

复方虫草多糖含片质量控制方法的研究

苏颖¹, 宋艳², 黄蕾¹, 邹豪³, 周选围¹ (11 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200030; 2 黑龙江新医圣制药有限公司, 黑龙江 鸡东县 158200; 3 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 制定复方虫草多糖含片(北冬虫夏草多糖提取物, 罗汉果提取物, 西洋参提取物, 茶多酚)的质量控制方法。方法: 对罗汉果, 西洋参进行薄层鉴别; 茶多酚进行显色鉴别; 采用苯酚硫酸法测定复方虫草多糖含片中虫草多糖的含量。结果: 通过方法学考察, 虫草多糖浓度范围内线性关系良好, 相关系数 0.996 4, 平均回收率为 97.13% RSD = 11.41% (n = 5)。结论: 方法简便、准确、重现性高, 可用于控制复方虫草含片的质量。

关键词 虫草多糖; 罗汉果提取物; 西洋参提取物; 茶多酚; 质量控制

中图分类号: R944.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)03-0191-04

Quality control for compound cordycepic polysaccharide buccal tablets

Su Ying¹, Song Yan², Huang Lei¹, Zou Hao³, Zhou Xuanwei¹ (11 Department of Food Technology and Science, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 21 Heilongjiang Xingyisheng Sheng Pharmaceutical Co., Ltd, Jidong 158200, China; 31 College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective To establish a quality control method for compound cordycepic polysaccharide buccal tablets (cordycepic polysaccharide, extract of *Grosvenor monardica*, fruit *Panax quinquefolium* extract, and tea polyphenols). Methods The extract of *Grosvenor monardica* and *Panax quinquefolium* L. were identified by TLC. Tea polyphenols was identified according to the principle of display reaction between tea catechins and vanillin. Cordycepic polysaccharide was determined by spectrophotometry method. Results The methodological study showed that the calibration curve of polysaccharide was linear in the concentration range ($r = 0.9964$). The average recovery was 97.13% with the RSD of 11.41% ($n = 5$). Conclusion The method is simple, accurate, repeatable with and high precision. This method can be used for quality control for compound cordycepic polysaccharide buccal tablets.

KEY WORDS cordycepic polysaccharide, extract of *Grosvenor monardica*, fruit *Panax quinquefolium* extract, tea polyphenols, quality control

人类步入 21 世纪以来, 回归自然、崇尚天然药物的世界性潮流已悄然兴起, 发展传统医药、开发功能性食品已成为各国政府及民众的共识^[1]。真菌多糖是广泛存在于真菌中的具有众多生物活性的一大类物质^[2]。虫草多糖 (cordycepic polysaccharide, CP) 是指虫草无性型及其相关真菌多糖^[3], 作为虫草中含量最高的生物活性物质, 近年来引起了人们对它的极大兴趣和广泛关注^[4~7]。

复方虫草多糖含片是黑龙江新医圣制药有限公司以虫草多糖为主要原料, 附加罗汉果提取物、西洋参提取物、茶多酚等研制的保健食品。为了控制该含片的内在质量, 本文对其中 2 味药材进行了薄层鉴别, 1 味药材采用显色鉴别反应, 并采用苯

酚硫酸法测定了其中虫草多糖的含量。鉴别方法专属、简便, 含量测定方法快捷、准确, 可以控制该制剂的质量。

1 仪器与材料

Thermo LabSystems 全波长 Multiskan Spectrum 酶标仪 (德国); 96 孔细胞培养板 (北京鼎国生物技术有限公司); Eppendorf 冷冻离心机 (德国); 微量进样器 (上海微量进样器厂); 罗汉果苷 V (由桂林思特新技术公司提供); 人参皂苷 Rg1、Rb1 对照品 (中国药品生物制品检定所); CX2250 超声波清洗器 (北京医疗设备二厂); 硅胶 G 板 (青岛海洋化工有限公司); 复方虫草多糖含片 (黑龙江新医圣制药有限公司提供); 其它所用试剂均为 AR 级。

