品尿嘧啶、虫草素、腺嘌呤、腺苷、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷均购自美国 Sigma 公司,纯度均>98%;水为 Milli-Q 超纯水,用于 HPLC 分析的乙腈、甲醇等试剂均为色谱纯,购自德国 Merck 公司(Darmstadt, Germany)。

冬虫夏草采自青海省湟中县,古尼虫草采自安徽省金寨县。样品均由产地药材收集混批后(总量在1 kg以上)随机抽取,经澳门大学李绍平教授鉴定,分别为冬虫夏草[*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.]和古尼虫草[*Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk. Hook]。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 分别称取对照品尿嘧啶、虫草素、腺嘌呤、腺苷、次黄嘌呤、尿苷、肌苷、鸟苷适量,精确称定后置于量瓶中,用 Milli-Q 水溶解、定容,制成储备液。分别精密吸取上述对照品储备液各0.2 mL,置于2 mL Eppendorf 管中,涡旋混

匀,制得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 选取自然干燥后虫体与子座完好的正常个体,去泥沙后置于30~35℃烘箱中,低温干燥5~6 h。取出后用研钵研细成粉,置于塑料管中标记后密封,25℃恒温干燥箱内保存。供试品溶液制备参照文献方法^[5],实验前分别称取冬虫夏草和皖产古尼虫草各2份,每份0.2 g,置于具塞玻璃管中,100℃烘箱中干燥30 min后,加入90℃以上的沸水10 mL,冷后称重、密封,于100℃煮提30 min;取出后冷却至室温,准确称重,用 Milli-Q 超纯水补足失重。将提取液及药渣于3500 r·min⁻¹高速离心15 min,取上清液过0.45 μm 滤膜后供 HPLC 分析用。

2.3 色谱条件 采用 Zobax SB-Aq(250 mm×4.6 mm 5 μm) 色谱柱,预柱为 Zobax SB-C₁₈ 保护柱(20 mm×3.9 mm 5 μm),流动相为水(A)-乙腈(B) 梯度洗脱(0~10 min 0% B;10~40 min 0%→25% B),流速为0.8 mL·min⁻¹,柱温20℃,DAD 检测波长为260 nm,进样量10 μL。在此条件下,8个核苷及碱基成分均在40 min内出峰完毕,且峰形良好,分离度>1.5;对比混合对照品与药材色谱图的保留时间和UV特征光谱图后,可见药材中的其他成分对待测组分的含量测定无干扰,符合定量要求。混合对照品及样品 HPLC-DAD 色谱图见图1。

2.4 线性关系考察 准确吸取上述混合对照品溶液适量,用 Milli-Q 超纯水稀释成至少6个浓度的系列混合对照品溶液,过0.45 μm 微孔滤膜后供 HPLC 分析,所得8个化合物线性回归方程见表1。

2.5 精密度考察 取高(尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤、虫草素浓度分别为71.3, 70.3, 47.8, 70.8, 46.4, 70.8, 71.0, 70.3 μg·mL⁻¹)、中(尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤、虫草素浓度分别为47.5, 46.9, 31.9, 47.2, 30.9, 47.2, 47.3, 46.9 μg·mL⁻¹)、低(尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤、虫草素浓度分别为23.8, 23.4, 15.9, 23.6, 15.5, 23.6, 23.7, 23.4 μg·mL⁻¹) 3个浓度的混合对照品溶液,1 d内分别连续进样6次或连续3 d内每天进样2次,计算各峰面积,分别考察日内和日间精密度,结果见表2。

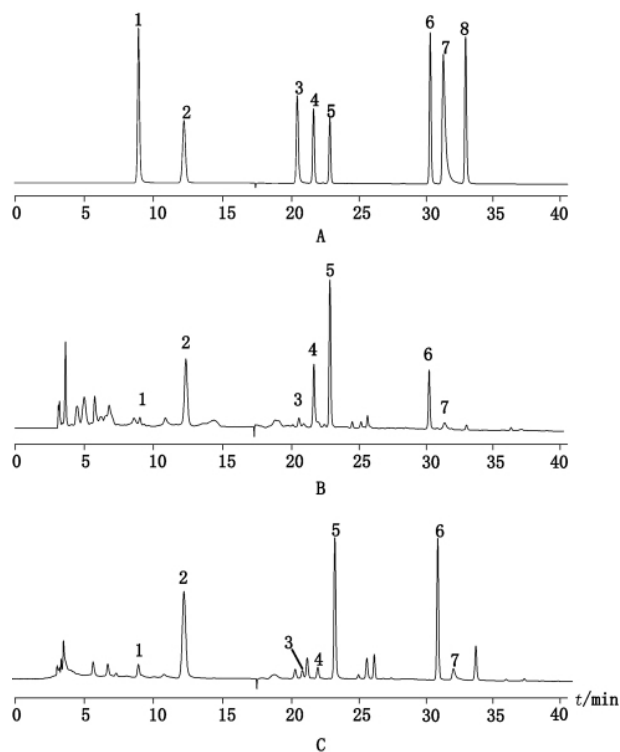


图1 混合对照品及样品的 HPLC-DAD 色谱图

Fig 1 HPLC-DAD chromatograms of investigated compounds and samples
 A. 对照品(mixed standards) B. 青海产冬虫夏草(natural *C. sinensis* produced in Qinghai) C. 皖产古尼虫草(natural *C. gunnii* produced in Anhui)
 1. 尿嘧啶(uracil) 2. 尿苷(uridine) 3. 次黄嘌呤(hypoxanthine)
 4. 肌苷(inosine) 5. 鸟苷(guanosine) 6. 腺苷(adenosine)
 7. 腺嘌呤(adenine) 8. 虫草素(cordycepin)

