

文章编号: 1673-1689(2006)05-0088-03

毛细管气相色谱法测定药用真菌生物转化液中 微量斑蝥素的含量

刘高强¹, 王林祥², 章克昌^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036 2. 江南大学 分析测试中心 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用毛细管气相色谱法对药用真菌培养液中斑蝥素的含量进行了测定。色谱条件: 色谱柱为 SPB-5 弹性石英毛细管柱, 进样口温度 240 °C; 柱温: 120 °C (5 min) → 8 °C/min → 240 °C (2 min); 检测器为 FID, 检测温度 240 °C。载气: 99.999 % 高纯氮气, 流量 1.5 mL/min; 尾吹气: 99.999 % 高纯氮气, 流量 25 mL/min。以香兰素作为内标, 采用内标法定量。斑蝥素在 1-200 mg/L 范围内线性关系良好, 检测限为 0.01 mg/L。

关键词: 斑蝥素; 药用真菌; 灵芝; 姬松茸; 毛细管气相色谱

中图分类号: O 658

文献标识码: A

Method for Determination of Cantharidin from Ferment Liquid of Medicinal Fungi Using Capillary Gas Chromatography

LIU Gao-qiang¹, WANG Lin-xiang², ZHANG Ke-chang^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Center of Analysis & Testing, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A method for separation and determination of cantharidin from the culture of medicinal fungi using capillary gas chromatography was developed. In this study, quantitative analysis with vanillin as the internal standard. The column is SPB-5 (30 m × 0.53 mm × 3 μm), the injector temperature was set at 240 °C, detector at 240 °C, oven at 120 °C initially for 5 min, then 120 ~ 240 °C at 8 °C/min, 240 °C for 2 min, respectively. The carrier gas was nitrogen, flow rate were at 1.5 mL/min. Tail-blowing gas was Nitrogen, flow rate were 25 mL/min. The linear ranges for cantharidin were in the range of 1-200 mg/L with detection limits of 0.01 mg/L.

Key words: cantharidin; medicinal fungi; *Ganoderma lucidum*; *Agaricus blazei* Murill; capillary gas chromatography

斑蝥素是昆虫类中药斑蝥体内的毒素,是斑蝥抗癌作用的主要有效成分^[1]。临床观察表明,斑蝥

素有明显的抗癌作用,对肝癌、食道癌、贲门癌、胃癌、肺癌等均有抑制效果^[2-3]。但斑蝥素的毒副作用

收稿日期: 2005-07-05; 修回日期: 2005-10-27.

作者简介: 刘高强(1974-),甘肃静宁人,讲师,发酵工程博士研究生;*为通讯作者。
万方数据

用较大。以前对斑蝥素的结构改造主要是通过化学修饰的方法^[4-6]。作者拟采用微生物转化法对其结构进行改造,以期获得高效低毒的斑蝥素衍生物。目前斑蝥中斑蝥素含量的测定方法有紫外分光光度法^[7]、薄层扫描法^[8]、反向高效液相色谱法^[9]、气质连用^[10]等。但由于灵芝等药用真菌培养液中所含物质的种类较多,这给药用真菌转化斑蝥素后斑蝥素的分离检测带来了一定困难。作者采用程序升温毛细管气相色谱法建立了灵芝等药用真菌转化中微量斑蝥素含量的检测方法。该方法可用氯仿直接萃取发酵液,进行上机测定,无需对斑蝥素进行进一步纯化分离。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 中药斑蝥 60 目细粉样:斑蝥研成粉后,过 60 目筛所得样品;中药斑蝥全虫粉样:斑蝥研成粉后,未过 60 目筛所得的样品;含斑蝥素的灵芝发酵液样品 1 和样品 2(样品 1 和样品 2 是采用不同发酵方法获得的样品);含斑蝥素的姬松茸发酵液样品 1 和样品 2(样品 1 和样品 2 是采用不同发酵方法获得的样品)。

