

法提取优于加热回流法提取,同时我们对样品提取时间的含量进行了考察,根据考察结果确定超声波震荡法提取时间为 50 min。

3.2 流动相的选择^[1,2] 比较了甲醇-水和乙腈-水 2种系统,发现前一种流动相系统分离效果并不比后一种差,而且前一种流动相系统的成本低,所以确定甲醇-水系统为本实验的流动相系统。在此基础上,考虑主峰分离效果、出峰时间等因素,调节甲醇与水的比例,确定甲醇-水-冰醋酸的体积比为 18:

81:1。

参考文献:

- [1] 杨能英,夏新华. HPLC测定小儿止咳颗粒中岩白菜素的含量 [J]. 中成药, 2003, 25 (7): 591.
- [2] 熊佐章. HPLC法测定复方岩白菜素片的含量 [J]. 基层中药杂志, 2002, 16 (2): 11.

收稿日期: 2006-04-24

冬虫夏草多糖测定方法的研究进展

刘桂萍 (总参管理保障部中心门诊部药局,北京 100082)

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2008)01-0053-03

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.^[1]寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体,具有补肺益肾、止血化痰、抗肿瘤、提高机体免疫力等功效。现代药物研究表明虫草中含有甘露醇、腺苷、腺嘌呤、尿苷、鸟苷、尿嘧啶、麦角甾醇、氨基酸、虫草素及微量元素、矿物质等成分^[2]。近年研究证明,虫草除了富含蛋白质、氨基酸、维生素及钙、铁、锰、锌、硒等微量元素外,还含有虫草酸、虫草素、虫草多糖和 SOD 等生物活性物质,具有扩张血管、镇静、抗菌、降血压等功效。特别是其功效成分虫草多糖具有抗肿瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、抗放射、降血糖、降血脂等活性。

国内对冬虫夏草部分活性成分的含量研究情况已有综述报道^[3]。但冬虫夏草多糖的检测方法近年发展很快,特对其研究进展作一综述。

多糖的检测,目前尚无一个统一的方法。多糖的检测方法一般可分为两大类,一类是直接测定多糖本身,如高效液相色谱法和酶法。另一类是利用杨酸法、斐林法、苯酚-硫酸法、硫酸-恩酮法等。前者测定方法准确,有效成分清晰,但需昂贵的仪器、多糖纯品和特定的酶,操作步骤繁琐,在应用中受到限制。后者虽然测定结果灵敏度有限,但方法简单、快速,无需多糖纯品和高级仪器,因而被广泛采用。

1 冬虫夏草多糖的含量测定

1.1 硫酸-苯酚法 鲁晓岩^[4]采用活性炭脱色、醇

析、Sevag法沉淀蛋白,用苯酚-硫酸法测定其含量,并用葡萄糖作为标准。实验结果表明,方法简单快速、灵敏度高、重现性较好。该方法多糖样品用水溶解,80%乙醇醇析,Sevag法沉淀蛋白,在浓硫酸作用下迅速脱水生成糠醛衍生物,然后和苯酚缩合反应显橙黄色,与葡萄糖标准系列比较定量。样品处理液中加入苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速加浓硫酸 5 mL,摇匀,放置 5 min,置沸水浴中加热 15 min,取出冷却至室温,于 490 nm 处,以空白校正零点,用 1 mL 比色皿测吸光度。计算方法为:

多糖 (以葡萄糖计) (mg/100 mL)

$$= \frac{A}{V_1/100 \times V_2 \times 1000} \times 100$$

式中: A 多糖含量, V₁ 样品取样量, V₂ 样品处理液吸取体积。

冬虫夏草多糖是一种复合多糖,葡聚糖含量高,可采用 490 nm 的葡萄糖比色范围比色。当然,总多糖的测定与葡萄糖有差别,需用换算因子换算。

1.2 蒽酮-硫酸法 采用蒽酮-硫酸法测定多糖的含量,反应原理为多糖在浓硫酸作用下,水解成单糖分子,并迅速脱水生成糠醛,然后糠醛与蒽酮缩合成糠醛衍生物,呈蓝绿色,颜色稳定,在 625 nm 处有特征吸收。

刘春泉^[5]以葡萄糖为标准,采用蒽酮-硫酸法测定北冬虫夏草子实体粗多糖含量。北冬虫夏草粗多糖液是经乙醚脱脂(脱色)、热水提取、乙醇沉淀和活性炭脱色后制得。结果表明,葡萄糖含量在 0.01~0.08 mg/mL 时有良好的线性关系,线性方程 y

= 9.897 1 x + 0.025 6, 相关系数 $r = 0.999 8$ 。对不同的冬虫夏草样品多糖含量进行测定, 试验精密度好、重现性高, 回收率达 94% ~ 96%。脱色处理对北冬虫夏草多糖液的测定影响较大, 2次脱色后用蒽酮硫酸法测定多糖含量效果较好。

