DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.012

定量毛细管电泳法测定虫草类保健品中的核苷及碱基类物质 *

李 栋 王 彦△ 薛 芸 周君裔 闫 超△

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:定量毛细管电泳法因采用了定量阀进样的方式,其进样量为固定值,定量结果更加可靠,且重复性好。本文探讨了采用定量毛细管电泳方法测定市售虫草类保健品中虫草素、腺嘌呤、尿嘧啶、腺苷、尿苷含量的可行性,优化了分析条件,并对其进行含量测定。**方法:**以浓度为 40 mM、pH 9.5 的硼砂为缓冲液,工作电压为 -15 kv,采用定量毛细管电泳的方测定了虫草类制品中的核苷及碱基类物质的含量。**结果:**五种核苷及碱基类物质在优化的定量毛细管电泳条件下得到了良好的分离和定量结果,峰面积 RSD 值小于 1.4%,测定了其在虫草菌丝体粉末及虫草王胶囊中的含量。**结论:**首次利用定量毛细管电泳法对虫草类保健品中的虫草素、腺嘌呤、尿嘧啶、腺苷、尿苷的含量进行了定量测定,不同形式虫草类保健品中核苷、碱基的种类和含量有差异。该方法快速、准确,对虫草类保健品的质量控制有重要意义。

关键词:定量毛细管电泳;核苷;碱基;保健品

中图分类号:TP202+.1,R917,R927.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-646-04

Determination of Nucleoside and Base in Cordyceps Health Products*

LI Dong, WANG Yan△, XUE Yun, ZHOU Jun-yi, YAN Chao△

(Pharmacy college of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: By using a quantitative valve to introduce sample into the capillary, the injection volume of quantitative capillary electrophoresis (qCE) is fixed, so quantitative results are more reliable and reproducible. This article explored the feasibility of determination of cordycepin, adenine, adenosine, uridine and uracil in cordyceps health product by quantitative capillary electrophoresis (qCE). **Methods:** The content of cordycepin, adenine, adenosine, uridine and uracil in cordyceps health product was determined at 40 mM borax buffer (pH 9.5) and separation voltage -15 kV. **Results**: The five kinds of nucleoside and base achieved a good separation, and RSD was lower than 1.4% in terms of peak area. The concentration of these substances were determined in real samples. **Conclusion:** Cordycepin, adenine, adenosine, uridine and uracil has been quantitative determination by qCE for the first time, the types and quantity of nucleoside and base from different products are different. This method is rapid, accurate, and important for the quality control of Cordyceps health products.

Key words: Quantitative capillry electrophoresis; Nucleoside; Base; Health care products

Chinese Library Classification(CLC): TP202+.1, R917, R927.11 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)04-646-04

前言

虫草是一类寄生于昆虫体上的真菌与其寄主昆虫形成的虫菌复合体,是驰名中外的珍贵食用药用菌。常见的虫草有冬虫夏草、蛹虫草、亚香棒虫草等等,其中以冬虫夏草(Cordyceps sinensis)的利用与研究最为长久和深入[1]。冬虫夏草的生长需要特殊的地理与气候环境,还受严格的寄生性限制。目前,野生的冬虫夏草已处于濒危状态。由于冬虫夏草显著的药用价值,因此人工培养的蛹虫草或以发酵生产的虫草菌丝生产的药品和保健品就成了冬虫夏草主要的替代品。

虫草类制品主要的有效产物为核苷类物质虫草素(cordycepin)、腺嘌呤(adenine)、腺苷(adenosine)、尿嘧啶(uracil)、尿苷(uridine)等,其中腺苷已被用作冬虫夏草的质控指标。传统毛细管电泳因其进样方式存在的天然缺陷,如采用压力进样时进样量会受到样品黏度、外界温度等多种因素的影响,而采用电迁移进样时进样量会因样品的电泳淌度不同而造成进样歧视并最终使分析结果失真,上述问题使毛细管电泳法在定量分析中的应用受到限制。而定量毛细管电泳系统[2]由于采用了具有固定体积的定量阀进样,每次的进样量为固定值,不受外界因素的干扰,定量结果稳定、可靠。本文建立了定量毛细管电泳系统下同时测定虫草素、腺嘌呤、腺苷、尿嘧啶、尿苷五种核苷及碱基的分析分离条件, 并对市售的虫草类保健品进行了定量分

