

黑柄炭角菌不同组织的核苷成分 HPLC 测定

廖琼, 周蓉, 陈作红*

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081)

摘要: 目的: 测定黑柄炭角菌不同组织(天然菌核、天然子座、栽培子座以及发酵菌丝)中的核苷种类及含量。方法: 以 YWG C₁₈(4.0mm × 300mm, 10μm) 为色谱柱, 甲醇-水(甲醇所占体积分数梯度变化为 0~8min 内由 0 增加到 10%, 8~10min 内由 10% 增加到 15%) 为流动相, 流速 1ml/min, 检测波长 259nm, 柱温 40℃。样品用水超声波提取, 0.45μm 滤膜过滤。结果: 黑柄炭角菌的天然菌核、天然子座、栽培子座以及发酵菌丝中主要含有尿苷和腺苷, 子座中的含量高于发酵菌丝和菌核, 而且人工栽培的子座与天然子座的核苷含量相差不大。结论: 黑柄炭角菌含有丰富的核苷活性成分, 并且人工栽培的子座可替代天然子座和菌核。

关键词: 黑柄炭角菌; 尿苷; 腺苷; 高效液相色谱

HPLC Determination of Nucleosides in Different Tissues of *Xylaria nigripes*

LIAO Qiong, ZHOU Rong, CHEN Zuo-hong*

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Objective: To determine the kinds and contents of nucleosides in different tissues (natural sclerotium, natural stroma, cultivated stroma and fermented mycelium) of *Xylaria nigripes*. Methods: Samples were extracted using water in an ultrasonic field, and the extracts were filtrated through 0.45μm membrane prior to HPLC analysis. The chromatographic separation was achieved on a YWG C₁₈ column (4.0 mm × 300 mm, 10 μm) at 40 °C using a mobile phase consisting of a mixture of methanol and water (0 min: 0% → 8 min: 10% → 10 min: 15%) at a flow rate of 1 ml/min, and the analytes were detected at 259 nm. Results: The natural sclerotium, natural stroma, cultivated stroma and fermented mycelium of *Xylaria nigripes* mainly contained uridine and adenosine, and the content of nucleosides in sclerotium was higher than that in stroma and fermented mycelium. Besides, the content of nucleosides in natural stroma was similar to that in cultivated stroma. Conclusion: nucleosides were rich in *Xylaria nigripes*, and the cultivated stroma can replace the natural stroma and sclerotium.

Key words: *Xylaria nigripes*; uridine; adenosine; HPLC

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)16-0228-03

黑柄炭角菌(*Xylaria nigripes* (KI.) Sacc.)属于子囊菌亚门(Ascomycotina)、炭角菌属(*Xylaria*)的一种真菌,它生长在白蚁废弃的蚁巢中,其形成的菌核是一种名贵的中药,我国民间称乌灵参、鸡枞蛋,具有除湿、镇静安神、造血以及提高机体免疫功能等功效^[1]。由于资源稀少,有关其生理活性成分的研究不多,陈宛如等对其粗多糖、蛋白质、氨基酸、微量元素等基本化学成分进行了定性或定量的测定^[2]。吴根福从黑柄炭角菌深层发酵制品中获得了具有 DPPH 自由基捕捉活性成分^[3]。龚庆芳等对黑柄炭角菌发酵菌丝体的化学成分进行了研究,从发酵菌丝体乙酸乙酯部分分离得到了 9 种化合物^[4]。

核苷是生物活性成分之一,尤以腺苷具有明显的药理作用,具有改善心脑血管血液循环、防止心率失常、抑制神经递质释放和调节腺苷酸环化酶活性^[5-7]等作用。钟荣华等测定了乌灵菌粉中的腺苷含量在 0.1% 左右^[8]。本研究利用 RP-HPLC 法对黑柄炭角菌的不同组织(天然菌核、天然子座、栽培子座以及发酵菌丝)中的核苷成分进行测定分析,以期进一步了解核苷活性成分在黑柄炭角菌中的分布情况。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(08A044)

作者简介: 廖琼(1983—),女,硕士研究生,研究方向为药用菌有效成分分析。E-mail: liaoqiong1983527@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 陈作红(1964—),男,教授,博士,研究方向为高等真菌有效成分分析。E-mail: chenzuohong@263.net

黑柄炭角菌天然子座和天然菌核于2007年3月采自湖南望城县,栽培子座和发酵菌丝为本实验室人工培育。核苷(尿苷、腺苷、胞嘧啶、2-脱氧胸苷、2-脱氧鸟苷、2-脱氧腺苷)对照品 上海生工生物技术有限公司; 甲醇(色谱纯); 超纯水。

Waters600 高效液相色谱仪、Waters 600E 泵、Waters 2487 紫外检测器 Waters 公司; YWG C₁₈(4.0mm×300mm, 10μm)色谱柱 大连依利特有限公司; AY120 电子天平。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: YWG C₁₈; 流动相: 甲醇-水(甲醇梯度变化为0~8min内由0增加到10%, 8~10min内由10%增加到15%); 流速: 1ml/min; 检测波长: 259nm; 进样量: 20 μl; 柱温 40℃。

