

网络出版时间:2013-09-22 17:09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130922.1709.026.html>

东北山樱桃核总黄酮成分双水相萃取条件的优化

陈丽华

(《北华大学学报》编辑部,吉林 吉林 132000)

【摘 要】 【目的】探究聚乙二醇-硫酸铵双水相体系在东北山樱桃核总黄酮成分分离纯化中的应用,并确定最佳萃取条件。【方法】采取单因素试验,分析聚乙二醇相对分子质量、聚乙二醇-硫酸铵质量比、pH、温度对东北山樱桃核总黄酮成分得率的影响,对双水相萃取条件进行优化筛选,并对筛选出的聚乙二醇-硫酸铵双水相萃取最佳体系分离纯化东北山樱桃核总黄酮成分的效果进行检验。【结果】在聚乙二醇相对分子质量为 400、 $m(\text{聚乙二醇}):m(\text{硫酸铵})=1:1.5$ 、pH 为 5.6、温度为 50 ℃ 的条件下,东北山樱桃核总黄酮成分的得率最高,两相间平均分配系数为 130.66,东北山樱桃核总黄酮的平均得率为 99.95%。【结论】在最佳双水相萃取条件下,东北山樱桃核总黄酮的得率较高,两相间分配系数较大,且该方法快速简便,结果稳定可靠。

【关键词】 东北山樱桃核;总黄酮;分离纯化;双水相萃取;聚乙二醇;硫酸铵

【中图分类号】 R284.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)10-0137-06

Optimization of the extraction of flavones from *Cerasus sachalinensis* Kom using Two-Phase System

CHEN Li-hua

(Editorial Department of Journal of Beihua University, Jilin, Jilin 132000, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to explore the application of polyethylene glycol ammonium sulfate aqueous two phase system in the separation and purification of total flavonoids from *Cerasus sachalinensis* Kom, and determine the optimal extraction conditions. 【Method】 Single factor exploration method was used to analyze the influence of four factors: Polyethylene glycol (PEG) molecular weight, polyethylene glycol ammonium sulfate ratio, pH value, and temperature on the receiving rate of total flavonoids of the *C. sachalinensis* Kom. The optimum combination was filtered out and the best results to do the verification test were selected. In addition, the verification test was used to examine the purification effect of the polyethylene glycol ammonium sulfate aqueous two-phase extraction system. 【Result】 When PEG400 was used, PEG ammonium sulfate was 1 : 1.5, pH was 5.6, and temperature was 50 ℃, the maximum extraction rate was obtained with the upper and lower phases distribution coefficient on average of 130.66 and the getting rate on average of 99.95%. 【Conclusion】 The best purification conditions for the receiving rate of total flavonoids from *C. sachalinensis* Kom and the coefficient of the two interphase distribution rate were obtained.

Key words: *Cerasus sachalinensis* Kom stone; total flavonoids; separation and purification; two-phase extraction system; polyethylene glycol (PEG); ammonium sulfate

〔收稿日期〕 2012-12-03

〔基金项目〕 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(20120138)

〔作者简介〕 陈丽华(1968—),女,吉林吉林人,副编审,硕士,主要从事天然药物提取研究。E-mail: bhdxcclh@126.com

东北山樱桃又称东北黑山樱、毛樱桃等,是长白山脉道地植物野生山樱桃的果实。东北山樱桃核总黄酮是果实的次级代谢产物,主要含有花色苷、褪黑素、异槲皮素等活性成分,具有良好的药用价值^[1-2];同时由于东北山樱桃的药食同源性,开发其总黄酮类化合物产品易于被接受,故具有良好的经济意义。笔者经多年的研究已经证实,东北山樱桃核总黄酮具有显著的抗冻伤^[3]和治疗风湿的作用^[4],相关成果已经申报专利或已进行转产性研究。笔者采用常规有机溶剂萃取总黄酮时发现,东北山樱桃总黄酮的提取率在 80%左右且萃取时间长^[5],加之萃取溶剂具有毒性^[6],因而不便于工业化生产。聚乙二醇(PEG)为药用辅料^[7],是毒性极低的一种良好溶剂,符合工业化生产的要求^[8]。资料检索发现,以 PEG-硫酸铵组成的双水相萃取体系在国外已逐渐应用于生物蛋白类、黄酮类等物质的分离纯化,得率较高,能较大幅度地保留所得物质的生物学活性^[9],但至今尚未见将该方法应用于东北山樱桃核总黄酮类化合物分离纯化的报道。鉴于此,笔者将 PEG-硫酸铵双水相萃取体系应用于东北山樱桃核总黄酮类化合物的分离与纯化,并对该萃取体系进行了优化筛选,旨在为 PEG-硫酸铵双水相萃取体系的推广应用和东北山樱桃核总黄酮的药用资源开发提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

