



表 3 全程加样回收率结果

提取物 样品重量	样品中丹 参酮 II <sub>A</sub> 含量 /mg	加入丹参 酮 II <sub>A</sub> 量 /mg	实测量 /mg	加样回 收率 %	平均加 样回收 率 %	RSD %
13.7	1.1889	1.3	2.545	104.32		
12.1	1.0501	1.3	2.349	99.92		
11.8	1.0241	1.3	2.369	103.45	102.23	2.09
12.7	1.1022	1.3	2.394	99.37		
12.4	1.0761	1.3	2.429	104.07		

表 4 滇丹参 SFE-CO<sub>2</sub> 提取物含量测定结果

批号	取样量 /g	丹参酮 II <sub>A</sub> 含量 %	$\bar{X}$ %	RSD %
1	0.2080	7.32		
2	0.2162	7.31		
3	0.1918	8.26	7.64	5.11
4	0.2085	7.74		
5	0.2255	7.57		

表 5 滇丹参常规提取物含量测定结果

批号	取样量 /g	丹参酮 II <sub>A</sub> 含量 %	$\bar{X}$ %	RSD %
1	0.1983	1.02		
2	0.2034	1.36		
3	0.2145	1.26	1.17	12.56
4	0.1980	1.03		
5	0.2037	1.18		

### 3 讨论

3.1 由于提取物取样量增大,为了考察索氏提取最佳提取时间,考察了 4、5、6 h 的提取效果,结果 5 h 内丹参酮 II<sub>A</sub> 已提取较为完全,因此选择 5 h 作为提取时间。

3.2 通过摸索,甲醇-水(80:20),流速在 1.2 mL/min 条件下,丹参酮 II<sub>A</sub> 出峰时间约在 9 min,适宜样品测定要求。

3.3 通过对常规和 SFE-CO<sub>2</sub> 提取物在同一流动相下的流出组分比较,可以看出两者中的化学组分几乎相同,即在此流动相下它们的化学组成无差别,这可能是超临界提取时加入乙醇作夹带剂,导致此结果。

3.4 由于本实验中提取物在浓缩、干燥时间相对较长,影响因素较多,而丹参酮 II<sub>A</sub> 稳定性差,导致相同质量药材、相同提取条件下的 5 批提取物丹参酮 II<sub>A</sub> 含量差异增大;通过二者提取物中丹参酮 II<sub>A</sub> 含量的比较看出, SFE-CO<sub>2</sub> 提取物比常规提取物高出 6.47%。

3.5 在索氏提取后,装有 SFE-CO<sub>2</sub> 提取物的滤纸袋较常规提取物纸袋干净,且无暗红色片状不溶物残留,纯度相对较高。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典(二部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 52
- [2] 中国药典委员会. 中国药典(一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 518-519
- [3] 侯安国, 梁晓原, 李树帆, 等. 正交实验优选复方丹参片 95% 醇提工艺研究 [J]. 云南中医学院学报(增刊), 2000 23: 31-33

## 滇重楼种子中氨基酸和元素的分析测定

杨永红<sup>1,2</sup>, 戴丽君<sup>1</sup>, 严君<sup>1</sup>, 杨昌红<sup>2</sup>, 马青<sup>2</sup>, 周朝训<sup>2</sup>, 王明辉<sup>3</sup>

(1. 云南农业大学 教育部农业生物多样性和病虫害防治重点实验室 云南省植物病理重点实验室 植物保护学院 云南昆明 650201; 2. 云南白药集团股份有限公司; 3. 中国科学院昆明植物研究所)

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2009)02-0039-03

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 是延龄草科 (*Trilliaceae*) 重楼属 (*Paris* L.) 植物, 分布于云南、贵州等, 生长在海拔 1400-3100 m 的常绿阔叶林、云南松林、竹林、灌丛或草坡中, 根茎入药, 有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效, 用于疗肿痛、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐等<sup>[1]</sup>。滇重楼作为中药材, 其药用在我国有着悠久的历史, 是云南白药、宫血宁、夺命丹等一