1.2.2 核苷标准品溶液的配制

精密称取6种对照品(尿苷、腺苷、胞嘧啶、2-脱氧胸苷、2-脱氧鸟苷、2-脱氧腺苷)各10mg, 均配成0.2mg/ml的溶液, 然后再分别稀释成6个不同的浓度梯度(200、100、50、25、10、5 μg/ml)。

1.2.3 样品处理

精密称取黑柄炭角菌不同组织(天然菌核、天然子座、发酵菌丝、栽培子座)各200mg, 研磨后加水至20ml, 超声波提取60min, 摇床振荡12h后, 离心, 取上清液, 最后分别过0.45 μm 滤膜, 即得。

2 结果与分析

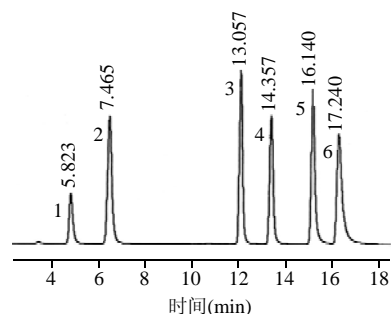
2.1 标样分析及线性关系考察

表1 核苷标样线性关系
Table 1 Linear equations for six nucleosides

核苷	线性关系	相关系数
胞苷	$Y=22993X+21285$	0.9999
尿苷	$Y=68988X+163078$	0.9999
2-脱氧鸟苷	$Y=70595X+159698$	0.9998
2-脱氧胸苷	$Y=60309X+163816$	0.9997
腺苷	$Y=70548X+151524$	0.9998
2-脱氧腺苷	$Y=69752X+9587$	0.9995

经各核苷标样单组分及混合组分的HPLC分析, 各核苷标样单组分洗脱峰的保留时间与混合标样中各组分洗脱峰的保留时间基本一致, 各组分的出峰时间如图1所示。通过每种标样不同浓度(200、150、100、75、50、25 μg/ml)所得的各核苷HPLC峰面积以及样品的HPLC图谱, 经过回归统计, 即可建立每种核苷峰面积与浓度之间的直线关系式: $Y=aX+b$ [式中, a 、 b 为常数, X 为核苷浓度(μg/ml), Y 为峰面积], 结果见表1。每个标样在浓度范围为5~200 μg/ml时, 浓度与峰面积

呈良好的线性关系, 在测定样品时即可根据核苷的峰面积通过上述关系式进行核苷类物质的定量分析。

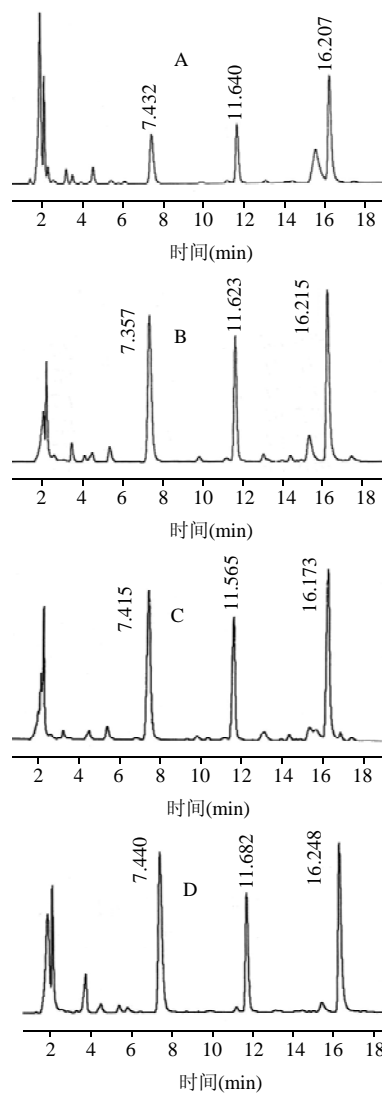


1.胞苷; 2.尿苷; 3. 2-脱氧鸟苷; 4. 2-脱氧胸苷; 5.腺苷; 6. 2-脱氧腺苷。

图1 核苷标样混合组分的HPLC图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standard nucleosides

2.2 样品测定



A.天然菌核; B.天然子座; C.发酵菌丝; D.栽培子座。

图2 黑柄炭角菌不同组织的HPLC图

Fig.2 HPLC chromatograms of nucleosides from different tissues of *Xylaria nigripes*: A. natural sclerotium; B. natural stroma; C. cultivated stroma; and D. fermented mycelium

对黑柄炭角菌不同组织材料按 1.2.3 节的方法操作制备供试品溶液, 按 1.2.1 节的液相色谱方法进样 20 μ l 进行分析测定, 结果见图 2 和表 2。

表 2 黑柄炭角菌不同组织主要核苷及其含量 (μ g/g 干重)
Table 2 Contents of uridine and adenosine in different tissues of *Xylaria nigripes* (μ g/g dry weight)

黑柄炭角菌不同组织	尿苷	腺苷
天然子座	2305.01	2423.45
栽培子座	2078.46	1886.19
发酵菌丝	1120.15	1156.19
天然菌核	340.43	909.72

