

# 油菜蜂花粉中一种核苷类成分的分离

黄 兰<sup>1,2</sup>, 孙丽萍<sup>1,\*</sup>, 薛晓锋<sup>1</sup>, 徐 响<sup>1</sup>, 庞 杰<sup>2</sup>, 何 伟<sup>1,2</sup>, 沈新锋<sup>1,2</sup>, 穆雪峰<sup>1,2</sup>  
(1.中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2.福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002)

**摘 要:** 为了研究油菜蜂花粉中核苷类成分的组成, 本实验采用 15% 乙醇进行超声提取, 结合薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)分析(展开剂为氯仿-甲醇-氨水, 体积比为 6.5:8.0:1.5), 再经 D101 大孔吸附树脂柱层析(洗脱剂为 5% 乙醇)、水饱和正丁醇萃取及高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)分离纯化, 最终分离得到单一化合物, 通过液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometer, LC-Q-TOF)对其相对分子质量、不饱和度、同位素匹配度、相似度进行分析, 通过 HPLC 法比较样品与标准品的保留时间、紫外光谱图比对, 确认该化合物为腺嘌呤(adenine)。

**关键词:** 油菜蜂花粉; 核苷类; TLC; 分离; 腺嘌呤

## Separation of a Nucleoside Analogue from Rape Bee Pollen

HUANG Lan<sup>1,2</sup>, SUN Li-ping<sup>1,\*</sup>, XUE Xiao-feng<sup>1</sup>, XU Xiang<sup>1</sup>, PANG Jie<sup>2</sup>,  
HE Wei<sup>1,2</sup>, SHEN Xin-feng<sup>1,2</sup>, MU Xue-feng<sup>1,2</sup>

(1.Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;  
2.College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In order to explore the nucleoside composition of rape bee pollen, the sample was subjected to extraction with 15% aqueous ethanol under the assistance of ultrasonic, TLC analysis using chloroform-methanol-ammonia (6.5:8.0:1.5, V/V) as the development solvent, chromatographic separation on D101 type macroporous adsorption resin column using 5% aqueous ethanol as the elution solvent, water saturated butanol extraction and high-performance liquid chromatographic (HPLC) purification and as a result, a single compound was obtained. The compound was identified as adenine by liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometer (LC-Q-TOF) according to the data of accurate mass, double bond equivalent (DBE), spacing match and similarity score and by comparison of its retention time and UV spectrum with those of the reference substance.

**Key words:** rape bee pollen; nucleoside analogue; thin layer chromatography(TLC); separation; adenine

中图分类号: S896.4; TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0151-04

关于核苷类的研究, 最早要追溯到酵母和动物生殖细胞, 目前多集中在冬虫夏草、三七、灵芝、半夏、贝母等中药材的研究<sup>[1]</sup>。该类化合物具有抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等多种生物活性, 应用领域甚是广泛<sup>[2]</sup>。腺嘌呤(adenine)为核苷类成分的一种, 是一种含氮杂环嘌呤类化合物, 化学名称为 6-氨基嘌呤, 其作为 DNA 与 RNA 中一种碱基, 能分别与胸腺嘧啶及尿嘧啶进行配对构成核酸, 因此是生命体遗传的重要物质。其磷酸盐有刺激白细胞增生的作用, 用于防治各种原因引起

的白细胞减少症, 特别是由于肿瘤化疗、放射治疗及苯类等药物中毒所造成的白细胞减少症<sup>[3]</sup>。

蜂花粉作为一种自然资源, 享有完全营养品的美誉, 具有多种生理活性功能, 诸如: 降血脂、增强心肌、耐缺氧、促进造血功能、改善微循环、抗疲劳、增强体质、抗衰老、对抗放化疗损伤、提高免疫力等<sup>[4-5]</sup>。油菜蜂花粉富含各种营养成分及功能因子, 研究表明, 油菜蜂花粉中含有黄酮类、酚类、维生素、必需氨基酸、植物甾醇、激素、多糖、油脂、蛋白