东北山樱桃核醇提原液:将东北山樱桃核粉碎过孔径 0.180 mm(80 目)筛,在体积分数 95%乙醇中超声提取 45 min,回收溶剂后所剩余液即是。

试剂:芦丁标准品(UV≥98%),购自北京世纪奥科生物技术有限公司;硫酸铵、不同相对分子质量的 PEG 等试剂,均为国产分析纯;蒸馏水,为北华大学生命科学中心实验室自制重蒸馏水。

仪器:紫外分光光度计(UV-2550 型),日本岛津;电子分析天平(AL204-IC 型),瑞士梅特勒;pH 计(PHBJ-260 型),上海三本环保科技有限公司;旋转蒸发仪(RE-52 型),上海亚荣;恒温磁力搅拌器(85-2 型),江苏省金坛市环宇科学仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 双水相体系的制备 双水相萃取体系制备的空间环境为室温,空气相对湿度 30%~70%。具体制备方法为:在 50 mL 烧杯中加入 20 mL 东北山樱桃核醇提原液,再加入适量的 PEG、硫酸铵,将烧杯置于恒温磁力搅拌器上水浴加热,温度设定为 50

℃,缓慢搅拌至 PEG 全部溶解后继续搅拌 20 min。搅拌结束后迅速将溶液转移至分液漏斗中,静置;待溶液分为上下 2 层,其中上层为 PEG 相,下层为盐水相,总黄酮类化合物富集于上相中,记录上下相的体积,分别留取上下相样品计算总黄酮质量浓度和纯度。

1.2.2 总黄酮质量浓度的检测 1)芦丁标准溶液配制。取芦丁标准品干燥至质量恒定,准确称取 0.075 0 g,转移至含体积分数 30%乙醇的烧杯中,并置于 60℃恒温水浴锅中加热,振荡使标准品完全溶解,转移至 250 mL 容量瓶中,继续补加体积分数 30%乙醇至刻度,振摇均匀即得芦丁标准溶液(质量浓度为 0.300 0 g/L)。2)芦丁标准溶液吸光度测量。准确移取一定量的芦丁标准溶液于 25 mL 容量瓶中,加入 0.5 mol/L 的 AlCl₃ 1.0 mL 振荡摇匀,放置 15 min,待溶液稳定后,用 pH=5.8 的 NaAc-HAc 缓冲溶液缓慢补充定容至刻度,振荡摇匀,5 min 后用 1 cm 比色皿,在 415 nm 波长处测定其吸光度,根据芦丁不同质量浓度(C)所得的吸光度值(A)绘制标准曲线(图 1),回归分析得 $A = 0.030\ 9\ C + 0.027\ 7, R^2 = 0.999\ 7$ 。

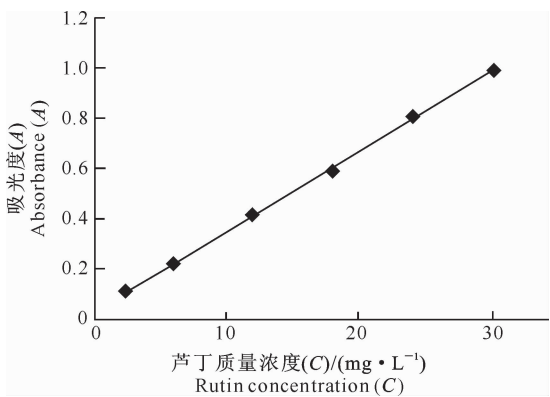


图 1 芦丁标准溶液吸光度与芦丁质量浓度的关系

Fig.1 Relation between concentration of rutin and rutin standard solution absorbance quality

