

^{60}Co - γ 射线辐照对蛹虫草子实体生物活性成分的影响

王平, 刘桂君*, 周思静, 乔宇琛, 杨素玲 (北京市辐射中心, 北京 100015)

摘要 为研究 ^{60}Co - γ 射线辐照对蛹虫草中4种生物活性成分的影响,采用剂量分别为5.0、10.0、15.0、20.0 kGy的 ^{60}Co - γ 射线辐照蛹虫草子实体干品,采用比色法测定多糖和虫草酸含量,最后采用高效液相色谱法测定虫草素及腺苷的含量。结果表明,0~20 kGy剂量的 ^{60}Co - γ 射线辐照对蛹虫草子实体干品中多糖、虫草酸、虫草素及腺苷含量的影响不显著。因此,可采用辐照的方法对蛹虫草子实体干品进行灭菌。

关键词 子实体;多糖;虫草酸;虫草素;腺苷

中图分类号 S567.3⁺5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)20-0202-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.20.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of ^{60}Co - γ Ray Irradiation on the Active Components in the Fruiting Body of *Cordyceps militaris*

WANG Ping, LIU Gui-jun, ZHOU Si-jing et al (Beijing Radiation Center, Beijing 100015)

Abstract In order to study the effects of ^{60}Co - γ ray irradiation on four kinds of bioactive components in the fruiting body of *Cordyceps militaris*, the dried fruiting bodies of *C. militaris* were irradiated with ^{60}Co - γ ray at the doses of 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 kGy. The contents of polysaccharide and cordycepic acid were determined by colorimetric method, and the contents of cordycepin and adenosine were determined by high performance liquid chromatography method. The result showed that ^{60}Co - γ ray irradiation at the irradiation dose of 0-20.0 kGy had no significant effect on the content of polysaccharide, cordycepic acid, cordycepin and adenosine in the fruiting bodies of *C. militaris*. Therefore, irradiation sterilization method could be used to treat the dried fruiting bodies of *C. militaris*.

Key words Fruiting bodies; Polysaccharide; Cordycepic acid; Cordycepin; Adenosine

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)是我国传统的食药两用菌,也是获得国家卫生健康委员会批准的新食品原料,含有虫草酸、虫草素、腺苷、多糖等重要的生物活性成分^[1],具有抗肿瘤、提高免疫力、治疗白血病、抗炎等多种活性作用^[2-5],具有很高的食用价值。目前市场上销售的蛹虫草主要是人工栽培的蛹虫草子实体,由于在栽培及烘干等过程中的处理不当,会导致子实体干品受到污染,在储存及运输过程中发霉、变质,从而影响产品质量。采用辐照的方式对蛹虫草子实体进行灭菌处理,能够减少霉变的发生,延长子实体干品的保质期,提高产品安全性。

辐照灭菌作为一种常用的灭菌方式,在中药材灭菌中应用较多。因此,研究辐照剂量对生物活性成分含量的影响具有重要意义,可为辐照灭菌剂量的选择提供重要的参考依据。秦芫花中龙胆苦苷含量随着 ^{60}Co - γ 射线辐照剂量的增大而明显降低,因此秦芫花不适宜用该方法灭菌^[6];李跃辉等^[7]研究流通蒸汽灭菌法、微波灭菌法及 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌法对牡丹皮中活性成分丹皮酚含量的影响,结果表明 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌前后牡丹皮中丹皮酚含量基本无变化,可见 ^{60}Co - γ 射线辐照是牡丹皮的最佳灭菌方法;段宝忠等^[8]研究不同辐照剂量对川贝母总生物碱及水溶性核苷类成分含量的影响,结果发现用6、8、10 kGy剂量辐照川贝母后,其总生物碱和水溶性核苷类成分的含量无显著变化,适宜用辐照灭菌方法。肖满等^[9]研究 ^{60}Co - γ 射线辐照对三七药材皂苷含量的影响,采用4、6、8 kGy剂量对三七进行辐照,结果发现与未辐照的三七相比,经 ^{60}Co - γ 射线辐照后的三七药材中人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、三七皂苷 R1 含量变化不显著,