冯祚臻^[6]为控制冬虫夏草多糖脂质体口服液的质量和保证其疗效, 用蒽酮硫酸法测定冬虫夏草多糖含量, 用透析法测定其包封率。采用透析法测定冬虫夏草多糖的包封率, 经硫酸钼酸铵反应和 Fehling 反应检验表明本法可靠。硫酸钼酸铵反应原理为有机磷和钼酸铵在酸性条件下反应, 生成有颜色的磷酸钼酸络合物。Fehling 反应原理为多糖类遇浓硫酸被水解成单糖, 单糖被浓硫酸脱水闭环, 形成糠醛化合物, 在浓硫酸存在条件下与 萘酚发生酚醛缩合反应, 生成紫红色缩合物。

白云娥^[7]用硫酸蒽酮比色法于波长 624 nm 处测定冬虫夏草中多糖的含量。结果表明冬虫夏草多糖含量为 42.0% ($n = 5$, 以粗多糖中多糖含量计算), 平均加样回收率为 99.2%, RSD 为 2.3%。该法测定操作简单、准确, 重现性、稳定性好。多糖的含量测定可以为冬虫夏草的应用提供一基础性依据。

1.3 高效液相法 李绍平^[8]采用高效液相色谱示差检测法测定天然和人工冬虫夏草多糖各组分的分子量分布及其构成比, 采用 TSK-Gel G 3000SW_{xl} 分析柱 (5 μ m, 7.8 mm \times 30 cm) 和 TSK-Gel G3000 SW_{xl} 预柱 (7 μ m, 6.0 mm \times 4 cm), 流动相为含 0.1 mol/L 硫酸钠的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8), 流速 1 mL/min, 柱温和检测器温度均为 25 $^{\circ}$ C, 示差检测, 进样量 25 μ L, GPC 软件分析。结果表明, 天然虫草多糖各组分构成比相似, 均以大分子量 ($> 1.5 \times 10^5$) 组分为主 ($> 50\%$); 人工虫草多糖各组分构成则差异明显, 其中华东产人工虫草多糖与天然虫草多糖构成最为相似。天然和人工虫草多糖构成存在一定差异, 多糖组分的构成比应作为虫草的质量控制指标。

2 冬虫夏草多糖组分的分析^[9]

用 1% 的虫草多糖溶液离心去沉淀, 以无水乙醇分级沉淀虫草多糖。当乙醇浓度为 40% 时出现沉淀, 乙醇浓度每次递增 5%, 至 75% 时沉淀完全, 共分出 8 个分级组分, 以 Sephadex G-100 柱层析检测成分是否单一。40% 乙醇浓度的沉淀物为单一峰, 定名为 PC, 其他 7 个组分为多峰, 合并后进行进一步的分离纯化, 定名为 PC。PC 的水溶液以 2.6 \times 40 cm 的 DEAE-Biogel A 柱层析分离, 以

蒸馏水进行柱平衡, 依次以蒸馏水、0.1 M NaCl 和 1 M NaCl 洗脱下 3 个含糖峰, 然后用 2.6 \times 60 cm Sephadex G-50 柱层析各分成两个组分。蒸馏水洗脱成分为 PCA 和 PCA, 0.1 M NaCl 洗脱组分为 PCB 和 PCB, 1 M NaCl 洗脱成分为 PCC 和 PCC 多糖组分的物理性状见表 1。

表 1 虫草多糖组分的物理性状

组分	颜色	水溶性
粗多糖	棕	部分水溶
PC	白	易溶于碱
PCA	白	水溶
PCA	土黄	水溶
PCB	白	水溶
PCB	棕	水溶
PCC	褐	水溶
PCC	褐	水溶

对分离纯化出的 7 种多糖组分进行不连续盘状凝胶系统电泳, 蛋白质染色采用考马斯亮兰 G250 改良法, 多糖染色采用 D. Racusen 法。结果表明, 7 个组分都呈单一带, 而且糖染色和蛋白质染色区带位置相同, 表明样品达到电泳纯。根据所分离样品分子量的大小差异, 选用 3 种凝胶进行柱层析: PC 和 PCA 进行 Sepharose 4B 柱层析; PCB 和 PCC 进行 Sephadex G-100 柱层析; PCA、PCB 和 PCC 进行 Sephadex G-50 柱层析。结果均为均一组分, 表明样品达到了层析纯。

以柱层析法测定样品的分子量, PC 分子量约为 35 万, PCA 分子量约为 55.6 万, PCA 分子量约为 1.67 万, PCB 分子量约为 6 万, PCC 分子量约为 5.7 万, PCC 分子量太小未测出。

采用纸层析定性测定了部分样品的单糖组成, 以气相色谱分析法定性和定量测定了单糖组成及比例。PC 中所含甘露醇、半乳糖、葡萄糖的摩尔比为 1: 0.65: 0.30; PCA 中含甘露糖和半乳糖的摩尔比为 1: 1; PCB 中含甘露糖和半乳糖的摩尔比为 1: 0.73; PCA 中含甘露糖、半乳糖、葡萄糖的摩尔比为 1: 0.71: 0.42; PCB 中含甘露糖、半乳糖、葡萄糖的摩尔比为 1: 0.51: 0.50。