1.1.2 主要试剂 斑蝥素纯品:Sigma 公司产品;香兰素和氯仿:国产分析纯试剂。

1.1.3 主要仪器 GC-14A 气相色谱仪:日本岛津公司产品。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 斑蝥粉中斑蝥素的提取:准确称取斑蝥粉 0.500 0 g,置具塞锥形瓶中,加氯仿 5 mL,振摇 15 min,置 6 h,滤过,滤液置 10 mL 量瓶中,用氯仿洗涤残渣与滤纸,洗液掺入同一量瓶中,加氯仿至刻度,摇匀,待气相色谱分析。

灵芝和姬松茸发酵液中斑蝥素的提取:在除去菌丝体的发酵清液中加入 4 倍体积的 95% 的乙醇,沉淀多糖等大分子,离心(8 000 r/min, 10 min),所得清液用氯仿萃取 3 次。合并萃取液,定容,待气相色谱分析。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:SPB-5 弹性石英毛细管柱(D 0.53 mm \times 30 m \times 3 μ m);进样口温度:240 $^{\circ}$ C;检测器:FID,检测温度:240 $^{\circ}$ C;柱温:120 $^{\circ}$ C(5 min) \rightarrow 8 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 240 $^{\circ}$ C(2 min);载气:99.999% 高纯氮气,流量 1.5 mL/min;尾气:99.999% 高纯氮气,流量 25 mL/min;进样量:1 μ L;进样方式:不分流进样。

1.2.3 定量方法 定量采用内标法。内标为香兰

素。香兰素不仅出峰时间在被分离物峰之前,达到完全分离,而且样品在内标出峰时间没有干扰。

1.2.4 标准曲线 准确称取斑蝥素标准品 50 mg,用氯仿溶液溶解,定容至 25 mL,质量浓度为 2 mg/mL。将上述溶液稀释配制成 1、5、25、100、150、200 mg/L 的斑蝥素标准溶液,在每个标准溶液中加入内标香兰素,使其浓度为 0.2 mg/mL。然后在 1.2.2 的色谱条件下进行气相色谱测定,绘制“样品峰面积(A_1)/内标峰面积(A_s)—斑蝥素浓度”的标准曲线。

2 结果

2.1 色谱图

在 1.2.2 的色谱条件下,斑蝥素和内标香兰素的色谱图如图 1。

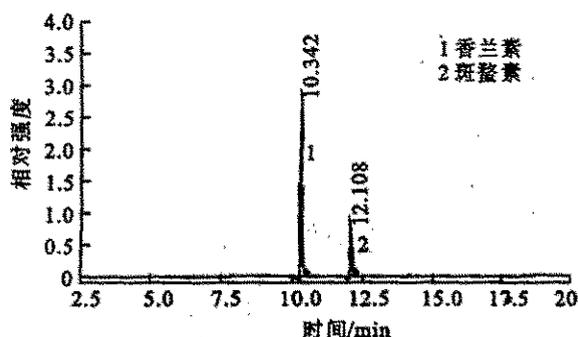


图 1 斑蝥素和内标香兰素的毛细管气相色谱图

Fig. 1 Determination of cantharidin and vanillin by Capillary gas chromatography

2.2 线性范围

分别将各系列浓度的标准斑蝥素溶液 1 μ L 注入色谱仪,在 1.2.2 的色谱条件下平行测定每个标准样品 3 次,以测得的样品峰面积(A_1)/内标峰面积(A_s)—斑蝥素浓度绘制标准曲线,计算回归方程,得相关系数为 0.998 9。标准曲线见图 2。

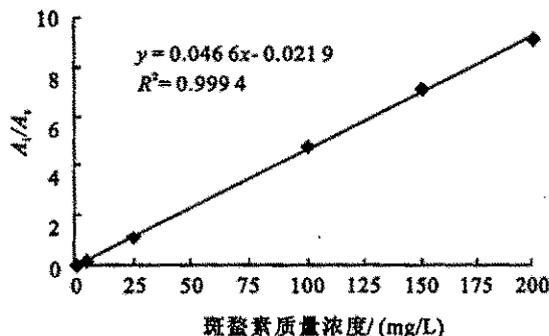


图 2 斑蝥素线性范围标准曲线

Fig. 2 Standard curve of cantharidin

2.3 加标回收率和精密度

在本底质量浓度为 5 mg/L 的斑蝥素标准溶液中,添加 5 个质量浓度水平的斑蝥素标准溶液:5 mg/L (5 个平行)、10 mg/L (5 个平行)、50 mg/L (6 个平行)、100 mg/L (6 个平行)、150 mg/L (6 个平行),在 1.2.2 的条件下进行测定,结果见表 1。