2 方法与结果

2.1 活性成分的定性鉴别

基金项目: 黑龙江新医圣制药有限公司、上海交通大学本科生 PRP 研究计划项目资助 (编号: T150110051)

作者简介: 苏颖 (1986), 女, 上海交通大学农业与生物学院学生。

通讯作者: 周选围 Tel: (021) 34205778; E-mail: xuanweizhou@sjtu.edu.cn

2.1.1 罗汉果提取物的 TLC 鉴别 罗汉果 (*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey) 是我国特有的珍贵的药食两用药材, 四环三萜类化合物是罗汉果的主要有效成分, 在罗汉果干果中的总含量为 31755~31858%^[8]。罗汉果苷 V 的含量是罗汉果产品质量的重要指标^[9]。本研究采用薄层色谱法为手段来鉴别罗汉果苷 V^[10]。

2.1.1.1 薄层色谱条件 硅胶 G 板在 105 e 活化 30 min, 以正丁醇:乙醇:水 (8:2:3) 为展开剂, 上行展开, 展距为 11 cm, 以 10% 硫酸乙醇显色, 在 105 e 烘至斑点清晰。

2.1.1.2 对照品溶液制备 精密称取罗汉果苷 V 对照品 10.0 mg 用蒸馏水定容于 10 mL 容量瓶中, 制成 1.0 mg/mL 溶液。

2.1.1.3 供试品溶液制备 准确称取复方虫草口含片 (相当于罗汉果提取物 0.2 g), 用蒸馏水适量溶解后, 转移至 25 mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度、摇匀, 配制成供试品溶液。

2.1.1.4 薄层分离试验 分别精确吸取罗汉果苷 V 对照品溶液 5.0 μ L 和供试品溶液 10.0 μ L 点于同一硅胶 G 薄层板上, 按 2.1.1.1 所述色谱条件展开、显色。

2.1.1.5 结果判断 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点 (见图 1)

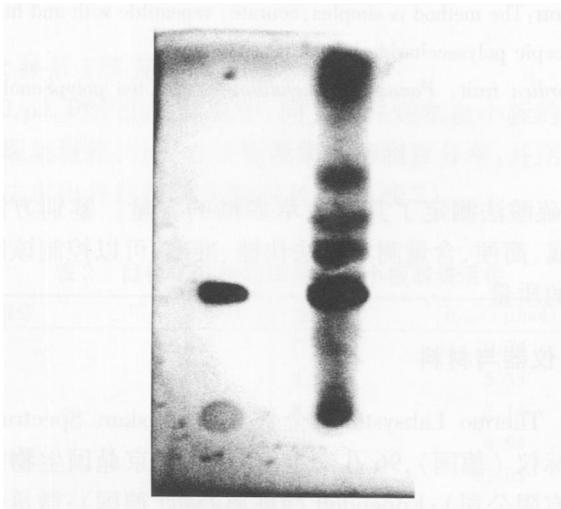


图 1 罗汉果苷 V 的 TLC 鉴别

1: 对照品 2: 供试品

2.1.2 西洋参提取物的 TLC 鉴别 含片中西洋参的鉴别主要采用薄层层析法, 其特征成分为人参皂苷 Rg1、Rb1^[11]。

2.1.2.1 薄层色谱条件 硅胶 G 板在 105 e 活化 30 min, 以氯仿:乙醇:水 (65:35:10) 为展开剂, 取下层溶液作展开剂, 展距 10~12 cm 取出, 立即吹

干, 喷以 10% 硫酸乙醇显色, 在 105 e 烘至斑点清晰。立即于日光下观察, 斑点显黑紫色。

2.1.2.2 对照品溶液制备 精密称取人参皂苷 Rb1、Rg1 对照品 10.0 mg 用蒸馏水定容于 10 mL 容量瓶中, 分别制成 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2.3 供试品溶液制备 准确称取复方虫草口含片 (相当于西洋参提取物 0.1 g), 加甲醇 30 mL 超声提取 30 min, 滤过, 蒸干, 残渣加水 30 mL 溶解, 用水饱和的正丁醇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并提取液, 再用正丁醇饱和的水洗涤 3 次, 每次 15 mL, 正丁醇蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 即得, 作为样品溶液。

