

· 药学基础 ·

石菖蒲中核苷类成分的分离鉴定及转化途径分析

焦森^{1,2}, 毛淑杰², 梁曜华², 陈两绵², 闫利华^{2*}, 王智民^{2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450000;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究石菖蒲(*Acorus tatarinowii*)根茎的水溶性化学成分及核苷类成分在水提过程中的转化途径。方法:采用大孔树脂, LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20), ODS柱色谱及制备HPLC等方法进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。采用HPLC指认石菖蒲水提液中的核苷类化学成分并考察其稳定性, 通过核苷酸添加试验, 研究石菖蒲水提过程中核苷类成分可能存在的转化途径。结果:从石菖蒲根茎中分离鉴定了11个化合物, 包括4个核苷或碱基类化合物, 4个苯丙素类化合物, 2个生物碱类化合物, 1个糠醛类化合物, 分别鉴定为尿苷(1), 腺嘌呤(2), 鸟苷(3), 腺苷(4), 5-羟甲基糠醛(5), 5-(羟基甲基)-1H-吡咯-2-甲醛(6), (threo) 1', 2'-dihydroxyasarone(7), (erythro) 1', 2'-dihydroxyasarone(8), acoraminol A(9), acoraminol B(10), 菖蒲碱丙(11)。化合物1~4及胞苷可从石菖蒲水提液的HPLC色谱图中指认出来。石菖蒲超声提取0.5 h水溶液中核苷类成分稳定性较差, 超声提取3 h和回流提取0.5 h水溶液中核苷类成分稳定性较好。石菖蒲在水提过程中, 可能存在5'-胞苷酸向胞苷转化; 单磷酸尿苷向尿苷转化; 鸟苷酸向鸟苷转化; 单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷均可以向腺苷转化, 腺苷进而向腺嘌呤转化。结论:化合物1~4和6为首次从菖蒲属植物中分离得到, 进一步丰富了石菖蒲的化学成分组成。石菖蒲中核苷类成分的稳定性及转化途径研究为石菖蒲及其他含核苷类成分中药的分析评价提供了参考依据。

[关键词] 石菖蒲; 水提液; 苯丙素; 核苷; 核苷酸; 转化途径

[中图分类号] R284.2; R22; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0145-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201411

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200326.2112.003.html>

[网络出版日期] 2020-3-27 13:37

Nucleosides from *Acorus tatarinowii* and Their Transformation Pathway

JIAO Sen^{1,2}, MAO Shu-jie², LIANG Yao-hua², CHEN Liang-mian², YAN Li-hua^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the water soluble chemical constituents in rhizoma of *Acorus tatarinowii* and transformation pathway of nucleosides in the process of water extraction. **Method:** Compounds were isolated and purified by column chromatography on macroporous resin, Sephadex LH-20, ODS and preparative HPLC. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectral data. Nucleosides were identified from aqueous extract of *A. tatarinowii*, and their stability was investigated by HPLC. The possible transformation pathways of nucleosides in aqueous extract of *A. tatarinowii* were studied

[收稿日期] 20200209(019)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721-004)

[第一作者] 焦森, 在读硕士, 从事中药化学和质量评价研究, Tel/Fax: 010-84014128, E-mail: jiaosen6796@163.com

[通信作者] *闫利华, 博士, 研究员, 从事中药化学和质量评价研究, Tel/Fax: 010-84014128, E-mail: lhyan@icmm.ac.cn;

*王智民, 博士, 研究员, 从事中药化学和质量评价研究, Tel/Fax: 010-84014128, E-mail: zmwang@icmm.ac.cn

by nucleotide addition test. **Result:** Eleven compounds including four nucleosides, four phenylpropanoids, two alkaloids and a furfural were isolated, and identified as uridine (1), adenine (2), guanosine (3), adenosine (4), 5-hydroxymethylfurfural (5), 5-(hydroxymethyl)-1H-pyrrole-2-carboxaldehyde (6), (threo) 1', 2'-dihydroxyasarone (7), (erythro) 1', 2'-dihydroxyasarone (8), acoraminol A (9), acoraminol B (10), and tatarine A (11). The chromatographic peaks of compounds 1-4 and cytidine were identified from aqueous extract of *A. tatarinowii* by HPLC. After ultrasonic extraction for 0.5 h, the stability of nucleosides in water was poor. After ultrasonic extraction for 3 h or refluxing extraction for 0.5 h, the stability of nucleosides in water was good. Four transformation pathways including 5'-cytidylic acid→cytidine, uridine monophosphate→uridine, guanosine monophosphate, guanosine and adenosine-5'-monophosphate, adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-triphosphate, adenosine, adenine might exist in water extract of *A. tatarinowii*. **Conclusion:** Compounds 1-4 and 6 were isolated from the genus *Acorus* for the first time. These compounds further enriched the chemical constituents of *A. tatarinowii*. The stability and transformation pathway of nucleosides in *A. tatarinowii* provides reference data for the analysis of nucleosides in *A. tatarinowii* and other traditional Chinese medicine.