测定结果表明, 在黑柄炭角菌中只含有 6 种核苷对照品中的 2 种, 即只含尿苷、腺苷。并且组织部位不同, 其含量也不一样, 不管是尿苷还是腺苷, 在组织中的含量依次为天然子座>栽培子座>发酵菌丝>天然菌核。而且人工栽培的子座与天然子座的核苷含量相差不大。

2.3 精密度实验

吸取同一对照品溶液反复进样 6 次, 结果如下: 尿苷的峰面积分别为 7789401.7、7759449.4、7833749.3、7427170.9、7507584.6、7272808.9, 腺苷的峰面积分别为 6794904.1、6780115.7、6325699.6、6431687.5、6904067.4、6445608.1, 尿苷、腺苷峰面积的平均值分别为 7598360.8、6613680.4, RSD 分别为 1.23%、1.48%, 说明仪器精密度良好。

2.4 稳定性实验

取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10h 内进样, 结果如下: 尿苷的峰面积分别为 1767900.0、1758066.5、1835327.4、1816897.3、1762684.8、1632651.7, 腺苷的峰面积分别为 404417.7、404128.9、406535.2、414480.9、401313.4、406785.8, 尿苷、腺苷峰面积的平均值分别为 1762254.6、406277.0, RSD 分别为 1.64%、0.45%, 供试品溶液在 10h 内稳定。

2.5 重复性实验

取同批样品精密称定 1g, 共 6 份, 制备供试品溶液, 按 1.2.3 节的方法配制供试品溶液, 按 1.2.1 节的高效液相色谱条件测定, 结果如下: 尿苷的峰面积分别为 2043603.8、2057599.3、1954774.1、1807240.1、1942601.6、1892638.4, 腺苷的峰面积分别为 408544.8、392519.0、395699.6、381168.1、411700.8、400453.5, 尿苷、腺苷峰面积的平均值分别为 1949742.9、398347.6, 平均含量分别为 2.024、1.179mg/g, RSD 分别为 1.97%、1.14%。表明重复性良好。

2.6 加标回收实验

称取已知含量的供试品 6 份, 分别加入混合对照品溶液, 按 1.2.3 节的样品溶液制备方法操作, 按照 1.2.1

节的高效液相色谱条件测定, 结果见表 3, 尿苷、腺苷的平均回收率为 98.8%、98.7%, RSD 分别为 1.08%、1.11%。

表 3 尿苷、腺苷的加标回收率
Table 3 Recoveries for uridine and adenosine

样品中成分	样品中含量(mg)	测得量(mg)	平均值(%)	RSD(%)
尿苷	2.078	4.041	98.8	1.08
	2.106	4.034		
	1.939	4.012		
	1.998	3.940		
	2.056	4.013		
	1.968	3.956		
腺苷	1.161	2.156	98.7	1.11
	1.210	1.178		
	1.145	2.162		
	1.206	2.150		
	1.201	2.193		
	1.149	2.156		

注: 尿苷的加入量均为 2.0mg; 腺苷的加入量均为 1.0mg。

3 讨论

本研究选择了 6 种通用的核苷作为标样, 并通过一系列的洗脱条件的筛选与优化, 得到了很好的标样分离图谱, 并以此条件对黑柄炭角菌的发酵菌丝、菌核、子座的核苷进行了很好的分离, 结果表明, 腺苷和尿苷的相对含量较高, 而且其含量在 4 种不同的结构中有明显的区别, 更为重要的是子座核苷的总体含量明显高于其他部位, 说明单从核苷活性成分方面来说, 子座更优于其发酵菌丝和菌核。而且人工栽培的子座与天然子座的核苷含量相差不大, 因此, 从核苷活性成分来说, 人工栽培的子座可替代天然子座和菌核。由于黑柄炭角菌生态环境独特、资源稀少, 开展人工栽培利用其子座替代传统的菌核有着重要意义。

参考文献:

- [1] 郭家林. 真菌乌灵参的生物学特性研究[J]. 成都中医学院学报, 1984, 2(3): 33-35.
- [2] 陈宛如, 方鸿峰, 马志章, 等. 真菌中药乌灵参化学成分初步研究[J]. 中国药理学杂志, 1990(11): 647-649.
- [3] 吴根福. 黑柄炭角菌产生的 DPPH 自由基捕捉成分[J]. 微生物学报, 2001, 41(3): 363-366.
- [4] 龚庆芳, 张玉梅, 谭宁华, 等. 黑柄炭角菌发酵菌丝体的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1269-1271.
- [5] TODA N, OKUNISHI H, TANIYAMA K, et al. Responses to adenine nucleotides and related compounds of isolated dog cerebral, coronary and mesenteric arteries[J]. Blood Vessels, 1982, 19(5): 226-236.
- [6] PELLEG A, PORTER R S. The pharmacology of adenosine[J]. Pharmacotherapy, 1990, 10(3): 157-174.
- [7] RIBEIRO J A. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system[J]. Pharmacol Toxicol, 1995, 77(5): 299-305.
- [8] 钟荣华, 徐水法. HPLC 测定乌灵菌粉中腺苷含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 679-680.