

· 基础研究 ·

三种鸡枞菌属真菌核苷及嘌呤碱基类成分含量测定[△]高艳云^{1,2}, 张园娇², 张倩², 陈建伟^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] **目的:** 以高效液相色谱法测定鸡枞、灰鸡枞和黄鸡枞3种鸡枞菌子实体中核苷及嘌呤碱基类成分的组成和含量, 建立鸡枞类真菌核苷及嘌呤碱基类成分的控制指标。**方法:** 采用 Waters Xbridge C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 流速为0.8 mL·min⁻¹, 柱温为30℃, 检测波长为260 nm。**结果:** 3种鸡枞菌子实体中均检出次黄嘌呤、黄嘌呤、胞苷、腺苷、鸟苷、尿苷、肌苷等成分, 且在质量浓度分别在7.51~120.12、4.99~79.84、25.13~402.00、12.61~201.80、5.03~80.48、5.00~80.00、10.00~160.00 μg·mL⁻¹与峰面积呈良好线性关系($r \geq 0.9996$); 平均回收率为95.83%~103.01%, RSD≤3.98% ($n=6$)。鸡枞中2种嘌呤碱基、5种核苷类成分含量分别为: 0.36、3.13、2.20、3.63、1.11、1.87、1.50 mg·g⁻¹; 灰鸡枞含量为: 0.10、0.78、1.86、3.07、1.48、1.70、0.62 mg·g⁻¹; 黄鸡枞含量为: 0.22、2.53、1.86、2.35、0.78、0.84、0.83 mg·g⁻¹。**结论:** 本实验建立的 HPLC 测定鸡枞类真菌中5种核苷及2种嘌呤碱基类成分含量的分析方法简单、重复性好、准确度高, 可以为鸡枞类真菌的质量控制提供参考, 3种鸡枞菌子实体在医疗和营养保健上都有较高的研究价值。

[关键词] 鸡枞菌属; 核苷类; 嘌呤碱基; HPLC; 含量测定

Determination of Nucleoside and Purine Bases in Three Kinds of Fruiting Body of *Termitomyces*GAO Yanyun^{1,2}, Zhang Yuanjiao², Zhang Qian², CHEN Jianwei^{2*}(1. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029;*2. *School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023*)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the determination of nucleoside components in the fruiting body of *Termitomyces albuminosus*, *T. eurhizus* and *T. aurantiacus*. **Methods:** The assay was performed on a Waters Xbridge C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, mobile phase consisted of methanol-0.1% orthophosphoric acid water with gradient elution at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, column temperature was 30℃, and the detection wavelength was set at 260 nm. **Results:** The three kinds of fruiting body of *Termitomyces* all checked out 2 kinds of purine base and 5 kinds of nucleoside, including hypoxanthine, xanthine, cytidine, adenosine, guanosine, uridine, inosine, and they showed good linearity($r \geq 0.9996$) in the range of 7.51-120.12, 4.99-79.84, 25.13-402.00, 12.61-201.80, 5.03-80.48, 5.00-80.00, 10.00-160.00 μg·mL⁻¹, respectively. The average recoveries ($n=6$) were within 95.83%-103.01% with RSD≤3.98%. The contents of 2 kinds of purine base and 5 kinds of nucleoside components in the fruiting body of *T. albuminosus* were 0.36, 3.13, 2.20, 3.63, 1.11, 1.87, 1.50 mg·g⁻¹, respectively, they in the fruiting body of *T. eurhizus* were 0.10, 0.78, 1.86, 3.07, 1.48, 1.70, 0.62 mg·g⁻¹ respectively, and they in the fruiting body of *T. aurantiacus* were 0.22, 2.53, 1.86, 2.35, 0.78, 0.84, 0.83 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This HPLC method was simple, accurate and reducible, and can be used for quality evaluation and quality control of *Termitomyces*. The three kinds of fruiting body of *Termitomyces* would have higher study value for medicine, nutrition and health food.