[Key words] *Acorus tatarinowii*; water extract; phenylpropanoids; nucleosides; nucleotides; transformation pathway

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲的干燥根茎,又名菖蒲、昌阳、昌本、兰荪等,始载于《神农本草经》,列为上品^[1]。其性温,味辛、苦,具有开窍豁痰,醒神益智,化湿开胃,的功效,主要用于神昏癫痫,健忘失眠,耳鸣耳聋,脘痞不饥,噤口下痢等症^[2]。石菖蒲在我国黄河以南各省区都有分布,通常为野生,目前主产于四川、江苏、浙江、江西、湖南等地。石菖蒲原植物拉丁学名在1963,1977和1985年版《中国药典》曾收录为 *Acorus gramineus*,后经考证为误定了金钱蒲的拉丁学名,1990年版及以后各版《中国药典》均采用修订后的拉丁学名 *A. tatarinowii*^[3]。

石菖蒲主要含挥发性成分,如 α -细辛醚, β -细辛醚,甲基丁香酚等,此类成分具有抗阿尔茨海默病、抗焦虑、抗抑郁、抗癫痫等药理作用^[4-7]。此外,石菖蒲水提液或去油水提液也具有神经保护、抗抑郁、抗癫痫等药理作用^[5,8-9]。但是,关于石菖蒲水溶性成分的研究较少,仅有少数学者从其水提液中分离鉴定了5-羟甲基糠醛、细辛醛、菖蒲碱甲、菖蒲碱乙、菖蒲碱丙等化合物^[10-12]。

为了明确石菖蒲水溶性部位药效成分,笔者对石菖蒲水提液的化学成分进行研究,从中分离得到11个化合物。同时,采用HPLC,通过与对照品对比,对石菖蒲水提液中的主要色谱峰进行指认。

核苷类成分在免疫调节、心血管疾病、抗肿瘤等多方面发挥着重要作用^[13],有学者^[14]把核苷类成分作为半夏、天南星、白附子等天南星科植物的质量控制指标。因此在从石菖蒲中分离鉴定出核苷类成分的基础上,尝试建立一套石菖蒲中核苷类成

分的HPLC含量测定方法,但方法学始终无法通过,样品中核苷类成分的稳定性、重复性较差,腺苷的加样回收率甚至出现负值。通过查阅文献^[15-16]发现,冬虫夏草中核苷类成分在超声水提过程中不稳定并存在单磷酸腺苷等向腺苷的转化。为了明确石菖蒲中核苷类成分在水提过程中的变化规律及转化途径,本实验对比了不同提取时间对核苷类成分含量的影响、不同提取方法对核苷类成分稳定性的影响,并在石菖蒲超声水提过程中进行了添加核苷酸试验。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司),Quik Sep-50型制备高效液相色谱仪(北京慧德易科技有限公司),Avance 600型核磁共振波谱仪(德国Bruker公司),LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20,美国GE公司),ODS填料(日本YMC公司,50 μ m),HPD-100型大孔吸附树脂(河北宝恩生物科技有限公司),月旭Ultimate XB-C₁₈半制备色谱柱(21.2 mm \times 250 mm,10 μ m),Kromasil 100-5C₁₈半制备色谱柱(10 mm \times 250 mm,5 μ m),YMC Hydrosphere C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,3 μ m)。对照品胞苷,尿苷,腺嘌呤,鸟苷,腺苷,5'-胞苷酸,单磷酸尿苷,鸟苷酸,单磷酸腺苷,二磷酸腺苷,三磷酸腺苷(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为CHB180609,CHB180121,CHB180428,CHB180118,CHB170802,CHB180608,CHB180610,CHB190327,CHB180207,CHB180210,CHB190117);5-羟甲基糠醛(云南西力生物科

技术有限公司,批号BBP01131),5-(羟基甲基)-1H-吡咯-2-甲醛(成都百科通生物科技有限公司,批号CHB19110703);二磷酸腺苷和三磷酸腺苷纯度 $\geq 95\%$,其余纯度均 $\geq 98\%$ 。色谱甲醇、乙腈(美国Fisher公司),娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈公司),其余试剂均为分析纯。

分离用石菖蒲药材于2019年1月采集于江西省宜春市袁州区洪江乡,分析用石菖蒲饮片购于北京万泰利克药业有限公司(产地安徽,批号17041003),经中国中医科学院中药研究所毛淑杰研究员鉴定为石菖蒲 *Acorus tatarinowii* 的干燥根茎。样本留样存放于中国中医科学院中药研究所中药质量标准研究中心。

2 提取分离

石菖蒲干燥根茎5.0 kg,粉碎成粗粉,用去离子水(8倍量)回流提取7 h。滤液经大孔吸附树脂柱(3 L)分离,依次用水3 L,10%乙醇9 L,30%乙醇9 L,50%乙醇9 L,95%乙醇9 L洗脱,共收集6个流分。减压回收溶剂,共得A(624.5 g,未吸附流分),B(15.6 g,水洗脱流分),C(33.8 g,10%乙醇洗脱流分),D(11.5 g,30%乙醇洗脱流分),E(7.5 g,50%乙醇洗脱流分),F(11.5 g,95%乙醇洗脱流分)6个部位。

将C部位(10.2 g)溶解于5%甲醇中,经ODS填料中压快速制备色谱分离,依次用5%,35%,95%甲醇洗脱,经HPLC检测合并,得到6个流分,

Fr. C1~Fr. C6, Fr. C2(1.0 g)通过制备液相(甲醇-水5:95)反复纯化得到化合物1(10.2 mg)。Fr. C3(1.3 g)通过制备HPLC(甲醇-水5:95)及重结晶分离纯化得到化合物3(20.1 mg),化合物5(97.2 mg)。Fr. C4(0.3 g)通过制备HPLC(甲醇-水5:95)分离纯化得到化合物2(3.2 mg),化合物6(3.4 mg)。Fr. C5(0.8 g)通过制备HPLC(甲醇-水10:90)分离纯化得到化合物4(26.7 mg)。

