

强度(int)表示炎性足组织中 5-羟色胺的相对含量^[1](荧光法),比较给药组和空白对照组 5-羟色胺相对含量的差异.结果见表 5.连钱草水提物对蛋清致小鼠肿胀足组织中炎症递质 5-羟色胺的释放有明显抑制作用($P < 0.05$),醇提物组有抑制 5-羟色胺释放的作用,但作用较水提物小。

表 5 3 组小鼠炎性足组织中 5-羟色胺测定结果

组别	给药剂量/ (g · kg ⁻¹)	小鼠数/ 只	5-羟色胺含量(int)
连钱草水提物组	20	9	5.48 ± 0.61 ^{*1}
连钱草醇提物组	20	10	5.68 ± 1.18
0.9%氯化钠溶液组	等体积	8	7.89 ± 2.58

与 0.9%氯化钠溶液组比较,^{*1} $P < 0.05$

3 讨论

炎症是机体活组织对各种损伤因子所发生的以防御为主的反应,连钱草提取物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀和小鼠腹腔毛细血管通透性增加等炎症模型具有较

强的抑制作用,表明连钱草提取物具有较强的抗炎作用。而 PGE₂、组织胺和 5-羟色胺均为参与炎症反应的主要炎症递质,在炎症反应中起重要作用。笔者使用紫外分光光度法测定炎症递质 PGE₂的相对含量,用荧光法测定 5-羟色胺和组胺的相对含量。结果表明连钱草提取物不能抑制炎性组织中 PGE₂的相对含量,但其水提物能明显抑制炎性组织中 5-羟色胺和组胺的相对含量。说明连钱草水提物抗炎作用主要是通过抑制内源性炎症递质 5-羟色胺和组胺的释放而发挥抗炎作用,可能与炎症递质 PGE₂的释放途径无关。

[参考文献]

- [1] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:298-300.
- [2] 向俭军. 组胺的荧光测定法研究[J]. 中国医学科学院学报,1981,3(3):183.

人工蛹虫草子实体多糖的提取与含量测定

王瑞华¹, 杨 昕¹, 涂秩平², 胡事君², 陈宝林¹, 李 高¹

(1. 华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030; 2. 瑞丹生物科技有限公司, 广东东莞 523086)

[摘要] 目的 建立人工蛹虫草子实体多糖的提取与含量测定方法。方法 采用正交试验筛选提取条件, 苯酚-硫酸法测定多糖的含量。结果 多糖的最佳提取条件为 80 倍量纯化水, 45 °C 提取 1 次, 每次 10 min; 线性范围为 10 ~ 100 μg · mL⁻¹, $r = 0.999 8$, 加样回收率为 99.41%, $RSD = 2.36\%$ 。3 批供试品中多糖的平均含量为 22.12%。结论 该提取和测定方法操作简单, 重复性好, 结果准确可靠, 可用于人工蛹虫草中多糖的提取与含量测定。

[关键词] 人工蛹虫草子实体; 多糖; 正交试验; 苯酚-硫酸法

[中图分类号] R286; R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)08-0843-03

Extraction and Determination of Polysaccharides in Cultured *Cordyceps militaris* L. Link

WANG Rui-hua¹, YANG Xin¹, TU Zhi-ping², HU Shi-jun², CHEN Bao-lin¹, LI Gao¹ (1. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Ruidan Biology Technique Company Limited, Dongguan 523086, China)

ABSTRACT Objective To develop a method for extracting and determining polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris* L. Link. **Methods** Orthogonal experiment was used to confirm the way of extracting. Contents of polysaccharides were detected by using phenol-sulphate acid. **Results** The best condition for extracting polysaccharides was by 80 times of pure water, once at 45 °C, 10 min for one time. Linear range was 10 ~ 100 g · mL⁻¹, $r = 0.999 8$, the recovery rate was 99.41%, $RSD = 2.36\%$. The average concentration of polysaccharides in three samples was 22.12%. **Conclusion** The extracting method is simple, reproducible and the results is accurate and reliable. It can be used to extract and determine the contents of polysaccharides in cultured *Cordyceps militaris* L. Link.