* 基金项目:国家自然科学基金项目(21175092,21105064);国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ150072;2011YQ15007204;2011YQ15007207;2011YQ15007210);上海市自然基金项目(12ZR1413600)

作者简介:李栋(1988-),男,主要研究方向:毛细管电泳

△通讯作者:王彦,电话:021-34205988,E-mail: wangyan11@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2013-03-11 接受日期:2013-04-10)

析。结果显示该方法快速、准确，可用于实际样品中虫草素、腺嘌呤、腺苷、尿嘧啶、尿苷的定量测定，为虫草类保健品的质量控制提供了一种有效方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

毛细管电泳仪 (TriSepTM-2100, Unimicro Technologies, Inc.)，色谱工作站(Unimicro Technologies, Inc. Pleasanton, CA, USA)，熔融石英毛细管柱(河北永年锐沣色谱器件公司)；尿嘧啶(美国 Sigma－Aldrich 公司)；虫草素(上海阿拉丁试剂有限公)；腺嘌呤、腺苷、尿苷(上海伯奥生物科技有限公司)。虫草菌丝体粉末和虫草王胶囊均为市售商品。

1.2 实验准备及样品制备

五种核苷及碱基标准溶液的配制：分别称取虫草素、腺嘌呤、尿嘧啶、腺苷、尿苷适量，用超纯水配成 1 mg/mL 的单标储备液，4℃ 冰箱保存，使用时稀释至所需浓度。

供试品溶液制备：称取胶囊内容物和虫草菌丝体粉末适量，110 ℃ 烘干 2 h。精密称取烘干后的虫草菌丝体粉末 1.0 g (0.0001 g)，加入 10 mL 超纯水，超声震荡提取 1 h，10000 r/min 离心 15 min，取上清液，放入 4℃ 冰箱备用。所有缓冲液及标准溶液使用前均经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，超声后使用。

2 方法与结果

2.1 定量毛细管电泳分离条件优化

2.1.1 缓冲液浓度 缓冲液浓度影响溶液的粘度系数、被分离物的扩散系数和毛细管内表面的 ζ 电位，不仅会影响被测物质的分离度和迁移时间，还会影响峰值电流。实验过程中发现随着硼砂缓冲液浓度的增加，五种分析物的分离度、峰形也越来越好，并在 40 mM 时获得了最好的分离效果。继续增大缓冲液浓度至 50 mM，电流接近 100 μA，较高的电流会产生大量的焦耳热，使得焦耳热效应更为显著，导致基线不平、分离效率下降。故最终确定硼砂缓冲液的浓度为 40 mM。

2.1.2 缓冲液 pH 缓冲液的 pH 除影响物质的带电状态外，还影响毛细管内的电渗流，从而对物质的选择性和分离度产生影响。结果发现，随着 pH 不断增大，五种核苷及生物碱的迁移时间不断增大，这是因为羟基的不断解离使得相对于电渗流方向的电泳流不断增加。五种核苷及碱基类物质在 pH 达到 9.0 时实现完全分离(图 1)。当 pH 继续增大，电流上升，焦耳热增大，电流也持续增加直至超过仪器量程导致基线不稳，区带展宽。综合考虑分离度及峰形等因素，最终选择 40 mM、pH 9.5 的硼砂作为最佳缓冲液条件。