总黄酮质量浓度的检测采用 AlCl₃ 测定法,总黄酮待测液同样按照上述步骤测量,得到吸光度 A 后按下式计算质量浓度 C(mg/L):

$$C = (A - 0.027\ 7) / 0.030\ 9。$$

1.3 东北山樱桃核总黄酮双水相萃取体系萃取条件的选择

1.3.1 PEG 最佳相对分子质量 向东北山樱桃核总黄酮双水相萃取体系中加入 PEG-硫酸铵溶液($m(\text{PEG}) : m(\text{硫酸铵}) = 1 : 1.5$),其中 PEG 相对分子质量选择 400,600,1 000,2 000 和 4 000,在 pH

为 6、温度为 50 ℃的条件下进行萃取试验,分别测定各试验组的上相总体积(V_s)、下相总体积(V_x)、相比(γ)、东北山樱桃核总黄酮在双水相体系两相间的分配系数(K)、总黄酮得率(Y),筛选双水相萃取东北山樱桃核总黄酮的 PEG 最适相对分子质量。

1.3.2 最适硫酸铵加入量 向东北山樱桃核总黄酮双水相萃取体系中加入 PEG-硫酸铵溶液($m(\text{PEG}):m(\text{硫酸铵})=1:1,1:1.2,1:1.5,1:1.7,1:2$),选用相对分子质量为 400 的 PEG,在 pH 为 6、温度为 50 ℃的条件下进行萃取试验,分别测定各试验组的 V_s 、 V_x 、 γ 、 K 和 Y ,筛选双水相萃取东北山樱桃核总黄酮的最适硫酸铵加入量。

1.3.3 最适 pH 值 分别调节东北山樱桃核总黄酮双水相萃取体系中的 pH 为 3.2,4.7,5.6,6.8 和 7.5,加入 PEG-硫酸铵溶液($m(\text{PEG}):m(\text{硫酸铵})=1:1.5$),选用相对分子质量为 400 的 PEG,在温度为 50 ℃的条件下进行萃取试验,分别测定各试验组的 V_s 、 V_x 、 γ 、 K 和 Y ,筛选双水相萃取东北山樱桃核总黄酮的最适 pH 值。

1.3.4 最适萃取温度 设定东北山樱桃核总黄酮双水相萃取体系的工作温度为 35,40,45,50 和 55 ℃,加入 PEG-硫酸铵溶液($m(\text{PEG}):m(\text{硫酸铵})=1:1.5$),选用相对分子质量为 400 的 PEG,在 pH 为 6 的条件下进行萃取试验,分别测定各试验组的 V_s 、 V_x 、 γ 、 K 和 Y ,筛选双水相萃取东北山樱桃核总黄酮的最适温度。

1.4 双水相萃取体系最优萃取条件的验证

根据各单因素试验确定的最佳提取条件,进行

表 1 不同相对分子质量 PEG 对东北山樱桃核总黄酮双水相提取效果的影响

Table 1 Effect of different PEG molecular weights on the extraction of total flavonoids from *C. sachalinensis* Kom

PEG 相对分子质量 PEG molecular weight	V_s/mL	V_x/mL	γ	K	$Y/\%$
400	10.10	10.10	1.00	128.47	99.93
600	10.10	10.30	0.98	173.25	99.92
1 000	10.10	10.80	0.94	218.39	99.95
2 000	10.00	11.20	0.89	291.31	99.93
4 000	9.30	11.80	0.79	386.41	99.87

2.2 硫酸铵加入量对东北山樱桃核总黄酮提取效果的影响

在设定的试验条件下,固定相对分子质量为 400 的 PEG 的质量,改变硫酸铵的质量,获得不同质量比的 PEG-硫酸铵双水相萃取体系,进行萃取试验,各试验组的测定结果如表 2 所示。由表 2 中各组的相比(γ)、分配系数(K)和总黄酮得率(Y),可以得出用于东北山樱桃核总黄酮提取的最佳 PEG-硫