说明三七可以采用辐照的方法灭菌。王春雷等^[10]研究 ^{60}Co - γ 射线辐照对白术有效成分含量的影响,结果发现辐照剂量不超过5 kGy时各成分含量变化不显著;当辐照剂量为8和10 kGy时白术内酯I、II、III及苍术酮含量均有变化,且苍术酮辐照前后含量变化显著。邓超^[11]研究 ^{60}Co - γ 射线辐照对龙胆和秦芫有效成分的影响,结果发现经过辐照后龙胆和秦芫中有效成分含量大多均有不同程度降低,其中龙胆苦苷含量的降低最明显,说明辐照对龙胆和秦芫有效成分含量有影响,需要根据情况选择辐照剂量。上述文献报道表明,不同的中药材中不同种类的生物活性物质对 ^{60}Co - γ 射线辐照剂量的耐受力各不相同,敏感成分会因辐照而改变其分子结构或者降解,因而不适宜采用辐照灭菌的方法,而有些中药材的生物活性成分则对 ^{60}Co - γ 射线辐照不敏感,成分含量没有显著变化,可采用辐照灭菌的方法,因此不同的中药材需要进行研究才能确定是否适宜用辐照灭菌方法。

在虫草辐照灭菌研究方面,赵小俊等^[12]采用8~9 kGy辐照剂量处理虫草头孢菌粉,其主要功能成分(腺苷、甘露醇、氮含量)及其他成分(脂肪酸、蛋白质、总糖、游离总氨基酸)含量均无显著变化,维生素C、E的含量下降;黄志勇等^[13]研究 ^{60}Co - γ 射线辐照对蝙蝠蛾拟青霉发酵菌粉的影响,结果表明8 kGy剂量辐照对发酵菌粉的感官质量及主要成分含量没有影响。目前尚未见到对蛹虫草子实体干品辐照灭菌的相关报道。笔者研究了辐照剂量对蛹虫草子实体干品中多糖、虫草酸(即甘露醇)、虫草素、腺苷等重要活性成分含量的影响,旨在为蛹虫草 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌的剂量选择提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料。蛹虫草子实体,由北京市辐射中心微生物实验

作者简介 王平(1991—),女,北京人,工程师,从事食药两用资源的开发与利用研究。*通信作者,高级工程师,博士,从事食药两用资源的开发与利用研究。

收稿日期 2021-01-21

室固体栽培,收集子实体后 60 °C 烘干。

1.1.2 试剂。虫草素(cordycepin)、腺苷(adenosine)为 HPLC 级;甘露醇(mannitol)、葡萄糖(glucose)为分析纯,均购自 Sigma 试剂公司;甲醇为 HPLC 级,购自上海安谱公司。

1.2 仪器与设备 主要试验仪器有 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)、M3 型多功能酶标仪(美国 MD 公司)、3-18k 型冷冻离心机(德国 Sigma 公司)等。

1.3 试验方法

1.3.1 蛹虫草 ^{60}Co - γ 射线辐照方法。为了保证辐照试验样品的一致性,将烘干后的蛹虫草子实体粉碎成粉末,并混合均匀。将蛹虫草子实体粉末分装在相同大小的离心管中,采用北京师范大学化学学院提供的钴源进行辐照,剂量率为 50 Gy/min,辐照剂量分别为 5、10、15 和 20 kGy,辐照时间分别为 100、200、300 和 400 min,辐照结束后将样品取出备用。

1.3.2 蛹虫草子实体活性成分的提取。取蛹虫草子实体粉末 1.0 g,加入 50 mL 超纯水,连接冷凝回流装置,沸水浴回流提取 1 h,使用冷冻离心机 8 000 r/min,离心 5 min,弃沉渣,将提取液用超纯水补至 50 mL 定容,然后用 0.22 μm 无菌滤膜过滤,备用。

1.3.3 多糖含量的测定。采用苯酚-硫酸法测定葡萄糖含量,用超纯水配制浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖标准溶液,经稀释得到浓度分别为 10、20、40、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液。吸取不同浓度的标准溶液 2 mL,加入 6% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,静止 10 min,摇匀,室温放置 20 min。以加入超纯水的样品为空白对照,于波长 490 nm 处测定光密度值^[14]。以葡萄糖含量为横坐标,以 OD 值为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。

取样品提取液 2 mL,分置不同试管中,按照标准曲线绘制方法,依次加入各试剂,测定波长 490 nm 处的吸光度值,每个样品测定 3 个平行,根据稀释度计算样品中多糖的含量。

