

文章编号:1001-6880(2015)6-1032-05

栝楼果皮中腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸动态积累规律研究

于京平^{1*}, 张永清², 林海燕¹, 林 莺¹¹滨州医学院, 烟台 264003; ²山东中医药大学, 济南 250355

摘要:对栝楼果皮生长期主要活性成分腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸含量进行分析,探索活性成分积累规律。以长清产栝楼果皮为研究对象,从2013年7月3日到2013年10月26日采用高效液相色谱法进行腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸含量测定。实验表明腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸在生长期含量变化趋势是先降后升再降,至果皮表面颜色稍微泛黄时,腺嘌呤含量达到最高值0.1893 mg/g,至果皮表面颜色基本全黄、仅维管束凸起处为绿色时鸟苷含量达到最高值0.4128 mg/g,瓜氨酸含量达到最高值12.8834 mg/g。提示不同生长期栝楼果皮中腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸含量变化较大,果皮表面颜色基本为黄色仅维管束凸起处为绿色时为山东长清瓜蒌皮药材最佳采收期。

关键词:栝楼果皮;腺嘌呤;鸟苷;瓜氨酸;动态积累

中图分类号:R282

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.017

Dynamic Accumulation of Adenine, Guanine nucleoside and Citrulline in *Trichosanthes kirilowii* Peel

YU Jing-ping^{1*}, ZHANG Yong-qing², LIN Hai-yan¹, LIN Ying¹¹Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; ²Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: To explore the general law of dynamic accumulation of the active components in the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim., the contents of adenine, guanine nucleoside and citrulline were investigated during its different growth periods. *T. kirilowii* peel in Changqing district from the periods of July 3rd 2013 to October 26th 2013 was used as the subjects of analysis. The results indicated that the contents of adenine, guanine nucleoside and citrulline declined at beginning then rose, then declined during the growth periods. When the surface color was slightly yellow, the content of adenine reached the highest 0.1893mg/g; When the surface color basic all yellow, only vascular bundle was green, the content of guanine nucleoside reached the highest 0.4128mg/g, the content of citrulline reached the highest 12.8834 mg/g. In conclusion, the contents of adenine, guanine nucleoside, citrulline in *T. kirilowii* peel from different growth periods differed significantly. The peel color yellow only vascular bundle green was suggested to be the best picking time for *T. kirilowii* peel.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* peel; adenine; guanine nucleoside; citrulline; dynamic accumulation

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 为葫芦科多年生草质藤本植物,其干燥成熟果皮是常用中药瓜蒌皮,可清热化痰、利气宽胸,具有抗心律失常、扩张冠状动脉、增加冠脉血流量等药理作用;临床常用于治疗肺热咳嗽、痰浊黄稠、胸痹心痛、肺痈等^[1]。

有关瓜蒌皮的活性成分至今不明确,现行《中华人民共和国药典》仅收载了以对照药材薄层定性的鉴别方法,控制瓜蒌皮药材质量尚缺乏合理指

收稿日期:2014-07-09 接受日期:2015-04-28

基金项目:山东省科技发展计划项目(2008GG2NS0222);山东省农业良种工程课题(2009LZ01-03);济南市科技局高等院校自主创新项目(200906028);滨州医学院科研启动基金项目(BY2014KYQD29)

*通讯作者 E-mail:yujingping69@163.com

标^[1]。以瓜蒌皮为原料研制生产的瓜蒌皮注射液可行气除满、开胸除痹,用于治疗痰浊阻络之冠心病、稳定型心绞痛等。我们研究发现,腺嘌呤^[2]、鸟嘌呤核苷^[2]、瓜氨酸是瓜蒌皮注射液中存在的主要成分之一。现代研究显示,腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸均具有明显的药理活性。腺嘌呤可提高红细胞携氧和放氧能力,与磷酸的结合物可刺激白细胞增生,用于防治白细胞减少症^[3];鸟苷可改善心脑血液循环,具有防止心率失常、抗肿瘤、抗病毒等活性^[4]。瓜氨酸在体内转化为人体必需氨基酸:L-精氨酸,在维持心血管正常功能的一氧化氮代谢中发挥着重要作用^[5]。因此,在活性成分尚不明确的情况下,可以将腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸作为瓜蒌皮药材质量的控制

