

- testinal epithelial cell line, Caco-2 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(12): 1185-1191.
- [4] Zhao X C, Wang G J, Sun B W, *et al.* Changes of expression and functions of dipeptide transporter after anoxia/reoxygenation in Caco-2 cells [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34(1): 74-77.
- [5] Jiang X H, Jia Y T, Yuan Y, *et al.* The application of Caco-2 cell model in drug oral absorption [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(5): 325-327.
- [6] Haber B A, Mohn K L, Diamond R H, *et al.* Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91: 1319-1341.
- [7] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175(3): 880-885.
- [8] Earvin L, John P, Mehran Y. Mechanisms of transport and structure-permeability relationship of sulfasalazine and its analogs in Caco-2 cell monolayers [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(10): 1168-1174.
- [9] Satio H, Inui K I. Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestine cell line Caco-2 [J]. *Am J Physiol*, 1993, 265: 289-293.

## 圆背角无齿蚌中抗肿瘤活性组分的提取工艺研究

柯乾坤<sup>1</sup>, 胡水根<sup>1\*</sup>, 刘娟<sup>2</sup>, 陈正伟<sup>2</sup>, 卞俊<sup>1</sup>, 王朝武<sup>1</sup>, 蔡定国<sup>1</sup>

(1. 解放军第四一医院 南京军区药学专科中心, 上海 200434; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

**摘要:**目的 优选圆背角无齿蚌中有效组分的最佳提取工艺。方法 选用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,以水提次数、醇沉体积分数、盐溶的氯化钠质量浓度为因素进行比较,对影响圆背角无齿蚌中有效组分的提取工艺进行优选。采用硫酸-苯酚法和凯氏定氮法测定含糖量和含氮量。以综合加权评分法比较实验结果。结果 最佳提取工艺为在4℃以下用4倍蒸馏水量,提取1次,醇沉时的乙醇体积分数为70%,盐析的氯化钠溶液质量浓度为8%。结论 优选的圆背角无齿蚌中有效组分的提取工艺可行。

**关键词:**圆背角无齿蚌;正交试验;硫酸-苯酚法;凯氏定氮法

**中图分类号:**R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)06-0839-03

### Extraction techniques of antitumor effective constituent from *Woodiana anatonata*

KE Qian-kun<sup>1</sup>, HU Shui-gen<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>2</sup>, CHEN Zheng-wei<sup>2</sup>, BIAN jun<sup>1</sup>,  
WANG Chao-wu<sup>1</sup>, CAI Ding-guo<sup>1</sup>

(1. Research Center of Pharmacy, 411 Hospital of PLA, Shanghai 200434, China; 2. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

**Abstract: Objective** To optimize the extraction of effective constituent from *Woodiana anatonata*. **Methods** L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) Orthogonal test was used with three factors, including times of water extracting, concentration of ethanol precipitation, and concentration of sodium chloride. The contents of polysaccharides and glycoprotein was determined by sulphoacid-phenol and testing nitrogen. The test results were compared by comprehensire weighted score. **Results** The optimum technology was: once of water extraction by four-fold amount of distilled water at 4℃, the concentration of sodium chloride to 8%, the concentration of ethanol precipitation to 70%. **Conclusion** The optimal extraction method for effective constituents in *W. anatonata* is feasible.

**Key words:** *Woodiana anatonata* Lea; orthogonal test; sulphoacid-phenol method; method of testing nitrogen

本课题组对贝壳软体动物进行抗肿瘤作用筛选发现圆背角无齿蚌 *Woodiana anatonata* Lea 和海洋蛤具有类似的抗肿瘤活性<sup>[1,2]</sup>。因此对圆背角无齿蚌抗肿瘤活性组分进行了提取分离,得到抗肿瘤活性

成分的有效组分<sup>[3]</sup>。进一步的药理实验表明圆背角无齿蚌抗肿瘤活性组分的脂质体口服给药对4种瘤株显示较强的抗瘤作用,同时具有一定的免疫功能。为了给圆背角无齿蚌抗肿瘤活性组分临床前研究提

收稿日期:2005-10-20

基金项目:上海市科委重点基金项目(03DZ19504)

