

至灵胶囊中多糖的测定

李繁荣

(杭州市第三人民医院, 浙江 杭州 310009)

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Burk.) Sacc 系寄生在鳞翅目蝙蝠蛾昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体, 是我国传统名贵的强壮滋补品。天然虫草及虫草菌丝体中所含的虫草多糖具有广泛药理作用^[1~3]。至灵胶囊系采用青海产天然冬虫夏草中分离出虫草菌种经人工培养液体发酵制得。本实验对至灵胶囊中多糖进行提取, 并采用硫酸-苯酚法测定粗多糖中多糖^[4]的量。

1 仪器与材料

722 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)、分析天平(上海上平仪器公司)、D-无水葡萄糖, 苯酚(用前蒸馏), 其余试剂为分析纯。至灵胶囊由杭州中新药业公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 2.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀备用。

2.2 虫草多糖的提取和精制: 精密称取至灵胶囊粉末 100 g, 置索氏提取器中, 加乙醚 100 mL 于圆底烧瓶中, 回流提取至无色。药渣挥干乙醚, 用 8 倍量沸水提取 2 次, 每次 30 min, 趁热滤过, 合并滤液, 浓缩至 15 mL, 加乙醇至乙醇体积分数为 80% (2 次), 冰箱静置过夜, 滤过, 并加 0.2% 活性炭脱色。沉淀分别用无水乙醇、丙醇依次洗涤 3 次, 每次 5 mL, 60 ℃ 烘干, 得灰白色粗多糖, 得率 4.9%。

2.3 供试品溶液制备: 精密称取虫草粗多糖 25 mg, 用蒸馏水溶解, 置 50 mL 量瓶中稀释至刻度, 摇匀。

2.4 线性关系考察: 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 分别置 10 mL 具塞刻度试管中, 各用重蒸馏水补足至每管 1.0 mL, 再分别加入 8% 苯酚 1.0 mL 摇匀, 浓硫酸 5.0 mL, 充分摇匀后放置 5 min, 置沸水浴中加热 15 min, 取出立即用冷水冷却至室温。另取蒸馏水 1.0 mL, 加苯酚、浓硫酸同法操作为一空白对照, 于 490 nm 处测定吸光度。以质量浓度为横坐标, 吸光度为

纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = 0.0702X - 0.0314$, $r = 0.989$, 线性范围为 10~70 μg 。

2.5 精密度试验: 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 按上述条件进行测定, 结果吸光度的 RSD 为 0.98%。

2.6 稳定性试验: 取供试品溶液 1.0 mL, 按线性关系考察项下操作, 每隔 30 min 测定 1 次吸光度, 连续 2 h, 结果吸光度的 RSD 为 2.13%。表明供试品溶液在 2 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 取同一批号至灵胶囊 6 份, 制备供试品溶液, 测定, 结果吸光度的 RSD 为 1.45%。

2.8 加样回收率试验: 取粗多糖溶液 6 份, 各 1 mL 于 10 mL 具塞试管中, 以 1.0 mL 蒸馏水作空白对照, 各加苯酚-浓硫酸试液 4.0 mL, 摇匀, 于 490 nm 测定吸光度, 计算回收率为 99.37%, RSD 为 1.78。

2.9 换算因子的测定: 取多糖溶液 1.0 mL 和苯酚-浓硫酸试液 4.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 混匀, 按线性关系考察项下操作, 测定吸光度值, 计算多糖溶液中葡萄糖。按下式计算得换算因子 $f = 3.654$, RSD 为 1.40% ($n = 6$)。

$f = \text{多糖质量} / (\text{溶液中葡萄糖质量浓度} \times \text{溶液体积} \times \text{稀释因数})$

2.10 多糖的测定: 按下式计算 3 批至灵胶囊中多糖分别为 454.8、428.6、481.0 mg/g。

多糖质量分数 $= C \cdot V \cdot D f / W$

C 为供试品溶液中葡萄糖质量浓度, V 为供试品溶液的体积, D 为溶液稀释因数, f 为换算因子, W 为样品质量

3 讨论

对于虫草多糖的提取和精制, 实验中发现与使用的乙醇体积分数、提取液温度、静置时间直接相关, 当乙醇体积分数调整至 80%, 温度 0~4 ℃, 静置 10~15 h, 沉淀基本完全。

实验表明, 硫酸-苯酚法测定至灵胶囊中多糖切实可行。有报道天然虫草中其多糖约为 2%^[5], 至灵胶囊中的多糖可能高于药材。但借助人工培育的虫草菌丝体, 其所含多糖药理活性是否与天然完全一

致,尚需进一步研究。

References:

