

由于冬虫夏草为我国高原特产, 每年出口量极大。据报道, 2006 年上半年, 中药材和饮片累计出口 1. 80 亿美元, 其中冬虫夏草占中国大陆出口总值的 90%。故在冬虫夏草药材出口前, 应考察进口国对药材的重金属残留的限度要求。在对药材的砷元素的限度规定中, WHO、FDA、香港是以每日(周)最大摄入量(含来源于其他食品或药品的摄入)计算的, 而加拿大、新加坡、泰国和韩国的标准均不同程度地低于我国药用植物及制剂绿色行业标准的要求, 但欧盟的标准最为严格。即使采用限度最为宽松的加拿大标准, 仍有 7 批来自青海的药材不符合规定。

鉴于本实验中多数天然冬虫夏草的砷量超过《中国药典》和欧盟的标准规定, 笔者认为: (1) 有必要对

出口的天然冬虫夏草药材加强砷元素量的检查(尤其是出口到欧洲国家)以避免由于砷元素量过高影响出口而造成的不良影响和经济损失。在天然冬虫夏草的使用中也应注意避免砷量超标对人体所造成的不良影响。(2) 有必要开展对冬虫夏草产区土壤和植被的重金属研究, 以确定冬虫夏草药材含砷量高的机制。(3) 有必要探讨冬虫夏草中微量砷元素的实际存在状态(有机与无机), 及对体内代谢的作用与影响。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 韩国草药典[S]. (四). 2002.
- [3] 石岩, 王钢力, 林瑞超. 近红外技术测定冬虫夏草中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2007(1): 90.
- [4] 《中国药典》[S]. 二部. 附录IX B. 2005.

HPLC 法测定云南红豆杉细胞悬浮培养中 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ

郭玉婷¹, 张臻², 张经硕¹, 王剑文^{1*}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 测定经寡聚半乳糖醛酸(oligogalacturonic acid, OGA)诱导的云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* 细胞悬浮培养物中 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-deacetyl baccatin III, 10-DAB III) 的量。方法 采用不同质量浓度的 OGA 处理云南红豆杉悬浮培养细胞, 通过 RP-HPLC 法测定细胞和培养液中的 10-DAB III 的量, 甲醇-乙腈-水(2:3:8)为流动相, 检测波长为 232 nm。结果 10-DAB III 在 0.05~2.06 μg 与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y = 89.146X + 27.067$ ($R^2 = 0.9996$), 细胞内、外样品平均回收率分别为 94.96%、100.72%, RSD 分别为 0.44%、0.81%。OGA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可显著提高云南红豆杉细胞中 10-DAB III 的量。结论 10-DAB III 的 RP-HPLC 方法可靠简便、重现性好、灵敏度高, 具有较高的实用价值, 可用于对红豆杉细胞诱导培养研究中的分析, OGA 是 10-DAB III 细胞生产的有效诱导子。

关键词: 云南红豆杉; 细胞培养; 寡聚半乳糖醛酸; 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ; HPLC

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0118-03

云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 株数或蓄积量都占云南 3 种红豆杉的 99.6% 以上^[1], 其中紫杉醇和 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ的量高于同属其他植物^[2]。10-DAB III 是红豆杉中的紫杉烷萜类化合物之一, 不仅自身有抗癌活性, 且可作为紫杉醇及其类似物的合成前体, 其天然储量比紫杉醇高数十倍, 利用 10-DAB III 可合成比紫杉醇抗癌活性更高的 taxotere^[3], 因此对 10-DAB III 的开发利用具有更广泛的前景。近年来, 细胞培养技术已成为红豆杉研究的重要手段, 通过细胞培养^[4]、诱导技术^[5]、前体饲喂^[6]、生物反应器^[7]等各种生物技术来

