

I-VCR II-97CY₃

图2 HPLC图谱

Fig 2 Chromatogram of HPLC

3 讨论

从内生真菌的分离和筛选结果来看,植物内生真菌具有一定多样性,有可能利用药用植物内生真菌来生产与宿主所产相同或相似的生理活性物质,只是目前所分离到的内生真菌合成天然活性物质的量很少,有待于利用现代生物技术手段改造菌种,优化发酵条件及在培养物中添加前体物质等方法来提高其有效成分的产量。随着科技进步和研究的不断深入,开发利用药用植物内生真菌无疑应是解决药用植物资源短缺的最佳途径之一。

References:

- [1] Li C. General research aspect of antitumour drugs obtained from plant [J]. *Bull Pharm*, 1982, 17(2): 19-23.
- [2] Buechi G, Kulsa P, Rosati R L. The total synthesis of velbanamine [J]. *J Amer Chem Soc*, 1968, 90(9): 2448-2449.
- [3] Kutney J P, Bylsma F. Synthesis of monomeric and dimeric Vinca alkaloids The total synthesis of isovelbanamine, velbanamine, cleavamine, 18 β -carbomethoxycleavamine, and catharanthine [J]. *J Amer Chem Soc*, 1970, 92(20): 6090-6092.
- [4] Schiel O, Berlin J. Large scale fermentation and alkaloid production of cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1987, 8(2): 153-161.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [6] Strobel G, Yang X S, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 435-440.
- [7] Zhang L Q, Guo B, Shao H, et al. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 805-807.
- [8] Guo B, Li H, Zhang L. Isolation of a fungus producing vinblastine [J]. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), 1998, 20(3): 214-215.

不同采收期溪黄草中 2 α -羟基熊果酸含量的动态研究

吴剑峰¹, 刘斌², 祝晨³, 赖小平^{3*}

(1. 广东省佛山职工医学院, 广东 佛山 528000; 2. 天津医学高等专科学校, 天津 300052;

3. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 为确定溪黄草最佳采收期提供依据,为按中药材 GAP 原则制定相关标准操作规程(SOP)并实施推广应用,提供基础研究资料。方法 采用 RP-HPLC 法测定 GAP 基地产溪黄草药材不同采收期 2 α -羟基熊果酸的含量。色谱条件: Kromasil RP-C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液(70.5 : 29.5) 为流动相; 流速 0.8 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 210 nm。结果 不同采收期狭基线纹香茶菜药材中 2 α -羟基熊果酸的含量以 8 月份为高,即开花前期。结论 建议狭基线纹香茶菜药材在开花前枝叶繁盛时采收。

关键词: 溪黄草; 采收期; HPLC; 2 α -羟基熊果酸

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0081-03

Determination of 2 α -hydroxy-ursolic acid from *Herba Rabdosiae Serrae* in various collecting periods

WU Jian-feng¹, LIU Bin², ZHU Chen-chen³, LAI Xiaoping³

(1. Foshan Medical College for Personnel of Guangdong, Foshan 528000, China; 2. Tianjin Medical Training College, Tianjin 300052, China; 3. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Object To supply the basis for the optimal collecting period for *Herba Rabdosiae Serrae* (HRS). To lay down relevant Standard Operating practice (SOP) in accordance with GAP of Chinese medicinal materials and put them into practice with providing basic researching data. Methods To deter-

* 收稿日期: 2003-04-15

基金项目: “十五”国家科技攻关计划资助项目(99-929-01-23)

作者简介: 吴剑峰,女,江苏省无锡市人,副主任药师,硕士学位,一直从事药学专业的教学、科研和实践工作。现任广东省佛山职工医学院药学教研室主任,1994年获广东省“南粤教坛新秀”称号,同年获佛山市教育基金会颁发的二等奖,1999年获佛山市市直属优秀教师奖,主持了广东省立项科研课题《日本汉方制剂柴苓汤质量控制模式应用于中成药的研究》等3项,参加了国家攀登计划课题《补阳还五汤治疗脑中风作用机理研究》、国家重点科技攻关项目《中药规范化种植(GAP)研究》——溪黄草子课题等多项研究,发表论文10余篇,主编了卫生部规划教材《天然药物化学》和《天然药物化学学习指导》,担任《医学论文写作学》副主编,研究方向为天然活性成分和新药开发。Tel: (0757) 2816702 13612540388

mine the contents of 2 α -hydroxy-ursolic acid in HRS by various collecting periods (cultured under GAP) by RP-HPLC. Chromatographic conditions: Kromasil RP-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) column; the mobile phase was acetonitrile-0.05% trifluoroacetic acid solution (70.5 : 29.5); the velocity of flow was 0.8 mL/min; column temperature was 25 $^{\circ}$ C; and the detection wavelength was at 210 nm. **Results** In various collecting periods, contents of 2 α -hydroxy-ursolic acid in HRS are the highest in the collection of earlier flower of *Rabdosia lophanthoides* var. *gerardianus* (Beutham) H. Hara in August. **Conclusion** It suggests that HRS be gathered in the leaves luxuriance before blooming.