- [1] Ma L, Liu C G, Yao X M. Effects of *Cordycep sinensis* polysaccharide on immune function of mice [J]. *J Health Toxicol* (卫生毒理学杂志), 1995, 9 (3): 162.
- [2] Yan J L, Li H. Effects of *Cordycep sinensis* polysaccharide on the expression of hepatic stellate cell nuclear factor-kappa B and TNF- α [J]. *J Fudan Univ: Med Sci* (复旦大学学报:医学版), 2003, 30 (1): 27.
- [3] Jing D D, Qiu D K, Xiao S D. Regulative effect of *Cordycep sinensis* polysaccharide on IL-2, IL-2R and IFN- γ in peripheral blood [J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 1997, 17 (2): 127.
- [4] Lai Y B, Wang Q. Determination and analysis of *Cordycep militaris* (Fr) Link's amylose content [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23 (7): 517.
- [5] Shen X Y, Li Z L, Tian J. Analytical comparison of effective constituent of Chinese caterpillar fungus and *Cordyceps hypha* [J]. *J Shanxi Univ: Nat Sci* (山西大学学报:自然科学版), 1998, 21 (1): 80.

均匀设计优化半仿生提取葛根芩连汤的工艺研究

孟宪生, 曹爱民, 王海波, 包永睿

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 沈阳 110032)

葛根芩连汤由葛根、黄芩、黄连、甘草 4 味中药组成, 具有解肌清热、止泻止痢的功效, 临床上主要用于泻泄痢疾、身热烦渴、下利臭秽等证。近年来, 在中医药配伍研究、工艺优化、药物筛选和药理作用等方面的研究中, 均匀设计法运用越来越广泛。“半仿生提取法”是近几年提出的新方法, 它是从生物药剂学的角度将整体药物研究法与分子药物研究法相结合, 模拟口服药物经胃肠道转运吸收的环境, 采用活性指导下的导向分离方法, 是为经消化道口服给药的制剂设计的一种新的提取工艺。因此本实验采用半仿生提取法对葛根芩连汤的工艺进行了筛选。

1 仪器与药品

日本岛津 LC-6A 液相色谱仪, 中北工作站, SPD-6AV 检测器, SIL-6A 自动进样器。

葛根(粉葛)、黄芩、黄连、甘草药材经辽宁中医药大学药学院鉴定教研室翟延君教授鉴定, 分别为

粉葛 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根; 黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根; 黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根; 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 半仿生法提取条件考察: 葛根、黄芩、黄连、甘草药材中分别以葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸作为指标^[1]。根据文献, 采用原处方(葛根 24 g、黄芩 9 g、黄连 9 g、甘草 6 g)的 2 倍处方量, 采用半仿生提取法^[2]进行提取, 采用均匀设计法设计试验。

2.2 试验设计: 每个实验组提取 3 次, 根据实验安排表选择每次提取溶剂 pH 值、溶剂量和提取时间。按均匀设计法^[3]选择 $U_{11}(11^{10})$ 均匀设计表, 再按照使用表的规定, 选取 1、2、3、5、7 列组成 $U_{10}(10^{15})$ 表。将因素、水平值对应填入均匀设计表, 进行试验。实验结果见表 1。根据处方中药物配伍规律, 规定葛根

表 1 均匀设计及结果表

Table 1 Uniform design and results

实验组	X_1 第一次提取 pH 值	X_2 第二次提取 pH 值	X_3 第三次提取 pH 值	X_4 提取时间/min	X_5 溶剂/倍数	葛根素/%	黄芩苷/%	小檗碱/%	甘草酸/%	评分
1	1	2	3	30	6	0.083	3.04	2.97	0.668	45.332
2	2	4	6	30	8	0.066	2.84	1.14	1.20	32.896
3	3	6	9	25	12	0.121	3.46	1.09	1.14	46.021
4	4	8	1	25	4	0.134	4.04	2.79	3.35	62.091
5	5	10	4	20	6	0.121	3.12	0.51	4.48	44.692
6	6	1	7	20	10	0.216	4.1	4.79	1.09	96.06
7	7	3	10	15	12	0.071 3	2.3	0.46	3.42	30.156
8	8	5	2	15	4	0.097 9	3.62	1.53	2.07	44.759
9	9	7	5	10	8	0.112	4.6	0.76	4.85	51.748
10	10	9	8	10	10	0.134	5.92	1.33	9.33	66.791

收稿日期: 2005-12-22

作者简介: 孟宪生(1964—), 男, 副教授, 2003 级生药学博士研究生, 主要从事中药工艺及质量标准研究。Tel: (024) 31207124