部位D(11.5 g)溶解于5%甲醇中,经ODS填料中压快速制备色谱分离,依次用5%,10%,50%,95%甲醇洗脱,经HPLC检视合并,得到4个流分Fr. D1~Fr. D4。Fr. D2(9.4 g)用60%甲醇溶解,通过SephadexLH-20柱色谱,以甲醇-水(60:40)洗脱,得到流分Fr. D2.1~Fr. D2.3。Fr. D2.2(2.6 g)通过制备HPLC(甲醇-水30:70~90:10)分离纯化,得到化合物7(72.1 mg),8(74.3 mg),9(20.5 mg),10(43.1 mg),11(2.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物1 白色粉末。ESI-MS m/z 267.038 3 $[M+Na]^+$, 243.039 9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR(D_2O , 600 MHz) δ : 7.79(1H, d, $J=7.8$ Hz, H-6), 5.82(1H, br s, H-1'), 5.81(1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5), 4.27(1H, m, H-3'), 4.14(1H, m, H-2'), 4.05(1H, m, H-4'), 3.77(1H, br d, $J=12.6$ Hz, H-5'a), 3.83(1H, br d, $J=12.6$ Hz, H-5'b); ^{13}C -NMR(D_2O , 150 MHz) δ : 166.2(C-4), 151.7(C-2), 141.8(C-6), 102.2(C-5), 89.3(C-1'), 84.1(C-4'), 73.6(C-2'), 69.4(C-3'), 60.7(C-5')。以上数据与文献[17]基本一致,并且在相同的HPLC色谱条件,保留时间及紫外光谱与尿苷对照品一致,故鉴定化合物1为尿苷(uridine)。

化合物2 白色粉末。ESI-MS m/z 136.038 9 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(D_2O , 600 MHz) δ : 8.12(1H, s, H-2), 7.10(1H, s, H-8); ^{13}C -NMR(D_2O , 150 MHz) δ : 156.1(C-6), 152.9(C-2), 150.7(C-4), 139.4(C-8), 118.9(C-5)。以上数据与文献[18]基本一致,并且在相同的HPLC色谱条件,保留时间及紫外光谱与腺嘌呤对照品一致,故鉴定化合物2为腺嘌呤(adenine)。

化合物3 白色粉末。ESI-MS m/z 284.080 3 $[M+H]^+$, 282.064 9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR(DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10.65(1H, s, 1-NH), 7.94(1H, s, H-8), 6.46(2H, s, NH_2), 5.70(1H, d, $J=6.6$ Hz, H-1'), 4.39(1H, t, $J=6.6$ Hz, H-2'), 4.08(1H, d, $J=3.6$ Hz, H-3'), 3.86(1H, d, $J=3.6$ Hz, H-4'), 3.62, 3.52(2H, m, H-5'a, H-5'b); ^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 156.1(C-6), 152.9(C-2), 150.6(C-4), 134.9(C-8), 116.0(C-5), 85.6(C-1'), 84.5(C-4'), 73.0(C-2'), 69.7(C-3'), 60.7(C-5')。以上数据与文献[17]基本一致,并且在相同的HPLC色谱条件,保留时间及紫外光谱与鸟苷对照品一致,故鉴定化合物3为鸟苷(guanosine)。

化合物4 白色粉末。ESI-MS m/z 268.085 6 $[M+H]^+$, 312.076 6 $[M+HCOO]^-$ 。 1H -NMR(DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.36(1H, s, H-8), 8.15(1H, s, H-2), 7.35(2H, s, NH_2), 5.89(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-1'), 4.62(1H, dd, $J=6.0, 4.8$ Hz, H-2'), 4.15(1H, m, H-3'), 3.98(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-4'), 3.68(1H, dd, $J=12.6, 3.6$ Hz, H-5'a), 3.55(1H, dd, $J=12.0, 3.6$ Hz, H-5'b); ^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 156.6(C-6), 152.9(C-2), 149.5(C-4), 140.4(C-8), 119.8(C-5), 88.4(C-1'), 86.4(C-4'),

73.9(C-2'), 71.1(C-3'), 62.1(C-5')。以上数据与文献[17]基本一致,并且在相同的HPLC色谱条件,保留时间及紫外光谱与腺苷对照品一致,故鉴定化合物**4**为腺苷(adenosine)。

化合物**5**棕色油状物。ESI-MS m/z 127.040 2 [M+H]⁺。以上数据与文献[19]基本一致,并且在相同的HPLC色谱条件,保留时间及紫外光谱与5-羟甲基糠醛对照品一致,故鉴定化合物**5**为5-羟甲基糠醛。

化合物**6**黄褐色粉末。ESI-MS m/z 126.057 1 [M+H]⁺, 124.047 8 [M-H]⁻。¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz)δ: 9.40(1H, s, CHO), 6.92(1H, s, H-3), 6.19(1H, s, H-4), 4.45(2H, s, H-6); ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 150 MHz)δ: 179.1(CHO), 142.9(C-5), 132.5(C-2), 118.3(C-3), 109.3(C-4), 56.5(C-6)。以上数据与文献[20]报道基本一致,并且在相同的HPLC色谱条件下,保留时间及紫外光谱与5-(羟基甲基)-1H-吡咯-2-甲醛对照品一致,故鉴定化合物**6**为5-(羟基甲基)-1H-吡咯-2-甲醛[5-(hydroxymethyl)-1H-pyrrole-2-carboxaldehyde]。