些重要中成药和新药的主要原料之一<sup>[2]</sup>。

滇重楼是云南省地道稀缺贵重药材, 随着中医药产业的快速发展, 以滇重楼为原料的生产企业大幅度增加, 种植力度也在加大, 据不完全统计, 近 10 年来云南省重楼的驯化栽培面积累计达 40-66.67 hm<sup>2</sup>。其中, 云南白药集团中药材优质种源繁育有限责任公司种植面积占 50% 以上。人们对滇重楼栽培进行许多研究, 主要集中在种子繁殖、组织培养、切块繁殖等方面。由于滇重楼种子有二次休眠的特性, 打破休眠直至萌发需要较长时间, 因此利用种子繁殖, 技术复杂、生长周期长; 根据我们大量的实验结果发现, 从种子采收到胚根最早萌发最快需要 2 个月, 但到长出第一枚真叶需约 18 个月, 为了探明制约种子萌发的物质基础, 我们对种子在储藏过程中内涵物质进行了动态监测。笔者等对不同储藏年

收稿日期: 2008-10-20

基金项目: 工业和信息化部消费品工业司资助(2008年度中药材扶持资金项目)

作者简介: 杨永红(1965-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源、中药栽培及其病虫害防治研究。Tel 13700656671,

Email yyh831994@yahoo.com.cn

份滇重楼氨基酸和元素等含量进行了测定,以期为探明其种子萌发的物质基础提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

滇重楼种子,2006年10月和2007年10月分别采自云南白药集团优质种源种植基地。

### 1.2 仪器与方法

**1.2.1 氨基酸分析** 仪器: H IACH 830-50型氨基酸自动分析仪。分析方法: GB/T 5009.124-2003 样品处理方法: 精确称取样品 30 mg 置于安瓿中,加 6 N HCl 溶液 10 mL 封口,于 105 °C 水解 23 h,用碱中和,并用缓冲液调节 pH 值为 2.2。移入 50 mL 容量瓶中,用水定容至 50 mL,过滤。精密量取滤液 0.1 mL,加入 0.9 mL 茚三酮溶液 (20 g/L, pH 值 5.2-5.5),煮沸 5-10 min,比色,调整到仪器所需浓度,上机测定。

**1.2.2 元素分析** 仪器: CP-AES 仪。分析方法: CP (电感耦合等离子体发射光谱仪) 直接测定法。样品处理方法: 取样品粉末约 1 g 精密称量,置三角瓶中,加入 10 mL HNO<sub>3</sub> 和 HClO<sub>4</sub> 混合酸,于电热板上消化至干,加入 6 N HCl 5 mL,微热定容至 50 mL,用 CP 法直接测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨基酸的含量

贮藏两年的种子中均未检测到胱氨酸和蛋氨酸;新鲜种子与陈年种子相比,除天门冬氨酸含量低 0.02%,精氨酸含量低 0.23% 外,其余 14 种氨基酸含量都有不同程度升高。氨基酸含量测定结果见表 1。

表 1 滇重楼新鲜和陈年种子中氨基酸含量

氨基酸 %	新鲜种子	陈年干燥种子	备注
天门冬氨酸	0.57	0.55	↓
苏氨酸	0.20	0.31	↑
丝氨酸	0.26	0.35	↑
谷氨酸	1.04	1.58	↑
甘氨酸	0.28	0.40	↑
丙氨酸	0.29	0.43	↑
胱氨酸	未检出	未检出	
缬氨酸	0.33	0.45	↑
蛋氨酸	未检出	未检出	
异亮氨酸	0.27	0.35	↑
亮氨酸	0.44	0.64	↑
酪氨酸	0.18	0.23	↑
苯丙氨酸	0.28	0.45	↑
赖氨酸	0.39	0.52	↑
组氨酸	0.13	0.18	↑
精氨酸	0.68	0.45	↑
脯氨酸	0.22	0.38	↑
氨基酸总量	5.56	7.27	↑

注:“↑”表示含量升高;“↓”表示含量降低。

### 2.2 元素及蛋白质等组分含量变化

与新鲜种子相比较,铁元素含量降低 0.78%,锌含量升高 7.2%,铜含量升高 4.09%,锰含量升高最大为 36.18%,硼含量升高 3.90%,其余元素含量都有不同程度的升高;总糖降 4.69%,蛋白质、粗纤维和淀粉等其余组分的含量都有不同程度的下降。元素及蛋白质等组分的含量测定结果见表 2。