Key words: *Herba Rabdosia Serrae*; collecting periods; HPLC; 2 α -hydroxy-ursolic acid

溪黄草为民间习用草药,用于治疗湿热泻痢、跌打瘀肿、急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎等疾病^[1],临床上已广泛应用于治疗乙型病毒性肝炎,疗效确切。其主要成分有溪黄草甲素(rabdoserrin A),溪黄草乙素(rabdoserrin B), excisanin A, kamebakaurin, 2 α -羟基熊果酸, β -谷甾醇, 熊果酸, β -谷甾醇-D-葡萄糖苷等^[2,3]。溪黄草包括唇形科香茶菜属(*Rabdosia* B. L.) Hassk. 的线纹香茶菜 *R. lophanthoides* (Buch-Ham. ex D. Don) H. Hara, 线纹香茶菜两个变种狭基线纹香茶菜 *R. lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth) H. Hara, 细花线纹香茶菜 *R. lophanthoides* var. *graciliflorus* (Benth) H. Hara 以及同属植物溪黄草 *R. serra* (Maxim.) Hara^[1,4]的植物全株,广东省溪黄草药材的主流商品为狭基线纹香茶菜^[5]。我们对狭基线纹香茶菜的抗乙肝病毒的有效成分群进行了初步研究,实验表明狭基线纹香茶菜的醋酸乙酯提取部位具有显著的抑制乙肝病毒作用,化学分离与鉴定确定了该提取部位中相关单体成分群主要为熊果酸类成分。本实验以狭基线纹香茶菜的主要成分 2 α -羟基熊果酸为指标,应用 RP-HPLC 法,比较 GAP 基地的不同采收期狭基线纹香茶菜中 2 α -羟基熊果酸的含量,以期确定溪黄草最佳采收期提供科学依据,为按中药材 GAP 原则制定相关标准操作规程(SOP)并实施推广应用提供基础研究资料。

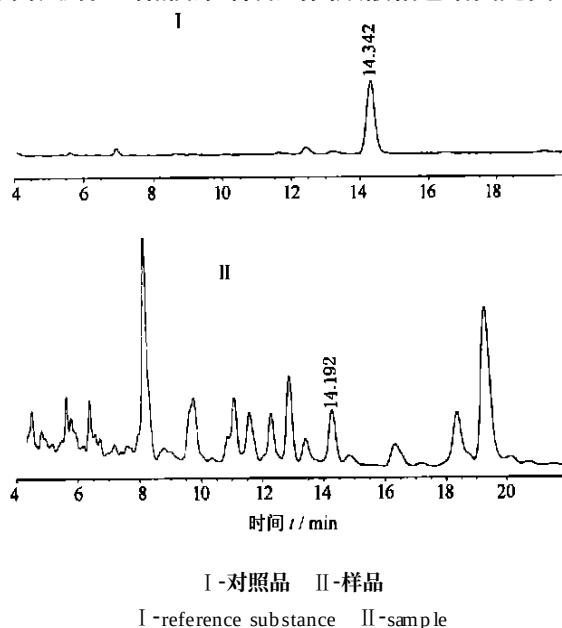
1 实验材料

HP1100 高效液相色谱仪; HP G1315A 二极管阵列检测器; Sartorius 分析天平; 乙腈为色谱纯,水为超纯水; 其他试剂均为分析纯; 2 α -羟基熊果酸对照品由广州中医药大学狭基线纹香茶菜课题组从狭基线纹香茶菜中提取分离得到,并通过 IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS 光谱鉴定,经面积归一化法标定其纯度为 98%; 溪黄草药材采于广东清远 GAP 基地。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性: 色谱柱: Kromasil

RP-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液(70.5 : 29.5)为流动相; 流速 0.8 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 210 nm。理论塔板数按 2 α -羟基熊果酸计不低于 10 000; 并且与其他成分分离良好。对照品和样品的高效液相色谱图见图 1。



I-对照品 II-样品

I-reference substance II-sample

图1 RP-HPLC 色谱图

Fig 1 RP-HPLC chromatogram of reference substance and sample

2.2 供试品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的狭基线纹香茶菜粉末(40 $^{\circ}$ C烘箱中干燥 6 h, 过 60 目筛) 0.5 g, 加甲醇 20 mL 回流提取 30 min, 滤过, 残渣再加入 20 mL 甲醇回流提取 30 min, 滤过, 合并滤液, 水浴蒸干, 残留物用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 备用。

2.3 标准曲线的制备: 精密称取干燥至恒重的 2 α -羟基熊果酸适量, 加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 制备成 0.1 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20 μ L, 以选定的色谱条件进样测定, 以峰面积(Y) 对照品质量(X) 进行线性回归, 回归方程为: Y =