作者简介:柯乾坤(1974—),男,硕士,从事新药研究与开发。Tel:(021)65927686 E-mail:kekun@163.com

\* 通讯作者 胡水根

供参考,本实验对提取工艺进行了进一步研究。

1 材料与仪器

圆背角无齿蚌购自上海郊区青浦的朱家角镇,经上海市自然博物馆鉴定。DS200 型组织捣碎机(上海标本模型厂),LXJ—Ⅰ离心沉淀机(上海医用分析仪器厂),FD—1 型冷冻干燥机(北京博医康技术公司),88—Ⅰ型膜过滤器,UV—754 型紫外光度计(上海第三分析仪器厂)FA1640S 型电子天平(上海天平仪器厂)、R—201 型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 试验操作:取圆背角无齿蚌 4 kg 匀浆,在 4 ℃ 以下用蒸馏水提取一定次数,提取液离心沉淀,所得上清液用一定体积分数乙醇醇沉,得到的沉淀物用 4 倍量的一定质量浓度的氯化钠溶液提取,提取液离心沉淀,所得上清液超滤浓缩,冷冻干燥后得到有效组分 HB。

2.2 因素水平的确定:在该提取工艺进行了初步研究<sup>[3]</sup>的基础上,本实验对水提次数(A)、醇沉的乙醇体积分数(B)、氯化钠质量浓度(C)作为因素进行考察,因素水平见表 1。

表 1 因素与水平  
Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A/次	B/%	C/%
1	1	60	4
2	2	70	8
3	3	80	12

2.3 HB 含氮量的测定:采用凯氏定氮法测定。取 HB 冷冻干燥粉末适量约 30 mg,精密测定,置干燥的 50 mL 凯氏烧瓶中,加硫酸钾粉末 0.3 g 和 30% 硫酸铜 5 滴,再沿瓶壁滴加 2.0 mL 浓硫酸,在凯氏烧瓶上放一漏斗,并使烧瓶成 45°斜置,用小火缓缓加热使溶液保持在沸点以下,等泡沸停止,逐步加大火力,沸腾至溶液成澄清的绿色后,继续加热 10 min,放冷,加水 2 mL。取 2% 硼酸 10 mL,置 100 mL 锥形瓶中,加甲基红-溴甲酚绿混合指示剂 5 滴,将冷凝管尖端插入液面以下,然后将凯氏烧瓶中内容物经漏斗转入蒸馏瓶中,用水少量淋洗凯氏烧瓶及漏斗数次,再加入 40% NaOH 溶液 10 mL,用少量水再洗漏斗数次后用橡皮管夹紧,加热使圆底烧瓶进行蒸汽蒸馏,至硼酸溶液开始由酒红色变为蓝绿色起,继续蒸馏约 10 min 起,将冷凝管尖端提出液面,用蒸汽继续冲洗约 1 min 后,用水淋洗尖端后停止蒸馏。馏出液用 5.136 mmol/L 硫酸标定液

滴定至溶液由蓝绿色变为灰紫色,并将滴定结果用空白实验校正。

2.4 HB 中多糖的测定:采用硫酸-苯酚法测定<sup>[4]</sup>。

2.4.1 标准曲线的制备:准确称取葡萄糖 32.25 mg 置于 500 mL 量瓶中,加水至刻度。分别吸取葡萄糖溶液 0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6 mL,各以水补至 4.0 mL,然后加入 2.0 mL 6% 苯酚和 10.0 mL 浓硫酸,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min 以后于 490 nm 波长处测定吸光度值。同时以 4.0 mL 水同样操作为空白。以质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,经线性回归,得回归方程  $Y = 0.1807 X + 0.0217, r = 0.9998$ 。

2.4.2 样品测定:取 HB 有效组分约 10 mg 溶于 10 mL 4 mol/L 三氟乙酸中,于 100 ℃ 水解 24 h,减压蒸干,加甲醇溶解、蒸干,反复多次,直至三氟乙酸除尽,加蒸馏水定容至 100 mL。精取水解液 2.5 mL 定容至 25 mL。分别取样品液 1.0、2.0、3.0 mL,补水至 4 mL,然后加入 6% 苯酚 2.0 mL 和浓硫酸 10.0 mL,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min 后于 490 nm 测定吸光度值。将数值带入回归方程计算多糖的质量分数。