1.3.4 虫草酸含量的测定。配制甘露醇标准溶液 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后用超纯水分别稀释成所需浓度。取浓度分别为 50、100、200、400、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甘露醇标准溶液各 1 mL,分置不同试管中,加入 1 mL 15 mmol/L 高碘酸钠溶液混匀,室温放置 10 min 后再加入 2 mL 0.1% L-鼠李糖溶液,以除去过多的高碘酸盐,混合后加入 4 mL 新配制的 Nash 试剂(150 g 醋酸铵+2 mL 冰醋酸+2 mL 乙酰丙酮,用蒸馏水稀释定容至 1 000 mL),53 °C 下水浴加热 15 min 使其呈色,冷却,在波长 412 nm 处测定吸光度(OD 值),根据样品浓度与 OD 值的关系,绘制标准曲线^[15]。

取样品提取液 1 mL,分置不同试管中,按照标准曲线的绘制方法,依次加入试剂,水浴加热,测定波长 412 nm 处的吸光度值,每个样品测定 3 个平行,根据稀释度计算样品中虫草酸的含量。

1.3.5 虫草素及腺苷含量的测定。配制虫草素及腺苷标准溶液,然后梯度稀释,虫草素和腺苷浓度分别为 10、20、40、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用高效液相色谱法(HPLC)测定虫草素及核苷类物质的含量,测定方法如下:DAD 检测器,检测波长为

260 nm,色谱柱为 XDB-C18,4.6 mm \times 250 mm,5 μm ,流动相为甲醇:纯水(V/V)15:85,流速 1 mL/min,进样量 10 μL ,柱温箱温度为 25 °C。根据标样浓度与峰面积的关系,绘制标准曲线^[15]。

按照“1.3.2”方法提取的样品,同样按照标准曲线的测定方法来测定,再将峰面积代入标准曲线方程,计算出样品提取溶液浓度,最后根据稀释度计算样品中虫草素及腺苷的含量。

2 结果与分析

2.1 多糖、虫草酸、虫草素和腺苷含量测定的标准曲线方程 根据葡萄糖浓度与 OD 值的关系,得到标准曲线方程 $y = 0.0070x - 0.0199$ ($R^2 = 0.9991$),表明葡萄糖浓度在 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好,可见该方法适宜测定葡萄糖浓度在该区间范围内的样品。根据虫草酸浓度与 OD 值的关系,得到标准曲线方程 $y = 0.0057x + 0.0072$ ($R^2 = 0.9998$),表明甘露醇浓度在 0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内线性关系良好,可见该方法适宜测定甘露醇浓度在该区间范围内的样品。根据虫草素、腺苷的浓度与峰面积的关系,得到标准曲线方程 $y = 40.774x + 138.870$ ($R^2 = 0.9991$) 和 $y = 25.313x - 35.662$ ($R^2 = 0.9997$)。这表明虫草素、腺苷在检测浓度范围内线性关系良好,该方法适合测定该试验中样品含量。

2.2 HPLC 测定蛹虫草子座色谱图 将虫草素与腺苷标样等体积混合,采用高效液相色谱法测定。样品经过色谱柱分离后腺苷、虫草素的保留时间分别为 8.578 和 11.125 min,色谱图如图 1 所示,腺苷与虫草素 2 个色谱峰分离较好,对于测定其含量无影响。蛹虫草子实体回流提取后的样品溶液采用高效液相色谱法测定,其中未经辐照的蛹虫草子实体提取液经过色谱柱分离后如图 2 所示,腺苷、虫草素的保留时间分别为 8.338 和 10.975 min。

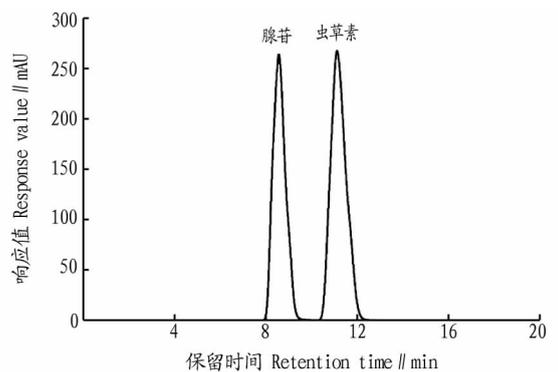


图 1 腺苷和虫草素标样色谱图

Fig.1 Chromatogram of adenosine and cordycepin standard samples

2.3 蛹虫草子实体中多糖、虫草酸、虫草素及腺苷的含量测定 根据比色法测定得到的蛹虫草子实体提取液中多糖和虫草酸含量,采用高效液相色谱法测定虫草素及腺苷的含量,然后根据溶液的稀释倍数计算出其在样品中的含量,得到各个样品中多糖、虫草酸、虫草素、腺苷的含量;最后,使用 DPS 18.10 统计软件对试验结果进行统计与分析,测定结果如表 1 所示。

