

· 中药农业 ·

不同采收时期雪峰虫草中腺苷含量的动态变化[△]

朱如彩, 谭电波, 秦优, 梁雪娟, 张水寒*, 黄惠勇*

(湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的: 通过研究不同采收期雪峰虫草腺苷含量的动态变化, 为确定雪峰虫草的最佳采收期提供科学依据。方法: 采用高效液相色谱法, 以 C18 柱, 磷酸盐缓冲液 (PH6.5)-甲醇 (85:15) 为流动相; 在 260 nm 波长处测定不同采收期雪峰虫草中腺苷的含量。结果: 不同时期采收的雪峰虫草中腺苷含量存在差异, 以 8~12 月份较高。结论: 确定 8~12 月为雪峰虫草的最佳采收期。

[关键词] 雪峰虫草; 腺苷; 高效液相色谱法; 采收期; 动态变化

Study on Dynamic Changes of Adenosine in *Ophiocordyceps xuefengensis* from Different Harvest Time

ZHU Rucai, TAN Dianbo, QIN You, LIANG Xuejuan, ZHANG Shuihan*, HUANG Huiyong*

(Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** According to the study on dynamic changes of adenosine in different harvest time of *Ophiocordyceps xuefengensis*, providing a scientific basis to the best harvest time of *O. xuefengensis*. **Methods:** Using a HPLC method for gradient elution, the mobile phase was a mixture of phosphate buffer (PH 6.5)-methanol (85:15), and the detection wavelength was set at 260 nm. The content of adenosine in different harvest time was tested. **Results:** There are differences in adenosine content in different harvesting time of *O. xuefengensis*, reached to the to Pat August to December. **Conclusion:** Determine August to December is considered to be the best harvest time of *O. xuefengensis*.

[Keywords] *Ophiocordyceps xuefengensis*; adenosine; HPLC; harvest time; dynamic changes

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2015.11.016

雪峰虫草为线虫草菌科真菌雪峰虫草菌 *Ophiocordyceps xuefengensis* T. C. Wen, R. C. Zhu, J. C. Kang & K. D. Hyde 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, 为线虫草菌科线虫草菌属的一个新种^[1], 首次发现于湖南省洞口县雪峰山, 经鉴定是目前同属真菌中与冬虫夏草亲缘关系最近的一个种^[1], 具有补肺益肾、止咳化痰的功效, 主治肾虚精亏、阳痿遗精、腰膝酸痛、久咳虚喘等症, 主要功效成分有腺苷、虫草素、D-甘露醇、多糖、氨基酸等。药理学研究表明雪峰虫草具有补肾壮阳、止咳化痰、增强免疫功能等作用。

雪峰虫草自晚唐年间就在湖南洞口瑶族民间秘密使用, 后来广泛流传并用来防病治病, 距今已有

千余年的历史。当地大多数老百姓将雪峰虫草煎煮、炖服、泡酒服用, 以提高免疫力, 强身健体, 防癌治癌, 普遍反映效果显著, 现有市场供不应求, 是开发前景广阔的虫草类品种, 本研究是为雪峰虫草申报湖南省中药材标准进行的研究, 为雪峰虫草的产品开发奠定法定标准。

腺苷为《中华人民共和国药典》2010 版冬虫夏草项下含量测定成分^[2], 是冬虫夏草的主要活性成分; 文献^[3-7]报道虫草属真菌的活性成分之一为腺苷, 故本研究选择腺苷作为测定指标, 用 HPLC 测定雪峰虫草中腺苷在不同采收时期的含量动态变化, 为雪峰虫草最佳采收期的确定提供科学依据。

[△] [基金项目] 湖南省科技重大专项 (2014FJ1007); 湖南省中医药科研计划项目 (201267、201322); 中医药公共卫生专项“国家基本药物所需中药原料资源调查和监测项目” (财社 [2011]-76)

* [通信作者] 张水寒, 研究员, 研究方向: 中药资源综合利用; E-mail: zhangshuihan0220@126.com;
黄惠勇, 教授, 研究方向: 中医药基础研究; E-mail: hntcmakj@163.com

1 仪器与试药

1.1 仪器

仪器: LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司), N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所), AE240 型电子分析天平(METTLER), HX-06 超声波清洗器(武汉恒信世纪科技有限公司)。

1.2 试剂与药品

腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110879-200202); 双重蒸馏水; 甲醇为色谱纯; 其余化学试剂均为分析纯。