表 2 滇重楼新鲜和陈年种子中元素及蛋白质等组分的含量

项目名称	检测方法	新鲜种子	陈年种子	备注
硫 %	CP	0.085	0.100	↑
磷 %	CP	0.084	0.130	↑
钾 %	CP	0.340	0.350	↑
钙 %	CP	0.070	0.180	↑
镁 %	CP	0.042	0.083	↑
铁 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CP	12.900	12.210	↓
锌 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CP	13.600	20.80	↑
铜 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CP	2.930	7.020	↑
锰 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CP	2.120	39.300	↑
硼 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CP	4.050	7.950	↑
钼 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CP	0.010	0.340	↑
蛋白质 %	GB/T 5009.4	6.600	8.50	↑
总糖 %	GB/T 5009.7	11.450	6.760	↓
粗脂肪 %	GB/T 5009.6	7.500	7.470	↓
灰粉 %	GB/T 5009.4	1.240	7.700	↑
粗纤维 %	GB/T 10469	5.320	9.170	↑
淀粉 %	GB/T 5009.9	4.720	7.070	↑

注:“↑”表示含量升高;“↓”表示含量降低。

### 2.3 脂肪酸的含量

新鲜种子和陈年种子中都未检出  $\gamma$ -亚麻酸和芥酸;二者相比棕榈酸含量降低 0.77%, $\alpha$ -亚麻酸含量降低 0.34%,硬脂酸和油酸等脂肪酸的含量都有不同程度的升高;其它脂肪酸含量降低,但峰数由 10 个增加到 12 个。脂肪酸含量的测定结果见表 3。

表 3 滇重楼新鲜和陈年种子中脂肪酸含量

项目名称	新鲜种子	陈年种子	备注
棕榈酸	15.58	14.71	↓
硬脂酸	2.55	2.67	↑
油酸	33.78	35.55	↑
亚油酸	24.79	26.05	↑
$\gamma$ -亚麻酸	/	/	
$\alpha$ -亚麻酸	0.67	0.33	↓
廿碳烯酸	14.32	14.90	↑
芥酸	/	/	↑
其它脂肪酸(峰数)	8.31(10)	5.78(12)	↓(↑)

注:(1)检测依据:气相色谱-甲酯化法,脂肪酸相对含量以%计;(2)表中“/”为未检出;(3)峰数以“个”表示;(4)“↑”表示含量升高,“↓”表示含量降低。

### 参考文献:

[1] 李恒.重楼属植物[M].北京:科学出版社,1998:3-12



[2] 杨永红,陆峻波,王明辉,等.从文献分析看我国重楼研究进展[J].中药品,2008,31(1):165-177.  
 [3] 李运昌.重楼属植物引种栽培的研究-I.滇重楼的有性繁殖试验初报[J].云南植物研究,1982,4(4):429-431  
 [4] 李运昌.重楼属植物引种栽培的研究-II.滇重楼的育

苗试验[J].云南植物研究,1986,8(2):209-212  
 [5] 李运昌.滇重楼的无性繁殖[J].云南植物研究,1986,8(4):429-435  
 [6] 袁理春,陈翠,杨丽云,等.温度和赤霉素对滇重楼种子二次发育的影响[J].种子,2003,5:33-34

## 3种中西药合剂对蛙嗜水气单胞菌体外抗菌作用研究

韩新畴,刁晓平,吴科榜

(海南大学农学院,海南海口 570228)