表1 标准曲线、检测限(LOD)及定量限(LOQ)的测定结果

Tab 1 Linear regression data of the investigated compounds

被分析物 (analytes)	线性方程 (linear equation)	R^2	线性范围 (linearity range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
尿嘧啶(uracil)	$Y = 4.910 \times 10^4 X - 4.8$	0.9999	0.371 - 191.080
尿苷(uridine)	$Y = 2.999 \times 10^4 X - 5.7$	0.9999	0.366 - 188.550
次黄嘌呤 (hypoxanthine)	$Y = 4.315 \times 10^4 X - 8.2$	0.9998	0.498 - 168.550
肌苷(inosine)	$Y = 2.067 \times 10^4 X - 4.9$	0.9998	0.369 - 190.360
鸟苷(guanosine)	$Y = 2.654 \times 10^4 X - 9.3$	0.9998	0.242 - 125.000
腺苷(adenosine)	$Y = 3.926 \times 10^4 X - 6.0$	0.9999	0.369 - 189.720
腺嘌呤(adenine)	$Y = 6.735 \times 10^4 X - 45.1$	0.9998	0.370 - 190.920
虫草素(cordycepin)	$Y = 4.220 \times 10^4 X - 12.1$	0.9999	0.366 - 188.480

2.6 重复性考察 精密称取古尼虫草菌样品 0.1 g 0.2 g 0.3 g 各 3 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别测定,以 3 次测定的峰面积的 RSD 作为重复性考察指标,结果所有被测组分在低、中和高 3 个取样量条件下的 RSD 分别小于为 1.6% , 1.1% , 1.4% 。

表2 日内、日间精密度试验结果

Tab 2 Intra- and inter-day precision of the investigated compounds

被分析物(analytes)	日内精密度 (intra-day precision of the investigated compounds) ,			日间精密度 (inter-day precision of the investigated compounds) ,		
	RSD / % (n = 6)			RSD / % (n = 6)		
	高浓度 (high conc.)	中浓度 (medium conc.)	低浓度 (low conc.)	高浓度 (high conc.)	中浓度 (medium conc.)	低浓度 (low conc.)
尿嘧啶(uracil)	0.14	0.17	0.86	0.92	0.19	0.50
尿苷(uridine)	0.35	0.13	0.75	0.68	0.23	0.34
次黄嘌呤 (hypoxanthine)	0.31	0.35	0.92	0.99	0.26	0.48
肌苷(inosine)	0.33	0.11	0.97	0.75	0.17	0.60
鸟苷(guanosine)	0.36	0.08	0.88	0.61	0.18	0.58
腺苷(adenosine)	0.30	0.11	0.84	0.74	0.13	0.62
腺嘌呤(adenine)	0.15	0.09	0.88	0.96	0.10	0.57
虫草素(cordycepin)	0.38	0.10	0.87	0.81	0.19	0.51

2.7 加样回收率考察 精密称取已知含量(尿嘧啶 $0.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、尿苷 $1.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、次黄嘌呤 $0.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、肌苷 $0.39 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、鸟苷 $1.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、腺苷 $0.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、腺嘌呤 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的皖产古尼虫草粉末 3 份,每份 0.10 g,按各成分在样

品中的含有量分别精密加入等量的核苷及碱基的对照品溶液(虫草素为其标准曲线范围内一定量),按“2.2”项下方法制备供试液,测定并计算加样回收率。结果:尿嘧啶、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤、虫草素平均加样回收率($n = 3$) 和 RSD

分别为 102.1% ,1.1% ; 96.9% ,0.1% ; 94.1% , 2.8% ; 108.7% ,0.5% ; 101.8% ,0.2% ; 95.3% , 0.2% ; 96.2% ,0.6% ; 102.1% ,1.2% 。

2.8 样品测定 精密称取虫草样品粉末 0.2 g ,按“2.2”项下方法制备供试品溶液 ,每个样品平行制备 2 份溶液。分别测定样品中 8 个核苷及碱基含量。通过对比相同色谱条件下的样品和对照品之间各个色谱峰的紫外吸收光谱和保留时间 ,判断被测成分的色谱峰归属。结果见表 3 ,青海天然冬虫夏草与皖产古尼虫草均未测得虫草素 ,皖产古尼虫草中含有较高的尿嘧啶、尿苷、腺苷 ,而青海产冬虫夏草中肌苷含量较高 ,二者次黄嘌呤、鸟苷、腺嘌呤含量相近。