化合物**7**无色油状物。ESI-MS m/z 265.085 5 [M+Na]⁺。¹H-NMR(CD₃OD, 600 MHz)δ: 7.12(1H, s, H-6), 6.65(1H, s, H-3), 5.00(1H, s, H-1'), 3.98(1H, m, H-2'), 3.85, 3.81, 3.81(各3H, s, 2, 4, 5-OCH₃), 1.06(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-3'); ¹³C-NMR(CD₃OD, 150 MHz)δ: 151.1(C-2), 148.9(C-4), 142.9(C-5), 121.6(C-1), 112.5(C-6), 97.5(C-3), 71.1(C-1'), 69.7(C-2'), 56.0, 55.4, 55.3(2, 4, 5-OCH₃), 16.0(C-3')。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定化合物**7**为(threo) 1', 2'-dihydroxyasarone。

化合物**8**无色油状物。ESI-MS m/z 265.085 6 [M+Na]⁺。¹H-NMR(CD₃OD, 600 MHz)δ: 7.05(1H, s, H-6), 6.70(1H, s, H-3), 4.79(1H, d, *J*=6.6 Hz, H-1'), 3.88, 3.83, 3.79(各3H, s, 2, 4, 5-OCH₃), 3.80(1H, m, H-2'), 1.04(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-3'); ¹³C-NMR(CD₃OD, 150 MHz)δ: 151.3(C-2), 149.2(C-4), 143.1(C-5), 122.1(C-1), 112.3(C-6), 97.6(C-3), 71.8(C-1'), 71.4(C-2'), 56.0, 55.4, 55.5(2, 4, 5-OCH₃), 18.0(C-3')。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定化合物**8**为(erythro) 1', 2'-dihydroxyasarone。

化合物**9**淡黄色油状物。ESI-MS m/z 279.102 4 [M+Na]⁺。¹H-NMR(CD₃OD, 600MHz)δ:

6.89(1H, s, H-6), 6.70(1H, s, H-3), 4.42(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1'), 3.88, 3.83, 3.79(各3H, s, 2, 4, 5-OCH₃), 3.81(1H, m, H-2'), 3.21(3H, s, 1'-OCH₃), 0.97(3H, d, *J*=6.6 Hz, H-3'); ¹³C-NMR(CD₃OD, 150 MHz)δ: 152.8(C-2), 149.6(C-4), 143.4(C-5), 118.7(C-1), 111.7(C-6), 97.6(C-3), 81.5(C-1'), 70.9(C-2'), 56.0, 55.6, 55.4, 55.3(2, 3, 5, 1'-OCH₃), 17.5(C-3')。以上数据与文献[22]报道基本一致,故鉴定化合物**9**为acoraminol A。

化合物**10**淡黄色油状物。ESI-MS m/z 279.101 6 [M+Na]⁺。¹H-NMR(CD₃OD, 600MHz)δ: 6.97(1H, s, H-6), 6.69(1H, s, H-3), 4.59(1H, s, H-1'), 3.94(1H, m, H-2'), 3.88, 3.83, 3.80(各3H, s, 2, 4, 5-OCH₃), 3.27(3H, s, 1'-OCH₃), 1.06(3H, d, *J*=5.4 Hz, H-3'); ¹³C-NMR(CD₃OD, 150MHz)δ: 152.5(C-2), 149.3(C-4), 143.2(C-5), 118.2(C-1), 112.3(C-6), 97.6(C-3), 80.8(C-1'), 69.3(C-2'), 56.1, 56.0, 55.4, 55.3(2, 3, 5, 1'-OCH₃), 16.2(C-3')。以上数据与文献[22]报道基本一致,故鉴定化合物**10**为acoraminol B。

化合物**11**灰白色粉末。ESI-MS m/z 325.141 5 [M+H]⁺。¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz)δ: 7.32(1H, s, H-5), 6.92(1H, s, H-8), 4.49(1H, m, H-1'a), 4.08(1H, s, H-2'), 4.01(1H, d, *J*=13.8 Hz, H-1'b), 3.57(1H, m, H-3'), 3.57(1H, m, H-4'), 3.61(1H, br d, *J*=11.4 Hz, H-5'a), 3.43(1H, m, H-5'b), 2.22(3H, s, H-9), 2.19(3H, s, H-10); ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 150 MHz)δ: 156.2(C-2), 154.3(C-3), 1321.8(C-6), 131.5(C-7), 125.4(C-8a), 123.8(C-4a), 117.0(C-5), 116.5(C-8), 74.1(C-3'), 73.2(C-4'), 68.6(C-2'), 63.9(C-5'), 45.0(C-1'), 19.8(C-9), 19.2(C-10)。以上数据与文献[23]报道基本一致,故鉴定化合物**11**为菖蒲碱丙(tatarine C)。

4 石菖蒲中核苷类成分的指认

考虑到石菖蒲中的胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤可能是由5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷转化而成,因此制备了5个核苷类成分及6个核苷酸类成分的对照品溶液,既对分离鉴定的5个核苷类成分进行指认又对其可能的转化前体进行指认。

4.1 色谱条件 采用YMC Hydrosphere C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 3 μm);流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~12 min, 0A; 12~13 min, 0~2%A; 13~25 min, 2%A; 25~28 min, 2%~5%; 28~42 min,

5%A);流速 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 260 nm ,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

4.2 对照品溶液的制备 分别取胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷对照品适量,精密称定,加水溶解,制成含胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷质量浓度分别为 $2.28, 4.15, 2.10, 3.17, 0.62\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液1,备用。

分别取5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷对照品适量,精密称定,加水溶解,制成含5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷质量浓度分别为 $2.88, 8.94, 3.46, 2.38, 2.90, 3.44\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液2,备用。