表 1 回收率和精密度测定结果

Tab.1 Determination results of recovery and relative standard deviation

本底 质量浓度/ (mg/L)	添加 质量浓度/ (mg/L)	测定 平均值/ (mg/L)	平均 回收率/ %	RSD/ %
5	5	9.01	82.13	4.92
5	10	13.87	89.07	4.83
5	50	52.32	95.71	3.39
5	100	103.18	98.24	3.03
5	150	152.23	98.21	2.89

2.4 检测限

本方法的噪音为 0.005 mg/L。按噪音的 2 倍计算检测限,本方法的检测限为 0.01mg/L。

2.5 样品测定结果

采用上述色谱条件,对斑蝥 60 目细粉、斑蝥全虫粉和药用真菌发酵液中斑蝥素的含量进行了测定。结果为 3 次测定的平均值,见表 2。

表 2 几种样品中斑蝥素的测定结果

Tab.2 Cantharidin content of some samples

样品	斑蝥素质量浓度
斑蝥虫 60 目细粉	1.62 g/L
全虫粉	1.31 g/L
灵芝 样 1	2.13 mg/L
发酵液 样 2	2.83 mg/L
姬松茸 样 1	5.13 mg/L
发酵液 样 2	7.15 mg/L

3 结 语

建立了一种采用程序升温毛细管气相色谱法测定药用真菌发酵液中斑蝥素的方法。由于药用真菌发酵液的组成十分复杂,在其中加入斑蝥素进行生物转化后,斑蝥素的分离较困难。作者利用斑蝥素极易溶于氯仿的特性,参考《中华人民共和国药典》中药斑蝥中斑蝥素的提取方法,用氯仿直接对药用真菌发酵液中的斑蝥素进行萃取,然后直接进气相色谱仪测定。发现采用 SPB-5 毛细管柱,以及当柱温采取程序升温设置为 120 °C (5 min)→8 °C/min→240 °C (2 min)时,斑蝥素和内标香兰素能够分离完全,且其它物质在斑蝥素和香兰素的出峰时间没有干扰。分离较为满意。该方法可用于同类研究中的过程分析,也可用于今后工业生产中的产品纯度检验及生产条件的控制分析。

参考文献:

- [1] 张志勇,袁锋. 斑蝥素资源及其利用的研究进展[J]. 西北农业学报,1996,5(4):89-92.
- [2] 杨素娟,杨绍俊. 斑蝥的研究应用与临床进展[J]. 中医药信息,1992,(1):33-36.
- [3] Williams L A D, Möller W, Merisor E, et al. In vitro anti-proliferation/cytotoxic activity of cantharidin (Spanish fly) and related derivatives[J]. *West Indian Medical Journal*, 2003, 52(1):10-13.
- [4] McCluskey A, Ackland S P, Bowyer M C, et al. Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2003, 31:68-79.
- [5] Edwards W C, Edwards R M, Ogdén L, et al. Cantharidin content of two species of Oklahoma blister beetles associated with toxicosis in horses[J]. *Veterinary and Human Toxicology*, 1989, 31:442-444.
- [6] Moed L, Shwayder T A, Wu Chang M. Cantharidin revisited: A blistering defense of an ancient medicine[J]. *Archives of Dermatology*, 2001, 137:1357-1360.
- [7] 刘力,徐德生. 斑蝥体中斑蝥素的紫外分光光度测定法[J]. 中国中药杂志,1989,14(7):40-41.
- [8] 段广珍,何兰,戴惠民,等. 中药斑蝥及中成药中斑蝥素的测定方法研究进展[J]. 时珍国药研究,1998,9(2):183.
- [9] 邹建军,蒋春莲,张胜强,等. RP-HPLC 法测定斑蝥素脂肪乳剂中斑蝥素的含量[J]. 江苏药学与临床研究,2003,11(5):31-33.
- [10] Steyn J M, Hundt H K L. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the quantitation of cantharidin in human serum [J]. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 1988, 432:177-184.

(责任编辑 朱明)