1.3 样品

24 批次样品均采集于洞口县, 由洞口县老年科技工作者协会、洞口县富康生物科技有限责任公司提供(见表1)。

表1 雪峰虫草采集信息表

样品编号	采集月份	采集地点
S1, S'1	01	洞口县山门镇里仁村洞门口
S2, S'2	02	洞口县山门镇里仁村洞门口
S3, S'3	03	洞口县长塘瑶族乡长塘村大岩山
S4, S'4	04	洞口县石柱乡七岭村、长塘瑶族乡大公村
S5, S'5	05	洞口县石柱乡七岭村、长塘瑶族乡大公村
S6, S'6	06	洞口县石柱乡七岭村、长塘瑶族乡大公村
S7, S'7	07	洞口县山门镇、石柱乡、月溪乡
S8, S'8	08	洞口县长塘瑶族乡双峰山
S9, S'9	09	洞口县古楼乡金坪村叶家冲
S10, S'10	10	洞口县古楼乡狮山村狮子山
S11, S'11	11	洞口县大屋瑶族乡和木村长蛇界
S12, S'12	12	洞口县长塘瑶族乡大公村黄毛垅

注:“S”为2012年采集的样品;“S'”为2013年采集的样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相为磷酸盐缓冲液(pH 6.5) [取0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钠 68.5 mL 与 0.01 mol·L⁻¹磷酸氢二钠 31.5 mL, 混合(PH6.5)] - 甲醇(85:15); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 260 nm; 柱温: 35 °C。理论板数按腺苷峰计算应不低于2000, 分离度不低于1.5。

2.2 对照品溶液的制备

取腺苷对照品适量, 精密称定, 加90%甲醇制成每1 mL含20 μg的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备

取本品粉末(过三号筛)约0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入15%甲醇10 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(250 W, 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定重量, 用15%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

以提取溶剂15%甲醇作为阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

精密吸取腺苷对照品溶液、阴性对照溶液及供试品溶液各10 μL, 注入液相色谱仪, 在2.1项的色谱条件下测定其峰面积。结果显示阴性对照溶液无干扰吸收峰。见图1、2、3。

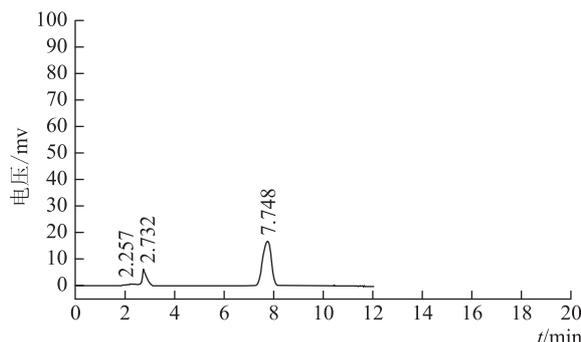


图1 雪峰虫草对照品液相色谱图

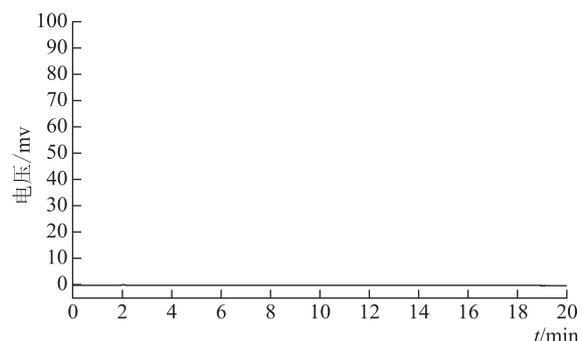


图2 缺雪峰虫草的阴性对照液相色谱图

2.6 线性关系考察

精密吸取腺苷对照品溶液(21.2 μg·mL⁻¹)2、4、6、8、10 μL注入高效液相色谱仪, 在2.1项的色谱条件下测定其峰面积。以腺苷量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线(见图4), 并进行线性回归。