[Keywords] *Termitomyces*; nucleoside; purine base; HPLC; content determination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.1.014

[△] [基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 我国水生、耐盐中药资源的合理利用研究行业专项(201407002)

* [通信作者] 陈建伟, 教授, 研究方向: 中药品质评价研究; Tel: (025)85811280, E-mail: chenjw695@126.com

鸡枞菌属(*Termitomyces* R. Heim)又译为蚁巢伞属真菌,是一类夏秋季节生于白蚁巢上的野生食用真菌。最新的 Dictionary of the Fungi 与 Index Fungorum 数据库将其归属于担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、伞菌目(Agaricales)、离褶伞科(Lyophyllaceae)。该属共有约63个物种,其中包括48个种、2个变种和13个型。目前在中国境内仅有11个物种被确认有分布^[1]。鸡枞菌肉味鲜美,营养丰富,并含多种具有保健功能的物质。《本草纲目》(1596年)中记载鸡枞菌气味甘、平、无毒,有益胃、清神、治痔的功效。现代研究发现鸡枞有抗氧化、降血脂、增强免疫功能、镇痛抗炎等作用^[2-6]。核苷类化合物具有多种生理功能,是改善人类健康和预防疾病的重要组成部分之一。除具有机体免疫功能调节、抗菌抗病毒等作用外,在维持骨髓造血细胞、肠黏膜以及脑组织的正常功能等方面亦有重要的作用,目前已经有很多核苷功能性食品的专利公开^[7]。笔者尚未见到关于鸡枞菌属真菌的核苷及嘌呤碱基类成分含量测定相关文献报道。本实验通过参考其他有核苷类成分含量测定的相关文献,对3种鸡枞菌属真菌中的5种核苷及2种嘌呤碱基类化合物进行了定性、定量分析,为鸡枞菌属真菌的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(Waters2489 型 PDA 检测器, Empower 工作站); BT1250 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KH-500DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); SAGA-10TQ 易普易达超纯水仪(南京易普易达科技发展有限公司)。

1.2 试剂

供试品:鸡枞采自云南楚雄彝族自治州,为鸡枞菌 *Termitomyces albuminosus* (Berk.) Heim 的干燥子实体;灰鸡枞采自云南白族自治州,为灰鸡枞菌 *Termitomyces eurhizus* (Berk.) Heim. 的干燥子实体;黄鸡枞采自四川绵阳,为金黄鸡枞菌 *Termitomyces aurantiacus* Heim. 的干燥子实体。以上样品经南京

中医药大学中药资源学教研室陈建伟教授鉴定。

对照品:黄嘌呤(批号:1001279304)、腺苷(批号:101183448)、肌苷(批号:1001271021)、次黄嘌呤(批号:1001392976)、鸟苷(批号:1001662525)、尿苷(批号:1001290893)、胞苷(批号:101069370)购于 SIGMA 公司。

甲醇(Fisher chemical, 批号:155175);磷酸(南京化学试剂有限公司,批号:13112612030);水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters Xbridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱为0~10 min, 2%~5%甲醇;10~18 min, 5%~10%甲醇;18~25 min, 10%~25%甲醇;25~35 min, 25%~80%甲醇;流速为0.8 mL·min⁻¹,柱温为30℃,检测波长为260 nm,进样量为10 μL。

