

及监测田间 CMV 的发病情况打下基础。

CMV 为雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型成员, 为单链正义 RNA 病毒^[6], 其基因组由 3 个正链的 RNA 分子组成, 按相对分子质量由大到小的顺序分别命名为 RNA1, RNA2, RNA3。它具有很广的寄主范围, 可以感染 1 000 多种双子叶和单子叶植物^[7], CMV 的分布是世界性的, 能通过蚜虫以非持久性的方式, 机械接种或带毒种子进行传播, 是农作物以及重要经济作物上危害最大的病毒之一。在实践中 CMV 的检测主要是应用酶联检测, 已经能检测到亚组, 接种鉴定, 电镜检测, 核酸杂交, RT-PCR 检测都有报道^[8,9]。依照血清学数据, 衣壳蛋白的多肽图谱, 核酸杂交以及核苷酸序列的相似性将 CMV 分成了亚组 I 和亚组 II, 我们依照 MARILYN^[10] 提供的方法进一步分析后, 将其命名为黄瓜花叶病毒丹参分离物, 并归入 IB 亚组。因只对此分离物的外壳蛋白基因进行了部分克隆, 所以若要进行更进一步的确认, 还需重新设计引物, 进行全序列的克隆分析。

致谢: 中国农业大学生物学院农业生物技术重点实验室牛胜乌博士、植物保护学院蔡祝南教授在电镜观察时给予指导。

RP-HPLC 法测定寻骨风中马兜铃酸 A 的含量

刘超, 陈蕴, 赵小磊, 龚立雄, 王林*

(河南省中药研究所, 河南 郑州 450004)

寻骨风为马兜铃科植物绵毛马兜铃 *Aristolochia mollissima* Hance 的全草。寻骨风药材收载于河南省药材标准^[1], 马兜铃酸 A 为其有效活性成分^[2], 具有抗癌、抗感染、抗早孕及增强吞噬细胞的活性等药理作用, 其对肝、肾的毒性剂量为有效剂量的 1 000 倍^[3~5]。近年来马兜铃酸引起的肾损害“马兜铃酸肾病”(AAN) 已日益受到临床重视并对用药情况进行了调查^[6]。目前马兜铃酸 A 的测定方法多为 HPLC 法, 涉及的药材有青木香、马兜铃及关木通^[7~11]等, 但有关寻骨风中马兜铃酸 A 的定量分析未见报道, 所以, 本实验对药材的马兜铃酸 A 含量进行测定研究。

References

- [1] Tian B. *Plant Virus Research Methods* (植物病毒研究方法) [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989.
- [3] Suzuki M, Kuwata S, Kataoda J, *et al.* Functional analysis of deletion mutants of *Cucurbit mosaic virus* RNA3 using an *in vitro* transcription system [J]. *Virology*, 1991, 183: 106-113.
- [4] Holcomb G E, Valverde R A. Natural infection of *Salvia uliginosa* with *Cucumber Mosaic Cucumovirus* [J]. *Hort Science*, 1998, 33(7): 1215-1216.
- [5] Wang X F, Pei M Y, Ma D F. Identification of Cuanhong mosaic virus [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1985, 15: 36-37.
- [6] Van Rengenmortel. *Virus Taxonomy* (7th ICTV Report) [M]. London: Academic Press, 2000.
- [7] Palukaitis P, Roossink M J, Dietzgen R G, *et al.* Cucumber mosaic virus [J]. *Adv Virus Res*, 1992, 41: 281-348.
- [8] Hsu H T, Barzuna L, Hsu Y H. Identification and sub grouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 2000, 90: 615-620.
- [9] Chaumpluk P Y, Sasaki N, Nakajima H, *et al.* Six new subgroup I members of Japanese *Cucumber mosaic virus* as determined by nucleotide sequence analysis of RNA 3' cDNAs [J]. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 1996, 62: 40-44.
- [10] Roossink M J, Zhang L, Hellwald K H. Rearrangement in the 5' nontranslated region: phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA3 indicate radial evolution of three subgroups [J]. *J Virol*, 1999, 8: 6752-6758.

1 仪器、试剂及样品

Waters 液相色谱仪, 481 紫外检测器, 510 泵 (美国), Echrom 98 色谱工作站 (大连依利特), 色谱纯甲醇 (上海陆忠); 水为乐百氏纯净水 (广东乐百氏, 规格 550 mL, 批号: 20020406); 马兜铃酸 A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 746-9002); 其他试剂均为分析纯。寻骨风药材购自郑州市及禹州市。由本所药材研究室安维教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm) (大连化学物理研究所); 流动相为甲醇-水-醋酸 (65: 35: 1); 流速 1.0 mL/min; 柱温 25