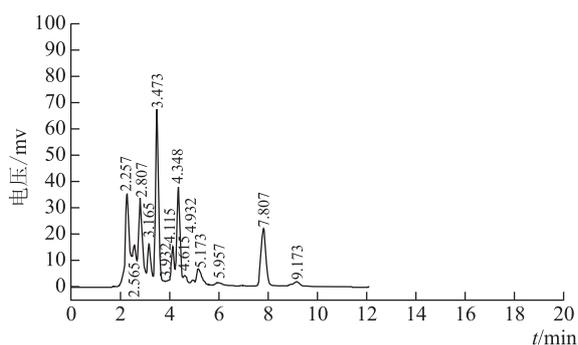


图3 雪峰虫草供试品液相色谱图

结果腺苷在 42.4 ~ 212 ng 范围内线性关系良好, 回归方程为 $Y = 2023.9X - 2451.9$ ($r^2 = 0.9999$)。

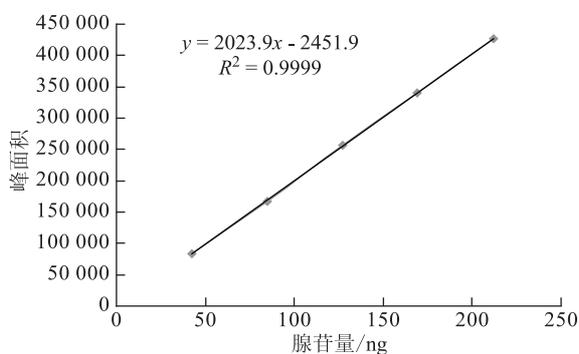


图4 腺苷对照品标准曲线图

2.7 精密度试验

精密吸取雪峰虫草(编号: S4)制成的供试品溶液 10 μ L, 在 2.1 项的色谱条件下连续进样 6 针, 记录色谱峰面积。结果腺苷峰面积的 RSD 1.12%, 表明精密度良好。

2.8 稳定性考察

取雪峰虫草(编号: S4)制成供试品溶液, 在 2.1 项的色谱条件下分别放置 0、2、4、6、8、10、12 h 各进样 10 μ L, 记录色谱峰面积。结果腺苷峰面积的 RSD 为 1.88%, 表明供试溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取同一批号(编号: S4)的雪峰虫草样品平行制备供试品溶液 6 份, 在 2.1 项的色谱条件下进样 10 μ L, 记录色谱峰的峰面积, 计算含量。结果腺苷的平均含量为 0.031%, RSD 为 2.66%, 表明重复性良好。

2.10 回收率试验

精密称取已知腺苷含量的雪峰虫草(编号: S4)

样品 6 份, 每份精密加入腺苷对照品适量, 按供试品溶液的制备方法制备加样回收供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 在 2.1 项的色谱条件下测定, 记录峰面积, 计算腺苷的加样回收率。结果腺苷的平均回收率为 97.09%, RSD 为 1.14%。

2.11 不同采收期雪峰虫草样品腺苷的含量测定

取各批次雪峰虫草粉末 0.5g, 精密称定, 按供试品溶液制备项下方法制备样品溶液, 精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 结果见表 2。

表2 不同采收期雪峰虫草样品腺苷的含量测定

样品编号	腺苷含量(%)	样品编号	腺苷含量(%)
S1	0.022	S'1	0.016
S2	0.025	S'2	0.018
S3	0.027	S'3	0.018
S4	0.023	S'4	0.020
S5	0.008 6	S'5	0.017
S6	0.008 4	S'6	0.017
S7	0.008 2	S'7	0.018
S8	0.030	S'8	0.022
S9	0.031	S'9	0.039
S10	0.033	S'10	0.021
S11	0.031	S'11	0.020
S12	0.037	S'12	0.028

2.12 结果分析

通过对不同时间采集的雪峰虫草样品进行腺苷含量测定, 以月份为横坐标, 腺苷含量为纵坐标, 绘制腺苷含量变化曲线图(见图 5)。结果表明: 从 2012 年和 2013 年每月采集的样品来看, 均以 8 ~ 12 月采集的雪峰虫草中腺苷含量较高; 2012 年 5 月至

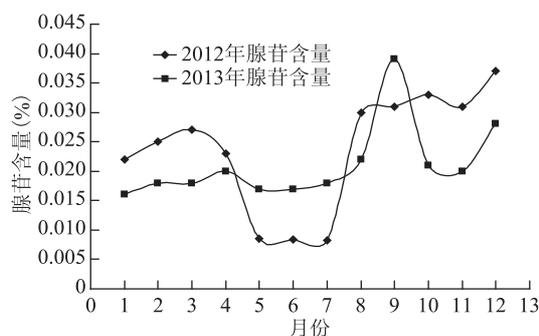


图5 不同采收时期雪峰虫草腺苷含量变化曲线图

7月样品的腺苷含量显著低于其它月份采集的样品,可能与当年该时期正处于雨水高峰期有关;结合雪峰虫草的生长特性,确定8~12月为雪峰虫草的最佳采收期。

3 讨论

腺苷含量测定供试品溶液制备方法的确定,是经不同提取方法(回流法、超声处理法)、不同提取溶剂(水、15%甲醇、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、90%甲醇)、不同提取时间(15 min、30 min、45 min)的比较而拟定的,以15%甲醇为提取溶剂,超声处理(250 W, 40 kHz)30 min,提取最完全,所测样品的腺苷含量最高。