3 次平行试验作为验证性试验,分别测定各试验组的 V_s 、 V_x 、 γ 、 K 和 Y ,以验证最佳提取条件的可靠性和稳定性。

1.5 相关指标的计算

1)萃取液相比(γ)(两相体积比)。计算公式为:

$$\gamma=V_s/V_x。$$

式中: V_s 为上相总体积(mL), V_x 为下相总体积(mL)。

2)萃取液两相间的分配系数(K)。计算公式为:

$$K=C_s/C_x。$$

式中: C_s 为上相中总黄酮质量浓度(mg/L), C_x 为下相中总黄酮质量浓度(mg/L)。

3)萃取液两相间质量比(G)。计算公式为:

$$G=K(V_s/V_x)=K \cdot \gamma。$$

4)萃取液萃取得率(Y)。计算公式为:

$$Y=1/(1+1/G) \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 PEG 相对分子质量对东北山樱桃核总黄酮提取效果的影响

在设定的试验条件下,用相对分子质量不同的 PEG 进行东北山樱桃核总黄酮的萃取试验,各试验组的测定结果如表 1 所示。由表 1 中各试验组的相比(γ)、分配系数(K)和总黄酮得率(Y)可以得出,用于东北山樱桃核总黄酮提取的最佳 PEG 相对分子质量为 400。

酸铵溶液中 $m(\text{PEG}):m(\text{硫酸铵})=1:1.5$ 。

2.3 pH 值对东北山樱桃核总黄酮提取效果的影响

根据设定的试验条件,采用相对分子质量为 400 的 PEG 和 $m(\text{PEG}):m(\text{硫酸铵})=1:1.5$,调节体系 pH 值进行萃取试验,各试验组的测定结果见表 3。由表 3 中各组的相比(γ)、分配系数(K)和总黄酮得率(Y),可以得出 pH 在 5.6~6.8 时提取

效果差异较小。试验发现,萃取液在初始状态下的黄酮提取中不必调节萃取液 pH 值。pH 值均处于上述区间,故认为在东北山樱桃核总

表 2 硫酸铵不同加入量对东北山樱桃核总黄酮双水相提取效果的影响
Table 2 Effect of different ammonium sulfate addition amounts on the extraction of total flavonoids from *C. sachalinensis* Kom

$m(\text{PEG}) : m(\text{硫酸铵})$ $m(\text{PEG}) : m((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	V_S/mL	V_X/mL	γ	K	$Y/\%$
1 : 1	10.50	9.80	1.07	109.70	99.86
1 : 1.2	10.10	10.10	1.00	116.53	99.89
1 : 1.5	10.10	10.10	1.00	128.47	99.93
1 : 1.7	10.10	10.10	1.00	124.73	99.90
1 : 2	10.00	10.50	0.95	128.51	99.82

表 3 体系 pH 值对东北山樱桃核总黄酮双水相提取效果的影响
Table 3 Effect of different pH values on the extraction of total flavonoids from *C. sachalinensis* Kom

pH	V_S/mL	V_X/mL	γ	K	$Y/\%$
3.2	9.60	10.50	0.91	129.30	99.89
4.7	9.90	10.30	0.96	128.18	99.91
5.6	10.10	10.10	1.00	128.47	99.93
6.8	10.00	10.10	0.99	128.51	99.89
7.5	9.10	11.20	0.81	136.32	99.61

2.4 萃取温度对东北山樱桃核总黄酮提取效果的影响

根据设定的试验条件,采用相对分子质量为 400 的 PEG 和 $m(\text{PEG}) : m(\text{硫酸铵}) = 1 : 1.5$,萃取液 pH 值为 6,设定不同系统温度进行萃取试验,

各试验组的测定结果见表 4。由表 4 中各组的相比(γ)、分配系数(K)和总黄酮得率(Y),可以得出最佳提取温度为 55 ℃,但由于 50 与 55 ℃时提取效果相差不大,出于保护总黄酮活性的考虑,最终确定最佳萃取温度为 50 ℃。

表 4 不同萃取温度对东北山樱桃核总黄酮双水相提取效果的影响
Table 4 Effect of different temperatures on the extraction of total flavonoids from *C. sachalinensis* Kom