* 收稿日期: 2003-03-18

作者简介: 刘超 (1962-), 河南郑州人, 工程师, 1988 年毕业于河南中医学院, 研究方向为中药新药研制及质量标准研究

Tel: (0371) 6323448 Fax: (0371) 6323880 E-mail: lc621023@ sina.com

℃;检测波长为 315 nm;理论板数按马兜铃酸 A 峰计算应不低于 4 000 该条件下对照品及样品的色谱峰基本达到基线分离,色谱图见图 1

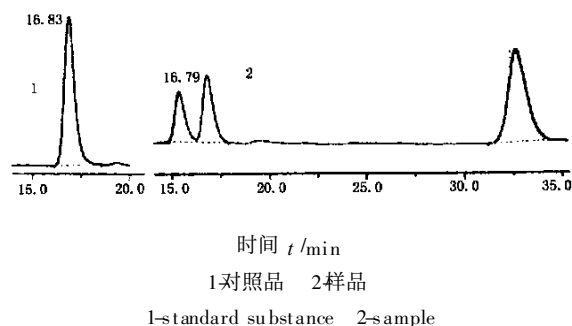


图 1 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 供试溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备:精密称取马兜铃酸 A 对照品 2.5 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得马兜铃酸 A 0.1 mg/mL

2.2.2 供试品溶液的制备:取本品细粉约 1 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,放置,取上清液,过 0.45 μ 滤膜,即得。

2.3 线性关系考察:取浓度为 0.1 mg/mL 的马兜铃酸 A 对照品溶液分别进样 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 μ L,在前述色谱条件下进行分析,记录色谱峰面积,回归方程为: $Y = 1540.28X - 8.463$, $r = 0.9998$,在 0.25~1.25 μ g 与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度的试验:取马兜铃酸 A 对照品溶液 (0.1 mg/mL) 和样品溶液分别在仪器上重复进样 6 次,进样量分别为 10 和 5 μ L,测定峰面积。结果:样品溶液的 $RSD = 2.57\%$,对照品溶液的 $RSD = 1.08\%$ 。

2.5 稳定性试验:取马兜铃酸 A 对照品溶液 (0.1 mg/mL) 和样品溶液按 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h 进样,测定峰面积。结果:样品的 $RSD = 1.30\%$,对照品的 $RSD = 0.94\%$ 。

2.6 重现性试验:称取同一样品 6 份,依次分别制得样品溶液,进样 5 μ L,测定峰面积, $RSD = 2.10\%$ 。

2.7 回收率试验:精密称取已知含量 (2.60 mg/g) 的寻骨风药材样品 0.100 g 5 份,置 10 mL 量瓶中,加马兜铃酸 A 对照品 0.25 mg,加甲醇近刻度,超声 30 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,取上清液,过 0.45 μ 滤膜,进样 10 μ L 依法测定。结果加样平均回

收率为 104.08%。 $RSD = 2.13\%$ 。

2.8 药材样品含量测定:精密称取各药材 1.000 g,按 2.2.2 方法处理。进样 5 μ L,结果见表 2

表 1 样品含量 ($n = 2$)

Table 1 Contents of sample ($n = 2$)

样品来源	测定结果 %	样品来源	测定结果 %
神丹药房	0.106	郑药股份	0.146
东明药房	0.102	复春药房	0.088
禹县药市	0.265	生力药房	0.070
东升药房	0.113	欣康药房	0.101
千禧药房	0.198	同心药房	0.113

结果表明,10 批药材的马兜铃酸 A 含量在 0.07%~0.26%。

3 讨论

3.1 测定波长的选定:将马兜铃酸 A 对照品的甲醇溶液在 200~400 nm 的波长范围内进行紫外扫描,马兜铃酸 A 在 315 nm 处有最大吸收,因此,本品的测定波长选定为 315 nm

3.2 流动相的选定:文献报道的流动相有甲醇-水-醋酸 (70:29:1)^[7]、甲醇-水-冰醋酸 (72:28:1)^[8]、甲醇-水-醋酸 (60:35:1)^[9],结果在上述流动相的基础上经过筛选,确定本方法的流动相为甲醇-水-醋酸 (65:35:1),分离度达到 1.5 以上。

3.3 文献报道有多种提取方法,经比较,超声提取 30 min 稍优于回流提取 5 h,且简便、省时。

3.4 鉴于近年马兜铃酸引起的肾损害,有必要对以马兜铃属植物入药的药材进行马兜铃酸限量检查。

References

- [1] Hean Province Standard of Traditional Chinese Herbs (河南省中药材标准) [S]. 1992.
- [2] Xu G J. Introduction to the Chinese Materia Medica (中国药理学) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1996.
- [3] Ding L S, Lou F C. Chemical constituents of *Aristolochia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1983, 14(9): 40.
- [4] Zhu D Y, Huang B S, Chen Z L. Chemistry Pharmacology and Clinic of *Aristolochia* [J]. *Foreign Med Sci - Section Pharm* (国外医学·药学分册), 1979, (2): 83.
- [5] Wang W H, Zheng H. The pregnancy terminating effect and toxicity of an active constituent of *Aristolochia mollissima* Hance, aristolochic acid A [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1984, 19(6): 405.
- [6] Chen W, Chen Y P, Li A, et al. The clinical and pathological manifestations of aristolochic acid nephropathy—the report of 58 cases [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 2001, 81(18): 1101.
- [7] Shen J, Dong L, Qi M F, et al. Determination of aristolochic acid A in Madouling and its melliti by RP-HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1996, 13(3): 218.
- [8] Omer A M, Wang Z T, Yu G D, et al. Determination of aristolochic acid A in the roots and rhizomes of aristolochic from Sudan and China by HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30(4): 288.

