

临界相对湿度是药物吸湿与否的临界值,可以根据它确定生产环境的湿度。实验结果表明,安宫胶囊临界相对湿度为60%,在生产中控制湿度,以免影响产品质量。

九州虫草中核苷类成分的HPLC法测定

罗珊珊,陈 畅,史艳秋,孙迎节,张长铠*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室,山东 济南 250100)

References:

- [1] Li T L, Jia Y R, Wei B. The Influence of different vehicles on humectation in granules of Chinese medicine [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 1993, 8 (2): 80-83.
- [2] Lu B. *Pharmaceutics Experiment* (药剂学实验) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.

虫草属[Cordyceps (Fr.) Link]真菌是一大类昆虫病原真菌,迄今记载的已有360多种,在我国分布的有70多种^[1]。冬虫夏草为我国传统的名贵药材,具有很好的强壮滋补功效和多种医疗保健作用。由于其生长环境独特,加之人们盲目挖采,资源已临近枯竭。因此寻找冬虫夏草的替代品以满足市场需求已刻不容缓。九州虫草 *Cordyceps kyushuensis* Kob. 采自山东蒙山,现已通过无性型菌株回接天然寄主获得了人工栽培成功^[2]。根据现有的对该虫草与冬虫夏草的化学成分监测、生物药效、体外抑瘤试验及抗氧化性能研究,表明其具有较高的药用价值,有望替代价格昂贵的冬虫夏草应用于临床^[3,4]。

核苷类物质为虫草属真菌中重要的药用成分之一,具有广泛的生理功能。如改善心脑血管的血液循环、防止心律失常、抑制神经递质的释放和调节腺苷酸环化酶的活性等。虫草素(3'-脱氧腺苷)为含氮配糖体的核酸衍生物,属于嘌呤类生物碱,最先从蛹虫草中提取到的,并且在少数种类的冬虫夏草中存在,具有广谱的抗菌活性,具有抑制肿瘤、抗疟原虫和抑制mRNA翻译的作用。目前对虫草核苷类成分研究多采用TLC和CZE法。但是,TLC只能用作定性分析和半定量分析^[5];CZE则存在准确度不高^[6],大部分成分分离不开等缺点;HPLC法现在已广泛用于样品的定性和定量分析中,它具有分离效果好,准确度高等诸多优势。因此本实验采用HPLC法对九州虫草中核苷类活性成分进行了测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型液相色谱仪(惠普公司);2487 UV 双波长检测器;3K-18 型超速冷冻离心机

(Sigma 公司);KQ-218 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

九州虫草通过无性型菌株回接天然寄主获得,本校生命科学学院菌种室提供,经中国科学院微生物研究所郭英兰确认。冬虫夏草购自西藏自治区药材公司;腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)、2'-脱氧腺苷(2'-dA)和3'-脱氧腺苷(3'-dA)对照品均购自Sigma公司,乙腈及其他试剂均为国产色谱纯。

2 方法与结果

2.1 流动相的选择:根据文献报道^[7],对核苷类成分进行色谱分离时,其流动相为乙腈-水(1:99)洗脱5 min后过渡为乙腈-水(3:97)至洗脱完全。但由于样品中成分的差异,分离效果不好,重叠峰和拖尾现象明显。设计流动相分别采用①乙腈-水(1:99)洗脱5 min后,增加流动相中乙腈的比例最终至乙腈-水(3:97);②乙腈-水(1:99)洗脱5 min后,增加流动相中乙腈的比例最终至乙腈-水(4:96);③乙腈-水(1:99)洗脱5 min后,梯度增加流动相中乙腈的比例最终至乙腈-水(5:95);每次实验重复3次,得出最佳流动相组成。将样品平行配置3份分别在不同条件下进行洗脱,根据色谱图峰形及分离状态表明,乙腈-水(1:99)洗脱5 min后过渡为乙腈-水(4:96)具有较好的分离作用。

