

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
[3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第一册)[S]. 广州: 广东科技出版社, 2004.
[4] 中国药科大学. 中药辞海(第二卷)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996.
[5] 孔令锋, 李书渊. 扭肚藤的生药学研究[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(5): 449-451.
[6] 谈远锋, 黄茂春. 扭肚藤的生药鉴定研究[J]. 中国医药指南, 2008, 6(23): 125-126.

[7] 吴忠, 李锐增, 罗健, 等. 腹可安片中扭肚藤、救必应、石榴皮的薄层层析鉴别[J]. 广东医药学院学报, 1994, 10(2): 92-93.
[8] 李镜友, 陈军, 张小兵, 等. 腹可安片质量标准的研究[J]. 中医药导报, 2007, 13(7): 95-97.
[9] 王秀芹, 侯惠婵, 林彤. 腹可安片质量标准改进研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 663-665.
[10] 彭维, 王小锐, 王永刚, 等. UPLC法测定扭肚藤药材中总萜萜素的含量[J]. 中药材, 2007, 30(5): 562-563.
[11] 王凤云, 韩亮, 宋雨鸿. UPLC/Q-TOF-MS技术快速鉴定瑶药别旁茶提取物的化学成分[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(1): 55-60.
[12] 胥爱丽, 陈雪, 江洁怡, 等. 扭肚藤的化学成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(8): 1779-1781.

HPLC法同时测定17种石杉亚科植物石杉碱甲、乙

赵惠¹, 覃兰芳², 黄云峰^{2,3*}

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530200; 2. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西南宁 530022; 3. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定 17 种(含 2 待发表新种)石杉亚科植物中石杉碱甲(huperzine A)和石杉碱乙(huperzine B)的含有量。方法 石杉碱甲、乙酒石酸提取液的分析采用 Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇-醋酸铵溶液为流动相, 等度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 310 nm; 柱温室温。外标法定量。结果 石杉碱甲、乙分别在 0.002 0~0.30 μg、0.001 8~0.27 μg 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率、RSD 分别为 103.86% (1.85%)、101.3% (1.30%)。17 种石杉亚科植物中都含有石杉碱甲、乙, 各物种之间含有量有显著性差异; 喜马拉雅马尾杉中石杉碱甲含有量最高, 达 0.22%, 柳杉叶马尾杉、有柄马尾杉和马尾杉含量也较高; 马尾杉中石杉碱乙含有量最高。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于石杉亚科植物中石杉碱甲和石杉碱乙的质量控制。

关键词: 石杉亚科; 石杉碱甲; 石杉碱乙; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)03-0637-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.027

Simultaneous determination of huperzine A and huperzine B in Seventeen species from Huperzioidae subfamily by HPLC

ZHAO Hui¹, QIN Lan-fang², HUANG Yun-feng^{2,3*}

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of huperzine A and

收稿日期: 2017-08-25

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(14123006-37); 南宁市青秀区科学研究与技术开发计划项目(2013S13)

作者简介: 赵惠(1994—), 女, 硕士生, 从事药用植物资源开发与利用研究。Tel: 15677185797, E-mail: xs1994zhaohui@126.com

* 通信作者: 黄云峰(1980—), 男, 硕士, 副研究员, 从事中药资源调查与评价研究。Tel: 18978933791, E-mail: huangyunfeng2000@

huperzine B from seventeen species Huperzioidae subfamily (including 2 ineditus new species). **METHODS**

The analyses of tartaric acid extracts of huperzine A and huperzine B were performed on a room temperature column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-spiritus mindereri flowing at 1.0 mL/min in an isocratic elution manner, and the detection wavelength was set at 310 nm. The contents were determined by external standards. **RESULTS** Huperzine A and huperzine B showed good linear relationships within 0.002 0–0.30 μg, 0.001 8–0.27 μg ($r=0.999 9$), whose average recoveries were 103.86%, 101.3% with the RSDs of 1.85%, 1.30%, respectively. Huperzine A and huperzine B were found in seventeen species, and there were significant differences in contents from species to species. The content of huperzine A in *Phlegmariurus hamiltonii* was the highest, which reached up to 0.22%, with higher levels of it in *Phlegmariurus cryptomerianus*, *Phlegmariurus petiolatus*, and *Phlegmariurus phlegmaria*; The content of huperzine B was the highest in *P. phlegmaria*. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of huperzine A and B from Huperzioidae subfamily.

