

不同产地蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量比较

张洪梅 史晓飒 刘腾飞 马维维 张艳聪 史新元

【摘要】 目的 分析比较 10 批不同产地蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量,为蝉花的质量评价及生产用药的筛选提供方法和基础数据。**方法** 采用高效液相色谱法分别测定不同产地蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量。**结果** 腺苷以江苏茅山的蝉花含量最高,为 44.957 $\mu\text{g/g}$,广西玉林的最低,为 11.331 $\mu\text{g/g}$;虫草素以四川宜宾的含量最高,为 191.725 $\mu\text{g/g}$,江西九江的蝉花含量最低,为 25.437 $\mu\text{g/g}$;各产地麦角甾醇含量差异相对较小,范围为 120.024 ~ 301.652 $\mu\text{g/g}$ 。**结论** 不同产地蝉花中的腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量差异较大;该方法适用于蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量测定,为其质量评价提供参考。

【关键词】 蝉花; 腺苷; 虫草素; 麦角甾醇; 高效液相色谱法

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.010

Comparing research on contents of adenosine, cordycepin and ergosterol in cordyceps cicadae

ZHANG Hongmei, SHI Xiaosa, LIU Tengfei, et al. School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: SHI Xinyuan, E-mail: xyshi@126.com

【Abstract】 Objective The contents of adenosine, cordycepin and ergosterol in cordyceps cicadae from 10 different areas were compared to provide basis for the quality evaluation and utilization of cordyceps cicadae. **Methods** The high performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure the contents of adenosine, cordycepin and ergosterol in cordyceps cicadae from different areas. **Results** The highest content of adenosine in cordyceps cicadae was 44.957 $\mu\text{g/g}$ from Jiangsu, and the lowest was 11.331 $\mu\text{g/g}$ from Guangxi. The highest content of cordycepin was from Sichuan and the content was 191.725 $\mu\text{g/g}$, and that from Jiangsu was 25.437 $\mu\text{g/g}$, which was the lowest. The content of ergosterol in cordyceps cicadae from different areas varied from 120.024 $\mu\text{g/g}$ to 301.652 $\mu\text{g/g}$. **Conclusion** There is difference among the contents of adenosine, cordycepin and ergosterol in Cordyceps cicadae from different areas; the method can be used to determine them in cordyceps cicadae, and to provide the reference for the quality evaluation of cordyceps cicadae.

【Key words】 Cordyceps cicadae; Adenosine; Cordycepin; Ergosterol; HPLC

蝉花又名蝉蛹草、蝉茸等,是蝉拟青霉等真菌寄生于一些蝉若虫后形成的菌虫复合体,隶属真菌门、子囊菌纲、麦角菌目、麦角菌科、虫草属,是传统中药材之一^[1-3]。现代研究表明,蝉花具有调节人

体免疫^[4-6]、改善肾功能^[7-9]、抗菌^[10-11]、抗肿瘤^[12-14]、抗氧化等多种药理活性。

作为一种传统的药用真菌,蝉花富含多种必需氨基酸、多糖、腺苷、麦角甾醇、虫草素等活性物质^[15-16]。其中,腺苷是一种嘌呤核苷,其含量已被用作多种虫草的质控指标。有报道表明,蝉花中的腺苷含量约为冬虫夏草中的 4 倍^[17]。腺苷涉及中枢神经系统中多种生理过程的调节,具有防止心律失常、降低血压、抑制血小板凝集等作用^[18]。虫草素是第一个从真菌中分离出来的核苷类成分,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、提高人体免疫力等生

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[张洪梅(硕士研究生)、史晓飒(硕士研究生)、刘腾飞(博士研究生)、马维维(硕士研究生)、张艳聪(硕士研究生)、史新元]

作者简介: 张洪梅(1993-),女,2016 级在读硕士研究生。研究方向: 中药生物技术研究。E-mail: lovwendy@126.com

通信作者: 史新元(1974-),女,博士,教授。研究方向: 中药生物技术研究。E-mail: xyshi@126.com

理活性^[19],在医药方面具有广泛的应用前景。麦角甾醇是真菌类细胞膜上的特征甾醇,在虫草类真菌中含量相对稳定,专一性强,通常作为质量控制指标之一,它是维生素 D₂的前体物质,其次代谢产物可产生麦角甾醇氧化物,对真菌具有重要的生理功能,且具有抗癌、减毒等广泛的生物学活性^[20]。