生产紫杉醇, 已取得了许多进展。本实验利用 RP-HPLC 法测定 OGA 诱导云南红豆杉细胞悬浮培养物中 10-DAB III 的量, 为通过云南红豆杉细胞培养生产 10-DAB III 提供调控手段和依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 型高效液相色谱系统, 自动液相色谱分离色谱仪(上海琪特分析仪器有限公司), Sk3300H 型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司), 电子分析天平(Sartorius), 冷冻干燥机(上海市离心机械研究所), 单层摇床(太仓市实验设备厂)。

10-DAB III 对照品(上海同田生化技术有限公

* 收稿日期: 2007-03-20

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(05KJB360120); 苏州大学医学发展基金项目(EE132514)

作者简介: 郭玉婷(1982—), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。

* 通讯作者 王剑文 Tel: (0512) 65880025 E-mail: jw wang@suda.edu.cn

司,质量分数>98%), Sephadex G-10(Pharmacia, $M_w > 700$), 多聚半乳糖醛酸(Fluka), 果胶酶(Fluka), 甲醇(色谱纯、分析纯)、乙腈(色谱纯), 三蒸水, 环己烷、二氯甲烷、冰醋酸均为分析纯。实验用的细胞株由本院生物制药研究室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为Restek C₁₈柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水(2:3:8), 检测波长为232 nm, 体积流量为0.2 mL/min, 柱温为35 °C, 进样量为10 μL。

2.2 红豆杉细胞的培养及处理

2.2.1 细胞的培养: 研究用的细胞系是经多次继代培养的云南红豆杉细胞株。在改良的MS固体培养基[含蔗糖20 g/L、萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 0.08 mg/L、6-苄基嘌呤(6-BA) 0.5 mg/L]上继代培养, 每25天接种一次。将生长良好的细胞3 g转入含30 mL MS液体培养的150 mL三角瓶中, 25 °C、110 r/min 黑暗振荡培养。

2.2.2 诱导子的制备: 诱导子的制备参照Hu等方法^[8], 略修改。多聚半乳糖醛酸经果胶酶室温下裂解20 min, 滤过, 浓缩后冻干成粗OGA粉末。将OGA粉末配成1 g/L溶液, 经Sephadex G-10柱处理滤除 $M_w < 700$ 的寡聚物, 所得溶液浓缩后用0.45 μm微孔滤膜滤过除菌, 作为OGA诱导子备用, 测定糖终质量浓度为285.53 μg/mL。

2.2.3 红豆杉细胞的诱导处理: 本实验将培养的云南红豆杉细胞分成对照组及处理组, 处理组设4种不同诱导子质量浓度, 分别为20、40、60、80 μg/mL, 对照组加入同量双蒸水。每种处理4瓶, 共4个重复。细胞培养至第17天加入OGA, 继续培养至第24天收获。

2.3 溶液的配制

2.3.1 10-DAB III的提取: 细胞培养液抽滤, 取滤液8 mL, 加入10 mL 二氯甲烷超声振荡后静置8 h, 收集二氯甲烷相, 上相再重复提取2次, 合并二氯甲烷相, 于室温下风干。用1 mL 甲醇(色谱纯)溶解, 过0.45 μm滤膜, 作为胞外供试品待测。

将抽滤所得的细胞冷冻干燥, 取100 mg干细胞, 于研钵中研磨成粉末状; 加入20 mL 环己烷研磨, 转至离心管中静置, 弃去环己烷相, 向沉淀中加入甲醇和二氯甲烷各10 mL, 低温下超声振荡萃取30 min; 加入20 mL 蒸馏水充分混匀后静置10 h; 收集二氯甲烷相, 水相加入10 mL 二氯甲烷再重复萃取2次; 将3次收集的二氯甲烷相室温下风干, 用1

mL 甲醇(色谱纯)溶解, 过0.45 μm滤膜, 作为胞内供试品待测。

2.3.2 对照品储备液的制备: 精密称取10-DAB III对照品, 配制成1.03 mg/mL对照品储备液。

2.4 方法的专属性: 在拟定的色谱条件下, 分别取对照品溶液及供试品溶液进样测定, 得到特征峰, 出峰时间为6.490 min, 与杂质分离良好, 无干扰, 见图1。