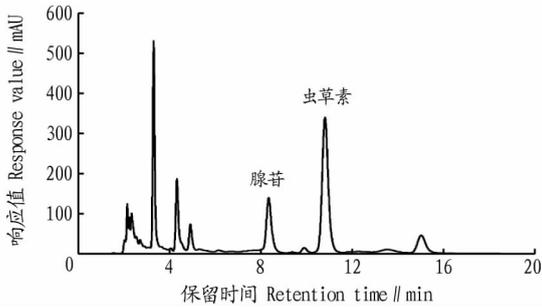


图2 蛹虫草子实体腺苷、虫草素的色谱图

Fig.2 Chromatogram of adenosine and cordycepin in the fruiting bodies of *C.militaris*

由表1可知,蛹虫草子实体多糖的平均含量为82.23~82.66 mg/g,经过不同剂量辐照后各样品多糖含量差异不显

表1 不同辐照剂量下蛹虫草子实体多糖、虫草酸、虫草素及腺苷的含量

Table 1 Content of polysaccharide, cordycepic acid, cordycepin and adenosine in the fruiting bodies of *C.militaris* at different irradiation doses

辐照剂量 Irradiation dose // kGy	多糖含量 Polysaccharide content // mg/g	虫草酸含量 Content of cordy- ceplic acid // μg/g	虫草素含量 Cordycepin content // μg/g	腺苷含量 Cordycepin content // μg/g
0	82.23±1.23	7 272.50±3.35	4 415.60±5.41	1 426.60±5.04
5	82.24±1.26	7 283.90±5.65	4 410.90±5.03	1 424.70±10.09
10	82.30±1.80	7 283.30±5.35	4 417.20±4.31	1 425.80±8.05
15	82.46±2.28	7 278.50±6.75	4 419.90±4.70	1 420.80±5.72
20	82.66±2.27	7 284.10±12.88	4 420.30±3.43	1 426.00±9.66

3 结论

蛹虫草子实体经过0、5、10、15、20 kGy辐照后,其多糖、虫草酸、虫草素、腺苷含量变化不显著,说明0~20 kGy剂量的辐照对蛹虫草子实体中这4种成分含量的影响较小,且这4种生物活性成分是蛹虫草的主要成分,可见辐照灭菌对蛹虫草子实体干品中多糖、虫草酸、虫草素、腺苷4种主要生物活性成分的影响小,因此该方法是一种适合于蛹虫草子实体干品的灭菌方法。

参考文献

- [1] 梁宗琦.中国真菌志:第32卷 虫草属[M].北京:科学出版社,2007:10-47.
- [2] FAN B Y,ZHU H B.Cordycepin:Pharmacological properties and their relevant mechanisms [J].TANG, 2012, 2(2):14.1-14.7.
- [3] 康冀川,康超,文庭池,等.虫草菌素药理学研究进展[J].菌物学报,2011,30(2):191-197.
- [4] REN Z H,CUI J H,HUO Z R,et al. Cordycepin suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation by reducing p65 transcriptional activity, inhibiting I κ B α phosphorylation, and blocking IKK γ ubiquitination[J].International

immunopharmacology, 2012, 14(4):698-703.