指标。

中药材采收期对保证中药材质量有重要意义,若采收期适宜,则可保证中药材中的药用部分产量和有效成分含量都达到较高水平。目前,有关采收时间对瓜蒌皮药材质量的影响等方面的研究几乎为空白。本文在统一种质的前提下,选取腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸等化学成分作为指标,对栝楼果皮不同生长期化学成分的动态积累进行分析,为确定瓜蒌皮药材的适宜采收期提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1200,美国 Agilent);

表1 不同生长期栝楼果皮的外观性状

Table 1 The morphologic characteristics of *T. kirilowii* peel from different growth periods

采收时间 Harvest time	编号 No.	外观性状 Morphologic characteristics
20130703	1	嫩绿色,果皮表面有毛绒。
20130708	2	果皮表面绿色程度增大,硬度增大,果皮表面变粗糙。
20130718	3	果皮表面绿色程度增大,硬度增大,果皮表面变粗糙。
20130728	4	果皮表面绿色程度增大,硬度增大,果皮表面变粗糙。
20130817	5	果皮绿色,硬度增大,果皮表面变粗糙。
20130907	6	果皮绿色,硬度增大,果皮表面变粗糙。
20130916	7	果皮绿色,硬度增大,果皮表面变粗糙。
20130926	8	果皮颜色泛黄,果实变软,出现维管束凸起。
20131006	9	果皮颜色基本为黄色,果实变软,仅维管束凸起处为绿色。
20131016	10	果皮颜色为黄色,果实变软。
20131026	11	果皮黄色程度增大,果实变软,果皮表面出现皱缩。

1.3 试剂

对照品:腺嘌呤(批号 050302,上海伯奥生物科技有限公司)、鸟苷(批号 26-2006,上海中药标准化中心),瓜氨酸(批号 0875-200205,中国药品生物制品检定所),经 HPLC-UV 检测纯度均达 98% 以上;邻苯二甲醛(色谱级,阿拉丁试剂上海有限公司);一氯甲酸芴甲酯(色谱级,阿拉丁试剂上海有限公司);乙腈(色谱级,Tedia,美国);甲醇(色谱级,Tedia,美国);纯净水。

2 实验方法

2.1 核苷类成分的测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters Atlantis T₃(5 μm,4.6 mm × 150

mm);流动相:水(A)-甲醇(B);柱温为室温;检测波长:254 nm;进样量:50 μL。流动相梯度洗脱程序:0~15 min,100% A;15~35 min,100%~90% A;35~60 min,90%~70% A。

1.2 瓜蒌皮药材

所用材料采自山东中医药大学药用植物园,经山东中医药大学张永清教授鉴定,确认为葫芦科栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.。自 7 月 3 日幼果期,在健壮枝条的中段选择花后发育天数相同的栝楼幼果,挂牌标记。自 7 月 3 日幼果期到 10 月 26 日果实成熟期共采样 11 次,采样时间统一在晴朗的上午 8:00 时左右。不同生长期栝楼果皮的采收时间及外观性状见表 1。

mm);流动相:水(A)-甲醇(B);柱温为室温;检测波长:254 nm;进样量:50 μL。流动相梯度洗脱程序:0~15 min,100% A;15~35 min,100%~90% A;35~60 min,90%~70% A。

2.1.2 对照品溶液制备

精密称取一定量减压干燥至恒重的鸟苷、腺嘌呤对照品,加 15% 甲醇溶解,转移至 20 mL 容量瓶中,定容,混匀,配制成腺嘌呤浓度为 0.0310 mg/mL、鸟苷浓度为 0.0704 mg/mL 的对照品溶液;以 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液备用。

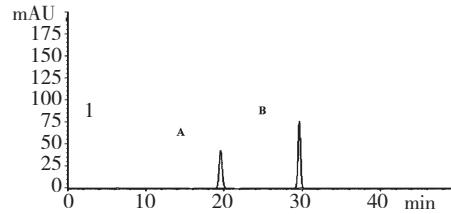
2.1.3 样品溶液制备

将瓜蒌皮置于 55 °C 条件下烘干,粉碎,过四号筛。四分法取样,精密称定适量干燥粉末,置具塞瓶中,加 15% 甲醇 10 mL,称重;50 °C 温浸 1 h,50 °C 超