温度/℃ Temperature	V_S/mL	V_X/mL	γ	K	$Y/\%$
35	10.10	10.10	1.00	128.32	99.92
40	10.10	10.10	1.00	128.74	99.91
45	10.10	10.10	1.00	129.85	99.94
50	10.00	10.20	0.98	131.51	99.96
55	9.80	10.50	0.93	131.68	99.95

2.5 东北山樱桃核总黄酮最佳双水相萃取体系的验证

根据前述试验结果,选择相对分子质量为 400 的 PEG,按 $m(\text{PEG}) : m(\text{硫酸铵}) = 1 : 1.5$ 称取适量硫酸铵加入到萃取液中,在原始 pH 值下,于 50

℃提取 2 h,按上述条件重复 3 次进行平行试验,结果见表 5。结合表 5 中各试验组的相比(γ)、分配系数(K)和总黄酮得率(Y)可以得出:本试验选择出的最佳条件是稳定且适宜的,该体系平均相比为 1.00,平均分配系数为 130.66,平均得率 99.95%。

表 5 东北山樱桃核总黄酮双水相萃取体系的重复验证试验结果
Table 5 Verification test of extraction of total flavonoids from *C. sachalinensis* Kom

序号 No.	V_S/mL	V_X/mL	γ	K	$Y/\%$
1	10.10	10.10	1.00	129.98	99.93
2	10.10	10.20	0.99	130.86	99.96
3	10.10	10.10	1.00	131.13	99.95
平均 Average	10.10	10.13	1.00	130.66	99.95

3 讨论与结论

从本试验结果可以看出,东北山樱桃核总黄酮

PEG-硫酸铵双水相萃取体系的最佳提取条件为:PEG 的相对分子质量为 400,PEG 与硫酸铵的质量比为 1 : 1.5,萃取环境 pH 为 5.6~6.7,萃取温度

为 50 ℃。PEG 在其相对分子质量增大的同时黏度也逐步升高,随着黏度的增大溶液分相变得困难^[10-11]。在相同情况下,PEG 相对分子质量越小,则萃取液相比(γ)越大,两相间的分配系数(K)越小,故在总黄酮得率(Y)相当时应优先选择相对分子质量小的 PEG。另外,本研究也发现,相对分子质量为 4 000 的 PEG 不适宜用于 PEG-硫酸铵双水相体系,可能是相对分子质量为 4 000 的 PEG 为粉末状固体,溶解后黏度过大^[12],不能针对东北山樱桃核总黄酮与硫酸铵间形成有效的竞争性溶解关系,造成得率明显下降,且当黏度过大时萃取液分相模糊,给后续操作增加了难度。

国内有报道认为,用 PEG-硫酸铵双水相分离纯化时,PEG 的加入质量应大于硫酸铵^[13]。本试验发现,选用相对分子质量为 400 的 PEG,当加入硫酸铵的质量较 PEG 质量少时溶液不成相,当两者质量相等时溶液勉强分层成相,但两相界面比较模糊,分离效果较差。经反复试验发现,在 PEG 与硫酸铵质量比为 1 : 1.5 时,分离效果最好,两相间界面清晰明朗,总黄酮得率也得到了有效保证。

在 PEG-硫酸铵双水相的分离纯化中,pH 值是一个至关重要的参数。本研究发现,一方面,当溶液呈弱碱性时,分配系数 K 值增大,分离效果急速下降,得率降低;另一方面,从总黄酮活性考虑,碱性环境易破坏黄酮的母核结构,使总黄酮化合物活性丧失^[14]。由此可知,在整个分离纯化体系中应保持弱酸性环境。

PEG-硫酸铵双水相分离体系属于高聚物-盐-水双水相体系^[8],在试验过程中体系内的含水量均一直维持在较高水平(80%以上),因此在快速竞争分相时不会产生热量^[15],在最佳萃取条件下,整个萃取体系性质温和,可使东北山樱桃核总黄酮化合物的生物活性得到最大限度的保留。此外,PEG 的生物相容性较传统有机溶剂高^[16],界面张力也较传统有机溶剂-水相更低^[17-18],因此该体系可在保持东北山樱桃核总黄酮化合物生物活性稳定的同时,缩短分相时间,更有利于工业化生产中的连续性分离纯化操作。