2.1.2.4 薄层分离试验 分别精确吸取人参皂苷 Rb1、Rg1 对照品溶液 2.0 μ L 和供试品溶液 2.0 μ L 点于同一硅胶 G 薄层板上, 按 2.1.2.1 所述色谱条件展开、显色。

2.1.2.5 结果判断 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点 (见图 2)。

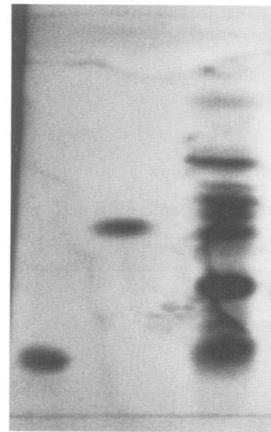


图 2 西洋参提取物的 TLC 鉴别

1: 对照品 Rb1 2: 对照品 Rg1 3: 供试品

2.1.3 茶多酚的显色鉴别 茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称, 约占其质量的 15~30%; 多酚类中以儿茶素含量最高, 占其总量的 60~80%^[12]。茶叶提取物中酚类 (或烯醇结构) 的化合物与三氯化铁发生显色反应, 可用来鉴别酚类化合物。该研究利用茶叶提取物中儿茶醛和香草醛试液的显色反应来鉴别茶叶提取物, 具有明显的选择性^[13]。① 三氯化铁试液: 取三氯化铁 9 g 加水使溶解成 100 mL, 混匀, 即得; ② 香草醛试液: 取香草醛 0.1 g 加盐酸至 10 mL 容量瓶, 混匀, 即得。③ 取本品适量 (约相当于茶叶提取物 0.1 g), 加水 100 mL, 搅拌均匀, 滤过, 取续滤液 2 mL, 滴加三氯化铁试液 1 滴, 即显蓝黑色。④ 取不含茶多酚的样品适量, 加水 100 mL, 搅拌均匀, 滤过, 取续滤液 2 mL, 滴加香草醛试液

(临用时配制) 1 mL, 未见樱红色。½取本品适量(约相当于茶多酚 0.1 g), 加水 100 mL, 搅拌均匀, 滤过, 取续滤液 2 mL, 滴加香草醛试液(临用时配制) 1 mL, 显樱红色。

2.2 虫草多糖的定量检测 虫草多糖的检测通常使用的是比色法^[14], 而苯酚硫酸法、蒽酮硫酸法在生产 and 科研实践中因方法简单、快速, 无需多糖纯品等优点被广泛采用^[15-16]。本试验考察以葡萄糖为对照的苯酚硫酸法测虫草多糖含量。

2.2.1 标准曲线的绘制 按照王亚光等^[17]描述的方法进行。以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $Y = 0.106422 + 11.16097X$, $r = 0.9964$ ($n = 7$)。

2.2.2 供试品的测定 准确称取 2 g 样品, 加水定容至 100 mL, 在 100℃条件下水浴 2 h, 过滤取上清 510 mL, 置于 50 mL 离心管中, 加入无水乙醇 30 mL, 混匀 5 min 后, 以 3000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液。加入 80% 乙醇溶液 5 mL, 充分洗涤沉淀后, 以 3000 r/min 离心 5 min 弃去上清液, 反复操作 3 次。残渣用硫酸溶液(10%)溶解并定容至 510 mL, 即得测定液。

准确吸取样品测定液 2.0 mL 置于 20 mL 带塞的试管中, 加入 50 g/L 苯酚溶液 1.0 mL, 在旋转混匀器上混匀, 小心加入浓硫酸 10.0 mL 于旋转混匀器上小心混匀, 置沸水浴中煮沸 2 min, 冷却至室温, 用全波长酶标仪在 490 nm 波长处, 以试剂空白为参比, 1 cm 比色皿测定吸光度值。从标准曲线上查出葡萄糖含量, 计算样品中多糖含量。同时做样品空白实验。