声提取 1 h, 冷却, 用 15% 甲醇补足重量, 离心 10 min(4500 rpm), 取上清液, 重复提取 2 次, 合并上清液, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.1.4 样品测定

分别精密吸取对照品溶液与样品溶液 50 μL, 按上述色谱条件测定其峰面积积分值, 以外标法计算样品溶液中的鸟苷、腺嘌呤含量, 重复 3 次。



2.1.5 线性关系考察及标准曲线

制备腺嘌呤、鸟苷对照品系列浓度溶液, 分别精密吸取 50 μL 进样, 按 2.1.1 项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 以对照品实际进样量(mg)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 腺嘌呤 $Y = 8800000X - 7.2062$ ($R^2 = 1$), 鸟苷 $Y = 3500000X + 6.8633$ ($R^2 = 1$), 见图 1。

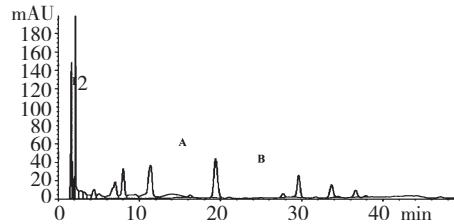


图 1 对照品(1)与供试液(2)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the reference substance (1) and sample (2)

注:A:腺嘌呤;B:鸟苷

Note: A: adenine; B: guanine nucleoside

2.2 瓜氨酸的测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm); 流动相: 取醋酸钠 10.88 g, 加水 4000 mL 使溶解, 加三乙胺 0.8 mL, 四氢呋喃 24 mL, 混匀, 用 2% 冰醋酸溶液调节 pH 值至 7.20, 即得流动相 A; 取醋酸钠 10.88 g, 加水 800 mL 使溶解, 用 2% 冰醋酸溶液调节 pH 值至 7.20, 加乙腈 1400 mL, 甲醇 1800 mL, 混匀, 即得流动相 B。柱温: 25 °C; 检测波长: 338 nm; 进样量: 50 μL。快速柱前衍生化反应: 供试品和对照品溶液在 pH10.2 的硼酸缓冲液中首先和 1% 邻苯二甲醛(OPA)反应, 再用 0.5% 一氯甲酸芴甲酯(FMOC)溶液进行衍生。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program

t/min	流动相 A Mobile phase A	流动相 B Mobile phase B	流速 Flow rate (mL/min)
0	100	0	1
8	92	8	1
22	86	14	1
31	73	27	1.5
38	71	29	1.5
54	21	79	1
58	85	15	1
60	100	0	1

2.2.2 对照品溶液制备

精密称取一定量减压干燥至恒重的瓜氨酸对照品, 加水溶解, 转移至 20 mL 容量瓶中定容, 混匀, 配制成浓度为 0.368 mg/mL 对照品溶液; 以 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2.3 样品溶液制备

精密称定适量干燥粉末, 置具塞瓶中, 加水 10 mL, 称重; 50 °C 温浸 1 h, 50 °C 超声提取 1 h, 冷却, 用水补足重量, 离心 10 min(4500 rpm), 取上清液, 重复提取 2 次, 合并上清液, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2.4 样品测定

分别精密吸取对照品溶液与样品溶液 50 μL, 按上述色谱条件测定其峰面积积分值, 以外标法计算样品溶液中的瓜氨酸含量, 重复 3 次。

2.2.5 线性关系考察及标准曲线

制备瓜氨酸对照品系列浓度溶液, 分别精密吸取 50 μL 进样, 按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 以对照品实际进样量(mg)为横坐标(X), 绘制瓜氨酸标准曲线, $Y = 2000000X - 1.3675$ ($R^2 = 1$), 见图 2。

2.3.1 精密度试验

精密吸取对照品溶液, 按 2.1.1、2.2.1 项下色谱条件, 测定腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸峰面积, 重复 5