KEY WORDS: Huperzioidae subfamily; huperzine A; huperzine B; HPLC

石松科石杉亚科植物为小型或中型草本植物,分石杉属、马尾杉属 2 属 (PPG I 系统), 广布于热带与亚热带^[1]。1972 年国内首次报道蛇足石杉生物碱具有横纹肌松弛作用, 进一步研究发现该植物生物碱-石杉碱甲 (HupA) 是一种高效的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 可用于提高学习效率以及改善老年人的记忆功能等, 对治疗重症肌无力和早期老年痴呆具有显著疗效^[2,4]。目前, 石杉碱甲片已在临床上广泛使用。石杉碱乙 (HupB) 也具有乙酰胆碱酯酶抑制作用, 其活性虽只有石杉碱甲的十分之一, 但持续时间更长^[5,6], 石杉碱甲与石杉碱乙组合对乙酰胆碱酯酶抑制活性具有减毒增效的作用^[6]。石杉亚科植物大多含有石杉碱甲, 含量甚至远高于蛇足石杉, 具有一定的开发利用价值^[8-9]。课题组收集了 17 种石杉亚科植物, 用 HPLC 法测定其中石杉碱甲、乙的含有量, 期为石杉碱甲乙药源的质量评价提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); FA1004 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司); KQ-300DE 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。石杉碱甲对照品 (批号 100243-201202, 中国食品药品检定研究院); 石杉碱乙对照品 (批号 R02J7Y15581, 上海源叶生物科技有限公司); 酒石酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 醋酸铵 (分析纯, 广东省化学试剂工程技术研究开发中心); 冰乙酸 (分析纯, 南宁师范学院化学试剂厂); 甲醇 (分析纯, 广东省化学试剂工程技术研究开发中心)。样品采集工作于 2015 年 5 月—2016 年 10 月进行, 国内样品均为实地采集;

国外样品购于南宁市各花卉园艺场, 主要由泰国、菲律宾等东盟国家引进; 17 种原植物由蒋日红高级工程师鉴定为正品 (信息见表 1)。

2 方法与结果

2.1 供试样品前处理 在野外样品采集过程中, 选取原植物中典型者, 用腐殖土和苔藓保鲜并从速送至广西中医药研究院中药资源所实验室, 洗净泥沙, 置于干燥阴凉处阴干, 粉碎过 50 目筛, 60 °C 烘箱中干燥至恒重, 低温密闭保存。

2.2 色谱条件 Wondasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.08 mol/L 醋酸铵缓冲溶液 (32:68, 冰醋酸调至 pH 6.0); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 310 nm; 柱温室温; 进样量 10 μL。

2.3 对照品溶液配制 精密称取石杉碱甲 2.0 mg、石杉碱乙 1.8 mg, 分别用甲醇溶解并定容至 10 mL, 制成石杉碱甲, 石杉碱乙对照品母液。取母液各 1 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得石杉碱甲 20 mg/L, 石杉碱乙 18 mg/L 的混合对照品溶液, 冷藏备用。

2.4 供试品溶液配制 取“2.1”项下供试样品粉末, 60 °C 烘箱中干燥至恒重, 精密称取 1.0 g, 加入 2% 的酒石酸 25 mL, 超声提取 2 h, 定性滤纸过滤, 取续滤液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤备用。

2.5 方法学考察

2.5.1 系统适用性试验 在“2.2”项色谱条件下分别进样 10 μL 对照品溶液和供试样品溶液, 色谱图见图 1。可得石杉碱甲、乙的保留时间分别为 8.904、5.545 min, 并且与其他成分分离良好。理论塔板数按石杉碱甲峰计不低于 6 000。