2.5 结果分析:以收率、含糖量和含氮量作为考察指标,将权重系数定为 3 : 3 : 1,得到综合评分,见表 2。方差分析见表 3。

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

试验号	A	B	C	收率/ g	含糖量/ %	含氮量/ %	综合 评分
1	1	1	3	18	52.17	9.18	73.23
2	2	1	1	23	49.10	10.18	75.49
3	3	1	2	20	48.12	8.58	70.98
4	1	2	2	22	53.62	11.59	79.48
5	2	2	3	20	42.35	11.76	66.27
6	3	2	1	26	51.08	13.70	81.65
7	1	3	1	19	38.26	11.84	61.21
8	2	3	2	21	53.51	18.25	80.59
9	3	3	3	22	48.50	10.11	73.87
K <sub>1</sub>	213.92	219.70	218.35				
K <sub>2</sub>	222.35	227.40	231.05				
K <sub>3</sub>	226.50	215.67	213.37				
R	12.58	11.73	17.68				

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	27.39	2	13.69	0.11	无
B	23.68	2	11.84	0.09	无
C	55.41	2	27.70	0.21	无
误差	259.63	2	129.813		

$F_{0.05}(2,2) = 19.00$

2.6 验证试验:4 kg 圆背角无齿蚌匀浆,在 4 ℃ 以下用 4 倍蒸馏水提取 1 次,醇沉时乙醇体积分数为 70%,盐析的氯化钠溶液质量浓度为 8%,进行了批样品验证,结果收率分别为 0.5%、0.6%、0.575%,含糖量分别为 42.84%、45.23%、43.56%。

### 3 讨论与结论

采用综合加权评分法的分析方法进行评估,进行方差分析得到结果。可以看出不同水平的水提次数、醇沉体积分数、盐析的氯化钠质量浓度对测定结果影响都不显著。多次提取可以提高收率,但影响不很显著,工时大为延长,效率不高,选择水提 1 次。盐析的氯化钠溶液质量浓度较低时,提取的有效组分外观、质量较好。通过对数据的直观分析,水提 1 次,

醇沉的乙醇体积分数为 70%,盐析的氯化钠质量浓度为 8%,综合分较高,因此作为最佳工艺。

### References:

- [1] Du L X, Yan H F, Hu S G, et al. Studies on antineoplastic activity of HB fraction [J]. *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 1993, 12(1): 10-12.
- [2] Hu S G, Zhu G P, Wu P P, et al. Studies on antitumor effective constituent of *Woodiana anodonta* Lea I. Analysis and characterization of glycoprotein HB- I [J]. *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 1997, 6(1): 23-25.
- [3] Hu S G, Wang Y, Zhu G P, et al. Studies on anti-tumor effective constituent of *Anodonta woodiana* Lea I. Isolation and purification of glycoprotein HB- I [J]. *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 1997, 16(2): 19-21.
- [4] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999.

## HPLC 法测定灵丹草软胶囊中臭灵丹酸

梅之南,杨建科<sup>2</sup>,李效宽<sup>1</sup>,李芸芳<sup>1</sup>

(1. 中南民族大学民族药物研究所,湖北 武汉 430074; 2. 湖北南洋药业有限公司,湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 建立 HPLC 法测定灵丹草软胶囊中臭灵丹酸的方法。方法 采用 Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相:乙腈-水(60:40), 检测波长:210 nm, 体积流量:1.0 mL/min, 柱温:25 ℃。结果 臭灵丹酸线性范围为 12.91~129.1 μg/mL ( $r=0.9999$ ), 平均回收率为 99.7%, RSD 为 2.0%。结论 该测定方法简便快捷、精密度高、准确性好, 可以作为灵丹草软胶囊的定量测定方法, 以控制其质量。

**关键词:**灵丹草软胶囊;臭灵丹酸;高效液相色谱

**中图分类号:**R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)06-0841-03

### Determination of pterodonic acid in Lingdancao Soft Capsula by HPLC

MEI Zhi-nan, YANG Jian-ke, LI Xiao-kuan, LI Yun-fang

(1. Institute of Ethic Medicine, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; 2. Hubei South Ocean Pharmaceutical Co., Ltd., Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for determination of pterodonic acid in Lingdancao Soft Capsula. **Methods** Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile-water (60:40) was used as mobile phase, the detection wavelength was 210 nm, flow rate was 1.0 mL/min, and column temperature was at 25 ℃. **Results** The linear range of pterodonic acid was 12.91—129.1 μg/mL ( $r=0.9999$ ), the average recovery rate of pterodonic acid was 99.7%, RSD was 2.0%. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reliable, and it can be used to the quality control of this preparation effectively as a quantitative method.

