

泰山虫草菌丝体与冬虫夏草有效成分的 TLCS 分析*

赵雪梅, 毕研平, 苏延友, 王桂玲, 费洪荣

(泰山医学院药学院, 山东 泰安, 271016)

摘 要 以腺苷、尿苷、次黄嘌呤核苷、虫草素及次黄嘌呤为指标, 测定泰山虫草菌丝体与天然冬虫夏草中相应成分的含量, 探索泰山虫草代替天然冬虫夏草开发药物或保健食品的可能性。采用 80% 乙醇超声提取, 在 GF254 硅胶板上点样后, 以薄层色谱扫描法(TLCS)测定上述各种成分的含量。首次证明泰山虫草菌丝体核苷类及次黄嘌呤等有效成分含量明显高于冬虫夏草。其腺苷、尿苷、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤含量分别是冬虫夏草的 8.25 倍、3.76 倍、11.8 倍和 1.55 倍。2 种虫草中有效成分的含量均表现为尿苷>次黄嘌呤核苷>腺苷>次黄嘌呤>虫草素。说明泰山虫草可以作为冬虫夏草代用品进行综合开发利用。TLCS 法简便快速, 重现性、稳定性良好, 能有效地对虫草中的有效成分进行定性定量分析。

关键词 泰山虫草菌丝体, 尿苷, 腺苷, 次黄嘌呤核苷, 次黄嘌呤, 虫草素

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis* (Berk.) sacc)是一种寄生于昆虫体上的真菌与其寄主昆虫形成的虫菌复合体, 以四川产量最大。至今已知虫草属共 137 种, 供药用的尚有蝉花菌(*Cordyceps sobolifera* (Hill) Berk. et Br)、蛹草菌(*C. militaris* (L.) Link)、亚香棒(*C. hawkesii* Gray)和凉山虫草(*C. liangshanensis* Zhang, Liu et hu)等^[1]。其主要生物活性成分包括 D-甘露醇、多糖、核苷类(包括虫草素)、多种微量元素和维生素。传统中医认为, 虫草味甘性平, 可补肾益肺, 止血化痰, 与人参、鹿茸并称“三大补药”。现代药理学研究表明, 虫草具有扩张支气管、控制心跳、镇静催眠、雄性激素样等作用, 还具有抗癌、抑菌和提高机体免疫功能等作用^[2]。天然的冬虫夏草有严格的寄生性和特殊的生长地理环境, 因而产量有限, 且不能人工培养, 再加上人为的滥采, 使得虫草资源日益匮乏, 因此积极寻找其代用品变得越来越紧迫。泰山虫草生长在海拔 1 500 m 的泰山上, 生态环境的不同, 使其各成分在含量上势必存在一定的差异。虫草是一种复型真菌, 由有性型(子实体)与无性型(菌丝体)组成。菌丝体是产生活性物质的基础, 开发利用菌丝体作为药物和保健食品是虫草资源开发的重要途径。

近些年来, 采用薄层扫描法测定虫草中有效成分的含量研究已有报道。于振成等最先采用双波长反射法锯齿扫描测定了金水保胶囊中腺苷的含量^[3];

随后, 吕武清^[4]、高道侠等^[5]采用薄层扫描法分别测定了金水保胶囊中腺嘌呤和鸟苷的含量; 米莉莉等采用 TLCS 对不同产地天然虫草及不同厂家人工菌粉(丝)共 14 个样品中的核苷类成分如腺苷、尿苷、鸟苷进行了含量测定^[6], 本研究通过采用双波长薄层扫描法, 首次对泰山虫草菌丝体和冬虫夏草的有效成分如腺苷、尿苷、次黄嘌呤核苷、虫草素及次黄嘌呤做定性定量研究, 以便为泰山虫草作为冬虫夏草代用品及泰山虫草的进一步综合开发提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DESAGA-CD60 薄层扫描仪及配套定量点样毛细管(1/2/5 μL)及分析软件(德国 DESAGA 公司); 分析天平(奥豪斯公司 AR2140, 1/1000); 离心机(常州国华电器有限公司); 高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂 LDZX-40BI 型); 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司 SW-CJ-2F 型); 恒温摇床(太仓市实验设备厂 DHZ-DA 型); 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司 KQ-250DB 型); 恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司 202-2AB 型)。

1.2 试剂

样品: 冬虫夏草(青海玉树产); 泰山虫草菌丝体摇瓶发酵制得(菌株由泰山医学院药学院苏延友教授提供)。对照品: 腺苷、尿苷、虫草素(天津一方科技有限公司); 次黄嘌呤核苷(上海伯奥生物科技有限公司, 生化试剂, 批号: 030208); 次黄嘌呤(Lancaster 公司, 批号 10061487)。其它试剂: 葡萄糖(分析纯, 天津市百世化工有限公司); 蛋白胨(分析纯, 天津市凯