表 1 样品信息
Tab. 1 Information of samples

编号	名称	产地
1	南川石杉	广西贺州市姑婆山
2	小杉兰	吉林抚松县长白山
3		广西贺州市
4		广西南宁市武鸣区
5		广西防城港市
6		广西那坡县
7		广西金秀县
8	蛇足石杉	广西乐业县
9		湖南城步县
10		广西玉林市
11		广西容县
12		广西玉林市六万山
13		广东怀集县
14		广西金秀县大瑶山
15		广西龙胜县
16	华南马尾杉	广西兴安县猫儿山
17		泰国
18		广西靖西县
19		泰国
20	龙骨马尾杉	广西防城区
21		广西凭祥市
22		广西靖西县
23		菲律宾
24		浙江文成县
25	柳杉叶马尾杉	浙江文成县
26		浙江文成县
27		福建龙岩梅花山
28		广西资源县
29		云南瑞丽市
30	金丝条马尾杉	广西金秀县
31		广西金秀县
32		广西金秀县
33		广西金秀县
34		云南普洱市
35	福氏马尾杉	广西金秀莲花山
36		广西防城港垌中
37		泰国
38	蓝色马尾杉	菲律宾
39	细茎马尾杉	云南富宁县
40		泰国
41	喜马拉雅马尾杉	菲律宾
42	椭圆马尾杉	广西上思县
43		广西那坡县
44	那坡马尾杉(待发表)	广西田林县
45		广西那坡县
46	圆叶马尾杉	菲律宾
47		菲律宾
48		广西防城港垌中
49	有柄马尾杉	广西金秀县莲花山
50		广西上思县
51		广西凭祥市
52	马尾杉	菲律宾
53		菲律宾
54		广西靖西县
55	粗糙马尾杉	泰国
56		广西靖西县
57		广西隆安县
58		广西凭祥市

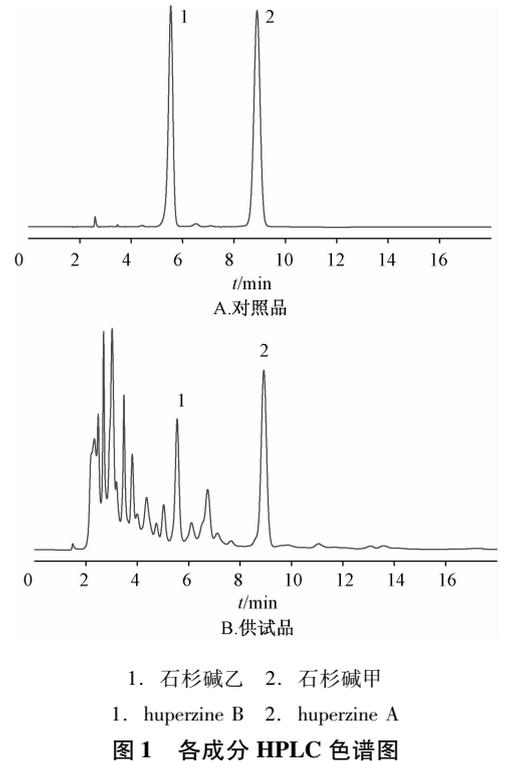


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5.2 线性关系考察 取“2.3”项下溶液，分别用甲醇配制成质量浓度为 0.2、1.0、2.0、10、20、30 mg/L；0.18、0.9、1.8、9、18、27 mg/L 的石杉碱甲、乙溶液。在“2.2”项条件下分别进样 10 μL，以峰面积为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，得石杉碱甲、乙回归方程分别为 $Y = 15.51X - 0.0827$ ($r = 0.9999$)； $Y = 12.855X - 0.165$ ($r = 0.9999$)，可知石杉碱甲、乙在 0.0020 ~ 0.30 μg、0.0018 ~ 0.27 μg 内线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 吸取“2.3”项下溶液 10 μL，在“2.2”项条件下测定，连续 6 次，测得石杉碱甲、乙峰面积 RSD 分别为 0.06%、0.23%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 按“2.4”项下方法平行制备供试样品溶液 6 份，在“2.2”项条件下测定，测得石杉碱甲、乙含有量 RSD 分别为 1.85%、1.30%，表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 吸取“2.3”项下溶液 10 μL，在“2.2”项条件下于 0、2、4、6、8、12 h 测定，测得石杉碱甲、乙峰面积 RSD 分别为 1.05%、1.13%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取已知含有量的石杉碱甲、乙样品提取液 9 份，精密加入相当于含有量