**Key words:** Lingdancao Soft Capsula; pterodonic acid; HPLC

灵丹草为菊科植物臭灵丹 *Laggera pterodonta* (DC.) Benth. 的干燥地上部分,具有疏风、解毒利咽、止咳祛痰的作用。《滇南本草》记载其有“治风热

积毒、痈疽、疮疖、疥癣、白风癣疮”等功效。灵丹草已上市的剂型有颗粒剂<sup>[1]</sup>、胶囊剂和片剂,其工艺技术特点是将处方中的药材提取挥发油后,滤液浓缩成

收稿日期:2006-10-15

作者简介:梅之南(1970—),男,博士,副教授,主要从事新药的研究与开发。

Tel: (027)67843237 Fax: (027)67843220 E-mail: imm-scuec@mail.scuec.edu.cn

# 圆背角无齿蚌中抗肿瘤活性组分的提取工艺研究

作者: 柯乾坤, 胡水根, 刘娟, 陈正伟, 卞俊, 王朝武, 蔡定国, KE Qian-kun, HU Shui-gen, LIU Juan, CHEN Zheng-wei, BIAN jun, WANG Chao-wu, CAI Ding-guo  
作者单位: 柯乾坤, 胡水根, 卞俊, 王朝武, 蔡定国, KE Qian-kun, HU Shui-gen, BIAN jun, WANG Chao-wu, CAI Ding-guo(解放军第四一一医院, 南京军区药学专科中心, 上海, 200434), 刘娟, 陈正伟, LIU Juan, CHEN Zheng-wei(江西中医学院, 江西, 南昌, 330006)  
刊名: 中草药 **ISTIC PKU**  
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS  
年, 卷(期): 2007, 38(6)  
被引用次数: 1次

## 参考文献(4条)

1. Du L X;Yan H F;Hu S G Studies on antineoplastic activity of HB fraction 1993(01)
2. Hu S G;Zhu G P;Wu P P Studies on antitumor effective constituent of Woodiana anodonta Lea I. Analysis and characterization of glycoprotein HB-II 1997(01)
3. Hu S G;Wang Y;Zhu G P Studies on anti-tumor effective constituent of Anodonta woodiana Lea II. Isolation and purification of glycoprotein HB-I 1997(02)
4. Zhang W J 糖复合物生化研究技术 1999

## 本文读者也读过(8条)

1. 牛江梅 微波消解-凯氏定氮法测定食品中蛋白质的方法研究[期刊论文]-实用预防医学2003, 10(5)
2. 唐波, 蒋伟, 许陆贵, 杨锡成 微波消解-分光光度法测定食品中蛋白质[期刊论文]-现代预防医学2004, 31(2)
3. 王永根, 王剑波, 陈淑莎, 沈永伟, Wang Yong-gen, Wang Jian-bo, Chen Shu-sha, Shen Yong-wei 微波消解-乙酰丙酮甲酯分光光度法测定食品中蛋白质[期刊论文]-中国卫生检验杂志2007, 17(2)
4. 姜明, 杨晓莹, 于雅楠, 刘莉莉 黑木耳加工品的理化检测与分析[期刊论文]-工会博览·理论研究2009(8)
5. 王坤, 吴伶俐, 高向阳, 宫安晶, WANG Kun, WU Ling-li, GAO Xiang-yang, GONG An-jing 微波消解-浓度直读法快速测定食品中的蛋白质[期刊论文]-食品科学2008, 29(9)
6. 不同蛋白酶解猪血红蛋白效果比较研究[期刊论文]-安徽农学通报2009, 15(22)
7. 商军, 沈富林, 王蓓, 蒋音 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定饲料中铜铁锌锰含量[期刊论文]-中国饲料 2003(13)
8. 冯敬晶 2200型半自动凯氏定氮仪测定饲料中粗蛋白的方法与注意事项[期刊论文]-养殖技术顾问2009(10)

## 引证文献(1条)

1. 韩琳, 胡水根, 柯乾坤, 马一明 圆背角无齿蚌抗肿瘤单一成分HB-I 中糖的成分分析[期刊论文]-药学服务与研究 2007(4)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zcy200706016.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200706016.aspx)