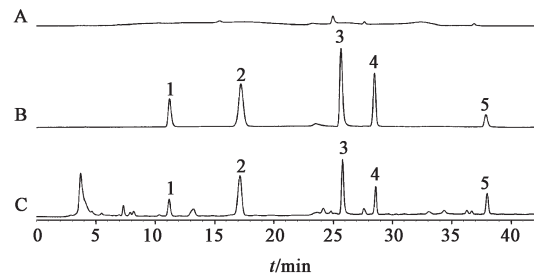
4.3 供试品溶液的制备

4.3.1 超声提取 取石菖蒲饮片粉末数份,每份约 0.5 g (过40目筛),精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入去离子水 20 mL ,称定质量,分别超声(功率 250 W ,频率 40 kHz)处理 $0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4\text{ h}$,取出,放至室温,称定质量,用水补足减失的质量,摇匀, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取上清液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得各提取时间的石菖蒲超声水提液。

4.3.2 回流提取 取石菖蒲饮片粉末约 0.5 g (过40目筛),精密称定,置于 50 mL 圆底烧瓶中,精密加入去离子水 20 mL ,称定质量,回流提取 0.5 h ,取出,放至室温,称定质量,用水补足减失的质量,摇匀, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取上清液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,得石菖蒲回流提取 0.5 h 水提液。

4.4 成分指认 取按4.3.1项下方法制备的石菖蒲超声处理 0.5 h 水提液,4.2项下混合对照品溶液1,混合对照品溶液2,按照4.1项下色谱条件进样分析。通过对照品溶液色谱图中各化合物的保留时间及最大吸收波长,对石菖蒲样品中的相应化合物进行指认。对照品溶液和供试品溶液HPLC色谱图见图1。

从图1可以看出,石菖蒲超声 0.5 h 水提液中含有胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷5个核苷类成分,且这5个成分为石菖蒲水提液中的主要化学成分。此外,在此色谱条件下,5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷6个核苷酸类成分没有响应,不能确定石菖蒲水提液中是否存在上述核苷酸类成分。



A.混合对照品溶液2;B.混合对照品溶液1;C.石菖蒲超声 0.5 h 水提液;1.胞苷;2.尿苷;3.腺嘌呤;4.鸟苷;5.腺苷

图1 对照品及石菖蒲水提液的HPLC

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances and aqueous extract of *Acorus tatarinowii*

5 石菖蒲中核苷类成分稳定性

为了明确核苷类成分自身的稳定性,首先考察了核苷类对照品在水溶液中的稳定性。其次为了明确石菖蒲水提液中核苷类成分的含量是否受到提取时间的影响,考察了超声时间对石菖蒲中核苷类成分含量的影响。考虑到超声提取时间对石菖蒲中核苷类成分的影响以及回流提取可能对核苷类成分转化的影响,选择了超声 0.5 h 水提,超声 3 h 水提和回流 0.5 h 水提3种提取方法,比较了这3种石菖蒲水提液中核苷类成分的稳定性。

5.1 核苷类对照品的稳定性考察 取4.2项下制备的混合对照品溶液1,分别于制备后 $0, 2, 4, 8, 12, 24, 36\text{ h}$ 按4.1项下色谱条件进行测定,计算胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷峰面积RSD分别为 $0.3\%, 0.3\%, 0.3\%, 0.3\%, 0.4\%$,表明胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷5个成分在 36 h 内具有较好的稳定性,在水溶液中不会发生转变。

5.2 超声提取时间对石菖蒲中核苷类成分含量的影响 取石菖蒲饮片粉末12份,按4.3.1项下方法制备石菖蒲超声 $0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4\text{ h}$ 水提液,按4.1项下色谱条件进行分析,测定不同提取时间胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷峰5个成分的峰面积。随着超声时间的增加,胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷4个成分的含量明显增加,而腺苷的含量整体来说随着时间的增加而降低,在超声提取 3 h 后,含量变化相对较小,见表1。

5.3 提取方式对石菖蒲中核苷类成分稳定性的影响

5.3.1 石菖蒲超声 0.5 h 水提液中核苷类成分稳定性考察 取按4.3.1项下方法超声处理 0.5 h 制备的供试品溶液,分别于制备后 $0, 2, 4, 6, 8, 10, 12\text{ h}$ 按4.1项下色谱条件进行分析,计算胞苷、尿苷、腺

表1 不同时间石菖蒲超声提取水提液中核苷类成分峰面积(n=2)
Table 1 Peak areas of nucleosides in water extract of *Acorus tatarinowii* by different extraction time (n=2)

t/h	胞苷	尿苷	腺嘌呤	鸟苷	腺苷
0.25	29 425	113 211	82 463	33 213	30 775
0.5	31 158	114 628	98 230	38 599	27 972
1	39 327	123 615	127 676	59 305	28 557
2	51 742	136 359	146 535	80 490	31 056
3	66 015	148 411	164 242	107 879	27 835
4	68 743	151 927	172 263	102 349	21 401

嘌呤、鸟苷、腺苷5个成分峰面积RSD分别为10.8%,3.0%,2.9%,20.1%,18.0%。石菖蒲0.5h超声水提液中这5个核苷类成分稳定性较差,且随着放置时间的延长,各成分的峰面积都有所增加。推测石菖蒲0.5h超声水提液在放置过程中,可能有其他成分转化成了这5个成分。见表2。

表2 石菖蒲超声0.5h水提液中核苷类成分稳定性
Table 2 Stability of 0.5 h water ultrasonic extract of *Acorus tatarinowii*

t/h	胞苷	尿苷	腺嘌呤	鸟苷	腺苷
0	31 355	120 753	94 586	39 169	30 239
2	32 233	115 741	95 334	42 903	37 527
4	34 198	114 335	95 716	48 792	44 551
6	36 022	116 599	97 093	54 835	48 850
8	38 115	119 730	98 130	60 425	50 258
10	38 511	122 156	99 345	64 091	50 920
12	42 440	124 025	102 713	67 795	51 295