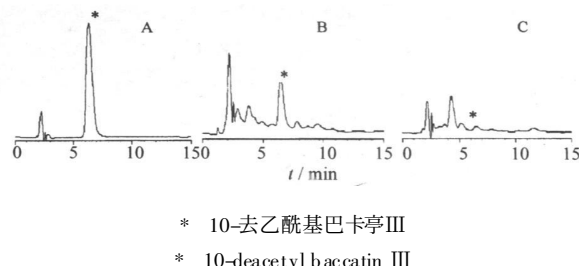


图1 10-DAB III对照品(A)、红豆杉细胞提取物(B)和细胞外液提取物(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of 10-DAB III reference substance (A), intracellular (B), and extracellular (C) extract of *T. yunnanensis* cell suspension cultures

2.5 标准曲线与线性范围: 精密吸取对照品储备液, 依次稀释成5.15、10.3、20.6、51.5、103、206 μg/mL溶液, 用0.45 μm微孔滤膜滤过, 进样量为10 μL, 每一质量浓度进3次。以10-DAB III质量浓度对峰面积进行回归, 得标准曲线方程: $Y = 89.146 X + 27.067$, $R^2 = 0.9996$ 。结果表明, 10-DAB III在0.0515~2.06 μg与峰面积线性关系良好。

2.6 精密度试验: 取51.5 μg/mL对照品溶液, 重复进样6次, 每次10 μL, 测定峰面积值, 结果10-DAB III峰面积积分值的RSD为1.31% ($n = 6$), 表明仪器精密度高。

2.7 稳定性试验: 精密吸取同一份供试液, 间隔3 h进样1次, 每次进样10 μL, 重复6次, 测定峰面积值, 结果细胞内、外样品RSD分别为1.43%、0.64%。表明供试品溶液在15 h内稳定。

2.8 重现性试验: 任选同一组细胞培养物(本实验选处理2组)按照2.4项方法平行制备4份供试品(细胞内+细胞外), 依法测定, 计算, 结果细胞内、外样品中10-DAB III质量分数的RSD分别为1.58%、1.52%。

2.9 加样回收率试验: 按2.3.1项平行制备供试品溶液4份, 各取100 μL, 分别加入甲醇100 μL、10-DAB III对照品10 μL(细胞内样品加10-DAB III对照品51.5 μg/mL、细胞外样品加20.6 μg/mL), 混匀, 进样测定, 结果细胞内、外供试品平均回收率分

别为 94. 96%、100. 72%, RSD 分别为 0. 44%、0. 81% ($n= 6$)。

2. 10 样品测定: 每组细胞培养物按 2. 3. 1 项方法制备供试品溶液, 依法进样测定, 每个样品进样 2 次, 取平均值, 并计算 10-DAB III 的量, 结果见表 1。

表 1 OGA 诱导红豆杉细胞培养中 10-DAB III 的测定结果($n= 4$, $\alpha= 0. 05$)

Table 1 Determination of 10-DAB III in *T. yunnanensis* cell suspension induced by OGA

OGA 诱导子浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10-DAB III 质量分数	
	细胞内/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	培养液中/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	0.052±0.001	0.092±0.039
20	0.143±0.011	0.151±0.055
40	0.178±0.026	0.275±0.059
60	0.139±0.022	0.179±0.027
80	0.154±0.015	0.219±0.048