对几种主要的大分子多糖组分 PCA、PCB 和 PC 进行酸水解后测定了其氨基酸组成, 详见表 2。

通过对样品红外光谱分析和核磁共振分析可以得出以下结果: PCA 的结构特点为, 以 1-4 连接的吡喃甘露醇构成主链, 侧链由单一的或多个单位的呋喃半乳糖组成, 侧链与主链连接点有 1-2、1-3、1-6

(下转第 68 页)

合理处方,对不合理用药及时予以干预。这就从立法上为临床药师在开展不合理处方分析等临床药学工作方面奠定了基础,使临床药师在工作中能做到有法可依。当然临床药师要胜任临床药学工作,就必须不断加强学习临床医学知识,掌握与医师和患者沟通的能力,势必也会引起传统药学教育模式的改革。

4 讨论

07版《处方管理办法》的出台,为规范处方管理,提高处方质量,促进合理用药,保障医疗安全打下坚实的法律基础。对于广大的药学工作者来说,要以07版《处方管理办法》的颁布为契机,顺应时代变化,以主人翁的姿态投入到医院药学工作中,大

力开展药学服务工作,积极倡导和努力实践全方位和全程化的医院药学服务,积极主动参与临床药学服务工作,保证临床用药的安全、有效、经济、合理。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 处方管理办法 [S]. 卫生部第 53 号令.
- [2] 卫生部,国家中医药管理局编. 处方管理办法(试行) [S]. 卫医发 [2004]269号.
- [3] 孙冲. 《处方管理办法(试行)》的新规定及执行中存在的问题 [J]. 泰山卫生, 2005, 29(6): 11.
- [4] Covington IR. Nonprescription drug therapy: issues and opportunities [J]. Am J Pharm Educ, 2006, 70(6): 137.

收稿日期: 2007-04-27

(上接第 54 页)

表 2 虫草多糖组分 PCA、PCB 和 PC 的氨基酸组成 (mg/100g 样品)

组分	PCA	PCB	PC
asp	1 833. 72	2 494	6 956. 11
thr	5 230. 69	6 111	4 738. 43
ser	3 226. 4	4 002. 92	3 611. 48
glu	2 470. 81	5 864. 08	8 787. 96
gly	1 556. 05	2 701. 42	3 595. 83
ala	1 273. 49	1 491	2 565. 83
cys	471. 86	1 189. 42	- -
val	2 101. 82	4 896. 3	3 648. 33
met	370. 7	648. 83	389. 72
ile	638. 72	1 805. 92	2 356. 94
leu	682. 67	1 503. 17	3 333. 24
tyr	629. 42	1 839. 57	1 220. 65
phe	157. 91	215. 69	4 585. 93
lys	648. 61	1 140. 75	2 067. 31
NH ₃	973. 95	927. 41	2 658. 8
His	587. 56	1 081. 58	- -
Arg	193. 95	1 602. 75	9 610. 83
Pro	2 115. 81	4 261. 91	2 688. 15
tp	756. 95	- -	- -

等连接方式,而且侧链偶尔夹杂一些吡喃甘露醇或吡喃半乳糖与主链以 1-2、1-3 方式连接; PCB 的结构特点为,以 1-4 连接的吡喃甘露醇构成主链,侧链

主要由吡喃半乳糖构成,也有少量吡喃甘露醇或吡喃半乳糖构成,侧链重复性很多,即分子中分支很多,为高度分支的半乳甘露聚糖; PCA 含有 6 个单糖分子,既有吡喃形式,又有呋喃形式,是 3 分子甘露醇、2 分子半乳糖和 1 分子葡萄糖构成多链连接的杂多糖; PCB 的结构特点为,4 分子的单糖 (2 分子甘露糖、1 分子半乳糖、1 分子葡萄糖)以 1-3 方式线性连接起来。

参考文献:

- [1] 中国药典 2000 年版 [S]: 一部 86, 二部 89.
- [2] 阴健. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993: 227.
- [3] 魏玲, 赵应华, 郭遂. 冬虫夏草活性成分的含量研究概况 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(5): 359.
- [4] 鲁晓岩. 硫酸苯酚法测定北冬虫夏草多糖含量 [J]. 食品工业科技, 2002, 23(4): 69.
- [5] 刘春泉, 李大婧, 刘荣. 蒽酮硫酸法测定北冬虫夏草多糖含量 [J]. 江苏农业科学, 2006, 34(2): 122.
- [6] 冯祚臻, 官东秀, 张晓婷. 冬虫夏草多糖脂质体口服液的质量标准 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(3): 203.
- [7] 白云娥, 李青山, 王毅, 等. 冬虫夏草多糖的含量测定 [J]. 山西医科大学学报, 2000, 31(2): 129.
- [8] 李绍平, 张平, 夏泉, 等. 天然和人工冬虫夏草多糖组分的 HPLC 分析 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(1): 20.
- [9] 袁建国, 程显好, 侯永勤, 等. 冬虫夏草多糖的研究开发 [J]. 精细与专用化学品, 2002, 10(7): 15.

收稿日期: 2007-03-30