表 3 含量测定结果(mg · g⁻¹ , n = 2)

Tab 3 Contents(mg · g⁻¹) of eight investigated compounds in the two samples of *Cordyceps*

被分析物 (analytes)	青海天然冬虫夏草 (natural <i>C. sinensis</i> produced in Qinghai)	皖产古尼虫草 (natural <i>C. gunnii</i> produced in Anhui)
尿嘧啶(uracil)	0.04	0.07
尿苷(uridine)	0.98	1.40
次黄嘌呤 (hypoxanthine)	0.07	0.09
肌苷(inosine)	0.80	0.39
鸟苷(guanosine)	1.26	1.22
腺苷(adenosine)	0.36	0.67
腺嘌呤(adenine)	0.08	0.08
虫草素(cordycepin)	未检测到(not detected)	未检测到(not detected)

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 由于核苷类和碱基类化合物的极性较大 ,因此选择可以用纯水做流动相的 Zorbax SB - Aq 分析柱用于本实验的色谱分离^[6] ,结果表明: 被分析物在乙腈 - 水为流动相体系中有很好的分离度。

3.2 不同虫草的化学成分特征

关于虫草属真菌中核苷类化学成分的研究报道较多 ,主要集中在冬虫夏草、蛹虫草及其发酵菌丝体^[7~9] ,只有少量报道古尼虫草核苷类成分的分析^[10] ,通过对比文献报道的湖南产古尼虫草核苷类成分测定结果 ,发现: 湖南产古尼虫草中腺苷的含量约为皖产古尼虫草的 2 倍 ,而后的尿苷含量远远大于前者 ,并与参考文献中所测西藏产天然冬虫夏草相近。不同产地古尼虫草核苷的差别 ,可能与其生长环境或样品处理方法^[5] 等有关。本研究结果表明: 皖产古尼虫草与青海产冬虫夏草含有相同的核苷和碱基成分 ,两者次黄嘌呤、鸟苷、腺嘌呤的含量相近 ,但古尼虫草中尿嘧啶、尿苷和腺苷的含量

是青海冬虫夏草的 1 ~ 2 倍 ,青海冬虫夏草则含有较高量的肌苷。

虽然冬虫夏草中确有虫草素(3' - 脱氧腺苷) 存在^[11] ,但因含量低 ,常规 HPLC 方法难以检测^[12] ,本研究虽未能从青海冬虫夏草和皖产古尼虫草中检出虫草素 ,但皖产古尼虫草是否含有虫草素尚有待进一步分析。

参考文献

- 1 ChP(中国药典) . 2010. Vol I (一部) : 106
- 2 Li SP ,Yang FQ ,Tsim KW. Quality control of *Cordyceps sinensis* , a valued traditional Chinese medicine. *J Pharm Biomed Anal* 2006 , 41(5) : 1571
- 3 Li SP ,Wang YT. Pharmacological Activity - Based Quality Control of Chinese Herbs. USA: Nova Science Publishers Inc. 2008. 139
- 4 Xu JT. Chinese Medicinal Mycology(中国药用真菌学) . Beijing(北京) : Peking Union Medical College Press(中国协和医科大学出版社) ,1997
- 5 Yang FQ ,Li SP. Effects of sample preparation methods on the quantification of nucleosides in natural and cultured *Cordyceps*. *J Pharm Biomed Anal* 2008 ,48(1) : 231
- 6 Feng K ,Wang S ,Hu DJ *et al.* Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the nucleosides assessment of fungal strains isolated from natural *Cordyceps sinensis*. *J Pharm Biomed Anal* 50(3) : 522
- 7 LIU Jing - ming(刘静明) ,ZHONG Yu - rong(钟裕荣) ,YANG Zhi(杨智) . Studies on the chemical constituents of *Cordyceps militaris* (L.) Link(蛹虫草化学成分研究) . *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) ,1989 ,14(10) : 608
- 8 LI Shao - ping(李绍平) ,LI Ping(李萍) ,JI Hui(季晖) *et al.* Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* by capillary electrophoresis(毛细管电泳法测定冬虫夏草中核苷类的含量) . *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) ,2001 21(2) : 77
- 9 Yang FQ ,Li SP ,Li P ,*et al.* Optimization of CEC for simultaneous determination of eleven nucleosides and nucleobases in *Cordyceps* using central composite design. *Electrophoresis* 2007 28(11) : 1681
- 10 CHEN Zuo - hong(陈作红) ,TIAN Xiang - rong(田向荣) ,MENG Xiang - xian(孟祥闲) ,*et al.* Determination of nucleosides in *Cordyceps gunnii* by HPLC(古尼虫草核苷类成分的高效液相色谱分析) . *Mycosystema*(菌物系统) 2003 22(3) : 489
- 11 Fan H ,Li SP ,Yang FQ *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) . *Anal Chim Acta* 2006 567(2) : 218
- 12 Li SP ,Li P ,Lai CM *et al.* Simultaneous determination of ergosterol , nucleosides and their bases from natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high - performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2004 ,1036(2) : 239

(本文于 2011 年 3 月 17 日收到)