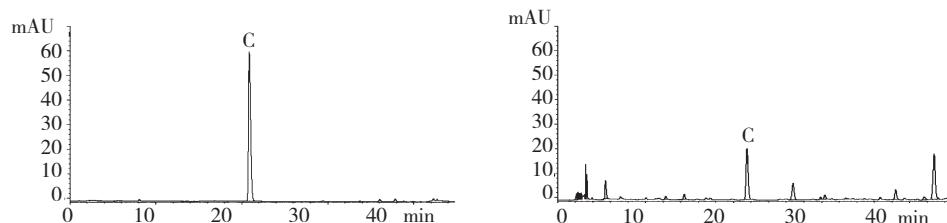


图2 对照品(1)与供试液(2)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the reference substance (1) and sample (2)

注:C:瓜氨酸

Note: C:citrulline

2.3 方法学考察次,其峰面积 RSD 分别为 1.17%、

2.3.2 稳定性试验

精密吸取样品溶液,在 10 h 内测定腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸峰面积 5 次,其峰面积 RSD 值分别为 2.12%、1.12%、1.00%,表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验

精密称取药材粉末,分别按照 2.1.3、2.2.3 项下方法同时制备 5 份,分别测定腺嘌呤、鸟苷、瓜氨酸含量,其 RSD 均小于 5%,表明重复性良好。

2.3.4 加样回收率试验

精密称量已知鸟苷、腺嘌呤、瓜氨酸含量的样品 1.000 g,共 6 份,分别加入一定量的对照品,分别按照 2.1.3、2.2.3 项下方法制备,按 2.1.1、2.2.1 项下色谱条件测定鸟苷、腺嘌呤、瓜氨酸含量,按回收率 = $(C-A)/B \times 100\%$ (A 为样品中所含被测成分量;B 为加入对照品量;C 为实测值)计算回收率,结果鸟苷、腺嘌呤、瓜氨酸对照品回收率均值分别为 101.20%、100.67%、100.15%,其 RSD 分别为 1.63%、1.91%、1.70%,表明鸟苷、腺嘌呤、瓜氨酸对照品回收率符合要求。

3 结果与分析

3.1 不同生长期栝楼果皮鸟苷、腺嘌呤含量的测定及比较

对栝楼果皮生长发育过程中鸟苷、腺嘌呤含量进行动态测量,变化情况动态如图 3。

由图 3 可以看出,生长发育前期腺嘌呤、鸟嘌呤核苷含量总体呈下降趋势,9 月中旬果实体积、重量基本达到最大时,两者含量达到最低点;之后腺嘌呤、鸟苷快速积累,至果皮表面颜色稍微泛黄时,腺嘌呤含量达到最高值 0.1893 mg/g,至果皮表面颜

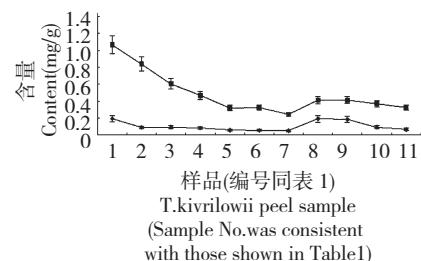


图3 不同生长期栝楼果皮腺嘌呤、鸟苷含量的变化

Fig. 3 The contents of adenine and guanine nucleoside in *T. kirilowii* peel from different growth periods

注:A:腺嘌呤;B:鸟苷

Note: A: adenine; B: guanine nucleoside

色基本全黄、仅维管束凸起处为绿色时鸟苷含量达到最高值 0.4128 mg/g;随着果实进一步成熟,两者含量均出现下降,表现出随着果实成熟度增加而下降的变化趋势。

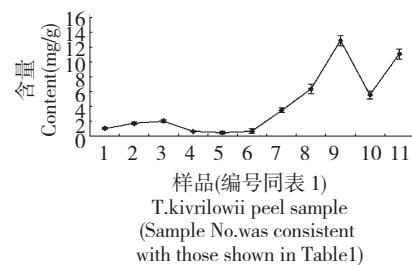


图4 不同生长期栝楼果皮瓜氨酸含量的变化

Fig. 4 The contents of citrulline in *T. kirilowii* peel from different growth periods