552.57X - 0.199, $r = 0.999\ 9$, 线性范围为 0.06~2.02 μg 。

2.4 精密度试验: 精密吸取上述对照品溶液 2 μL , 连续进样 5 次, 以峰面积计算, $\text{RSD} = 0.92\%$, 表明分析结果的精密度良好。

2.5 重现性试验: 取同批次狭基线纹香茶菜药材样品 5 份, 按 2.2 项下方法制备供试液, 进样 5 μL , 测得 2 α -羟基熊果酸的平均含量为 0.915 4 mg/g , $\text{RSD} = 0.56\%$, 重现性符合要求。

2.6 稳定性试验: 精密吸取同一批次样品溶液 5 μL , 分别于样品溶液配制后 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进行测定, 以峰面积计算, $\text{RSD} = 1.17\%$, 表明样品溶液放置 48 h 稳定。

2.7 回收率试验: 精密称取 5 份已知 2 α -羟基熊果酸含量的狭基线纹香茶菜 0.25 g, 分别准确加入 2 α -羟基熊果酸对照品 0.5 mg , 按 2.2 项下方法制备供试液, 进样 5 μL , 测定峰面积, 结果平均加样回收率为 99.3%, $\text{RSD} = 2.71\%$ 。

2.8 样品测定: 取广东清远 GAP 基地不同批次(以采收日期编号)狭基线纹香茶菜 0.5 g, 按 2.2 项下方法制备供试液, 进样 10 μL , 进行测定, 按外标法以峰面积积分值计算 2 α -羟基熊果酸的含量, 实验结果见表 1。

3 讨论

3.1 首次建立了采用 RP-HPLC 法测定狭基线纹香茶菜中 2 α -羟基熊果酸含量的测定方法。比较了不同溶剂系统和比例的流动相, 如甲醇-水, 乙腈-甲醇-水, 乙腈-0.1% 盐酸溶液, 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液, 结果表明: 在波长 210 nm, 流速 0.8 mL/min , 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液 (70.5:29.5) 为流动相的条件下, 可以对狭基线纹香茶菜中

表 1 广东清远 GAP 基地狭基线纹香茶菜中 2 α -羟基熊果酸的含量 ($n = 3$)

Table 1 Contents of 2 α -hydroxy-ursolic acid in *R. lophanthoides* var. *gerardianus* in GAP base in Qingyuan of Guangdong Province ($n = 3$)

批号	采收日期	2 α -羟基熊果酸含量/%	RSD/%
1	07-25	0.235 1	1.34
2	08-17	1.934 2	0.93
3	08-25	1.372 4	2.12
4	09-01	0.617 2	1.16
5	10-08	0.547 9	0.78

2 α -羟基熊果酸定量测定, 且简便、快速、无干扰, 重现性好, 结果准确。

3.2 本实验以狭基线纹香茶菜中 2 α -羟基熊果酸的含量为指标, 筛选并确定了用甲醇 30 min 重复加热回流提取两次的最佳提取方法。

3.3 不同采收期 GAP 基地狭基线纹香茶菜样品, 其 2 α -羟基熊果酸成分以 8 月份含量为高, 8 月中旬含量最高, 即开花前枝叶繁盛期为狭基线纹香茶菜的最佳采收期。并提示 2 α -羟基熊果酸可能在叶中的含量较高, 有关研究另见报道。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997.
- [2] Jin R L, Cheng P Y, Xu G Y, *et al*. A Study on the compositions of rhabdoserrin B [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1987, 13 (10): 39.
- [3] Jin R L, Cheng P Y, Xu G Y, *et al*. A study on the compositions of rhabdoserrin A [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1985, 20(5): 366.
- [4] Hunan Public Health Bureau *The Standard of Chinese Medicinal Materials Herbs in Hunan* (湖南省中药材标准) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1993.
- [5] Chen J N, Lai X P, Liu N. The investigation of original flora of *L. linearis* *Rabdosia* Herbs and the determination of commodities of Guangdong [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(2): 73-74.

甘草的免疫学鉴定方法研究

白 钢¹, 曹学琳¹, 杨文博¹, 唐元泰², 芮 菁², 梁会旭^{2*}

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津市药品检验所, 天津 300070)

摘 要: 目的 利用种属特异性蛋白建立一种生药甘草的免疫学鉴定方法。方法 选用生药甘草为实验对象, 利用抗甘草总抗原血清并结合 Western-blot 的结果确定甘草种属特异性蛋白(RGP)。分离纯化该蛋白抗原并制备和生物素标记其特异性抗体, 建立夹心式 ELISA 法用于甘草的分析鉴定。结果 该方法灵敏度高、专属性强, 对不同产

* 收稿日期: 2003-04-11

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(003805311)

作者简介: 白 钢(1967—), 男, 药理学博士, 南开大学生命科学学院教授, 博士生导师, 主要从事现代生物技术与中药现代化的研究。

E-mail: gangbai@eyou.com