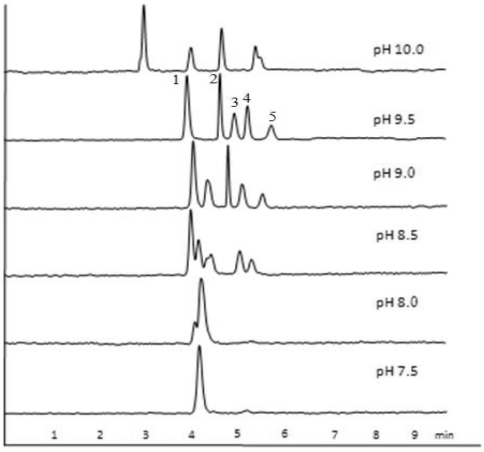


图 1 不同 pH 的硼砂缓冲液对五种核苷及碱基类物质的分离电泳图
(1，虫草素；2，腺嘌呤；3，尿嘧啶；4，腺苷；5，尿苷)

Fig.1 Electropherogram of cordycepin, adenine, adenosine, uridine, uracil at 40 mM borax buffer with different pH
(1, cordycepin; 2, adenine; 3, adenosine; 4, uridine; 5, uracil)

2.1.3 分离电压 以优化得到的 40 mM、pH 9.5 硼砂作为缓冲液，在毛细管两端施加 -5 kV 至 -25 kV 的电压，发现在 -12 kV 时五种物质实现了基线分离。相对较高的分离电压会提高分离度和缩短分析时间，但若电压太高则会使谱带变宽降低分离效率。考虑分离度及分析时间等因素，最终确定电压为 -15kV。

2.1.4 最优条件 最终得到的经优化的毛细管电泳条件为：浓度为 40 mM、pH 9.5 的硼砂缓冲液，工作电压为 -15 kV。在此条件下五种核苷及碱基类物质的标准品获得了良好的分离 (图 2) 。

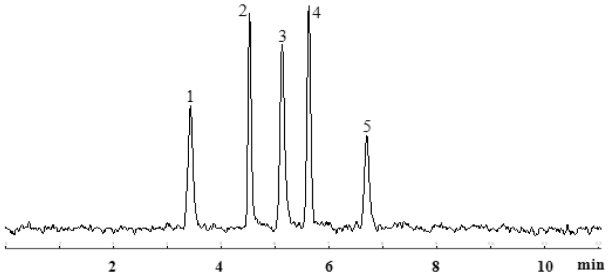


图 2 最优实验条件下五种核苷及碱基标准品的电泳图
(1，虫草素；2，腺嘌呤；3，尿嘧啶；4，腺苷；5，尿苷)

Fig.2 Electropherogram of cordycepin, adenine, adenosine, uridine, uracil at the optimal experimental conditions
(1,ordycepin, 2,adenine 3, adenosine 4,uridine 5, uracil)

表 1 五种核苷及碱基的线性关系

Table 1 Linear correlation and LOD, LOQ of cordycepin, adenine, adenosine, uridine and uracil

Compound	Calibration	R	LOD(μg/mL, S/N=3)	LOQ(μg/mL, S/N=10)
Cordycepin	y=446386x-1517.8	0.9967	8	20
Adenine	y=208992x+633.98	0.9989	5	10
Uridine	y=344403x-2376.1	0.9995	8	15
Adenosine	y=222947x+1475.5	0.9955	5	10
Uracil	y=390282x+2683.9	0.9974	8	20

2.2 精密度实验

系统的精密度实验通过对虫草素、腺嘌呤、腺苷、尿嘧啶和尿苷的标准混合液(浓度均为 20 μg/mL)连续进样 6 次所得的结果进行分析。结果显示,五种物质迁移时间的 RSD 值小于 0.8%,峰面积的 RSD 值小于 1.4%,精密度良好。

2.3 线性、检测限及定量限

精密称取五种核苷及碱基,分别配制成 200 μg/mL、150 μg/mL、100 μg/mL、70 μg/mL、50 μg/mL、30 μg/mL、20 μg/mL 的混合标准溶液。在每一个浓度水平下连续进样 3 次,取其平均值。在优化的毛细管电泳条件下,五种核苷及碱基类物质的峰面积 - 浓度曲线都表现出良好的线性关系。