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD33B04); 国家现代农业(蜂)产业技术体系建设专项(CARS-45KXJ18); 科技部农业科技成果转化资金项目(2009GB23260456)

作者简介: 黄兰(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工工程。E-mail: huanglan922@163.com

\*通信作者: 孙丽萍(1963—), 女, 研究员, 硕士, 研究方向为蜂产品功能因子的分离与纯化。E-mail: caasun@126.com

等成分,具有抗氧化、抗疲劳、抗前列腺增生、抗肿瘤、增强免疫力及保护大鼠酒精性肝损伤等功效<sup>[6-12]</sup>。但是,目前关于蜂花粉中核苷类成分及其活性研究鲜见报道。Crane<sup>[13]</sup>指出蜂花粉中含有微量核苷类物质;岳兵等<sup>[14]</sup>通过 HPLC 技术对油菜蜂花粉中腺苷进行测定,未见蜂花粉核苷类成分系统研究的报道。本实验通过 D101 大孔吸附树脂柱层析、萃取及高效液相色谱(HPLC)法对油菜蜂花粉的乙醇提取物进行分离纯化,结合薄层色谱(TLC)法展开分析,以探究油菜蜂花粉中核苷类成分的组成。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

油菜蜂花粉,产自甘肃天水, -20℃ 保藏。

腺苷(Adenosine, 纯度≥99%)、腺嘌呤(Adenine, 纯度≥99%) 美国 Sigma 公司;肌苷(Inosine, 纯度99%)、尿苷(Uridine, 纯度99%)、鸟苷(Guanosine, 纯度99%) 美国 Amresco 公司;GF254 硅胶板(10cm×10cm) 青岛海洋化工厂分厂;D101 大孔树脂 南开大学试剂厂;甲醇(色谱纯) 美国 Fisher 公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AL204 电子天平 梅特勒-托利多(上海)公司;KH2200DE 超声仪 昆山和创超声仪器有限公司;LD5-2B 离心机 北京金立公司;RE-2000B 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;HA22-40-48 超临界萃取流体装置 江苏华安科技仪器有限公司;HL-2B 数显横流泵 上海精科实业有限公司;LC-20 HPLC 色谱仪 日本岛津公司;Agilent 6510 Q-TOF 液质联用仪 安捷伦科技有限公司;JY002S 型紫外分析仪 北京君意电泳设备有限公司;玻璃层析柱(2.0cm×40cm) 北京万鑫化业商贸公司。

### 1.3 标准品的配制

分别精密称取腺苷、肌苷、尿苷、鸟苷标准品 0.0040g,用 70% 甲醇定容至 10mL,最终质量浓度为 400 μg/mL 标准品溶液,其中鸟苷溶液中滴加几滴 10% KOH 溶液以保持稳定<sup>[15]</sup>;取各标准品溶液 1mL,混合均匀,制成混标溶液,低温避光保存。

### 1.4 油菜蜂花粉粗提样的制备

取油菜蜂花粉 50g,加 15% 乙醇超声提取 3 次(提取体积 250mL×3,时间 30min/次,温度 45℃,超声频率 100Hz),4500r/min 离心 10min,取上清液,合并 3 次上清液并浓缩至体积约 100mL,以备分离纯化之用。取 10mL 提取液浓缩至干,用 70% 甲醇溶解,以备 TLC 分析用。

### 1.5 油菜蜂花粉粗提样的分离纯化

取经预处理过<sup>[16-17]</sup>的 D101 大孔吸附树脂,湿法上

柱,用 3BV 超纯水平衡层析柱材,以 1.0BV/h 的流速上样(样品制备方法见 1.4 节),吸附完毕后用 5% 乙醇以 3BV/h 流速洗脱,收集洗脱液并减压浓缩。浓缩样经水饱和和正丁醇等体积萃取 4 次,取正丁醇萃取液,减压浓缩至干,加 70% 甲醇溶解,再经 HPLC 分离得单一化合物,记为 H。