50%、100%、150% 的石杉碱甲、乙对照品溶液，在“2.2”项条件下测定，计算回收率，结果见表2。

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
石杉碱甲	0.008 80	0.004 33	0.013 27	103.42	103.86	1.97
	0.008 87	0.004 33	0.013 27	101.76		
	0.008 85	0.004 33	0.013 52	108.02		
	0.008 80	0.008 66	0.017 80	104.03		
	0.008 87	0.008 66	0.017 76	102.72		
	0.008 85	0.008 66	0.017 99	105.57		
	0.008 80	0.012 97	0.022 36	104.63		
	0.008 87	0.012 97	0.022 00	101.31		
	0.008 85	0.012 97	0.022 24	103.29		
石杉碱乙	0.002 21	0.001 20	0.003 41	100.04	101.13	1.99
	0.002 23	0.001 20	0.003 42	99.03		
	0.002 22	0.001 20	0.003 46	103.70		
	0.002 21	0.002 41	0.004 64	100.42		
	0.002 23	0.002 41	0.004 64	99.85		
	0.002 22	0.002 41	0.004 68	102.27		
	0.002 21	0.003 63	0.006 02	104.80		
	0.002 23	0.003 63	0.005 84	99.38		
	0.002 22	0.003 63	0.005 87	100.72		

2.5.7 样品含有量测定 按“2.4”项下方法平行制备样品4份，在“2.2”项条件下进样10 μL，用外标法定量，计算可得各原植物中石杉碱甲、乙的含有量，结果见表3。

2.6 数据分析 计算17种石杉亚科植物石杉碱甲、乙平均含有量，结果见表4。按不同种对石杉碱甲、乙含有量数据进行分组，利用SPSS 19.0软件比较各组样品均数，对数据进行单因素方差分析，结果见表5。

3 结果分析

由表3可知，本实验测定的17种石杉亚科植物全都含有石杉碱甲、乙。石杉碱甲在喜马拉雅马尾杉中含有量最高，达0.22%；有柄马尾杉次之，达0.20%；柳杉叶马尾杉、马尾杉的含有量超过0.10%；华南马尾杉、龙骨马尾杉也有较高含有量；小杉兰与粗糙马尾杉中石杉碱甲含有量极低。石杉碱乙含有量最高的为马尾杉(0.055%)；蛇足石杉和细茎马尾杉(待发表新种)中含有量相对较高；龙骨马尾杉、福氏马尾杉、粗糙马尾杉等有部分样品未检出石杉碱乙。

表3 石杉碱甲、乙含有量测定结果

Tab. 3 Results of content determination of huperzine A and huperzine B

编号	石杉碱甲/ %	石杉碱乙/ %	编号	石杉碱甲/ %	石杉碱乙/ %
1	0.020 21	0.004 61	30	0.037 48	0.010 75
2	0.004 25	0.009 88	31	0.037 18	0.032 81
3	0.034 58	0.012 70	32	0.062 69	0.041 07
4	0.028 00	0.007 89	33	0.009 62	0.001 11
5	0.032 97	0.019 13	34	0.020 89	0
6	0.046 77	0.025 11	35	0.001 88	0
7	0.044 45	0.020 92	36	0	0.003 13
8	0.042 74	0.026 49	37	0.031 16	0.003 29
9	0.038 01	0.015 48	38	0.044 85	0
10	0.059 31	0.030 69	39	0.050 33	0.035 36
11	0.066 15	0.026 68	40	0.154 02	0.015 84
12	0.022 64	0.010 73	41	0.215 71	0
13	0.026 72	0.004 93	42	0.043 45	0.007 01
14	0.065 69	0.021 85	43	0.040 16	0.003 82
15	0.036 61	0.053 14	44	0.026 23	0.002 64
16	0.025 77	0.008 47	45	0.028 00	0.008 52
17	0.095 24	0.004 91	46	0.046 18	0.003 83
18	0.090 57	0.014 54	47	0.095 83	0.006 10
19	0.051 62	0.004 17	48	0.179 84	0.012 54
20	0.046 95	0	49	0.059 04	0.010 80
21	0.043 17	0.004 46	50	0.200 71	0.004 43
22	0.039 00	0.003 55	51	0.149 82	0.054 85
23	0.121 74	0.018 70	52	0.109 79	0.007 24
24	0.174 46	0.015 99	53	0.068 32	0.011 15
25	0.135 51	0.006 84	54	0.005 03	0.001 46
26	0.190 85	0.019 37	55	0.011 48	0
27	0.103 83	0.011 33	56	0	0
28	0.029 13	0.008 67	57	0	0
29	0.034 08	0.016 88	58	0.004 86	0.014 09