2.2 对照品和供试品溶液的制备

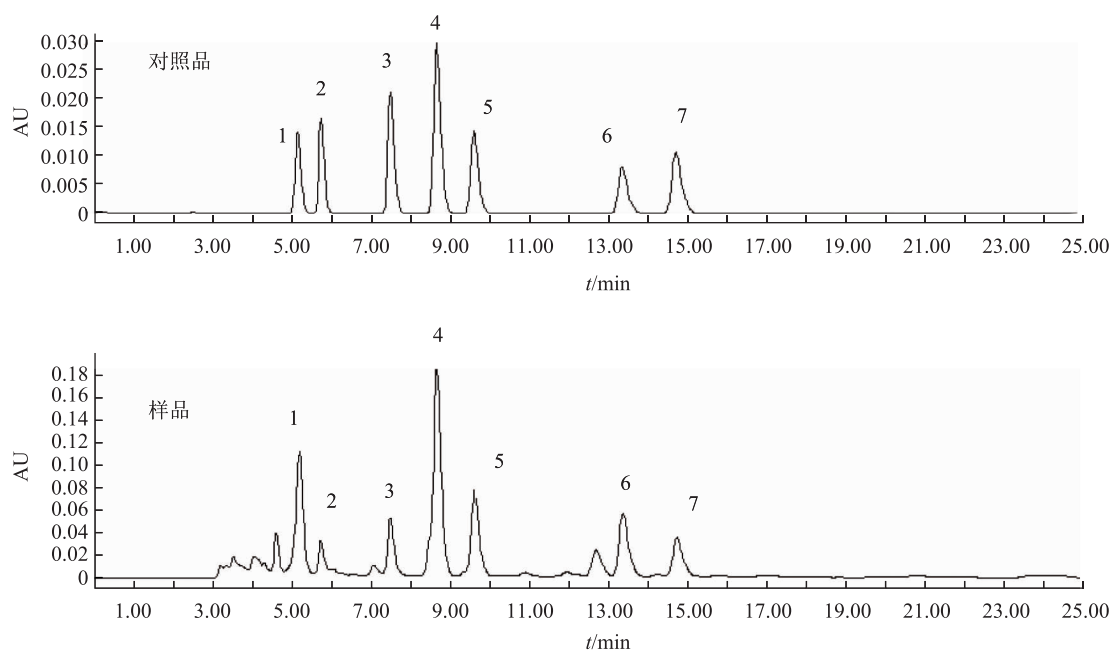
2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称取次黄嘌呤、黄嘌呤、胞苷、腺苷、鸟苷、尿苷、肌苷的对照品适量,用15%甲醇水溶液配制成质量浓度分别为79.84、402.00、120.12、201.80、80.48、80.00、160.00 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 3种鸡枞分别低温烘干,研成粉末,过60目筛,精密称取1.000 g,置于50 mL 具塞锥形瓶中,量取15%甲醇水溶液30 mL,称定重量,超声(500 W, 40 kHz)处理30 min,冷却至室温,称重,补足失重,过滤,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 在2.1项色谱条件下,混合对照品溶液及鸡枞供试品溶液中2种嘌呤碱基及5种核苷达到基线分离,见图1。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液0.1、0.5、1.0、1.5、2.0置10 mL容量瓶中,加15%甲醇定容至刻度,离心后取10 μL注入高效液相色谱仪,按2.1项下色谱条件进行分析,以峰面积Y对进样量X进行回归计算,回归方程见表1。



注: 1. 胞苷; 2. 次黄嘌呤; 3. 黄嘌呤; 4. 尿苷; 5. 腺苷; 6. 鸟苷; 7. 肌苷。

图1 混合对照品和鸡枞供试品溶液的HPLC图

表1 被测嘌呤碱基与核苷类化合物的线性关系和线性范围

对照品	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r
次黄嘌呤	$Y=32\ 807X-9835$	4.99~79.84	0.999 9
黄嘌呤	$Y=5166X+58\ 810$	25.13~402.00	0.999 9
胞苷	$Y=20\ 825X-15\ 113$	7.51~120.12	0.999 7
尿苷	$Y=31\ 414X-26\ 313$	12.61~201.80	0.999 8
腺苷	$Y=40\ 974X-15\ 396$	5.03~80.48	0.999 8
鸟苷	$Y=28\ 428X-11\ 705$	5.00~80.00	0.999 6
肌苷	$Y=19\ 616X-15\ 869$	10.00~160.00	0.999 7

2.3.3 精密度的试验 取2.2.1项下混合对照品溶液按2.1项下色谱条件分别连续进样测定6次,测定2种嘌呤碱基及5种核苷类化合物的峰面积并计算其RSD。结果显示次黄嘌呤、黄嘌呤、胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、肌苷的RSD分别为0.6%、0.7%、0.5%、0.6%、0.6%、0.6%、0.6%,符合精密度要求。

2.3.4 稳定性试验 取黄鸡枞供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别于0、4、8、12、16、20 h进样10 μL ,测2种嘌呤碱基及5种核苷类成分的峰面积