2.4 实际样品测定

虫草菌丝体粉末和虫草王胶囊中的五种核苷及碱基类物质在优化的电泳条件下获得了良好的分离和检测。根据实际样品中各组分迁移时间的不同来进行定性分析。结果显示,虫草菌丝体粉末中没有尿嘧啶和尿苷这两种核苷,而虫草王胶囊中则不含尿苷。

取干燥后的虫草菌丝体粉末和胶囊内容物 1.0 g,按 1.2 项下方法制备测定,连续进样 3 次进行分析,实际结果如下表。

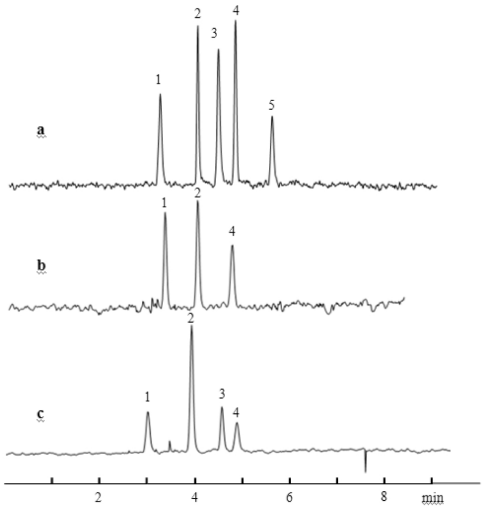


图 3 不同实际样品的定量电泳图

(a:标准品,b:虫草菌丝体粉末,c:虫草王胶囊, 1,虫草素;2,腺嘌呤;3,尿嘧啶;4,腺苷;5,尿苷)

Fig.3 Electropherogram of real samples

(a: standard sample, b: cordycepspowder, c: cordyceps capsules, 1, cordycepin,2, adenine, 3, adenosine,4, uridine 5, uracil)

表 2 实际样品的含量分析

Table 2 Determination of real samples with qCE system

Sample	Cordycepin (mg/g)	Adenine (mg/g)	Uridine (mg/g)	Adenosine (mg/g)	Uracil (mg/g)	RSD(%)
Cordyceps	1.19	0.78	ND	0.41	ND	1.1
Powder	0.86	1.93	1.07	0.25	ND	2.1

Note: * ND for Not Detected.

3 讨论

由于冬虫夏草药材的昂贵性以及特殊的生物活性,特别是其在免疫调节、抗菌抗肿瘤等方面的作用[3],使其在医药领域越来越多的受到重视和追捧,而发展快速、简便、灵敏准确的活性物质含量测定方法则是研究开发和应用冬虫夏草的基础。目前应用较多的方法有高效液相色谱(HPLC)[4-6]、毛细管电泳[7-9]等方法, 两种分析方法各有其优缺点,HPLC 法的方法专属性强,灵敏度高,选择性好,但由于柱效的局限,常见于单个或两个成分的同时测量,不适合同时测定多成分。而毛细管电泳则因其分离效率高、分析速度快、样品消耗少等优势,在日常的分析工作中所占的比重也越来越大。本研究建立了采用定量毛细管电泳系统分析核苷及碱基类物质成分的方法。定量毛细管电泳由于采用了定量阀进样的方式,相比传统电泳其分析结果的精度更高,重现性更好,定量结果更加准确。