目前,利用 HPLC 法对蝉花中核苷类成分进行测定已有较多文献报道^[17,21-23],但对其麦角甾醇含量测定的研究较少,蝉花的质量评价指标较为单一;且现有研究多集中于对蝉花和其他虫草类活性成分的比较,缺少对不同产地蝉花中有效成分的差异性研究。中国蝉花资源分布广泛,由于各产地的环境差异较大,蝉花中的活性成分也存有一定差异,导致蝉花品质参差不齐。因此,分析比较各产地蝉花中的有效成分,科学评价各产地蝉花的质量十分有意义。本文收集了安徽、浙江、福建等十个产地的蝉花药材,采用 HPLC 法对腺苷、虫草素、麦角甾醇的含量进行了测定,以了解不同产地蝉花中活性成分的含量是否存在差异、综合评价不同产地蝉花的质量,以期为蝉花的质量评价提供方法和依据,并为临床与生产用药的筛选提供参考。

1 仪器与材料

1.1 供试样品

安徽、福建、广东、广西玉林、江苏、九江、四川北川、四川绵阳、四川宜宾、浙江十个产地的蝉花,均为干品。将其粉碎为粉末,装入密封袋,置于干燥器中保存。

1.2 试剂

标准品:腺苷(批号:110879-200202,中国食品药品检定研究院);虫草素(批号:58-200202,中国药品生物制品检定所);麦角甾醇(批号:20150905,成都普菲德生物技术有限公司);甲醇为色谱醇(赛默飞世尔科技(中国)有限公司),其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.3 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪(PDA 检测器,美国沃特世公司);超声波清洗器(昆山市一波超声仪器有限公司);电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);电热恒温水浴锅 HW SY21-KP4 型(北京市长风仪器仪表公司)。

2 方法与结果

2.1 标准品溶液的制备

2.1.1 腺苷标准液的制备 精密称取腺苷标准品 2.32 g,置于 20 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,溶解摇匀,作为储备液。精密吸取腺苷储备液,用甲醇依次稀释成浓度为 5.8、11.6、23.2、58.0、116.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列溶液,作为腺苷标准品溶液。

2.1.2 虫草素标准液的制备 精密称取虫草素标准品 10.00 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,溶解摇匀,即为 1 mg/mL 虫草素储备液。精密吸取虫草素储备液,用甲醇依次稀释浓度为 25.0、50.0、75.0、100.0、125.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列溶液,作为虫草素标准品溶液。

2.1.3 麦角甾醇标准液的制备 精密称取麦角甾醇标准品 3.80 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,溶解摇匀,作为麦角甾醇储备液。精密吸取麦角甾醇储备液,用甲醇依次稀释成浓度为 9.28、18.56、37.13、74.25、148.50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列溶液,作为麦角甾醇标准品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 腺苷供试品溶液的制备 称取各产地蝉花粉末(过 50 目筛)约 0.20 g 置于具塞锥形瓶中,精密加入 20% 乙醇溶液 25 mL,超声提取 30 分钟,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,按色谱条件进行含量测定。

2.2.2 虫草素供试品溶液的制备 称取各产地蝉花粉末(过 50 目筛)约 0.25 g 置于锥形瓶中,精密加入蒸馏水 20 mL,在 70℃ 水浴锅中浸提 5 小时,冷却,过滤,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,按色谱条件进行含量测定。

2.2.3 麦角甾醇供试品溶液的制备 称取各产地蝉花粉末(过 50 目筛)约 0.25 g 置于锥形瓶中,精密加入 88% 乙醇溶液 50 mL,在 80℃ 水浴锅中提取 45 分钟,冷却,过滤,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,按色谱条件进行含量测定。

2.3 色谱条件

2.3.1 腺苷含量测定 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇(A)-水(B),梯度洗脱:0~10 分钟,1% A~5% A;10~15 分钟,5% A~15% A;15~20 分钟,15% A~20% A;20~30 分钟,20% A;30~35 分钟,20% A~35% A;35~40 分钟,35% A~1% A,流速为 1.0 mL/min,柱