著,说明0~20 kGy对蛹虫草子实体中多糖含量的影响不大,此剂量范围的辐照不会使多糖含量明显降低;蛹虫草子实体中虫草酸的平均含量为7 272.50~7 284.10 μ g/g,经过0~20 kGy剂量的辐照后各样品虫草酸的含量差异不显著,说明辐照没有引起虫草酸的变化,从而导致其含量升高或降低;蛹虫草子实体中虫草素的平均含量为4 410.90~4 420.30 μ g/g,腺苷的平均含量为1 420.80~1 426.60 μ g/g,经过0~20 kGy剂量的辐照各样品虫草素及腺苷含量差异不显著,说明此范围的辐照剂量对蛹虫草子实体中虫草素及腺苷含量的影响很小。通过对蛹虫草子实体的活性成分含量进行统计发现,未经辐照与经过不同剂量辐照的蛹虫草子实体多糖、虫草酸、虫草素、腺苷的含量无显著差异($P>0.05$),说明0~20 kGy剂量的辐照不会影响蛹虫草子实体的品质。

- [5] 吴勇,陈卫东.蛹虫草药理作用研究概述[J].中国药师,2011,14(5):732-734.
- [6] 崔文婷,谭睿,罗琴,等. 60 Co- γ 辐照灭菌对秦花中龙胆苦苷含量的影响[J].安徽农业科学,2012,40(22):11227-11228,11282.
- [7] 李跃辉,王银,张水寒,等.灭菌方法对牡丹皮粉体主要成分含量的影响[J].中国医药科学,2012,2(13):41-42,72.
- [8] 段宝忠,黄林芳. 60 Co- γ 射线辐照贮藏对川贝母质量的影响[J].中国药房,2012,23(15):1391-1392.
- [9] 肖满,吴艳,马江南,等. 60 Co- γ 辐照灭菌对三七药材质量的影响[J].湖南中医杂志,2020,36(3):150-152,175.
- [10] 王春雷,姜建伟,侯桂兰.钴-60射线辐照对白术药材中4种有效成分的影响研究[J].中国药师,2018,21(8):1358-1362.
- [11] 邓超.高效液相色谱指纹图谱分析钴60辐照前后龙胆和秦艽成分变化[J].生物化工,2020,6(2):56-59.
- [12] 赵小俊,史建君,孙志明,等.虫草头孢菌粉辐照灭菌及其主要成分的影响[J].中国农业科学,2003,36(9):1081-1085.
- [13] 黄志勇,陈庆隆,曹丰生,等.发酵虫草菌粉辐照灭菌研究[J].江西农业科技,2002(6):17-18.
- [14] 张惟杰.糖复合物生化技术研究[M].杭州:浙江大学出版社,1994:16.
- [15] 刘桂君,周思静,林金星.培养基质对蛹虫草中虫草酸及核苷类物质的影响[J].食品与发酵工业,2015,41(5):94-98.

(上接第201页)

减低,在该试验的基础上,烟丝物理特性、烟丝化学成分的变化、挥发性物质含量的变化等有待进一步研究,以确保烟丝的质量。

参考文献

- [1] 李秀芳,王永华,赵春元,等.解决烘丝机干头干尾的方法与实现[J].烟草科技,2013,46(9):27-29,32.
- [2] 高辉,何邦华,朱勇,等.滚筒烘丝过程干头干尾烟丝物理特性研究[J].中国烟草学报,2014,20(5):31-37.
- [3] 何邦华,朱勇,邱昌桂,等.“干头干尾”烟丝化学成分的变化[J].烟草科技,2014,47(6):45-48.
- [4] 白麟.烘丝机干头干尾控制方法研究[J].轻工科技,2017,33(7):46-48.
- [5] 李军,刘旭强,钱启福,等.烘丝机工艺参数对“干头干尾”烟丝含水率的

- [6] 影响研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2015,30(6):873-879.
- [7] 华一崑,王慧,徐永康,等.管式回潮装置对干头干尾烟丝挥发性化学物质的影响[J].安徽农业科学,2018,46(26):175-179.
- [8] 赵凡,李银华,郑伟.薄片烘丝机干头干尾量改进研究[J].包装工程,2019,40(15):225-229.
- [9] 仝智强.逆流式滚筒烘丝机干头干尾控制的一种方法[J].科技信息,2010(3):474,488.
- [10] 成皓,喻鹏程.滚筒管板式烘丝机干头干尾的技术改进[J].产业与科技论坛,2014,13(5):68-69.
- [11] 叶鸿宇,许峰,张建中,等.SH38型滚筒管板式烘丝机干头干尾控制模式[J].中国科技信息,2015(2):190-191.
- [12] 张智慧.降低叶丝干燥干头干尾量[J].重庆与世界(学术版),2015,32(12):26-28.
- [13] 高占勇,华一崑,杨晶津,等.优化滚筒烘丝机控制模式降低干头干尾量[J].机械制造与自动化,2018,47(6):232-235.