2.2 色谱条件:色谱柱:YWG-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),RESTEK Pinnacle ii 型;检测波长:260 nm;体积流量:1.0 mL/min;灵敏度:1.0 AUFS;进样量:5 μL;柱温为室温。

2.3 标准回归方程的建立:精密称取腺苷、鸟苷、尿

收稿日期:2004-12-24

基金项目:山东省科技攻关计划项目(012100104)

作者简介:罗珊珊(1981—),女,河南平顶山人,硕士研究生,主要从事微生物制药方面研究。

*通讯作者 张长铠 Tel: (0531) 86364427 E-mail: ckzhang@sdu.edu.cn

苷、2'-脱氧腺苷、3'-脱氧腺苷各 10 mg 溶于蒸馏水中,定容至 50 mL,分别精密量取 7.5、5、2.5、1.25、0.625 mL 于 10 mL 量瓶中,加水至刻度。将所配制的上述标准品溶液分别进样 5 μ L,在优化条件下进行 HPLC 分离,得 5 种标准品的回归方程。其中 X 代表质量浓度, Y 代表峰面积,线性范围均为 0.025~1.025 mg/mL。

A: $Y=42.27182X-17.05376$, $r=0.9998$;
U: $Y=31.53282X-3.16643$, $r=0.9999$;
G: $Y=30.58996X-14.36780$, $r=0.9998$;
2'-A: $Y=43.44666X-1.73680$, $r=0.9999$;
3'-A: $Y=52.02569X-4.37672$, $r=0.9999$ 。

2.4 供试品溶液的制备:将冬虫夏草子座和九州虫草不同部位(子座、虫体、全草、菌丝体)样品 60 $^{\circ}$ C 烘干至恒重、粉碎、制成样品粗粉。准确称取每种样品粗粉各 3 份,每份 1.00 g,置 80 mL 玻璃管中,加双蒸水 40 mL,常温下浸提 24 h,提取物于 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,将提取物分别蒸发浓缩、冷冻干燥、双蒸水溶解并定容至 10 mL,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.5 溶剂的选择:精密称取 1.00 g 九州虫草子座干粉,分别选择无水乙醇、双蒸水和石油醚作为提取溶剂,按供试品溶液的制备方法操作,将 3 种溶剂提取液分别过 HPLC 柱,结果发现水提取液色谱峰和重现性均最佳,核苷类物质基本提取完全;无水乙醇提取液有洗脱峰出现,但量太小,而石油醚提取液只洗脱出几个杂质峰,几乎无核苷类成分存在。这可能与核苷类物质具有良好的水溶性有关。

2.6 定性分析:分别将标准品、九州虫草和冬虫夏草子座水提取液 5 μ L 进样, HPLC 法分析,每个样品重复 3 次,结果表明谱型图具有很好的重现性,且各组分与标准品的相应成分具有近似的保留时间,因此可以基于组分保留时间的一致性进行定性分析^[8]。结果表明冬虫夏草中含有鸟苷、尿苷、3'-脱氧腺苷;九州虫草中含有腺苷、2'-脱氧腺苷、3'-脱氧腺苷,尿苷和鸟苷。此时通过标准加入法将九州虫草样品中加入 5 种核苷标准品混合物^[9],同样条件下进行 HPLC 检测,进一步验证了上述活性结论。

2.7 精密度和稳定性试验:精密称取九州虫草子座粉末 1.00 g,制备供试品溶液,以 5 μ L 连续进样 5 次,按 3'-脱氧腺苷峰面积计, RSD 为 0.9%。每隔 3 h 连续进样 4 次,结果表明 3'-脱氧腺苷峰面积在 9 h 内稳定, RSD 为 1.8%。

2.8 回收率试验:分别取含 3'-脱氧腺苷 2.415 g

的九州虫草子座 0.5 g (以 3'-脱氧腺苷为检测指标), 3 份,分别加入 3'-脱氧腺苷标准样品 0.25、0.5、0.75 mg,制备供试品溶液,计算得平均回收率 101.5%, RSD 为 3.0%。

