

图 1 麝香酮对照品(A)和凉开胶囊(B)的 GC 图
Fig. 1 GC chromatograms of muscone reference substance (A) and Liangkai Capsule (B)

提取至无色,提取液挥干,残渣以无水乙醇适量溶解,定量转移至 10 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取麝香酮对照品适量,加无水乙醇制成 2.8 mg/mL 的溶液。以无水乙醇稀释 100 倍,摇匀,作为对照品溶液。

2.4 线性关系考察:精密吸取麝香酮对照品溶液 (1.41 mg/mL) 适量,分别稀释 100、50、25、12.5、10 倍,吸取 1 μL,分别注入气相色谱仪,测定。以进样量为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 $Y = 63\ 601 + 9\ 848\ 307 X$, $r = 0.996\ 7$,结果表明麝香酮在 0.014 1~0.141 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,重复进样 5 次,每次 1 μL,测定麝香酮峰面积,结果其 RSD 为 0.93%。

2.6 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,每隔 2 h 测定 1 次,共测定 10 h,RSD 为 1.28%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 重现性试验:精密称取同一批样品 5 份,制备供试品溶液,进样 1 μL,测定峰面积,计算质量分数。结果麝香酮的质量分数为 0.565 mg/g,RSD 为 2.24%。

2.8 加样回收率试验:取本品 2 粒内容物(含麝香酮 0.562 5 mg/g) 约 0.8 g 5 份,精密称定,分别精密加入麝香酮对照品溶液(0.311 mg/mL) 2 mL,按供试品溶液制备方法操作,制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定。结果平均回收率为 96.08%,RSD 为 0.38%。

2.9 样品测定:分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 1 μL,进样,测定,采用外标法计算,结果见表 1。

表 1 凉开胶囊中麝香酮的测定结果 (n=2)

Table 1 Muscone in Liangkai Capsule (n=2)

批号	麝香酮/(mg·粒 ⁻¹)
1	0.225
2	0.155
3	0.165

3 讨论

以麝香酮质谱质核比 m/z 238、223、209 为检测指标,以麝香酮特征离子峰 m/z 238 的丰度为定量指标测定,专属性强,结果准确。而以氢火焰为检测器测定样品,检出峰较多,相同色谱条件,麝香酮峰有干扰。

超声波提取龙胆多糖的研究

江蔚新,朱正兰

(哈尔滨商业大学药学院,黑龙江 哈尔滨 150076)

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *G. scabra* Bunge、三花龙胆 *G. triflora* Pall. 或坚龙胆 *G. rigescens* Franch.

的干燥根及根茎,具有清热燥湿、泻肝胆火的功效,主治湿热黄疸、阴肿阴痒、带下、强中、湿疹搔痒、目赤等症^[1]。龙胆除含有裂环环烯醚萜类和环烯醚类

化合物外,还含有生物碱、挥发油、多糖等成分^[2]。目前多糖提取主要采用传统水浸提取法,该方法存在费时长、耗能多的缺点。有文献报道将超声波应用于对中药苷类成分的提取中可以提高苷类的提出率并缩短提取时间^[3]。初步药理实验表明,龙胆多糖有一定的免疫增强作用。本研究考察超声波在龙胆多糖的提取中应用的可行性,对实验条件进行优化,并和传统水提法进行比较。

1 仪器与试剂

UV—2102C 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;AS—3120 超声波清洗器,天津奥特塞恩斯仪器有限公司。试剂均为 AR 级。龙胆药材购自哈尔滨三棵树药材市场,经我院中药鉴定室沈志滨副教授鉴定为条叶龙胆。

2 方法与结果

2.1 超声波提取龙胆多糖:称取一定质量龙胆粉末,加入蒸馏水适量,分别用一定频率的超声波超声处理,提取液滤过、浓缩、去蛋白、乙醇沉淀,得粗品多糖,真空干燥,即得。

2.2 龙胆多糖的测定

2.2.1 葡萄糖对照品溶液的制备:精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖 100 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入蒸馏水至刻度,摇匀,备用。

2.2.2 龙胆多糖供试品液的制备:精密称取干燥至恒重的龙胆多糖 23.80 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