温为 25 ℃, 检测波长为 260 nm, 进样量为 20 μL。腺苷对照品及样品 HPLC 测定结果见图 1。

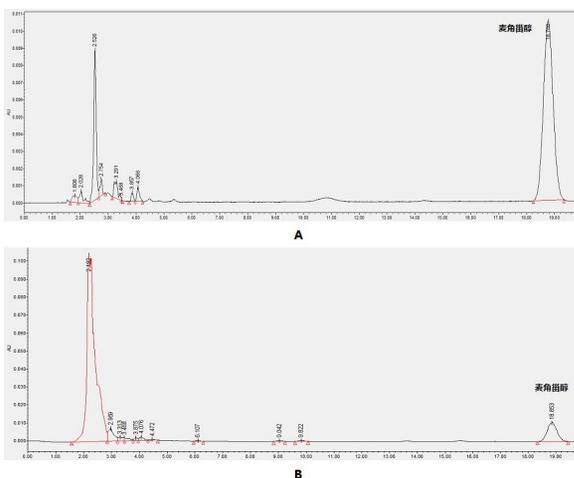


图 1 腺苷标准品(A)和江苏茅山产地蝉花样品(B)色谱图

2.3.2 虫草素含量测定 色谱柱同 2.3.1。流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~5 分钟, 15% A~20% A; 5~10 分钟, 20% A; 10~15 分钟, 20% A~15% A, 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 25 ℃, 检测波长为 260 nm, 进样量为 20 μL。虫草素对照品及样品 HPLC 测定结果见图 2。

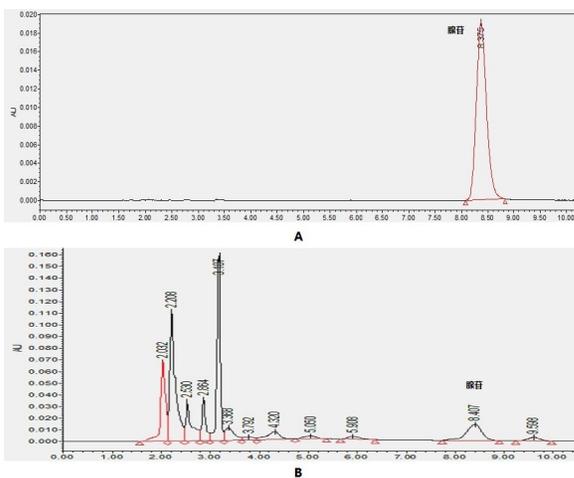


图 2 虫草素标准品(A)和四川宜宾产地蝉花样品(B)色谱图

2.3.3 麦角甾醇含量测定 色谱柱同 2.3.1。流动相为甲醇-水(98:2), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25 ℃, 检测波长为 283 nm, 进样量为 20 μL。麦角甾醇对照品及样品 HPLC 测定结果见图 3。

2.4 线性关系考察

依次吸取腺苷系列标准品溶液各 20 μL, 根据 2.3.1 项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。以标准品进样量(μg)为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 计算回归方程。同法, 按 2.3.2、

2.3.3 项下色谱条件分别得虫草素标准品和麦角甾醇标准品的标准曲线及回归方程, 见表 1。

结果表明, 腺苷在线性范围 5.8~116.0 μg/mL、虫草素在线性范围 25.0~125.0 μg/mL、麦角甾醇在线性范围 9.28~148.5 μg/mL 内呈现良好的线性关系, 符合试验要求。

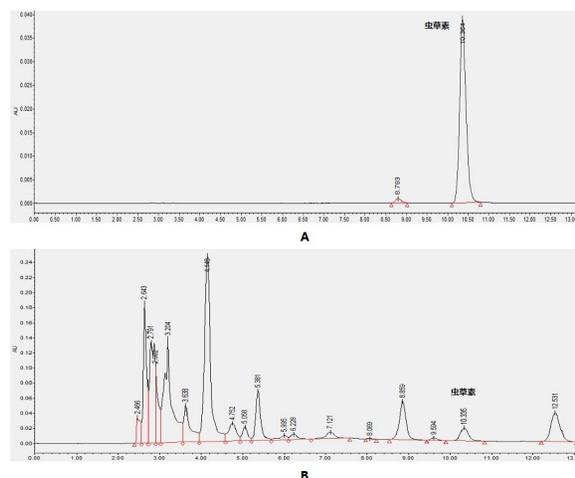


图 3 麦角甾醇标准品(A)和安徽产地蝉花样品(B)色谱图

表 1 腺苷、虫草素和麦角甾醇的线性关系考察结果

成分	回归方程	相关系数 (R ²)	线性范围 (μg/mL)
腺苷	Y=44.9407X-0.0109	0.999	5.8~116.0
虫草素	Y=25.1982X+0.8005	0.999	25.0~125.0
麦角甾醇	Y=87.0091X-0.0974	0.999	9.28~148.5