注:C:瓜氨酸

Note: C:citrulline

3.2 不同生长期栝楼果皮瓜氨酸含量的测定及比较

对栝楼果皮生长发育过程中瓜氨酸含量进行动态测量,变化情况动态如图 4。

由图4可以看出,瓜氨酸含量短暂升高之后平稳降低,8月17日达到最低仅为0.4492 mg/g,之后呈现逐渐升高,至果皮颜色基本为黄色仅维管束凸起部分为绿色,此时瓜氨酸含量达到最高值12.8834 mg/g,随着果实进一步成熟至果皮表面颜色基本全黄含量下降,至栝楼果实完全成熟果皮表面皱缩时含量稍微上升。

4 讨论与小结

4.1 栝楼果实生长动态

栝楼果实从形成到成熟呈现出生长动态规律变化,经历果实重量、果实体积、果实长、果实直径的增大、果实变软、果皮颜色变化等一系列变化。9月26日果皮颜色稍微泛黄标志着栝楼果实进入转色期。

4.2 栝楼果皮生长过程中化学物质积累动态

我们系统研究栝楼果皮整个生长周期多种化学成分含量变化规律,进一步探讨栝楼果皮化学物质积累与生长发育的关系。果皮中腺嘌呤含量在果皮颜色微黄时达到最高;鸟苷、瓜氨酸含量在果皮颜色基本全黄仅维管束凸起处为绿色时达到最高;总的来说未完全成熟的栝楼果皮中的化学物质含量高于完全成熟的栝楼果皮,多种化学成分含量变化与果皮颜色转变密切相关。

4.3 采收期的确定

采收是药材生产过程中的重要环节,直接影响着瓜蒌皮药材的质量与产量,中药材的采收应综合考虑有效成分含量和产量的动态变化,最大限度保证中药材中的药用部分产量和有效成分含量均达到较高水平。针对栝楼果皮采收期没有明确记载,传统采收期多以栝楼果实为目标产物。栝楼果皮采收期与有效成分的动态累积有何内在关联,亦未见系统报道。结合实验结果我们认为果皮颜色未转黄之前是栝楼果皮生长和积累的重要时期,不宜采收;栝楼果皮应于10月初果实尚未完全成熟时、果皮表面颜色基本为黄色仅维管束凸起处为绿色时采摘,此阶段栝楼果皮多种化学成分含量均达到最高峰;不宜过迟,否则果实老熟,皮薄,产量质量均下

降。

不同采收时间瓜蒌皮药材质量有明显差异,获得高产质优的瓜蒌皮药材,需要精确到距离开花后的具体天数,之前提到由于其开花结果时间不一致,精确开花后的具体天数实践操作复杂;但通过果皮颜色变化药农就可以准确快速判断最佳采收时间,获得高产质优的瓜蒌皮药材,生产上直观性强。另外在采收时我们可以做到分批选择性采收,有效降低采收难度。

综上所述,栝楼为多年生藤本植物开花挂果持续时间长,目前栝楼果皮发育过程中化学物质积累规律等方面的研究尚为空白。栝楼果皮在发育和成熟过程中发生了许多结构和代谢上的变化,我们通过了解各种化学物质在栝楼果皮生长发育过程中的积累规律,探索栝楼果皮品质的形成规律,提示我们通过制定合理的栽培措施调控其化学物质含量具有可行性。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I,52.
- 2 Teng YR(滕勇荣). Studies on chemical constituents of *Trichosanthes kirilowii* Marim. and Trichosanthes skin injection. Jinan: Shandong University of Chinese Medicine(山东中医药大学), MSc. 2011.
- 3 Xu HY(徐红颖). Determination of content of adenine in Isatidis RADIX. *Inner Mongolia Petrochem Ind* (内蒙古石油化工), 2012, 13:5-6.
- 4 Kinahan JJ, KowaL EP, Grindey GB. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L1210. *Cancer Res*, 1981, 41:445-451.
- 5 Liu J(刘娟), Lu XX(路欣欣), Meng H(孟慧). Progress on pharmacological activities and production methods of citrulline. *J Pharm Prac*(药学实践研究), 2011, 32:173-175.