表4 石杉碱甲、乙平均含有量测定结果

Tab. 4 Results of average content determination of huperzine A and huperzine B

品种	石杉碱甲/%	石杉碱乙/%
小杉兰	0.004 25	0.009 88
蛇足石杉	0.041 90	0.021 21
南川石杉	0.020 21	0.004 61
华南马尾杉	0.060 51	0.006 69
龙骨马尾杉	0.065 51	0.007 57
柳杉叶马尾杉	0.151 16	0.013 38
金丝条马尾杉	0.035 03	0.018 55
福氏马尾杉	0.007 59	0.001 04
蓝色马尾杉	0.038 01	0.001 65
细茎马尾杉	0.050 33	0.035 36
喜马拉雅马尾杉	0.184 87	0.007 92
椭圆马尾杉	0.043 45	0.007 01
那坡马尾杉	0.031 46	0.004 99
圆叶马尾杉	0.071 01	0.004 97
有柄马尾杉	0.146 53	0.009 26
马尾杉	0.109 31	0.024 41
粗糙马尾杉	0.004 27	0.003 11

表5 方差分析
Tab.5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值	
石杉碱甲	组间	0.135	16	0.008	9.821	0
	组内	0.035	41	0.001		
	总数	0.17	57			
石杉碱乙	组间	0.004	16	0	1.946	0.044
	组内	0.005	41	0		
	总数	0.009	57			

由表4、5可知,不同种之间石杉碱甲含有量有显著性差异($P < 0.01$)。喜马拉雅马尾杉和柳杉叶马尾杉石杉碱甲含有量最高;其次是有柄马尾杉,小杉兰与粗糙马尾杉含量有最低。结合王骏、张君诚、Wei-Han Lim^[8,10-11]等人的研究结果发现,较高的石杉碱甲含有量是柳杉叶马尾杉的特征,极低含有量甚至不含石杉碱甲是小杉兰和粗糙马尾杉的特征。课题组查阅文献发现蛇足石杉中石杉碱甲的含有量为0.02%~0.06%^[8,12-19],这与本实验结果0.023%~0.066%相近,表明该水平范围的石杉碱甲含有量为蛇足石杉的特征。大多数样品中石杉碱乙含有量低于0.01%,远低于石杉碱甲,不同种之间差异显著($P < 0.05$)。

4 讨论

细茎马尾杉是课题组在收集样品过程中发现的一个马尾杉属新种,该种在形态上与金丝条马尾杉相似,但茎枝明显比金丝条马尾杉细,只有约1.0 mm,植株表现出茎细瘦的特征。本实验结果表明,两者在石杉碱甲、乙的含有量上也存在显著性差异,对该种的详细描述将另文发表。石杉亚科植物物种鉴定较难,物种分类一直存在争议,本实验在样品鉴定工作中,采用最新的PPGI系统分类观点,将原来的石杉科降为石杉亚科,蛇足石杉的变种、变型全都合并到蛇足石杉,接受伏贴石杉与小杉兰各为独立种的分类观点。