- [9] Zhang Y P, Xu G J, Jin R L, *et al.* Determination of aristolochic acid A in drugs from *Aristolochia* by RP-HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1993, 24(1): 56.
- [10] Zhao N, Lai J F, Bi K S. Determination of aristolochic acid

- A in *Radix Aristolochia* by RP-HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2001, 18(2): 125.
- [11] Fu G X, Zhan S P, Chen W, *et al.* TLC/SC determination of aristolochic acid in Longdanxiegan Pills [J]. *J Pharm Ana* (药物分析杂志), 2002, 22(3): 17.

高效液相色谱法测定叶下珠中槲皮素的含量

田 密¹, 钟长平¹, 江铁军^{2*}

(1. 广州奇星药业有限公司, 广东 广州 510310 2. 广州陈李济药厂, 广东 广州 510290)

叶下珠为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草, 具有清热、解毒、明目等功效, 主要用于治疗腹泻下痢、尿路感染、肝炎等病症^[1,2]。药理研究表明具有很强的抑制乙肝表面抗原 (HBsAg) 的活性, 保护大鼠肝细胞 CCl₄ 损伤^[3]等作用。叶下珠含黄酮类、木脂素类、生物碱类、鞣质等多种成分^[4-8], 其中黄酮类化合物具有较明显抗病毒活性^[9]。槲皮素是叶下珠中黄酮类化合物的主要成分之一, 具有抗自由基、抗氧化、抗癌防癌、抗菌、抗病毒等多种生物活性及药理作用^[10]。目前尚未见叶下珠中化学成分含量测定的报道, 本实验建立了测定叶下珠中槲皮素含量的方法, 以控制叶下珠药材的质量。

1 实验材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦), AG-204 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo); 甲醇为色谱纯; 水为去离子双蒸水; 其他试剂为分析纯。槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所); 叶下珠经广州中医药大学丁平副教授鉴定为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *P. urinaria* L. 的全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Hypersil ODS 柱 (4.0 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (1:1), 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40℃; 检测波长: 360 nm; 进样量: 20 μL。HPLC 图谱见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称定槲皮素对照品 2.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成含槲皮素 0.2 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取叶下珠粉末 2.5 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加甲醇适量和 0.4% 硫酸溶

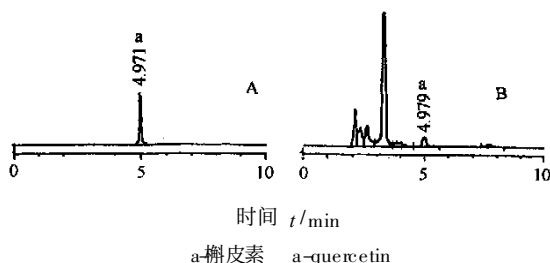


图 1 槲皮素对照品 (A) 和叶下珠供试品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of quercetin (A)

and sample of *P. urinaria* (B)

液 20 mL, 水浴加热提取至无色 (6 h), 提取液挥至约 30 mL, 放冷, 转移至 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.4 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作供试品溶液。

2.4 标准曲线: 精密吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8 μL, 进样, 测定槲皮素的吸收峰峰面积, 以进样量为横坐标, 吸收峰峰面积为纵坐标作图, 得回归方程为: $Y = 5.1 + 3723.3X$, $r = 0.9999$, 线性范围为 0.2~1.6 μg。

2.5 精密度试验: 同一供试品溶液, 取相同体积, 重复进样 6 次, 按上述条件进行测定, 其相对保留时间稳定, 峰面积 RSD=0.28%。

2.6 重现性试验: 同一批样品, 按供试品溶液制备方法平行制备 5 份, 按上述条件进行测定, 其相对保留时间稳定, 峰面积 RSD=1.79%。

2.7 稳定性试验: 在室温条件下, 将本品按测定方法处理后, 每隔 1 h 测定一次, 得峰面积的 RSD=1.26% ($n=5$)。结果表明在 4 h 内溶液的含量基本保持不变。

2.8 回收率试验: 取已知含量的叶下珠粉末 1 g, 精密称定, 加入一定量的槲皮素对照品, 按供试品溶液

* 收稿日期: 2003-04-12

作者简介: 田 密 (1976-), 女, 四川省江安县人, 助理工程师, 学士 (双专业) 学位, 1999 年毕业于广州中医药大学中药学院, 现在广州奇星药业有限公司, 主要从事中药药理学工作。 Tel 84206877