第一作者: 博士。

* 泰安市科技攻关项目(20071029)资助; 泰山医学院博士启动基金资助

收稿日期: 2007-11-30, 改回日期: 2008-01-07

通化学试剂有限公司); KH_2PO_4 (分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司);无水乙醇(分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司);乙酸乙酯(分析纯,天津市博迪化工有限公司);甲醇(分析纯,天津市纵横兴贸有限公司化工试剂分公司);氨水(25%~28%,淄博化学试剂厂);异丙醇(山东省化学研究所);三氯甲烷(分析纯,天津市永大化学试剂开发中心);GF254 硅胶预制板 200mm×70mm(上海信宜仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 泰山虫草菌丝体的制备

采用正交表 $L_9(3^4)$ 对菌丝体液体发酵培养基进行优化,得到优化后的培养基:玉米粉 3%,黄豆粉 1%,葡萄糖 1%,酵母膏 0.8%,127℃,1.5Mpa,灭菌 20 min,冷却后接种,以发酵 2d 的液体发酵液为母种,250 mL 锥形瓶装量 100 mL,接种量 5%,发酵 7 d,离心(5 000 r/min,5 min)得菌丝体,菌丝体以 100 mL 蒸馏水冲洗,重复 3 次,50℃烘干备用。

2.2 泰山虫草菌丝体供试品溶液的制备

将 2.1 项下所得干燥泰山虫草菌丝体粉碎后过 60 目筛,精密称取菌丝体粉末 0.5077 g,置具塞试管中,加入 80%乙醇 5 mL,45℃浸泡 0.5 h,超声提取 1h(45℃,超声功率 100%),4 000 r/min 离心 10 min,取上清液移入 5 mL 量瓶中,用 80%乙醇定容至刻度,混匀备用。

2.3 冬虫夏草供试品溶液的制备

取完整冬虫夏草个体(包括虫体和真菌子座)数个于 50℃烘干 24 h,取出研碎后过 60 目筛得菌粉。

精密称取菌粉 1.0267 g,置具塞试管中,加入 80%乙醇 10 mL,45℃浸泡 0.5h,超声提取 1h(45℃,超声功率 100%),4 000 r/min 离心 10 min,取上清液减压浓缩至约 2 mL 转移至 5 mL 量瓶中,并用 80%乙醇洗涤 2 次,洗涤液一并移入量瓶,再用 80%乙醇定容至刻度,混匀备用。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取对照品腺苷 6.5 mg、次黄嘌呤核苷 7.9 mg、次黄嘌呤 5.2 mg,分别置于 25 mL 量瓶中;精密称取尿苷 4.2 mg,置于 10 mL 量瓶中;虫草素 4.1 mg,置于 50 mL 量瓶中,分别用 70%乙醇溶解,并定容至刻度,混匀备用。

2.5 薄层色谱条件

GF254 硅胶板先在 105℃活化 30 min,以定量毛细管每隔 1 cm 点样,展开剂组成为三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-异丙醇-浓氨水(8:3:3:3:0.9),展开约 7.5 cm,取出薄层板吹干残留溶剂,在紫外灯箱内 254 nm 下观察荧光淬灭色谱图象后,描出欲测斑点轮廓,用薄层扫描仪在 254 nm 处扫描积分,狭缝宽度:8.0 mm,狭缝高度:核苷类 0.1 mm,次黄嘌呤 0.2 mm。以 R_f 值定性,以峰高 h 定量。

2.6 精密度试验

称取干燥菌粉样品 1 份,按 2.2 项下泰山虫草菌丝体供试品溶液的制备方法,制得供试品溶液,于同一薄层板上点样 5 个点,每个点 2 μL ,按 2.5 方法进行扫描,以腺苷斑点峰高为对象进行统计 $\text{RSD}=1.4\%$,其它数据及结果见表 1。

表 1 精密度试验(以腺苷峰高计)

样品点	1	2	3	4	5	均值	RSD/%
腺苷峰高	150.089	146.241	146.360	148.487	144.778	147.191	1.4

2.7 重现性试验

取干燥菌粉样品,分别称取 5 份,每份 0.5 g,按 2.2 项下泰山虫草菌丝体供试品溶液的制备方法,制

得供试品溶液,均点样于同一块薄层板上,按 2.5 测定方法对腺苷斑点进行扫描积分,记录各峰峰高进行统计, $\text{RSD}=2.6\%$,其它数据及结果见表 2。