5.3.2 石菖蒲超声3h水提液中核苷类成分稳定性考察 取按4.3.1项下方法超声处理3h制备的供试品溶液,分别于制备后0,2,4,6,8,10,12h按4.1项下色谱条件进行测定,计算胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷峰面积RSD分别为4.3%,1.7%,0.7%,3.5%,2.4%。石菖蒲超声3h水提液中这5个核苷类成分相对较为稳定,胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷4个成分的峰面积明显高于超声0.5h水提液,而腺苷的峰面积又低于超声0.5h水提液,这表明石菖蒲粉末在超声水提过程中不仅有其他成分生成转化成分这5个成分,腺苷还可能进一步的转化为其他成分。当超声提取3h时,核苷类成分的生成或转化到达相对稳定的状态。见表3。

5.3.3 石菖蒲回流0.5h水提液中核苷类成分稳定性考察 取按4.3.2项下方法回流提取0.5h制备的供试品溶液,分别于制备后0,2,4,6,8,10,12h

表3 石菖蒲超声3h水提液中核苷类成分稳定性
Table 3 Stability of 3 h water ultrasonic extract of *Acorus tatarinowii*

t/h	胞苷	尿苷	腺嘌呤	鸟苷	腺苷
0	66 511	150 071	172 569	106 225	28 676
2	68 464	151 987	172 319	111 015	30 564
4	70 232	153 295	173 966	112 838	30 833
6	71 430	153 897	173 792	115 806	30 624
8	73 618	156 004	173 252	117 033	30 661
10	75 548	157 895	175 764	117 915	30 398
12	70 967	153 858	173 610	113 472	30 293

后按4.1项下色谱条件进行测定,计算胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷峰面积RSD分别为0.8%,0.3%,1.2%,2.4%,1.1%。石菖蒲回流0.5h水提液中这5个核苷类成分相对较为稳定,推测回流过程中的高温状态可能破坏了石菖蒲中的核苷类成分的相关转化酶,回流水提液中核苷类成分未进行相关反应或转化。见表4。

表4 石菖蒲回流0.5h水提液中核苷类成分稳定性考察
Table 4 Stability of 0.5 h water reflux extract of *Acorus tatarinowii*

t/h	胞苷	尿苷	腺嘌呤	鸟苷	腺苷
0	31 552	116 152	111 783	37 839	40 858
2	32 113	115 692	113 977	38 509	41 456
4	31 972	115 467	114 744	39 240	41 747
6	32 253	115 366	113 434	39 604	41 945
8	32 375	115 460	114 454	40 036	42 005
10	32 137	115 341	111 757	39 798	41 945
12	32 185	116 123	111 832	40 553	42 141

6 石菖蒲超声水提过程中核苷类成分转化途径

根据冬虫夏草水提过程中核苷类成分的转化途径^[15-16],推测石菖蒲超声水提液中胞苷、尿苷、鸟苷、腺嘌呤、腺苷可能是由5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷转化而来。实验通过在石菖蒲样品中添加单一核苷酸对照品后再制备供试品溶液,对石菖蒲中核苷类成分在超声水提过程中可能存在的变化规律进行研究。利用对照品溶液的峰面积和浓度按外标一点法粗略计算石菖蒲样品中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的含量,为了了解不同添加量对转化的影响,核苷酸加入量按照1:1,2:1,4:1进行添加。为了使加入的核苷酸能够充分转化,选择超声提取3h。

6.1 对照品溶液的制备 分别取5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸

腺苷对照品适量,精密称定,分别加水溶解,制成5'-胞苷酸、单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷质量浓度分别为4.32, 10.20, 5.53, 1.62, 2.03, 2.71 mg·L⁻¹的单一核苷酸对照品溶液,备用。

6.2 供试品溶液的制备 取石菖蒲饮片粉末4份,每份约0.25 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,分别加入6.1项下5'-胞苷酸对照品溶液和去离子水的混合溶液共20 mL(混合比例依次为0+20 mL, 5 mL+15 mL, 10 mL+10 mL, 20 mL+0),称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理3 h,取出,放至室温,称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,12 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得添加不同量5'-胞苷酸的石菖蒲超声水提液。按照相同方法,分别制备添加不同量单磷酸尿苷、鸟苷酸、单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷的石菖蒲超声水提液。

6.3 样品分析 取6.2项下依次添加不同量单一核苷酸制备的供试品溶液,按4.1项下色谱条件进行测定。以不加核苷酸对照品的石菖蒲供试品溶液为空白供试品溶液,计算添加不同量核苷酸的供试品溶液与空白供试品溶液中各核苷类成分的峰面积比值,即峰面积增加率。以每组试验3份平行样品的平均核苷峰面积增加率和SD值作图。添加不同量核苷酸时,核苷的峰面积增加率见表5~7。

表5 5'-胞苷酸添加试验

Table 5 Results of 5'-cytidine acid addition test

称样量/g	加入量/μg	胞苷峰面积	胞苷峰面积增加率/%
0.250 0	0	21 073	0
0.250 2	21.60	43 981	108.71
0.250 0	21.60	43 779	107.75
0.250 1	21.60	43 980	108.70
0.250 2	43.20	65 306	209.90
0.250 2	43.20	65 845	212.46
0.250 0	43.20	66 000	213.20
0.250 1	86.40	108 089	412.93
0.250 0	86.40	107 791	411.51
0.250 0	86.40	109 211	418.25
0	86.40	0	0