2.2.3 精密度试验 精密吸取葡萄糖对照品溶液(0.104 mg/mL), 按 2.1.2.2 项下重复测定 6 次, 测得浓度分别为 0.10414, 0.10409, 0.10402, 0.10413, 0.10401, 0.10402 mg/mL, 计算 RSD 为 11.49%。

2.2.4 重复性实验 取供试品溶液 6 份, 按 2.1.2.2 项下测定含量, 测得含量分别为 0.105833, 0.105836, 0.105802, 0.105824, 0.105821, 0.105838 mg 计算 RSD 为 0.123%。

2.2.5 加样回收率实验 吸取多糖样品溶液 0.15 mL, 分别加入标准葡萄糖溶液 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.110 mL, 分别置于 25 mL 试管中, 按 2.2.2 测定, 测定结果见表 1。

2.2.6 稳定性实验 精密吸取供试液, 按标准曲线项下操作, 于不同时间内测其吸收度, 在 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min 时间, 吸收度分别为 0.1161, 0.1159, 0.1157, 0.1157, 0.1158, 0.1158, 0.1160。结果表明本法测定多糖在 2 h 内稳定 RSD = 0.92%。

表 1 回收率实验

序号	葡萄糖含量 (mg)	供试品多糖含量 (mg)	测得多糖总量 (mg)	回收率 (%)
1	0.03	0.05813 ± 0.0006	0.0873 ± 0.0021	97.08
2	0.06	0.05813 ± 0.0006	0.1165 ± 0.0042	97.35
3	0.09	0.05813 ± 0.0006	0.1475 ± 0.0057	99.31
4	0.12	0.05813 ± 0.0006	0.1733 ± 0.0095	95.96
5	0.15	0.05813 ± 0.0006	0.2021 ± 0.0030	95.96

计算回收率平均值为 97.13%, RSD = 1.41% ($n = 5$)。

2.2.7 样品测定 按 2.2.2 项下制备 3 个批号的供试品溶液, 测定结果见表 2。

表 2 样品中虫草多糖的含量测定

批次	含量 (%)	相对标准偏差 (%)
070403	5.50	0.83
070512	5.55	0.45
070605	5.58	0.79

3 讨论

采用 TLC 法对本制剂中罗汉果提取物、西洋参提取物进行了鉴别, 重复性好, 简便, 快速的特点。本文采用三氯化铁和香草醛试液的显色反应鉴别茶多酚简便可靠。本文采用苯酚硫酸法测定虫草多糖的含量, 方法简便, 准确, 重现性高, 可用于控制复方虫草含片的质量。本文在总结前人研究的基础上建立的含量测定方法, 对复方虫草含片中的虫草多糖可以准确快速地测定, 干扰因素试验表明, 在样品中加入与粗多糖等量的乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖及其 2 倍量的淀粉、糊精, 不影响样品中粗多糖测定的结果。值得注意的是, 目前虫草多糖作用机理的解释尚不完善, 许多种类不能人工栽培, 加之环境不同、培养条件不同、提取分离技术不同都会造成多糖结构上的差异, 因而影响其活性和检测的结果; 另外, 苯酚硫酸法和其它比色法一样, 同样存在着重复性差, 数据波动较大等缺点。总之, 由于多糖结构的多样性和复杂性, 现有的检测方法和质控方法并不能都应用到多糖类药物中, 所以还需要深入研究, 以提高多糖药物质量标准的检测方法和手段。

参考文献:

- [1] Xu Y. Perspectives on the 21st century development of functional foods bridging Chinese medicated diet and functional foods [J]. International journal of food science and technology, 2001, 36(3): 229.
- [2] 吕长武, 付永前, 陈恒雷, 等. 1 食(药)用真菌多糖研究进展 [J]. 1 化学与生物工程, 2005, (11): 5.