并计算RSD。结果显示次黄嘌呤、黄嘌呤、胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、肌苷的RSD分别为0.7%、2.1%、1.8%、1.3%、1.4%、2.1%、2.0%。表明供试品溶液在20 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取黄鸡枞供试品6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,测定峰面积,计算含量及RSD。结果显示次黄嘌呤、黄嘌呤、胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、肌苷的平均含量分别为1.6%、0.7%、0.4%、1.5%、1.4%、2.1%、2.3%,表明方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的样品(黄鸡枞)1.0 g共6份,按1:1的比例加入适量对照品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下进样分析,根据测得量和加入量计算回收率,结果见表2。

2.4 样品含量测定

取3种鸡枞粉末1.0 g,平行3份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下方法进样分析,采用外标法计算含量,取3份平均值结果见表3。

表2 黄鸡枞中2种嘌呤碱基及5种核苷的加样回收率试验结果($n=6$)

成分	取样量/g	样品中含量/mg	对照品加入量/mg	测定量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
次黄嘌呤	1.000 5	0.220 1	0.240 0	0.470 3	104.26	103.01	2.5
	1.000 5	0.220 1	0.210 0	0.439 5	104.48		
	1.000 4	0.220 1	0.200 0	0.416 9	98.43		
	1.005 9	0.221 3	0.2200	0.446 3	102.26		
	1.000 2	0.220 0	0.220 0	0.449 4	104.25		
	1.000 1	0.220 0	0.210 0	0.437 6	103.63		
黄嘌呤	1.000 5	2.501 3	2.470 0	4.849 7	95.08	97.33	2.28
	1.000 5	2.501 3	2.470 0	4.875 4	96.12		
	1.000 4	2.501 0	2.470 0	4.843 9	94.85		
	1.005 9	2.514 8	2.550 0	5.049 7	99.41		
	1.000 2	2.500 5	2.550 0	5.041 2	99.64		
	1.000 1	2.500 3	2.550 0	5.137 2	103.41		
胞苷	1.000 5	1.850 9	1.850 0	3.610 3	95.10	95.83	2.05
	1.000 5	1.850 9	1.850 0	3.602 6	94.69		
	1.000 4	1.850 7	1.850 0	3.614 1	95.32		
	1.005 9	1.860 9	1.850 0	3.627 3	95.48		
	1.000 2	1.850 4	1.850 0	3.696 2	99.78		
	1.000 1	1.850 2	1.850 0	3.600 8	94.63		
尿苷	1.000 5	2.351 2	2.200 0	4.470 9	96.35	96.42	1.72
	1.000 5	2.351 2	2.200 0	4.461 4	95.92		
	1.000 4	2.350 9	2.200 0	4.542 5	99.62		
	1.005 9	2.363 9	2.350 0	4.590 1	94.73		
	1.000 2	2.350 5	2.350 0	4.602 3	95.82		
	1.000 1	2.350 2	2.350 0	4.608 4	96.09		
腺苷	1.000 5	0.770 4	0.770 0	1.518 7	97.18	98.41	3.98
	1.000 5	0.770 4	0.770 0	1.578 2	104.91		
	1.000 4	0.770 3	0.770 0	1.497 6	94.45		
	1.005 9	0.774 5	0.770 0	1.548 8	100.55		
	1.000 2	0.770 2	0.770 0	1.528 5	98.49		
	1.000 1	0.770 1	0.770 0	1.500 6	94.87		
鸟苷	1.000 5	0.840 4	0.850 0	1.656 3	95.98	97.26	2.13
	1.000 5	0.840 4	0.850 0	1.697 9	100.88		
	1.000 4	0.840 3	0.850 0	1.651 2	95.39		
	1.005 9	0.845 0	0.850 0	1.658 2	95.67		
	1.000 2	0.840 2	0.850 0	1.670 4	97.67		
	1.000 1	0.840 1	0.850 0	1.673 0	97.99		
肌苷	1.000 5	0.830 4	0.830 0	1.651 3	98.90	98.21	1.10
	1.000 5	0.830 4	0.830 0	1.645 0	98.14		
	1.000 4	0.830 3	0.830 0	1.641 6	97.75		
	1.005 9	0.834 9	0.830 0	1.641 8	97.22		
	1.000 2	0.830 2	0.830 0	1.660 3	100.01		
	1.000 1	0.830 1	0.830 0	1.637 4	97.27		