中图分类号: S854/857

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2009)02-0041-03

肝宝 2000主要由龙胆、黄芩、甘草、柴胡和氟苯尼考等组成;海大速康主要由甘草素、抗应激剂和培氟沙星等组成;蛙胃肠康主要由痢原清[桃金娘科植物海南丁香(*Engenycaryophyllata* Thaub)提取物丁香混酚和山龙眼科植物深绿山龙眼(*Helicia hainanensis* Hayata)有效提取物接枝聚合的大分子化合物]和乳酸 TMP等组成。这些药物的共同特点是具有很强的杀菌消炎、改善胃肠功能、帮助消化、促进吸收、护肝利胆、恢复肝功能、提高免疫力、促进康复等功效。在海南地区经几年来的大量临床应用,对由嗜水气单胞菌等病原菌引起蛙的败血症、烂皮病、红腿病、胀气病、腹水病和肝肿大病等治疗效果显著。本试验测定了这3种药物对蛙嗜水气单胞菌的MIC和MBC,杀菌曲线以及培养条件对药效的影响,并以硫酸阿米卡星作为对照药物进行比较,旨在进一步探讨这3种药物的体外抗菌作用特点,为更科学、合理的应用这3种药物防治蛙嗜水气单胞菌病提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 药品 肝宝 2000,批准文号:琼饲添字(2006)017006;海大速康,批准文号:琼饲添字(2006)017007;蛙胃肠康,批准文号:琼兽药字(2001)X008038。上述药物均为可溶性粉剂,由海南海大实验兽药厂生产。硫酸阿米卡星,浙江金华康恩贝生物制药有限公司生产,批准文号:国药准字H33021384。

1.1.2 嗜水气单胞菌 从患有典型嗜水气单胞菌病症状的虎纹蛙的肝脏、肾脏中分离培养,并经细菌形态特征、培养特性和生理生化特性等检验鉴定后保存的菌种。

1.1.3 仪器 SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司生产;微量移液器,上海求精生化试剂仪器有限公司生产;电子天平,日本生产;LRH-250生化培养箱,上海一恒科技有限公司生产。

#### 1.2 方法

收稿日期:2008-10-09

作者简介:韩新畴(1953-),男,实验师,主要从事基础兽医学教学与研究。E-mail:hxc1688168@sina.com

1.2.1 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定 采用试管两倍稀释法,将系列稀释的药物溶液与菌液混合,使终菌液浓度为 $10^6$  CFU/mL,置28℃培养24h以肉眼观察未见细菌生长的最低药物浓度为最小抑菌浓度(MIC),继续培养48h从最小抑菌浓度以上未见细菌生长的各试管培养物中,分别吸取0.1mL,接种到不含药物的普通琼脂平板上,置28℃培养箱中过夜,计数少于5个菌落者的最低药物浓度为最小杀菌浓度(MBC)。相同试验重复3次,求平均值。

1.2.2 杀菌曲线的测定 取2倍MBC的药物浓度,将菌液与之混合,使终菌液浓度为 $10^5$  CFU/mL。对照管不含药物,置28℃培养,分别于0,2,4,6,8,10,12h取0.1mL培养液进行活菌计数,并绘制时间-杀菌曲线。

1.2.3 培养因素对药物抗菌活性的影响 采用不同pH值(pH 5.0,7.0,9.0)、不同 $Mg^{2+}$ 浓度(0,2,4,6mg/mL)和不同血清浓度(0,25%,50%,75%的猪血清)的培养基以及不同细菌接种量( $10^3$ , $10^5$ , $10^7$  CFU/mL)和不同培养温度(14,28℃),测定其对各种实验药物MIC和MBC的影响。

### 2 结果

#### 2.1 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

结果见表1。从表1可见,3种药物对蛙嗜水气单胞菌的MIC为0.0156-0.125 mg/mL, MBC为0.0313-1 mg/mL,其MBC/MIC比值在2-8之间,未出现MBC与MIC明显分离的情况,说明均具有明显的抑菌杀菌作用,但以蛙胃肠康的抗菌活性最强,其MIC比海大速康小2倍,比肝宝2000小8倍。其MBC比海大速康小4倍,比肝宝2000小32倍。

表1 3种试验药物对蛙嗜水气单胞菌的MIC和MBC/mg·mL<sup>-1</sup>

药物	肝宝 2000		海大速康		蛙胃肠康		硫酸阿米卡星	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
蛙嗜水气单胞菌	0.125	1	0.0313	0.125	0.0156	0.0313	0.0625	1
MBC/MIC值	8		4		2		16	