从表5~7可知,添加5'-胞苷酸、单磷酸尿苷的石菖蒲供试品溶液中胞苷、尿苷色谱峰的峰面积相应增加,且随着5'-胞苷酸、单磷酸尿苷的成倍加入,胞苷、尿苷的峰面积也接近于成倍增加。因此,石菖

表6 单磷酸尿苷添加试验

Table 6 Results of uridine monophosphate addition test

称样量/g	加入量/μg	尿苷峰面积	尿苷峰面积增加率/%
0.250 0	0	63 699	0
0.250 2	51.00	125 997	97.80
0.250 1	51.00	125 055	96.32
0.249 9	51.00	127 818	100.66
0.250 2	102.00	190 796	199.53
0.250 1	102.00	192 255	201.82
0.250 0	102.00	191 338	200.38
0.249 9	204.00	318 281	399.66
0.250 0	204.00	317 325	398.16
0.249 9	204.00	318 565	400.11
0	204.00	0	0

表7 鸟苷酸添加试验

Table 7 Results of guanosine monophosphate addition test

称样量/g	加入量/μg	鸟苷峰面积	鸟苷峰面积增加率/%
0.250 1	0	63 699	0.00
0.250 0	27.65	125 997	76.18
0.250 2	27.65	125 055	77.84
0.250 1	27.65	127 818	79.70
0.249 9	55.30	190 796	164.10
0.250 2	55.30	192 255	165.16
0.250 2	55.30	191 338	161.32
0.250 1	110.60	318 281	324.03
0.250 0	110.60	317 325	326.30
0.250 1	110.60	318 565	332.67
0	110.60	0	0

蒲在提取过程中5'-胞苷酸到胞苷、单磷酸尿苷到尿苷的转化率大约为100%。添加鸟苷酸的供试品溶液中鸟苷色谱峰的峰面积相应增加,鸟苷酸到鸟苷的转化率大约为80%。添加单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷的供试品溶液中腺苷与腺嘌呤的峰面积都相应增加,但腺苷和腺嘌呤的峰面积没有呈现规律性增加,且3组试验的3份数据中的腺苷峰面积增加率的SD值均较大,这可能是由于单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷与腺苷和腺嘌呤之间的转化过程较为复杂。

通过添加核苷酸试验可以得出,石菖蒲超声水提液中核苷类成分的转化途径可能为5'-胞苷酸转化为胞苷,单磷酸尿苷转化为尿苷,鸟苷酸转化为鸟苷,单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷转化为腺苷,腺苷转化为腺嘌呤。结构示意图2。

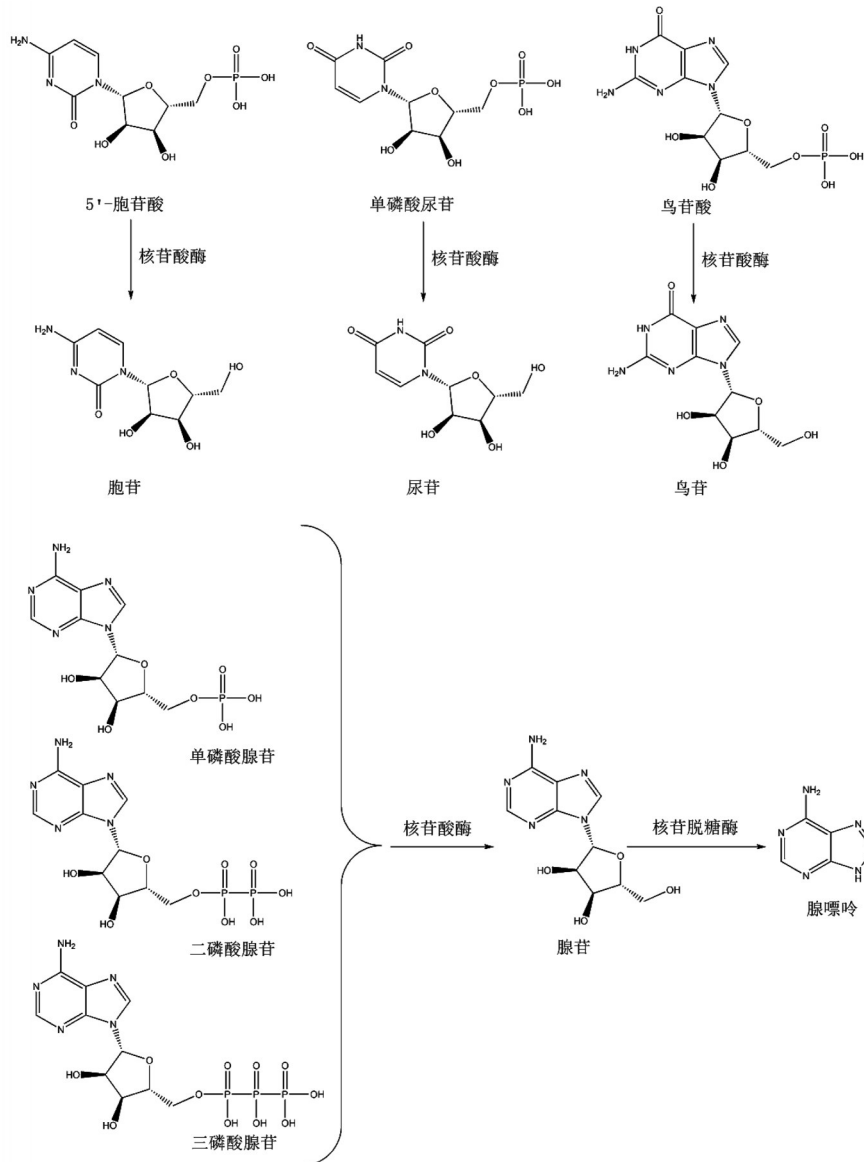


图2 石菖蒲水提过程中核苷类成分可能的转化途径

Fig. 2 Possible transformation pathways of nucleosides in *Acorus tatarinowii* during water extraction