表3 3种鸡枞中2种嘌呤碱基及5种核苷成分的含量

名称	/mg·g ⁻¹						
	嘌呤碱基			核苷类			
	次黄嘌呤	黄嘌呤	胞苷	尿苷	腺苷	鸟苷	肌苷
鸡枞	0.36	3.13	2.20	3.63	1.11	1.87	1.50
灰鸡枞	0.10	0.78	1.86	3.07	1.48	1.70	0.62
黄鸡枞	0.22	2.53	1.86	2.35	0.78	0.84	0.83

3 讨论

通过查阅相关文献^[8], 分别对鸡枞样品超声提取方法中的提取溶剂10%、15%、30%甲醇水溶液, 提取时间30、60、90 min, 料液比1:10、1:20、1:30等因素进行了考察。结果发现提取溶剂中15%甲醇水溶液提取效果较好, 嘌呤碱基及核苷成分的含量较高, 并同时确定了提取时间30 min较适宜, 料液比1:30为最佳提取条件。

利用高效液相色谱法, 使用Waters Xbridge C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 对流动相甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液和甲醇-0.1%磷酸水溶液进行了考察, 最后发现在以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相时效果最佳。核苷类成分极性较大, 在反向柱上容易拖尾, 磷酸类流动相可减小其分子间氢键的作用, 抑制拖尾^[9]。实验结果也表明在以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相、流速为0.8 mL·min⁻¹、柱温为30℃、检测波长为260 nm的条件下检测鸡枞类真菌中次黄嘌呤、黄嘌呤、胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、肌苷成分峰形好, 分离度高, 且重复性良好, 可作为鸡枞类真菌核苷及嘌呤碱基类成分定性定量检测依据。

从表4中可知3种鸡枞检出的5种核苷类成分中均以尿苷含量最高。灰鸡枞中腺苷含量在3种鸡枞中最高。其余4种核苷类成分均为鸡枞中含量最高。另外, 冬虫夏草是滋补强壮的名贵中药, 核苷类物

质为其药效成分之一。3种鸡枞中腺苷类成分含量均数倍于冬虫夏草(0.17~0.37 mg·g⁻¹)^[10]。一项研究表明, 腺苷是深层大脑刺激效果的关键, 可用于治疗帕金森病和有严重震颤患者, 试用于治疗严重抑郁患者^[11]。提示鸡枞高含量的腺苷与《本草纲目》记载的“清神”可能有关, 值得进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 王鹏飞, 何隽, 周文, 等. 蚁巢伞属真菌研究进展[J]. 微生物通报, 2012, 39(10): 1487-1498.
- [2] 王一心, 狄勇, 杨桂芝. 鸡枞菌在大鼠高胆固醇血症中的抗氧化作用[J]. 中国预防医学杂志, 2005, 6(1): 10-12.
- [3] 周继平, 许泓瑜. 鸡枞菌粉不同组分的体外抗氧化活性研究[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(5): 46-49.
- [4] 赵云霞, 陶明焯, 陆文娟, 等. 鸡枞菌多糖对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 260-265.
- [5] 邢佳, 陶明焯, 郭宇星, 等. 鸡枞菌精多糖对酒精性损伤小鼠肾及免疫器官的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 246-249.
- [6] 陆奕宇, 敖宗华, 成成, 等. 鸡枞菌粉提取物镇痛抗炎作用的研究[J]. 中成药, 2007, 19(12): 1742-1745.
- [7] 张雪梅, 杨丰庆, 夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 277-282.
- [8] 陈东东, 陈亚运, 周萍, 等. HPLC同时测定延胡索6个核苷成分含量[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1571-1575.
- [9] Ranogajec A, Beluhan S, Smit Z. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversed-phase HPLC [J]. J Sep Sci, 2010, 33(8): 1024-1033.
- [10] 夏文娟, 曾晓英, 袁海龙, 等. 不同产地冬虫夏草腺苷含量的测定[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8): 540-542.
- [11] Bekar L, Libionka W, Tian G, et al. Maiken Nedergaard. Adenosine is crucial for deep brain stimulation-mediated attenuation of tremor[J]. Nat Med, 2008, 14(1): 75-80.

(收稿日期 2016-04-14)