### 1.6 TLC 条件

取 GF254 预制硅胶薄层板,于 105℃ 干燥箱内活化 30min<sup>[18]</sup>备用;展距为 8cm,点样间隔 1cm;展开剂为氯仿-甲醇-氨水(体积比 6.5:8.0:1.5),饱和 30min 后将薄层板置于层析缸内,展开完毕取出晾干,于紫外灯(254nm)下检视并拍照、记录。

### 1.7 液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(LC-Q-TOF)分析条件

HPLC 条件:岛津 LC-20 HPLC 色谱仪, AQ-C<sub>18</sub> (250mm×4.6mm, 5 μm) 色谱柱;洗脱剂为甲醇(A)-水(B);梯度洗脱:1~5min, 5%~9% A; 5~24min, 9% A; 24~25min, 9%~10% A; 25~27min, 10%~40% A; 27~37min, 40% A; 37~40min, 40%~5% A; 40~50min, 5% A; 流速 1.0mL/min;柱温 30℃;进样体积:5 μL。

LC 条件:Agilent 6510 Q-TOF, SB C<sub>18</sub> (2.1mm×150mm, 3.5 μm) 色谱柱;流动相:0.1% 的甲酸水溶液-乙腈(70:30);流速:0.2mL/min;柱温:30℃;进样体积:5 μL。

质谱条件:电离方式:ESI<sup>+</sup>;雾化气压力:30 psi;干燥气流速:9L/min;干燥气温度:350℃;毛细管电压:4000V;碎裂电压:135V;扫描方式:全扫描;扫描质量范围:60~1000;采集速率:1 spectra/s。

## 2 结果与分析

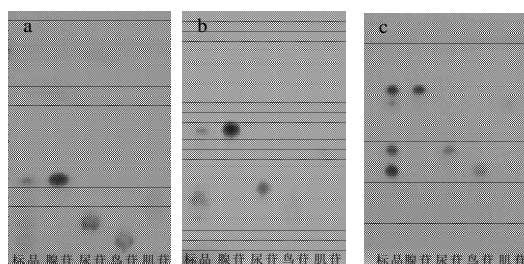
### 2.1 提取溶剂的选择

核苷类成分为强极性化合物,常用较强极性溶剂提取<sup>[19-20]</sup>。本实验采用水、15% 乙醇、45% 乙醇 3 种溶剂进行提取并对提取效果进行比较。结果表明:水提液减压干燥时容易起泡,造成样品喷出旋蒸瓶外;进行 TLC 分析时,样液黏稠,点样及展开困难。采用 45% 乙醇提取,增加了油菜蜂花粉中酚类成分(含黄酮类)的溶出,增加了后续分离纯化的难度。实验证明 15% 乙醇不仅能将核苷类成分提取出来,还能减少黄酮、酚酸、蛋白、糖类等非核苷类成分的干扰,因此选择 15% 乙醇作为本实验的提取溶剂。

### 2.2 油菜蜂花粉粗提样 TLC 分析

#### 2.2.1 展开剂选择

对两种展开体系(苯-甲醇-氨水体系和氯仿-甲醇-氨水体系)进行了比较,展开效果如图 1a、b 所示。



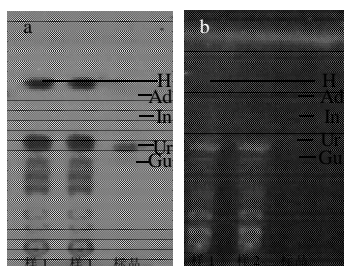
a. 苯-甲醇-氨水(体积比 8.5:7.0:0.5); b. 氯仿-甲醇-氨水(体积比 8.5:7.0:0.5); c. 氯仿-甲醇-氨水(体积比 6.5:8.0:1.5)。

图1 油菜蜂花粉粗提样3种TLC展开剂展开效果对比

Fig.1 Comparison of three development solvents for TLC analysis of rape bee pollen extract