7 讨论

本实验对石菖蒲水提液化学成分进行了分离鉴定,其中,化合物1~4和6为首次在菖蒲属植物中分离得到。首次从菖蒲属植物中分离得到核苷类化合物,明确了石菖蒲水提液中的主要成分有尿苷(1),腺嘌呤(2),鸟苷(3),腺苷(4),胞苷等,丰富了菖蒲属植物化合物的数量和种类,弥补了石菖蒲水溶性成分研究较少的不足,为阐明石菖蒲水溶性药效成分提供了参考。

目前,已有较多学者^[14,24]建立了不同中药中核苷类成分的含量测定方法,这些研究结果表明有些中药水提液中的核苷类成分在放置过程中稳定性较好,如金蝉花超声0.5 h水提液在24 h内稳定性

较好,尿苷、鸟苷、腺嘌呤、腺苷4个成分色谱峰RSD均<0.8%。而本实验通过对石菖蒲超声水提液和回流水提液在放置过程中稳定性考察发现,石菖蒲超声0.5 h水提液在12 h内稳定性较差,胞苷、鸟苷、腺苷3个成分色谱峰峰面积变化尤为明显。石菖蒲在超声水提过程中,随着提取时间延长,胞苷、尿苷、腺嘌呤、鸟苷4个成分含量呈增加的趋势,腺苷含量有减少的趋势。可见,不同中药中的核苷类成分稳定性差异比较大,这种差异可能与植物体内自身存在的酶不同有关。

通过添加核苷酸试验,本研究初步明确了石菖蒲超声水提液中胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷、腺嘌呤5个化合物的转化途径。其转化规律表现为部分核苷

酸通过脱磷酸转化为对应的核苷;部分核苷通过脱糖转化为对应的碱基,此研究结论与冬虫夏草在水提过程中的核苷类化合物转化途径有类似之处^[16]。本文为石菖蒲及其他中药中核苷类成分的发现及分析评价提供了参考。

[参考文献]

- [1] 佚名. 神农本草经[M]. 成都:四川科学技术出版社, 2008:26.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:91-92.
- [3] 吴淑英,杨成梓,蔡杏栗,等. 石菖蒲的本草考证[J]. 中药材, 2016, 39(9):2150-2156.
- [4] 李晓青,赵佳奇,田雅娟,等. 远志、石菖蒲及其对药改善记忆的物质基础和作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3):190-199.
- [5] 唐洪梅,席萍. 石菖蒲不同部位镇静抗致惊厥作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4):45-47.
- [6] 冯波,靖慧军,郭敏娟,等. 石菖蒲挥发油和水煎液的抗焦虑作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9):207-210.
- [7] 蒋征奎,李晓,陈卓. 石菖蒲挥发油对链脉佐菌素致大鼠痴呆模型学习记忆能力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(2):263-265.
- [8] 李腾飞,孙秀萍,高江晖,等. 石菖蒲水提物对获得性无助模型的抗抑郁作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):132-135.
- [9] 姚娜,梁迷,林森相,等. 石菖蒲水提物对PC12细胞增殖及细胞突起的作用[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(2):75-78.
- [10] 林双峰,邹衍衍,李小兵,等. 石菖蒲去挥发油水提液的LC-MS分析[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(15):2952-2957, 2960.
- [11] 蔡锡潮,龚又明,邓广海,等. 石菖蒲水煎液及浓缩液的药物成分分析[J]. 四川中医, 2015, 33(6):53-55.
- [12] 杨晓燕,陈发奎,吴立军. 石菖蒲水煎液化学成分的研究[J]. 中草药, 1998, 11:730-731.
- [13] 丁兴杰,熊亮,周勤梅,等. 天然核苷类成分的化学结构和药理活性研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(2):102-108.
- [14] 黄鲛,易进海,刘玉红,等. 天南星、半夏、白附子中8种核苷成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16):59-62.
- [15] 钱正明,甄达明,李文庆,等. 冬虫夏草水提取过程中腺苷转化途径研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(5):758-762.
- [16] YANG F Q, LI D Q, FENG K, et al. Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in Cordyceps by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(34):.
- [17] 王钧箴,陈丽华,高丽,等. 隐孔菌子实体化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(9):1228-1232.
- [18] YUAN Y, WIN A K K, RAN X K, et al. A new sesquiterpene lactone from yacon leaves[J]. Nat Prod Res, 2017, 31(1):43-49.
- [19] 赵方方,韩丙军,吕岱竹,等. 海南胡椒蔓提取物活性测试及化学成分分离鉴定[J]. 热带作物学报, 2019, 40(7):1317-1324.
- [20] CHEN S D, YONG T Q, XIAO C, et al. Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti- α -glucosidase and anti-proliferative activities[J]. J Funct Foods, 2018, 43:196-205.
- [21] 廖矛川,陈凤,张雨馨,等. 石菖蒲正丁醇部位化学成分研究[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2016, 35(1):64-66.
- [22] PARK C H, KIM K H, LEE I K, et al. Phenolic constituents of *Acorus gramineus*[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(8):1289-1296.
- [23] 劳爱娜,唐希灿,王洪诚,等. 石菖蒲中菖蒲碱及它们的用途:中国, CN1220260[P]. 1999-06-23.
- [24] 葛琦,万晶琼,朱益灵,等. 金蝉花核苷类成分的LC-MS定性分析与HPLC含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(11):1857-1863.

[责任编辑 顾雪竹]