石杉亚科植物石杉碱甲含有量主要由物种决定,喜马拉雅马尾杉、有柄马尾杉、柳杉叶马尾杉、马尾杉等植物中石杉碱甲含有量高,是提取石杉碱甲良好的原材料,具有很高的开发潜力。小杉兰与粗糙马尾杉中石杉碱甲含有量极低,不太具有从原植物中直接提取石杉碱甲的价值,但这两种植物利用组织培养方法获得的原叶体和无菌苗中都检测到了较高的石杉碱甲^[20-21]。石杉碱乙的药用功效尚处于研究阶段,未广泛用于临床,但其价值不容被忽视,在提取石杉碱甲的同时,应珍惜植物资源,合理利用石杉碱乙及同类生物碱,不能作为废

料和杂质舍弃。

目前石杉碱甲主要从野生的蛇足石杉植物中提取,根据评估,2005年我国蛇足石杉商业可采量约为200 t^[22],近年由于过度采挖和原生植被的破坏,野外存储量急剧下降,苏、浙、皖、闽、赣5省石杉属植物资源基本枯竭^[23]。课题组在广西区内多个蛇足石杉、金丝条马尾杉和龙骨马尾杉原分布点都未能找到活体,无节制的商业采集已使多种石杉碱甲药源植物趋于灭绝。石杉亚科植物中虽不乏像喜马拉雅马尾杉、有柄马尾杉、柳杉叶马尾杉一样,石杉碱甲含有量极高者,但都为小草本,生长缓慢,资源再生能力非常弱,直接采收天然资源不是可持续利用途径,甚至会将新的药源植物迅速推向灭绝。根据评估,我国石杉亚科植物中7种列为易危,28种缺乏数据,蛇足石杉被列为濒危种^[24];在广西蛇足石杉和金丝条马尾杉已被列入广西壮族自治区重点保护野生植物名录。为防止石杉亚科植物灭绝,同时解决石杉碱甲资源短缺的问题,应当加大对野生资源的保护力度,杜绝商业采挖,同时加速科学研究,解决人工繁育问题,以家种代替野生,或利用人工快繁的方法获得石杉碱甲原材料,这将对解决石杉碱甲药源植物可持续利用问题提供巨大帮助。

参考文献:

- [1] PPG I. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns[J]. *J Syst Evol*, 2016, 54(6): 563-603.
- [2] 张秀尧,王惠康.蛇足草(千层塔)的化学成分研究[J]. *中草药*, 1990, 21(4): 2-3.
- [3] 袁珊琴,魏同泰.蛇足石杉生物碱成分的研究[J]. *药学报*, 1988, 23(7): 516-520.
- [4] 袁带秀,恩特马克·布拉提白.药用植物蛇足石杉的化学成分与药理活性研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2011, 30(3): 1-3.
- [5] 刘静,唐希灿.石杉碱乙的抗胆碱酯酶作用[J]. *中国药理学报*, 1999, 20(2): 141-145.
- [6] 谢家骏,谢德隆.石杉碱甲与石杉碱乙组合对乙酰胆碱酯酶抑制活性的增效减毒作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2014, 33(2): 142-145.
- [7] 王峻,潘胜利.千层塔的23种原植物中石杉碱甲含量[J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(16): 1212-1214.
- [8] 王峻,吴伟,潘胜利.HPLC法测定6种石杉科植物中石杉碱甲的含量[J]. *中草药*, 2003, 34(7): 607-608.
- [9] 张君诚,黄晖,张杭颖,等.武夷山脉石杉科植物石杉碱甲含量的研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(4): 629-633.
- [10] Lim W H, Goodger J Q D, Field A R, et al. Huperzine alka-