经验。同时,为来自不同政治背景国家的军队药师提供了互相交流的机会,从而提高他们在药学领域救治与保障工作的水平。大会会议结束后,小组委员会将编辑出版会讯,包括参观的主要内容以及主题报告的摘要。

会讯 (newsletter) 是一个很好的沟通媒介,由 MEPS 不定期编辑、出版,并向所有需要的人员免费提供,无论是否为 MEPS 会员都可以查阅。许多非会员就是通过会讯了解了 MEPS 和近期会议的讨论热点,并开始与 MEPS 进行交流,积极开展相关的工作。例如,2000 年维也纳会议的主要议题就是灾难后的医疗保障及与地方医院合作,目前东欧许多国家也正通过准备 FIP 进行大规模的合作与研究,为灾害医疗保障提供更为完善的平台。

MEPS 近年最为主要的一项工作是通过与 WHO 合作,发起了 pictogram^{*} (象形图示) 计划,为沟通有障碍的病人提供非文字与语言的用药指导。Pictogram 在交通等公共设施领域已经得到了广泛的应用。MEPS 的军队药学工作者在灾害救援及维和期间发现,文化水平与语言沟通障碍影响了病人对于用药时间、方法等方面的理解。已有研究证明,pictogram 结合语言或文字的说明,能显著增加病人对于治疗方法的理 解。对于较复杂的用药方法,pictogram 还可以增加病人对于服药方案的记忆能力。

目前,已有埃及、新加坡、印度尼西亚、芬兰、英国、澳大利亚、加纳、厄瓜多尔、印度、塞尔维亚、匈牙利等国家的军队药学工作者开展了本国用药指导的 pictogram 设计工作^[3]。Pictogram 设计完成后,在 MEPS 和 WHO 的组织与协调下进行测试。加拿大与非洲卫生联盟近期完成了一项 500 名病人参加的测试,80% 以上的病人都能够充分理解粘贴在药品包装上的有关用药指导的 pictogram。加拿大军队已经开发了基于网络的测试程序,可以让更多人通过网络来评价所设计的 pictogram 是否便于理解。而在加蓬与贝宁开展的相关测试,已经形成报告正式出版,各项试验都表明使用 pictogram 对于提高病人用药依从性是一种较为经济的方法。MEPS 正在鼓励更多的会员在本国开展有关的研究与设计,从而进一步提高药学服务的水平。

参考文献:

- [1] <http://www.fip.nl/www2/index.php>
- [2] <http://ca.geocities.com/sgrenier@rogers.com/WebSite/index.html>
- [3] <http://chinesesites.library.ingentaconnect.com/content/np2gb/ipp/2004/00000012/00000004/ar000051>

收稿日期: 2008203231

(上接第 193 页)

- [3] 肖建辉,梁宗琦,刘爱英. 虫草无性型及其相关真菌多糖的研究开发现状 [J]. 药学学报, 2002, 37(7): 589.
- [4] 汪玲玲,钟士清,方祥,等. 虫草多糖研究综述 [J]. 微生物学杂志, 2003, 23(1): 43
- [5] 王菊凤,杨道德,李鹤鸣,等. 虫草多糖的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 附 6
- [6] 宋江峰,刘春泉,李大晴,等. 北冬虫夏草多糖活性研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2006, (4): 145
- [7] Li SP, Yang FQ, Tsim KW. Quality control of Cordyceps sinensis a valued traditional Chinese medicine [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(5): 1571
- [8] 王勤. 罗汉果化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2001, 24(3): 215
- [9] 赵二芳,赵丽婷,李满秀. 罗汉果的保健功能及产品开发 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 125.
- [10] 梁成钦,苏小建,李俊,等. 薄层扫描法测定罗汉果糖苷

(V) 含量的研究 [J]. 广西轻工业, 2005, 88(3): 13

- [11] 陆文瑾. 西洋参在其制剂中的薄层色谱鉴别 [J]. 中国血液流变学杂志, 2006, 16(2): 176
- [12] 王利,翟金兰,杨婷,等. 茶多酚的应用及提取方法 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 154
- [13] 许海琴,许列琴. 常用天然提取物质量标准参考手册 [J]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 290
- [14] 葛新,李云兰,白小红,等. 比色法测定人工虫草菌丝体多糖含量 [J]. 山西医科大学学报, 2001, 32(5): 4181
- [15] 鲁晓岩. 硫酸2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
- [16] 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, (2): 122.
- [17] 王亚光. 保健食品功效成分检测方法 [J]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 19

收稿日期: 2007207203