2.5 精密度考察

取标准品溶液腺苷 23.2 μg/mL、虫草素 25.0 μg/mL、麦角甾醇 37.13 μg/mL, 分别按 2.3 项下相应色谱条件进行进样分析, 进样 6 次, 每次 20 μL, 测定峰面积, 并计算 RSD 分别为腺苷 0.98%、虫草素 1.32%、麦角甾醇 1.55%, 表明仪器精密度符合试验要求。

2.6 加样回收试验

取已知含量蝉花粉末(过 50 目筛)0.2 g, 共 6 份, 分别加入浓度为腺苷 5.8 μg/mL、虫草素 25.0 μg/mL、麦角甾醇 37.13 μg/mL 的标准品溶液 1 mL, 按照上述制备方法及色谱条件制样、测定, 并计算回收率、RSD 值分别为腺苷 95.7%、2.04%, 虫草素 98.4%、1.72%, 麦角甾醇 100.2%、1.79%, 结果表明, 准确度符合试验要求。

2.7 重复性考察

取安徽产地蝉花粉末(过 50 目筛)按上述供试品溶液制备方式制备 6 份供试品溶液, 精密吸取

20 μL ,注入色谱仪,测定并计算。结果样品中腺苷、虫草素、麦角甾醇平均含量分别为 39.04 $\mu\text{g/g}$ 、140.52 $\mu\text{g/g}$ 、301.65 $\mu\text{g/g}$,RSD 分别为 2.32%、1.27%、1.73%,重复性符合试验要求。

2.8 稳定性考察

取安徽产地蝉花供试品溶液 20 μL ,分别测定 0.5、10、15、20、25 小时腺苷、虫草素、麦角甾醇的峰面积值,计算 RSD 值分别为 1.78%、1.46%、1.53%,表明供试品溶液中腺苷、虫草素、麦角甾醇成分在 25 小时内稳定。

2.9 样品测定

精密吸取供试品溶液 20 μL ,分别进样,记录峰面积,外标定量测得各产地蝉花中腺苷、虫草素、麦角甾醇的含量。见表 2。

从表中可以看出,各产地蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇含量均存在一定差异,其中,腺苷和虫草素含量差异较大。腺苷以江苏茅山的蝉花含量最高,为 44.957 $\mu\text{g/g}$,广西玉林的最低,为 11.331 $\mu\text{g/g}$,相差近 4 倍;虫草素以四川宜宾的含量最高,为 191.725 $\mu\text{g/g}$,江西九江的含量最低,仅为 25.437 $\mu\text{g/g}$,相差 8 倍左右。相较而言,各产地麦角甾醇含量差异较小,范围为 120.024 ~ 301.652 $\mu\text{g/g}$ 。

表 2 不同产地蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量

产地	腺苷($\mu\text{g/g}$)	虫草素($\mu\text{g/g}$)	麦角甾醇($\mu\text{g/g}$)
安徽大别山	39.035	140.521	301.652
浙江磐安	39.399	30.502	126.770
四川北川	28.089	128.260	227.092
江西九江	41.766	25.437	120.024
四川宜宾	32.215	191.725	202.618
四川绵阳	41.375	164.623	276.929
福建三明	33.255	42.338	150.654
广东河源	37.092	42.035	192.729
广西玉林	11.331	110.451	189.737
江苏茅山	44.957	38.666	198.672

整体而言,四川绵阳、四川宜宾和安徽大别山的蝉花中三种成分含量较高,一定程度上反映了这三个产地的蝉花质量较好。

3 讨论

近年来,蝉花由于其丰富的营养价值和广泛的药理活性备受关注,有研究表明,蝉花是一种不亚于冬虫夏草和蛹虫草的优质虫草^[17],显示了蝉花广阔的药用前景。其中,有效成分的研究是开发并评

价蝉花药用价值的基础,本文采用 HPLC 法分别对安徽、浙江、江西等十个产地的蝉花中腺苷、虫草素和麦角甾醇的含量进行了测定。通过对标准品和供试品的线性范围、精密度、准确度、稳定性和重复性的考察,证明了该方法的适用性。

不同产地蝉花供试品中腺苷、虫草素和麦角甾醇成分含量存在明显差异,这可能与各地的环境不同、菌种差异及产品保存时间和方式等有关。本实验检测对比了蝉花中三种成分的含量差异,为综合评价各地蝉花质量提供了实验依据,并可为将来蝉花的临床应用与生产用药提供一定参考。