- loids from Australasian and southeast Asian *Huperzia* [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(9): 1073-1078.
- [11] 黄雅祺, 向琴, 钱继伟. 三种千层塔中石杉碱甲含量测定[J]. 中国民族民间医药杂志, 2014, 23(3): 20.
- [12] 郑雅焯, 刘海元, 张方方, 等. HPLC法测定蛇足石杉及闽浙马尾杉不同部位的石杉碱甲含量[J]. 福建中医药大学学报, 2013 23(3): 42-43.
- [13] 王 姗, 王 沫. HPLC法测定石杉属植物中石杉碱甲的含量[J]. 商洛学院学报, 2012, 26(2): 38-41.
- [14] 邵 浩, 张 丽, 吕会芳, 等. HPLC测定九龙山国家自然保护区石杉科4种植物石杉碱甲的含量[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(6): 67-69.
- [15] 黄 静, 杨理明, 李齐激, 等. HPLC法测定台江产千层塔中的石杉碱甲的含量[J]. 贵州医药, 2007, 31(7): 644-645.
- [16] 孙远明, 余红英, 杨跃生, 等. HPLC法测定蛇足石杉中石杉碱甲含量[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1078-1080.
- [17] 杜 次, 李 菁, 田向荣, 等. 湘西蛇足石杉不同部位石杉碱甲分布及与LDC表达的关系[J]. 中药材, 2013, 36(3): 361-364.
- [18] Ma X, Tan C, Zhu D, et al. Huperzine a from *huperzia* species-an ethnopharmacological review [J]. *J ethnopharmacol*, 2007, 113(1): 15-34.
- [19] Goodger J Q D, Whincup A L, Field A R, et al. Variation in huperzine A and B in Australasian *Huperzia* species [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2008, 36(8): 612-618.
- [20] Szypuła W, Pietrosiuk A, Suchocki P, et al. Somatic embryogenesis and in vitro culture of *huperzia* selago shoots as a potential source of huperzine A [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(6): 1443-1452.
- [21] Ma X, Gang D R. In vitro production of huperzine a, a promising drug candidate for alzheimer's disease [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(10): 2022-2028.
- [22] 吴 荭, 庄 平, 冯正波, 等. 中国蛇足石杉资源调查与评估[J]. 自然资源学报, 2005, 20(1): 59-67.
- [23] 王 峻, 潘胜利. 湖南省石杉属植物中石杉碱甲含量的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(21): 1616-1618.
- [24] 环境保护部和中国科学院. 中国生物多样性红色名录-高等植物卷 [M/OL]. 2013-09-02. <http://www.mep.gov.cn/gkml/hbb/bgg/201309/W020130917614244055331.pdf>

麦芽蛋白质组成分析及其酶解物 ACE 抑制活性

张月圆^{1,2}, 刘 露^{1,2}, 陈佩瑶^{1,2}, 冀会方^{1,2}, 李玲玲^{1,2}, 王灵芝^{1*}

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 目的 分析麦芽蛋白质组成, 并研究其清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白4类组分酶解产物的血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性。方法 采用顺序抽提法依次提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白4类组分, 并采用凯氏定氮法及SDS-PAGE电泳进行定量和定性分析; 各蛋白组用胃蛋白酶水解, 经超滤(截留分子量3 kD)后收集滤液, 获得小分子肽组分, RP-HPLC法进行ACE抑制活性评价。结果 麦芽总蛋白含有量为10.27%, 其中清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白分别占总蛋白含有量的24.70%、9.25%、20.09%和33.30%。清蛋白酶解产物(小于等于3 kD)对ACE具有最高的抑制活性, 在质量浓度0.01 mg/mL下的抑制率为33.28%。相反, 谷蛋白酶解产物(小于等于3 kD)对ACE具有一定的促进活性, 同一质量浓度下的抑制率为-10.50%。结论 麦芽清蛋白含有量较为丰富, 其多肽组分具有明确的体外ACE抑制活性, 可进一步开发降压活性成分。

关键词: 麦芽; 清蛋白; 球蛋白; 醇溶蛋白; 谷蛋白; 抑制活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)03-0642-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.028

Analysis of protein compositions and study ACE inhibitory activities of their hydrolysates in raw malt

收稿日期: 2017-09-06

基金项目: 北京中医药大学基本科研业务费自助选题项目(2015-JYB-JSM S026); 北京中医药大学发展基金(2016)

作者简介: 张月圆(1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药活性蛋白及多肽的功能。Tel: 18810612568, E-mail: 13521311896@163.com

*通信作者: 王灵芝(1973—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药活性蛋白及多肽的功能。Tel: (010) 84738621, E-mail: wanglz@bucm.edu.cn