【参考文献】

- [1] 熊蔚蔚,丁雪馨,张成义,等. 樱桃成分及其药理作用的研究[J]. 北华大学学报:自然科学版,2010,11(5):408-411.
Xiong W W, Ding X X, Zhang C Y, et al. A study on cherry's ingredient and its pharmacological effects [J]. Journal of Beihua University: Natural Science, 2010, 11(5): 408-411. (in Chinese)
- [2] 程秋月,郭 菁,张成义. 黄酮类化合物药理作用的研究[J]. 北华大学学报:自然科学版,2011,12(2):180-183.
Cheng Q Y, Guo J, Zhang C Y. On the pharmacologic effect of flavanoids [J]. Journal of Beihua University: Natural Science, 2011, 12(2): 180-183. (in Chinese)
- [3] 张成义,邵世和,史玉玲. 毛樱桃总黄酮对冻伤及炎症相关性的影响[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(11):977-981.
Zhang C Y, Shao S H, Shi Y L. Effects on frostbite and inflammation dependability of Changbai *Prunus tomentosa* thumb total flavone [J]. Chinese Journal of Immunology, 2010, 26(11): 977-981. (in Chinese)
- [4] Zhang C Y, Chen X, Shi Y L, et al. Anit-frostbite effects of *Prunus tomentosa* Thumb total flavone [J]. Eur J Inflamm, 2011, 9(1): 65-71.
- [5] 孙晶波,徐 晶,张成义,等. 毛樱桃乙醇提取物的试验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):33-35.
Sun J B, Xu J, Zhang C Y, et al. Study on ethanol extracts of *Prunus tomentosa* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16(10): 33-35. (in Chinese)
- [6] 熊蔚蔚,徐铭键,陈 曦,等. 毛樱桃总黄酮超声提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):29-31.
Xiong W W, Xu M J, Chen X, et al. Optimization of ultrasonic extraction technology for total flavones from *Prunus tomentosa* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(15): 29-31. (in Chinese)
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 版[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
CHPC. Chinese pharmacopoeia; 2010 Ed [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010. (in Chinese)
- [8] 巩育军,姚晓青,薛鹏升. 聚乙二醇-硫酸铵双水相萃取结晶紫的研究[J]. 化学与生物工程,2011,28(11):27-29.
Gong Y J, Yao X Q, Xue P S. Study on the extraction behaviors of crystal violet in PEG/ammonium sulfate aqueous two-phase system [J]. Chemistry & Bioengineering, 2011, 28(11): 27-29. (in Chinese)
- [9] 李 敏. 双水相萃取与双水相浮选技术在生物产品及中药材分离测定中的应用[D]. 北京:北京化工大学,2010.
Li M. Application of aqueous two-phase extraction and aqueous two-phase floatation on bioseparation and analysis of natural product [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2010. (in Chinese)
- [10] 张国权,石书奎,欧阳韶晖,等. 荞麦淀粉制备新工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(7):165-172.
Zhang G Q, Shi S K, Ouyang S H, et al. Study on new preparation conditions of buckwheat starch [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(7): 165-172. (in Chinese)
- [11] 王 雷,李 楠,黄登禹,等. 采用双水相系统从发酵液中提取聚谷氨酸[J]. 食品研究与开发,2008,29(11):5-9.
Wang L, Li N, Hang D Y, et al. Extraction and partition of γ -PGA by atps from fermentation broth [J]. Food Research and