2.9 定量分析及不同提取液中核苷比较:利用标准回归方程,根据九州虫草不同部位色谱峰中各组分的峰面积代入各组分对应的回归方程计算,结果见表 1,表明九州虫草子座中所含的核苷类成分最高。

表 1 九州虫草不同部位中核苷类成分

Table 1 Nucleosides in different parts of *C. kyushuensis*

成分	$\omega/(mg \cdot g^{-1})$			
	子座	虫体	全草	菌丝体
A	2.562	1.635	1.985	0.998
U	5.683	2.859	3.069	2.698
G	2.954	1.128	1.289	1.008
2'-dA	2.316	1.039	1.379	1.689
3'-dA	4.829	2.698	3.896	2.089

根据九州虫草和冬虫夏草中各组分的峰面积代入各组分回归方程计算,结果见表 2。可看出,九州虫草子座中 3'-脱氧腺苷明显高于冬虫夏草,而尿苷和鸟苷略高于冬虫夏草。因此通过改善培养条件,九州虫草有望替代价格昂贵的冬虫夏草应用于临床。

表 2 九州虫草和冬虫夏草子座中各核苷类成分

Table 2 Nucleosides in *C. sinensis* and *C. kyushuensis*

成分	$\omega/(mg \cdot g^{-1})$	
	九州虫草	冬虫夏草
A	2.562	0
U	5.683	5.176
G	2.954	2.770
2'-dA	2.316	0
3'-dA	4.829	1.239

3 讨论

本实验采用 HPLC 法检测九州虫草中的核苷类成分,为深入研究九州虫草的药用价值提供有用的数据参考。结果表明该法灵敏度高,定性准确,重复性好,回收率高等优点,是目前成分分析方面首选的技术之一。

本研究通过对溶剂的选择,确定了以双蒸水提取其结果的重现性和准确度最优。本文首次准确地对九州虫草不同部位的核苷类成分进行了定性和定量分析,为进一步开发和利用九州虫草资源提供了理论依据。

References:

- [1] Li Z Z, Huang B, Li C R, et al. Ensuring the molecular biology anamorph evidence of *Cordyceps sinensis* — connection of wool fleece spore and *Cordyceps sinensis* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19 (1): 60-64.
- [2] Guo Y L, Xu L. Studies on cercospora and allied genera in China [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2002, 21 (4): 497-499.
- [3] Ling J Y, Sun Y J, Zhang H, et al. Measurement of adeno-

- sine in stroma of *Cordyceps* sp. by capillary zone electrophoresis (CZE) [J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94 (4): 371-374.
- [4] Zweier J L. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart [J]. *Biol Chem*, 1988, 26 (3): 1353-1357.
- [5] Wang X P, Ma M X, Shuang S M, et al. Determination of druggery in Rhubarb and the content in loop dextrin by TLC [J]. *Anal Chem* (分析化学), 2002, 31 (1): 98-100.
- [6] Ling J Y, Zhang C K, Sun Y J, et al. Study on the nucleotides in *Cordyceps kyuushuensis* [J]. *Anal Chem* (分析化学), 2003, 31 (1): 123-125.
- [7] Liang Q, Davis P A, Thompson B H, et al. High-performance liquid chromatography multiplex detection of two single nucleotide mutations associated with hereditary hemochromatosis [J]. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 2001, 745 (1): 265-270.
- [8] Liu H, Pan G X, Gao X M, et al. Detecting the content of glycoside in Chinese silkvine bark by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (4): 578-579.
- [9] Kvalheim O M, Liang Y Z. Heuristic evolving latent projections: resolving two-way multicomponent data. Part 1. Selectivity, latent projective graph, datascope, local rank and unique resolution [J]. *Anal Chem* (分析化学), 1992, 6 (4): 936-938.