参考文献

[1] Wen TC, Zhu RC, Kang JC, et al. *Ophiocordyceps*

xuefengensis sp. nov. from larvae of *Phassus nodus* (Hepialidae) in Hunan Province, southern China [J]. *Phytotaxa*, 2013, 123(1): 41-50.

- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 中国医药科技出版社, 2010, 106
- [3] 王利, 陈卫东. HPLC法测定蛹虫草中腺苷和虫草素的含量[J]. *现代中药研究与实践*, 2010, 24(5): 72-73
- [4] 喻东, 陈璐, 国锦琳, 等. 凉山虫草的研究综述[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(8): 2024-2025
- [5] 张秀波, 刘玉升. 泰山虫草的研究进展[J]. *环境昆虫学报*, 2009, 31(3): 280-284
- [6] 索菲娅, 苏俊, 姜彦成, 等. 新疆虫草与冬虫夏草中腺苷和虫草素的HPLC法测定比较[J]. *中国民族医药杂志*, 2008, (3): 65-67
- [7] 孙迎节, 吕鹏, 凌建亚, 等. 九州虫草的核苷类成分及不同部位两种活性成分含量的分布[J]. *药学学报*, 2003, 38(9): 690-694.

(收稿日期 2015-03-16)

(上接第1179页)

3.2 不同采收期对蒽醌类含量的影响

何首乌药材中蒽醌类成分包括游离型蒽醌和结合型蒽醌,蒽醌类成分多具有抗菌、消炎、泻下等生物活性。目前认为是何首乌药材发挥解毒、消痈、润肠通便功效的主要活性成分,且认为结合型蒽醌泻下通便作用强于游离型蒽醌^[6]。本实验结果显示贵州施秉县何首乌样品中结合蒽醌含量同样在9月份达到峰值,随后呈现下降趋势。同时游离蒽醌含量总体呈现上升趋势,其结果符合结合蒽醌转化为游离蒽醌的论述^[7]。

3.3 不同采收期对何首乌质量影响的综合评价

由于不同采收期何首乌样品中各化学成分的含量变化不尽相同,所以可以用主成分分析综合评价法对其进行综合评价,以确定何首乌的适宜采收期^[8]。以二苯乙烯苷和蒽醌类成分为指标综合评价结果显示,9、10月份采收何首乌较为适宜,与二苯乙烯苷和结合蒽醌含量显示适宜采收期结果具有一致性。分析其原因可能是在营养生长期,养分不断积累,11月份进入果熟期消耗大量养料所致^[9]。

参考文献

- [1] 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, 164-165.
- [2] 中国药材集团公司. 中国中药资源[M]. 北京:北京:科学出版社, 1995: 2231.
- [3] 徐国钧, 徐璐珊, 王峰涛. 常用中药材品种整理和质量研究:第3册[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1999: 431.
- [4] 易思荣, 黄娅, 肖中, 等. 何首乌的高产栽培技术[J]. *中国现代中药*, 2008, 10(3): 41-43.
- [5] 谢岚. 何首乌及二苯乙烯苷的研究进展[J]. *天津药学*, 2010, 22(03): 70-73.
- [6] 罗瑞芝, 贾伟, 赵利斌, 等. 何首乌研究进展[J]. *中草药*, 2005, 36(7): 1097-1100.
- [7] 郭盛, 段金廛, 吴达维, 等. 干燥方法对何首乌块根中多元功效物质转化的影响[J]. *中草药*, 2014, 45(04): 498-503.
- [8] 段金廛, 严辉, 宿树兰, 等. 药材适宜采收期综合评价模式的建立与实践[J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1755-1760.
- [9] 蔡丽芬. 何首乌质量标准的研究[D]. 北京中医药大学, 2009.

(收稿日期 2015-01-13)