利用定量毛细管电泳系统,在优化的实验条件下:以浓度为 40 mM、pH 9.5 的硼砂为缓冲液,采用内径为 75 μm 的毛细管(总长 60 cm,其中有效长度 40 cm),在 -15 kV 电压下对虫草菌丝体粉末和虫草王胶囊中的五种核苷及碱基类成分进行了定性和定量分析,获得了满意的结果。由于上述虫草类保健中核苷及碱基类成分含量受诸多因素的影响[10],如温度、湿度等,会造成其在有效成分种类和数量上的差别,因此急需一种方便快速的测量方法对其成分进行测量。而传统毛细管电泳方法由于在进样方式上存在的缺陷,使其在质控和质保领域的应用受到限制。在冬虫夏草以克或条论价的今天,药食两用、家庭保健和商务送礼使冬虫夏草及其相关保健品行业异常兴旺而混乱,同时也是很热门的研究课题[11-20],建立虫草类保健品的质量标准迫在眉睫。本研究建立的定量毛细管电泳方法具有定量准确、分析速度快、样品消耗少等特点,可用于虫草类保健品中核苷及碱基类成分的定性分析及定量测定,为其质量控制开辟了一条新的有效的途径。

参考文献(References)

[1] 周慧燕, 陈珏, 许丽丽. 冬虫夏草中核苷类化学成分的含量测定研究进展[J]. 中成药, 2011, 33 (11): 1955-1960
Zhou Hui-yan, Chen Jue, Xu Li-li. Progress in determination of nucleoside in cordyceps sinensis [J].Chinese Traditional Patent Journal, 2011, 33(11): 1955-1960

[2] Li Meng-jia, Zhou Jun-yi, Gu Xue, et al. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets[J]. J. Sep. Sci., 2009, 32(2): 267-274

[3] 刘高强, 王晓玲, 杨青, 等. 冬虫夏草化学成分及其药理活性研究[J]. 食品科技, 2007, 1: 202-209
Liu Gao-qiang, Wang Xiao-ling, Yang Qing, et al. Study of chemical constituents and pharmacological activity in CordycepsSinensis [J]. Food science and technology, 2007, 1: 202-209

[4] Zhou Jin-hui, Xu Xiang, Sun Li-ping, et al. Simultaneous determination of four nucleosides in bee pollens of various floral origin by

HPLC-UV detector[J]. Analytical Methods, 2012, 4(11): 3792-3797

[5] Yu Jia-wen, Zhao Jie, Xiao Qin, et al. Simultaneous determination of myriocin-like long-chain bases in cordyceps by HPLC-UV with pre-column derivatization[J]. Analytical Methods, 2012, 4(7): 2134-2140

[6] 李丹, 文红梅, 崔福春, 等. LC-MS/MS 法快速测定中成药、保健食品中非法添加的 36 种化学成分[J]. 药物分析杂志, 2010, 8: 1527-1532
Li Dan, Wen Hong-mei, Cui Fu-chun, et al. LC-MS/MS screening for 36 chemical components in health food and Chinese traditional patent medcine[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 8: 1527-1532(In Chinese)

[7] Yang Feng-qing,Ge Li-ya,Yong Jean-wan-hong, et al. Determination of nucleosides and nucleobases in different species of cordyceps by capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50(3): 07-314

[8] 阮婧华, 孙毓庆. 毛细管区带电泳法同时测定冬虫夏草中多种核苷及其碱基成分含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2): 112-114
Ruan Jing-hua, Sun Yu-qing. Simutaneous determination of nucleosides and their bases in Cordyceps Sinensis(Berk.) Sacc. by capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2002, 19(2) :112-114

[9] 吴敏, 卢佳, 孙成均, 等. HPCE 法同时测定保健品及中成药中的 5 种苷类成分[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(2): 165-167
Wu Min, Lu Jia, Sun Cheng-jun, et al. Simultaneous determination of five kinds of glycosides in health care products and Chinese patent medcine by HPCE[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 26(2): 165-167

[10] 李绍平, 李萍, 季晖, 等. 天然与发酵培养冬虫夏草中核苷类成分的含量及变化[J]. 药学学报, 2001, 36(6): 436-439
Li Shao-ping, Li Ping, Ji Hui, et al. The contents and their change of nucleosides from natural cordyceps sinensis and culturedcordyceps mycelia. Acta Pharmaceutica Sinica, 2001, 36(6): 436-439