2.2.3 苯酚溶液的制备:取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 与碳酸氢钠 0.05 g,蒸馏收集 18 ℃ 馏分,称取此馏分 10 g,加水 150 g,置于棕色瓶中备用。

2.2.4 标准曲线的绘制:精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 置于 50 mL 量瓶中,加入蒸馏水至刻度,摇匀。精密吸取各溶液 2 mL 于 10 mL 具塞刻度试管中,分别加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀。迅速加入 5 mL 浓硫酸,振摇 5 min,定容,置沸水浴中加热 15 min,然后置冷水浴中冷却 30 min,定容,随行空白,在 490 nm 处测定吸光度^[4]。数据经回归处理后,得回归方程: $A = 12.886C + 0.0015$, $r = 0.9997$ 。

2.2.5 换算因子的测定:精密量取多糖供试品溶液 0.5 mL,按照“标准曲线的绘制”项下的方法测定吸光度值,计算葡萄糖的质量浓度,得换算因子 $f = 5.4185$ 。

2.2.6 多糖的测定:精密称取各样品溶液 1 mL,分别置于 10 mL 具塞刻度试管中,按照“标准曲线的

绘制”项下方法测定吸光度值,按下式计算样品中多糖的质量分数。

$$\text{多糖} = \frac{C \cdot D \cdot f}{W} \times 100\%$$

式中 C 为样品溶液的葡萄糖的质量, D 为样品溶液的稀释倍数, f 为换算因子, W 为样品的质量

2.3 超声波法提取多糖的单因素考察

2.3.1 超声时间对多糖提取的影响:称取相同质量龙胆粉末 5 份,加入蒸馏水适量后分别用一定频率的超声波超声处理 15、30、45、60、75、90、120 min,后处理同 2.1。结果见图 1。可知,超声提取 75 min 时提出量最高,多糖提出率可达 14.4%。而后随着超声时间的延长,龙胆多糖的提取率无多大变化,并有缓慢下降之趋势。

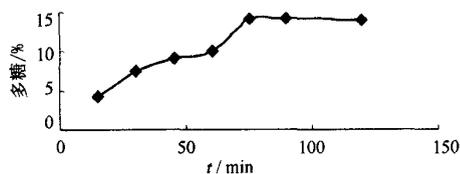


图 1 提取时间对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of extracting time on polysaccharide yield

2.3.2 pH 值对多糖提取的影响:称取相同质量龙胆粉 5 份,分别加入蒸馏水适量,然后分别调节 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,超声处理 75 min,后处理同 2.1。结果见图 2。可知,超声提取 pH 值为 7 时提取率最高,粗多糖提出率可达 14.2%。

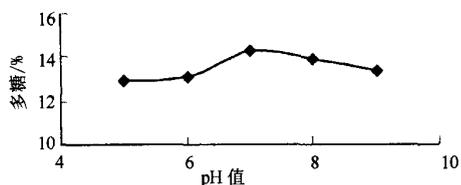


图 2 pH 值对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of pH value on polysaccharide yield

2.3.3 加入蒸馏水量对多糖提取的影响:称取相同质量龙胆粉 5 份,分别按药材量与蒸馏水质量体积比为 1:20、1:40、1:60、1:80、1:100 加入蒸馏水,超声处理 75 min,后处理同 2.1。结果见图 3。可知,超声提取加入蒸馏水量为龙胆粉:蒸馏水(1:60)时提取率最高,粗多糖提出率可达 14.1%。

2.4 提取条件的优化:在单因素考察的基础上,称取相同质量的龙胆粉 9 份,分置于 9 个烧杯中,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行优化,结果见表 1。正交实验结果表明在龙胆粉末中加入 60 体积的水,在 pH 7.0 的条件下用超声波提取 75 min 得到的龙胆多糖的量最大。根据极差分析结果,影响龙胆多糖提出率的 3

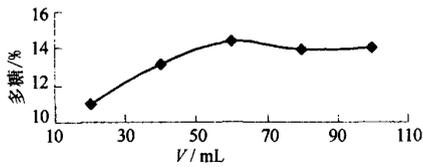


图 3 水体积对多糖收率的影响

Fig. 3 Effect of water volume on polysaccharide yield

表 1 $L_9(3^4)$ 正交优选设计及结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal design and results