表 2 重现性试验(以腺苷峰高计)

样品点	1	2	3	4	5	均值	RSD/%
腺苷峰高	189.650	180.452	186.255	177.666	186.033	184.011	2.6

2.8 稳定性试验

以人工泰山虫草菌丝体为测定对象,按测定方法

对腺苷斑点在不同时间进行扫描,将峰高记录结果进行统计, $\text{RSD}=2.1\%$,其它数据及结果见表 3。

表 3 稳定性试验(以腺苷峰高计)

测定时间	0 h	0.5 h	2.0 h	3.0 h	6.0 h	均值	RSD/%
腺苷峰高	159.943	155.179	154.768	158.325	151.362	155.915	2.1

2.9 回收率试验

分别精密称定泰山虫草菌丝体 0.5 g(以腺苷为检测指标)3 份,分别加入腺苷标准样品 0.25、0.5、

0.75 mg,制备低、中、高供试品溶液,将峰高记录结果进行统计,平均回收率 97.5%,RSD=2.7%,其它数据及结果见表 4。

表 4 回收率试验(以腺苷峰高计)

样品	低浓度		中浓度		高浓度	
腺苷峰高	208.531	218.124	288.542	304.378	360.164	366.065
均值	213.328		296.460		363.115	
RSD/%			2.7			

2.10 泰山虫草菌丝体及冬虫夏草中有效成分含量的测定

分别用定量毛细管精密吸取腺苷、尿苷、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤和虫草素对照品溶液 1 μL、2 μL、3 μL、4 μL、5 μL,泰山虫草菌丝体及冬虫夏草提取液

适量(见表 5),从左至右依次点于同一块薄层板上,放入层析缸中饱和 30 min 后上行展开,薄层扫描后记录各峰峰高,以峰高一对照品含量作标准曲线进行定量。各成分的标准曲线、线性范围及含量测定结果见表 5。

表 5 冬虫夏草与泰山虫草菌丝体核苷类成分含量测定结果

有效成分	样 品	峰高/h	标准曲线	线性范围/μg	点样量/μL	含 量
腺 苷	菌丝体	193.740	$y=280.78x+62.266$	0.260~1.300	2	0.230%
	冬虫夏草	160.449	$r=0.9923$		6	0.028%
尿 苷	菌丝体	188.772	$y=95.23x+13.118$	0.420~2.100	2	0.908%
	冬虫夏草	155.225	$r=0.9693$		3	0.242%
次黄嘌呤	菌丝体	186.860	$y=169.80x+9.012$	0.316~1.580	2	0.515%
核 苷	冬虫夏草	100.727	$r=0.9910$		6	0.044%
次黄嘌呤	菌丝体	118.340	$y=222.04x+29.338$	0.208~1.040	2	0.097%
	冬虫夏草	76.320	$r=0.9994$		6	0.017%
虫草素	菌丝体	9.237	$y=360.31x+2.091$	0.215~0.509	30	0.92 μg/g
	冬虫夏草	9.951	$r=0.9998$		20	0.906 μg/g

由表 5 可见,泰山虫草菌丝体中腺苷、尿苷、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤和虫草素含量分别是冬虫夏草的 8.21 倍、3.75 倍、11.7 倍、5.7 倍和 1 倍。2 种虫草中 3 种核苷的含量均表现为尿苷>次黄嘌呤核苷>腺苷。

3 讨论与结论

3.1 扫描波长的选择

根据文献报道,虫草中核苷类成分的检测波长,除 254 nm^[7] 外,还有 260 nm^[8]、265 nm^[9]、270 nm^[6],通过对样品进行全波长扫描,可知其最大吸收峰在 254 nm 处,所以实验中采用 254 nm 的检测波长。

3.2 提取溶剂的选择

文献中关于对核苷类成分的提取方法报道不一,主要是以不同浓度的乙醇提取^[6,7,9],本试验通过对 70%、80%乙醇提取进行对比,发现后者提取效率明显高于前者,故采用 80%乙醇进行提取,但最优提取条件还有待进一步研究。

3.3 测定方法的选择

薄层扫描(TLCS)法具有快速、经济可靠、操作简单、分离效果较好、时间较短等优点,是一种重要的分析分离手段与方法,除低沸点物质外,各种无机和有机化合物都可进行分离;它既可以用于少量物质的分析鉴定,又可用于大量物质的分离纯化制备,因此,被广泛应用于石油、化工、医药卫生、生物科学、环境科学、农业科学等领域,尤其对中药材中复杂天然产物的组分分离及定性、定量分析可提供丰富直观的色谱图谱,同时完成多个样品的薄层色谱图比较,反映各中药的相似程度,为鉴别真伪提供最直接的指纹信息,《中国药典》2000 年版一部采用薄层色谱法作鉴别的品种已达 602 种,占一部中已收载中药材、中药成方制剂的 60.7%,是目前成分分析方面首选的技术之一。本实验采用 TLCS 法检测泰山虫草菌丝体及冬虫夏草中有效成分的含量,为深入研究泰山虫草菌丝体的指纹图谱和药用价值提供有用的数据参考。