但由于条件所限,本研究仅对十个产地蝉花中核苷类成分的腺苷、虫草素进行了定量分析,不能反映蝉花中整体核苷成分信息;对于蝉花甾醇类成分检测,也仅对麦角甾醇进行了简单定量研究,没有考虑其他甾醇类物质。此外,目前对于各产地蝉花的药理药效的差异尚不了解,可于进一步的实验中将与其与活性成分差异相结合,为蝉花资源的进一步开发利用甚至不同用途的蝉花的选择提供理论上的依据及可行性分析。

参 考 文 献

- [1] 任颖芳,朱戎. 中药蝉花药物考证及其防治肾病的研究进展[J]. 河南中医,2013,33(5):781-784.
- [2] 陈显群,羊悦,杨胜利. 中药蝉花菌株筛选及发酵条件优化研究[J]. 浙江化工,2015,46(2):18-21.
- [3] 裘洁,宋捷民. 蝉花的药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药,2009,18(9):4-6.
- [4] 宋捷民,陈玲,陈玮,等. 蝉花对免疫功能影响的实验研究[J]. 中国中医药科技,2007,14(1):37-38.
- [5] Takano F, Yahagi N, Yahagi R, et al. The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isariasinclairii* (Berk.) Llod) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(5):903-916.
- [6] Kuo Y C, Weng S C, Chou C J, et al. Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadae*[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2003, 140(5):895-906.
- [7] 谢炜,郭月芳,盛雨辰. 蝉花菌丝体对慢性肾功能衰竭大鼠的治疗作用[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(10):770-772.
- [8] 刘玉宁,陈以平,王立红,等. 蝉花菌丝抗大鼠肾小管间质纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2011,12(3):243-245.
- [9] Zhu R, Chen Y P, Deng Y Y, et al. *Cordyceps cicadae* extracts ameliorate renal malfunction in a remnant kidney model[J]. *Journal of Zhejiang University B*, 2011, 12(12):1024-1033.

- [10] 徐红娟,莫志宏,余佳文,等. 蝉花抗真菌活性成分的分离纯化研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(5):794-797.
- [11] Sharma S K, Gautam N, Atri N S. Optimized extraction, composition, antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular polysaccharides from submerged culture of Cordycepsicidae [J]. BMC Complementary & Alternative Medicine,2015,15(1):1-10.
- [12] 蔡菊芬,姜志明,卢红阳,等. 蝉拟青霉不同纯化组别对体外抗肿瘤作用的基础研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(4):760-764.
- [13] Wang H,Zhang J,Sit W H,et al. Cordyceps cicadae induces G2/M cell cycle arrest in MHCC97H human hepatocellular carcinoma cells: A proteomic study[J]. Chinese Medicine,2014,9(1):15-15.
- [14] Wang J,Zhang D M,Jia J F,et al. Cyclodepsipeptides from the ascocarps and insect-body portions of fungus Cordyceps cicadae [J]. Fitoterapia,2014,97(17):23-27.
- [15] 王琪,刘作易. 药用真菌蝉花的研究进展[J]. 中草药,2004,34(4):469-471.
- [16] Wang S X,Liu Y,Zhang G Q,et al. Cordysobin, a novel alkaline serine protease with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom Cordycepsobolifera[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering,2012,113(1):42-47.
- [17] 温鲁,唐玉玲,张平. 蝉花与有关虫草活性成分检测比较[J]. 江苏中医药,2006,27(1):45-46.
- [18] 赵京林. 腺苷与心脏保护的研究进展[J]. 中国心血管病研究杂志,2004,2(8):658-661.
- [19] SJ Park, YJ Ahn, SG Lee, et al. Cordycepin; selective growth inhibitor derived from liquid culture of Cordycepsmilitaris against Clostridium spp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000,48(7):2744-2748.
- [20] 韦会平,肖波,胡开治. 蛹虫草药用价值考[J]. 中药材,2004,27(3):215-217
- [21] 吕慧慧,杨安伦,张浩. HPLC-DAD 同时测定金蝉花中 8 种核苷类成分的含量[J]. 实用药物与临床,2015,18(12):1466-1469.
- [22] 周尧,滕晔,宋玉良,等. HPLC 法测定金蝉花及半野生培养基中腺苷成分的含量[C]//2013 第六次临床中药学学术年会暨临床中药学学科建设经验交流会论文集,2013.
- [23] 陈安徽,陈宏伟,徐洋,等. 蝉花虫草中核苷类成分的分离纯化和鉴定[J]. 食品科学,2013,34(1):131-134.

(收稿日期: 2016-08-22)

(本文编辑: 董历华)