图1a展开剂为苯-甲醇-氨水(体积比 8.5:7.0:0.5), 分离效果较差,  $R_f$  值过低, 在 0.30 以下, 究其原因可能为甲苯稠度较大, 展开体系极性偏小, 不利于各成分展开; 图1b展开剂为氯仿-甲醇-氨水(体积比 8.5:7.0:0.5), 斑点分离效果较苯-甲醇-氨水体系好,  $R_f$  值在 0.20~0.50 范围, 但存在拖尾现象, 因此调整各溶剂比例以改善拖尾, 最终确认氯仿-甲醇-氨水(体积比 6.5:8.0:1.5)作为最佳展开剂(图1c), 该展开条件下, 各斑点彼此分离、无拖尾,  $R_f$  值在 0.30~0.70 的范围内, 符合 TLC 要求。

### 2.2.2 油菜蜂花粉粗提样 TLC 分析



a. 波长 254nm; b. 波长 365nm; Ad.腺苷; In.肌苷; Ur.尿苷; Gu.鸟苷。

图2 油菜蜂花粉粗提样 TLC 分析

Fig.2 TLC analysis of crude rape bee pollen extract

在 254nm 波长处观察, 标品由上至下依次为腺苷(Ad,  $R_f$  值 0.71)、肌苷(In,  $R_f$  值 0.67)、尿苷(Ur,  $R_f$  值 0.44)、鸟苷(Gu,  $R_f$  值 0.36); 在 365nm 波长处观察, 各核苷标品无斑点。TLC 显示粗提样(样1)成分较杂, 斑点较多, 在  $R_f$  值 0.44 和  $R_f$  值 0.36 处有对应斑点, 与标品比对, 提示粗提样可能含有尿苷和鸟苷; 同时粗提样在腺苷上方有一大而深的斑点,  $R_f$  值为 0.78, 且 365nm 波长处未见斑点, 推测该斑点(标记为 H)可能为核苷类

成分, 因此对此斑点进行制备鉴定以确认其成分。

### 2.3 H 成分的 HPLC、UV、LC-Q-TOF 分析

采用 D101 大孔树脂柱层析分离、水饱和正丁醇萃取、HPLC 制备得到单一色谱峰, 经面积归一法计算其纯度达到 94.9%, 由 UV 图谱可知该成分在 213nm 及 259nm 处有最大吸收, 见图 3。

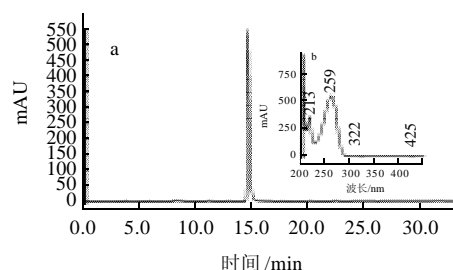


图3 H 化合物的高效液相色谱及紫外光谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram and UV spectrum of TLC spot H

经 LC-Q-TOF 测定, 并采用 Agilent Mass HUNTER 软件用分子特征提取对质谱数据进行数据分析, 得到结果如表 1 所示。

表1 LC-Q-TOF 法鉴定 H 化合物的精确质量和元素组成

Table 1 Accurate mass and elemental composition of TLC spot H identified by LC-Q-TOF

保留时间/min	$[M+H]^+$ 准确质量	$[M+H]^+$ 理论质量	元素组成	误差	相似度/%	同位素匹配度/%	不饱和度
1.937	36.0619	136.0618	$C_5H_5N_5$	$1.0 \times 10^{-4}$	99.43	99.96	6

由表 1 可知, H 的  $[M+H]^+$  准确质量为 136.0619, 而理论质量为 136.0618, 两者相差  $1.0 \times 10^{-4}$ ; 不饱和度为 6, 与腺嘌呤相符合; 且同位素匹配度高达 99.96%, 具有 99.43% 相似度得分, 经与腺嘌呤标品比对, 其 HPLC 保留时间及紫外光谱同标准品一致, 质谱测定分子质量与标准品相同, 由此确定化合物 H 为腺嘌呤, 结构见图 4。