通过本研究首次证明泰山虫草菌丝体中核苷类等有效成分含量明显高于冬虫夏草,由于核苷类成分

是虫草的主要有效成分之一,且药典中多以腺苷含量来控制虫草质量^[10],另外还具有培养条件易控制等优点,因此泰山虫草菌丝体可以作为冬虫夏草代用品,开发利用潜力更大。

参考文献

- 1 郑汉臣,蔡少青.药用植物与生药学(第四版)[M].北京:人民卫生出版社,2003
- 2 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
- 3 于振成,赵仁庚.薄层扫描法测定金水宝胶囊中腺苷含量[J].中国药理学杂志,1995,30(6):380
- 4 吕武清,颜华荣.胶囊中腺嘌呤的含量[J].药物分析杂志,1996,16(3):197~198
- 5 高道侠,许敏.薄层扫描法测定金水宝胶囊中鸟苷的含量[J].江西中医学院学报,1998,10(3):131
- 6 米莉莉,张素文,孙家进,等.冬虫夏草及人工虫草核苷类成分的 TLCs 研究[J].中成药,2003,(5)402~405
- 7 李绍平,李萍,李晖,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
- 8 袁永生,张莉,许效枫,等.反相高效液相法测定虫草菌粉中核苷类成分的含量[J].中国药理学杂志,2002,37(10):776~778
- 9 丁振成,赵仁庚.薄层扫描法测定金水宝胶囊中腺苷含量[J].中国药理学杂志,1995,30(6):380
- 10 Li Shaoping, Li Ping, Ji Hui, 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

Analysis of Effective Components in *Taishan cordyceps* Mycelia and *Cordyceps* by TLC-Screening

Zhao Xuemei, Bi Yanping, Su Yanyou, Wang Guiling, Fei Hongrong

(Pharmacy College, Taishan Medical University, Taian, Tai'an 271016, China)

ABSTRACT Adenosine, uridine, inosine, cordycepin and hypoxanthine were determined in natural *Cordyceps* and cultured *Taishan cordyceps* mycelia, to explore the possibility of medicine or health food for the cultured *Taishan cordyceps* mycelia to replace the natural *Cordyceps*. Samples were extracted by the supersonic extractive of 80% ethanol, measured by TLC—scanning in order to determine the contents of these five components. Results The contents of these effective components in the cultured *Taishan cordyceps* mycelia were found higher than that of natural *Cordyceps*. The adenosine, uridine, inosine, and hypoxanthine from cultured *Taishan cordyceps* mycelia are 8.25 times, 3.76 times, 11.8 times and 1.55 times as the natural *Cordyceps*. The contents of these effective components in the two samples are uridine > inosine > adenosine > hypoxanthine > cordycepin. This method is convenient and rapid, it can effectively evaluate nucleotides and some other components in natural and cultured *Cordyceps*. *Taishan cordyceps* can substitute the natural *Cordyceps* and manufacturing application should be further explored.

Key words *Taishan cordyceps* Mycelia, uridine, adenosine, inosine, hypoxanthine, cordycepin

政策法规标准

“绿茶国际标准技术指标原则”获得通过

从在杭州举行的国际标准化组织(ISO)茶叶标准化技术委员会第22届年会上获悉,倍受关注的“绿茶国际标准技术指标原则”已经获得通过。

来自中国、英国、德国、日本、印度等国家和地区的50多位茶叶专家及代表出席了会议,并对有关茶叶国际标准进行讨论和表决。其中,倍受关注的“绿茶国际标准技术指标原则”获得通过。会议还决定建立特种茶国际标准工作组,秘书处设在中国,并由中国负责筹建。

杭州是中国绿茶的主要产茶区,拥有西湖龙井茶等历史悠久、驰名中外的茶叶品牌。本次会议也是国际标准化组织在杭州召开的第三次国际茶叶标准化会议。

本次会议由国际标准化组织农产品食品技术委员会茶叶分技术委员会(ISO/TC34/SC8)主办,中国国家标准化管理委员会承办,中华全国供销合作总社、中国茶叶流通协会协办,浙江省质量技术监督局、杭州茶叶研究院、浙江省茶叶集团公司等单位提供支持。