- Development, 2008, 29(11): 5-9. (in Chinese)
- [12] 郭 丽, 朱 林, 杜先锋. 微胶囊双水相提取柑桔精油的工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 229-233.
Guo L, Zhu L, Du X F. Optimization of the technology for the extraction of citrus essential oil by microcapsule and aqueous two-phase system [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23(1): 229-233. (in Chinese)
- [13] 陈利梅, 李德茂, 孙秀平. 聚乙二醇/硫酸铵双水相体系萃取葡萄糖氧化酶的研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 32(5): 209-211.
Chen L M, Li D M, Sun X P. Extraction of glucose oxidase by PEG/(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase systems [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 32(5): 209-211. (in Chinese)
- [14] 戈延茹, 曹恒杰. 双水相萃取技术及其在药物提取分离中的应用近况 [J]. 中国现代应用药学, 2009, 26(8): 623-627.
Ge Y R, Cao H J. Application of aqueous two phase extraction in drug extraction and separation [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2009, 26(8): 623-627. (in Chinese)
- [15] 阮 科, 张 翎, 汤蛟宁, 等. 正负离子混合表面活性剂双水相界面张力的研究 [J]. 物理化学学报, 2006, 22(12): 1451-1455.
Ruan K, Zhang L, Tang J N, et al. Interfacial tension of the aqueous two-phase systems of cationic-anionic surfactant mixtures [J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2006, 22(12): 1451-1455. (in Chinese)
- [16] 阮 科, 肖进新, 张 翎, 等. 表面活性剂双水相界面性质的研究 [J]. 化学学报, 2002, 70(6): 961-963.
Ruan K, Xiao J X, Zhang L, et al. Interfacial properties of aqueous surfactant two-phase systems [J]. Acta Chimica Sinica, 2002, 70(6): 961-963. (in Chinese)
- [17] 辜 鹏. 无机盐/低分子有机物双水相体系的研究及其应用 [D]. 湖南湘潭: 湘潭大学, 2008.
Gu P. Study on inorganic salts and low molecular weight organics formed aqueous two-phase system and its applications [D]. Xiangtan, Hunan: Xiangtan University, 2008. (in Chinese)
- [18] 白海鑫, 刘小花, 杨 帆, 等. 通过一步萃取将组蛋白分为多个亚组分的蛋白质组预分离方法的建立 [J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(7): 1314-1321.
Bai H X, Liu X H, Yang F, et al. Prefractionation method to separate proteomic proteins into multigroups by one-step extraction [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2010, 31(7): 1314-1321. (in Chinese)

(上接第 136 页)

- [8] 曾照芳, 罗光丽. 虫草素临床应用研究概述 [J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(9): 666-668.
Zeng Z F, Luo G L. The research survey of clinical application of cordycepin [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Medicine, 2010, 26(9): 666-668. (in Chinese)
- [9] Suger A M, Mccaffrey R P. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine(cordycepin) [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42: 1424-1427.
- [10] Ahn Y J, Park S J, Lee S G, et al. Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against clostridium SPP [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 2744-2748.
- [11] Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation [J]. Anticancer Res, 2006, 26(1A): 43-47.
- [12] Cho H J, Cho J Y, Rhee M H, et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner [J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 558: 43-51.
- [13] 夏春雨, 孙 巍, 刘学铭. 虫草有效成分的研究进展 [J]. 中国食用菌, 2009, 28(2): 3-7.
Xia C Y, Sun W, Liu X M. Research advances on bioactive constituents of *Cordyceps* [J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(2): 3-7. (in Chinese)
- [14] 王建芳, 杨春清. 蛹虫草人工栽培及产品开发研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 268-269.
Wang J F, Yang C Q. Cultivation and product development survey of *Cordyceps sinensis* [J]. Lishizhen Medicine and Material Medical Research, 2006, 17(2): 268-269. (in Chinese)
- [15] 韦会平, 叶小利, 张华英, 等. 从废弃蛹虫草大米培养基中高效提取纯化虫草素工艺条件研究 [J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 220-225.
Wei H P, Ye X L, Zhang H Y, et al. An efficient method of extracting and purifying cordycepin from waste rice medium of *Cordyceps militaris* [J]. Mycosystema, 2009, 28(2): 220-225. (in Chinese)
- [16] 黄子琪, 贡松彬, 桑育黎, 等. 微波法与超声破碎法提取蛹虫草菌丝体中虫草素的比较研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(18): 176-180.
Huang Z Q, Pen S B, Sang Y L, et al. Extraction of cordycepin from fermented mycelia of *Cordyceps militaris*: A comparative study of ultrasonic-assisted and microwave-assisted procedures [J]. Food Science, 2009, 30(18): 176-180. (in Chinese)
- [17] 翁 梁, 温 鲁. 不同 pH 值提取液浸提虫草素研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(11): 274-276.
Weng L, Wen L. Study on cordycepin extraction with different pH value distilling solution [J]. Food Science, 2006, 27(11): 274-276. (in Chinese)