[11] 胡咏川, 田国鑫. 冬虫夏草性状鉴别与含量标准存在的问题[J]. 中国药房, 2011, 22(47): 4502-4503
Hu Yong-chuan, Tian Guo-xin. Problems in Cordyceps character identification and content standards[J]. China Pharmacy, 2011, 22(47) : 4502-4503

[12] Ikhlas AK, Troy S. Implementing a “quality by design” approach to assure the safety and integrity of botanical dietary supplements [J]. 2012, 75(9): 1665-1673

[13] Claver BJ, Valencia MC, Captain-Vallvey LF. Analysis of phenolic compounds in health care products by low-pressure liquid-chromatography with monolithic column and chemiluminescent detection [J]. Luminescene, 2011, 26(1): 44-53

[14] Yue GGL, Lau CBS, Fung KP, et al. Effects of Cordyceps sinensis, Cordyceps militaris and their isolated compounds on ion transport in Calu-3 human airway epithelial cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 117(1): 92-101

[15] Guo Wei-liang, Zhang Zhuo-yong, Lu Jian-hui. Application of near infrared spectroscopy in screening Cordyceps militaris mutation strains and optimizing their fermentation process [J]. Spectroscopy and spectral analysis, 2010, 30(8): 2077-2082

[16] Chan Wing-hin, Ling Ka-ho, Chiu Siu-Wai. Molecular Analyses of Cordyceps gunnii in China [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2011, 19(1): 18-25

[17] Ikeda R, Nishimura M, Sun Y, et al. Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of Cordyceps? and its allies[J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(6): 630-636

[18] Chen ML, Chenung FWK, Chan MU, et al. Protective roles of Cordyceps on lung fibrosis in cellular and rat models[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 143(2): 448-454

（上接第 616 页）

[13] 周永刚, 刘畅, 毛飞, 等. 荷叶化学成分的 HPLC-TOF/MS 分析 [J]. 药学实践杂志, 2011, 29: 342-346
Zhou Yong-gang, Liu Chang, Mao Fei, at al. Analysis of chemical constituents of Lotus leaf by HPLC-TOF /MS [J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2011, 29: 342-346

[14] Tao Jun, Qian Chen-qin, Tang Zhong-qiu, et al. Chemical fingerprint technique and its application in the classification and quality assessment of the Gastrodia tuber[J]. African J Biotech, 2011, 10: 16746-16756

[15] 谭碧君, 孔海文, 陶钧. 天麻色谱学分类与品质评价 [J]. 化学与生物工程, 2012, 29: 85-90
Tan Bi-jun, Kong Hai-wen, Tao Jun. Chromatographic classification & quality assessment of Gastrodia tuber[J]. Chemistry and bioengineering, 2012, 29: 85-90

[16] 周俊, 浦湘渝, 杨雁宾, 等. 天麻的化学研究：几种国产天麻属植物的化学成分[J]. 云南植物研究, 1983, 5: 443-444
Zhou Jun, Pu Xiang-yu, Yang Yan-bin, et al. Chemical studies of Gastrodia elata: chemical constituents of Several kinds of domestic Gastrodiae elata[J]. Acta Botanica Yunnanica, 1983, 5: 443-444

[17] 周俊, 杨雁宾, 杨崇仁. 天麻的化学研究Ⅰ：天麻化学成分的分离和鉴定[J]. 化学学报, 1979, 37: 183-185
Zhou Jun, Yang Yan-bin, Yang Chong-ren. Chemical studies of Gastrodia elata: Isolation and identification of chemical constituents of Gastrodia tuber[J]. Acta Chimica Sinica, 1979, 37: 183-185

[18] 谢笑天, 李海燕, 王强, 等. 天麻化学成分研究概况[J]. 云南师范大学学报, 2004, 24: 22-25
Xie Xiao-tian, Li Hai-yan, Wang Qiang, et al. The Study of chemical constituents in Gastrodia elata blume [J]. Journal of Yunnan Normal University, 2004, 24: 22-25