3 讨论

3. 1 本实验建立了 HPLC 测定云南红豆杉细胞悬浮培养物(细胞及胞外液)中 10-DAB III 量的方法。将 10-DAB III 对照品的甲醇溶液在 200~400 nm 内扫描, 结果在 232 nm 处有最大吸收, 故选 232 nm 为检测波长。同时, 分别采用不同流动相组成: 甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水, 以及各流动相不同配比等多种条件下进行洗脱, 考察各种流动相对细胞培养物供试品中 10-DAB III 分离度的影响, 结果发现以甲醇-乙腈-水(2:3:8)为流动相等度洗脱下, 10-DAB III 得到良好的分离, 见图 1。本操作简便可靠、重现性好、灵敏度高, 对红豆杉细胞大规模生产

具有实用价值, 此方法的建立将为云南红豆杉细胞生产 10-DAB III 开发研究提供依据。

3. 2 诱导作用: OGA 为果胶的不完全酶解产物, 其单体半乳糖醛酸是组成植物细胞壁中果胶质的主要成分, 参与细胞壁复杂网架的形成。以 OGA 为诱导物, 可促进人参细胞中人参皂苷的合成^[8], 但未见其对红豆杉属植物和紫杉烷类合成诱导作用的报道。本实验测定结果可见, OGA 可显著提高云南红豆杉细胞中 10-DAB III 的量, 其中 OGA 为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时诱导效果较优, 关于 OGA 对 10-DAB III 等紫杉烷类化合物生物合成的诱导作用机制有待进一步探讨。

参考文献:

[1] 王达明, 杨德军, 邱琼, 等. 云南红豆杉短穗条扦插育苗试验 [J]. 云南林业科技, 2002(2): 15-19.
[2] 王达明, 周云, 李莲芳. 紫杉醇药物的发展态势与云南省的红豆杉资源 [J]. 西部林业科学, 2005, 34(2): 38-42.
[3] Bissery M C, Guenad D, Voegelin G, et al. Experimental antitumor activity of taxotere, a taxol analogue [J]. Cancer Res, 1991, 51(18): 4845-4852.
[4] 胡益明, 甘烦远, 鲁春华, 等. 利用云南红豆杉悬浮细胞生产紫杉醇和紫杉烷类化合物(英文) [J]. 植物学报, 2003, 45(3): 373-378.
[5] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Biochem Eng J, 2004, 19: 259-265.
[6] 周忠强, 梅兴国. 前体饲喂对细胞培养生产紫杉烷的促进作用(英文) [J]. 林产化学与工业, 2005, 25(3): 51-54.
[7] Wang Z Y, Zhong J J. Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors [J]. Biotech Lett, 2002, 24: 445-448.
[8] Hu X Y, Neill S, Cai W M, et al. Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension cultured cells of *Panax ginseng* [J]. Physiol Planta, 2003, 118: 414-421.

葎草叶总黄酮的测定及最佳采收期研究

陈伟光, 盛静*

(嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 建立葎草叶总黄酮的测定方法, 并考察总黄酮的量随葎草不同采摘时间的动态变化。方法 通过单因素试验、正交试验, 考察乙醇体积分数、料液比、提取时间对提取液中总黄酮量的影响, 确定最佳提取条件, 然后在该条件下对不同时间采收的葎草叶进行总黄酮提取并进行定量测定。结果 所考察的因素中, 葎草总黄酮的超声提取工艺各因素影响程度为: 乙醇体积分数> 提取时间> 料液比; 最佳水平搭配为: A₂B₃C₃。不同时间采收的葎草中总黄酮的量有明显变化。结论 葎草中黄酮类成分提取的最佳工艺为 75% 乙醇, 料液比 1:60, 超声提取 50 min。葎草总黄酮的量与采摘时间密切相关, 以 8 月采收量最高。

关键词: 葎草; 总黄酮; 正交设计

中图分类号: R 282. 6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)01-0120-03

收稿日期: 2007-03-15
基金项目: 嘉兴市科技局科研基金资助项目(2005A Y 3042)
作者简介: 陈伟光(1952—), 男, 副教授, 研究方向为天然药物化学成分的提取分离和定量分析。 Tel: (0573) 82259796
E-mail: jx weiguang@ 126. com