试验号	A 超声时间/min	B pH 值	C 加入蒸馏水量/倍	D (空白)	多糖/%
1	1(60)	1(6.0)	1(40)	1	145.2
2	1	2(7.0)	2(60)	2	173.7
3	1	3(8.0)	3(80)	3	158.1
4	2(75)	1	2	3	156.0
5	2	2	3	1	148.1
6	2	3	1	2	139.2
7	3(90)	1	3	2	149.2
8	3	2	1	3	142.9
9	3	3	2	1	138.5
K_1	0.477 0	0.450 4	0.427 3		
K_2	0.443 3	0.464 7	0.468 2		
K_3	0.430 6	0.435 8	0.455 4		
k_1	0.159 0	0.150 1	0.142 4		
k_2	0.147 8	0.154 9	0.156 1		
k_3	0.143 5	0.145 3	0.151 8		
R	0.015 5	0.009 6	0.013 7		

个因素中(pH、提取时间、加水量)以提取时间影响最大,其次是加水量,影响最小的是 pH。

2.5 传统方法提取与精制龙胆多糖:将干燥粉碎后的龙胆生药样品称取 100 g,用 500 mL 石油醚回流脱脂 2 次,每次 1 h。回收石油醚,药渣挥干溶剂后用 80%乙醇 500 mL 浸渍过夜,回流提取 2 次,每次 2 h。滤过,将药渣用 2 500 mL 蒸馏水 90 °C 温浸提取 60 min,再用 500 mL 蒸馏水 90 °C 重复温浸提取 60 min,滤过,合并滤液。将此溶液减压浓缩至 200 mL 用氯仿萃取多次以除去蛋白质,再加 1%活性炭脱色 2 次,滤过,滤液加入 95%乙醇使乙醇的体积分数达到 80%,静置过夜,残渣依次用 95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤,真空干燥,得精制龙胆多糖。与超声提取的结果比较,见表 2。

3 讨论

3.1 超声波法提取龙胆多糖时,超声时间不宜过

表 2 两种提取方法结果比较 (n=5)

Table 2 Comparison of two extracting methods (n=5)

方法	粗多糖/g	提取率/%	多糖/%
水提	0.152±0.021	15.20±2.10	19.80±1.57
超声	0.168±0.022	16.80±2.20*	28.19±1.52**

与水提相比较: *P>0.05 **P<0.05

*P>0.05 **P<0.05 vs water extracting

长。超声处理 75 min 时提取率达到最大,随着处理时间的延长,提取率反而下降。原因可能是由于超声波具有较强的剪切作用,长时间的作用会使大分子的多糖断裂,从而在后处理的过程中的损失增大而影响多糖的提出率。

3.2 龙胆多糖的组成十分复杂,由多种单糖组成。目前最常用的测定方法是蒽酮-硫酸比色法和苯酚-硫酸比色法。但在实际工作中,特别是在测定天然产物中的糖测定时,测得的结果与实际情况不符。原因是这两种方法都是以葡萄糖作为对照,这对含有多种单糖的天然多糖来说必将使测量值与实际值不符。本实验中有将近 70%的产物未被检出,这是多糖测定方法的研究中经常遇到的问题^[5]。如果在制作标准曲线时能够根据多糖的组成,用多种单糖适当混合后作为对照,就可以在一定程度上改善这种情况。

3.3 植物多糖作为免疫增强剂已引起人们的广泛关注^[5],临床用于肿瘤病人的治疗已取得较好疗效。龙胆多糖可否作为免疫增强药物应进一步深入研究。

References:

- [1] Ch P (中国药典). Vol 1. 2000.
- [2] Wang L, Zhou L. The general situation of *Gentiana genus* plant chemical research [J]. *Shaanxi Forest Sci Tech* (陕西林业科技), 2001 (3): 71-78.
- [3] Liao J M, Zhang J, Shen Z L. Extraction of *Laminaran* by supersonic method [J]. *Pharm Biotech* (药物生物技术), 2002, 9 (3): 157-160.
- [4] Lin Y, Wu M Y, Wu W, et al. The correctness research on the polysaccharide content determination of natural product [J]. *Nat Prod Res*, 1996, 8 (3): 5.
- [5] Zhou J H. *Chinese Herbs Pharmacological and Clinical Research Advance* (中药药理与临床研究进展) [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 1995.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