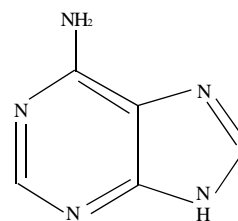


图4 腺嘌呤分子结构图

Fig. 4 Molecular structure of adenine

## 3 结论

本实验采用 TLC 对油菜蜂花粉中核苷类成分进行定

性分析, 展开剂为氯仿-甲醇-氨水(体积比 6.5:8.0:1.5)。采用 D101 大孔树脂柱层析、水饱和正丁醇萃取及 HPLC 分离纯化油菜蜂花粉中未知成分 H, 经 LC-Q-TOF 测定, 采用 HPLC 与标准品的保留时间及紫外光谱比对, 确认该化合物为腺嘌呤。腺嘌呤为一种核苷碱基, 由嘌呤环及 6 位上的氨基组成。

#### 参考文献:

- [1] 吕爱娟, 吴皓. 中药中核苷类成分的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 94-97.
- [2] KINAHAN J J, KOWALE P, GRINDEY G B. Biochemical and anti-tumor effects of the combination of thymidine and 1- $\beta$ -D-arabino-furanosylcytosine against leukemia L1210[J]. Cancer Res, 1981, 41(2): 445-451.
- [4] 杨晓宇, 杨少玲, 杨华. 花粉资源利用研究进展[J]. 特产研究, 2003 (4): 52-63.
- [5] ELKINS R. Bee pollen, royal jelly, propolis and honey: an extraordinary energy and health-promoting ensemble[M]. Orem UT: Woodland Publishing, 1996.
- [6] LU T, EDWARD P C L, JORN C C, et al. Analysis for flavonoids in bee pollens by capillary electrophoresis[J]. Food Science, 2006, 325: 582-587.
- [7] 徐响, 何伟, 孙丽萍, 等. 蜂花粉油脂抗氧化活性与类胡萝卜素含量的相关性[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 155-158.
- [8] 张金明, 杨晓萍. 油菜花粉多糖对小鼠机体免疫功能的影响[J]. 公共卫生与预防医学, 2004, 15(6): 45-46.
- [9] 杨佳林, 孙丽萍, 徐响, 等. 油菜蜂花粉黄酮醇的测定及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 79-82.
- [10] 孙丽萍, 王大仟, 廖磊, 等. 油菜蜂花粉及其提取物对大鼠酒精性肝损伤组织学影响[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 442-444.
- [11] 杨晓萍, 吴谋成. 油菜蜂花粉多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 营养学报, 2006(2): 160-162.
- [12] 龚蜜, 张力, 杨冰, 等. 油菜蜂花粉醇提工艺的优化[J]. 中国农学报, 2010, 26(23): 112-115.
- [13] CRANE E. Bees and beekeeping: science, practice and world resources [M]. Oxford: Heinemann Professional Publishing Ltd, 1990.
- [14] 岳兵, 薛晓锋, 吴黎明, 等. 高效液相色谱法测定蜂花粉中的腺苷[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(增刊 1): 62-64.
- [15] RANOGAJEC A, BELUHAN S, MIT Z. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversed-phase HPLC [J]. J Sep Sci, 2010, 33: 1024-1033.
- [16] 徐青, 卢莹莹, 辛建美, 等. 大孔树脂吸附分离海芦笋中黄酮类化合物工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 115-119.
- [17] 孙静, 严建业, 张玉波. 板蓝根提取物中核苷类成分的纯化工艺研究[J]. 中南药学, 2010, 8(2): 101-105.
- [18] 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, 25(5): 402-405.
- [19] JIANG Y, WONG J H, FU M, et al. Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*[J]. Phytomedicine, 2011, 18: 189-193.
- [20] GU Yuxiang, WANG Zunsheng, LI Suxia, et al. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*[J]. Food Chemistry, 2007, 102: 1304-1309.