表面活性剂对大黄总蒽醌提取率的影响

韩 刚, 史国友, 孙海燕*, 王炳强*, 安 晋*

(华北煤炭医学院 药理学系, 河北 唐山 063000)

大黄具有清热解毒、抗菌消炎、泻热通便等功效。其主要化学成分为结合和游离的大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚和芦荟大黄素等蒽醌类化合物。游离蒽醌难溶于水, 溶于乙醇、氯仿和乙醚等有机溶剂。结合蒽醌易溶于水和乙醇, 难溶于氯仿和乙醚等有机溶剂。大黄总蒽醌的提取多采用70%~80%乙醇回流提取^[1,2], 但所使用的乙醇体积分数高, 回收耗能高。利用表面活性剂能够提高姜黄中姜黄素提取率^[3], 因此本实验研究了不同表面活性剂对大黄中总蒽醌提取率的影响, 结果表明十二烷基硫酸钠(SDS)可大幅度提高大黄中总蒽醌的提取率。

1 仪器与试剂

AE-240S 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒); THZ-82 气浴恒温振荡器(江苏金坛市医疗仪器厂); TU-1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司)。

1,8-二羟基蒽醌对照品(中国药品生物制品检定所, 供测定用); 表面活性剂为化学纯(浙江黄岩人民化工厂); 其余试剂均为分析纯; 实验用水均为去离子水。大黄饮片购自唐山市药材采购供应站, 批号040306, 经鉴定为掌叶大黄 *Rheum Palmatum* L.。

2 方法与结果

2.1 大黄粉末的制备: 取大黄饮片于烘箱中60℃干燥24 h, 粉碎至全部通过20目筛备用。

2.2 标准曲线的制备: 精密称取干燥后的1,8-二

羟基蒽醌2.5 mg, 置于25 mL量瓶中, 以0.5%醋酸镁甲醇溶液为显色剂定容。分别准确量取该溶液0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL于10 mL量瓶中, 0.5%醋酸镁甲醇溶液定容。以0.5%醋酸镁甲醇溶液为参比, 于510 nm波长下测定吸光度(A)值^[4], 回归得标准曲线 $A = 32.74 C + 0.0135$, $r = 0.9999$, 线性范围为5~25 μg/mL。

2.3 提取方法和提取溶剂的选择: 精密称取大黄粉末0.5 g于比色管中, 准确加入提取溶剂10 mL, 浸泡30 min, 35℃气浴恒温振荡器中振荡30 min, 静置2 min, 迅速用0.45 μm微孔滤膜滤过。准确量取续滤液0.5 mL于具塞试管中, 沸水浴挥去乙醇, 加入1.5 mL蒸馏水, 加入0.5 mL 40%三氯化铁水解20 min, 再加入0.2 mL稀盐酸沸水浴30 min, 水浴蒸干。加水2 mL, 用乙醚萃取3次, 至醚层无色。合并乙醚萃取液, 转入量瓶中, 水浴挥干乙醚, 残渣用0.5%醋酸镁甲醇溶液定容。于510 nm波长下测量A, 按照提取率=总蒽醌质量/药材质量×100%, 计算总蒽醌提取率。见表1。结果显示: 70%乙醇提取率最高。以70%乙醇的提取率为相对标准100%, 选定40%乙醇为提取溶剂, 此工艺条件下总蒽醌提取率相对70%乙醇的提取率为49.2%, 提取率适中, 以便考察表面活性剂对提取率的影响。以40%乙醇为溶剂, 考察加入不同的表面活性剂对总蒽醌提取率的影响。

2.4 表面活性剂的选择: 以40%乙醇为溶剂, 加入

收稿日期: 2004-12-18

作者简介: 韩 刚(1957—), 男, 河北唐山人, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药有效成分提取分离及药物新剂型的研究。

Tel: (0315) 3807977 E-mail: YXXHG@163.com.cn

* 华北煤炭医学院药理学系2000级实习生