KEY WORDS *Cordyceps militaris* L. Link; Polysaccharides; Orthogonal test; Phenol-sulphate acid procedure

蛹虫草(*Cordyceps militaris* L. Link), 别名北冬虫夏草。有文献报道, 蛹虫草与冬虫夏草具有相似的活性成分与药理作用^[1], 由于其对自然生长环境要求不高, 人工培育较易成功, 有望成为冬虫夏草的替代品而造福于人类^[2]。蛹虫草中有效活性成分虫草多糖具有

提高免疫力, 延缓衰老, 扶正固本, 保护心脏、肝脏, 抗痉挛、抗癌、防毒、减毒等作用^[3,4]。目前关于人工蛹虫草中活性多糖成分的研究报道较少, 只是近几年来蛹虫草的人工培养及其活性成分的研究才相对活跃起来^[5,6]。笔者研究并建立了人工蛹虫草中多糖的提取及定量方

法,为人工蛹虫草的质量评价及开发提供科学依据。

1 仪器与试剂

瓦利安 (Varian) Cary 50 可见紫外光谱仪;TG16-11 台式离心机 (长沙平凡仪器有限公司)。蛹虫草子实体由广东东莞生物技术研究提供,经华中科技大学同济医学院药学院生药系阮金兰教授鉴定 (批号:20050103,20050317,20050929);D-无水葡萄糖 (中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用);所用试剂均为分析纯 (天津市化学试剂三厂)。

2 方法与结果

2.1 正交试验

2.1.1 正交试验设计 由于多糖类成分在水中具有较好的溶解度,因此选用纯化水作为提取溶剂,再通过单因素试验对影响多糖提取的几个因素,如溶剂用量、提取时间、提取次数及提取温度分别进行试验,确定下列4个因素的3个水平进行试验,筛选出一个最佳组合,因素水平安排见表1。

表1 因素水平安排表

水平	溶剂用量(A)/ (g·mL ⁻¹)	提取时间 (B)/min	提取次数 (C)/次	提取温度 (D)/℃
1	1:20	10	1	30
2	1:50	30	2	45
3	1:80	50	3	60

2.1.2 供试品溶液的制备 将批号为20050103的人工蛹虫草子实体粉末于55℃干燥至恒重,精密称取9份,每份约0.5g,按1~9进行编号,80%乙醇提取,滤过,烘干残渣。残渣中加入纯化水,按正交试验要求进行操作。合并滤液,纯化水定容至100mL。精密吸取1mL置于10mL容量瓶中,纯化水定容至刻度,摇匀,得供试品溶液,备用。

2.1.3 显色反应 精密吸取上述供试品溶液1mL置于20mL离心管中,加入5%苯酚溶液1mL,快速加入浓硫酸5mL,混匀,于沸水浴中加热15min,放冷,在486nm波长处测定吸光度,代入线性方程计算百分含量。

2.1.4 正交试验结果 对影响多糖提取效果的4个主要影响因素(溶剂用量、提取时间、提取次数、提取温度)进行研究。按表1所示的因素水平进行正交试

验,结果如表2,3所示。

2.1.5 正交试验结果分析 经方差分析,因素A及因素D对多糖的提取有显著影响,因素B及因素C无显著影响;极差分析表明,4个因素对多糖提取的影响顺序为:D>A>C>B;由直观分析得多糖最佳提取条件为:A₃B₃C₃D₂,即80倍量纯化水,45℃超声提取3次,每次50min。考虑到提取时间、提取次数对提取率无显著影响,为缩短整个分析时间,将实验条件定为80倍量纯化水,45℃超声提取1次,每次10min。

表2 正交试验结果与分析

试验号	A	B	C	D	%
1	1	1	1	1	16.4213
2	1	2	2	2	17.6007
3	1	3	3	3	18.9284
4	2	1	2	3	18.3803
5	2	2	3	1	17.8826
6	2	3	1	2	20.4490
7	3	1	3	2	20.8282
8	3	2	1	3	19.7484
9	3	3	2	1	17.4656
I	17.650	18.543	18.873	17.256	
II	18.904	18.411	17.816	19.626	
III	19.347	18.948	19.213	19.019	
极差	1.697	0.537	1.397	2.370	

表3 以多糖得率为指标的方差分析

误差来源	离均差平方和	f值	F值	P值
A	4.649	2	9.891	<0.1
C	3.187	2	6.781	
D	9.089	2	19.338	<0.05
误差(B)	0.472			

2.2 换算因子的计算

2.2.1 多糖的提取与精制 取人工蛹虫草子实体于60℃鼓风干燥10h,粉碎,过筛孔内径(355±13)μm(50目)筛后,称取粉末8g,无水乙醇提取10h以除去脂溶性成分,滤过,烘干残渣。将脱脂后的残渣用纯化水45℃恒温提取1次,每次10min,滤过。纯化水反复洗涤残渣,合并滤液,减压浓缩,以氯仿:正丁醇(5:1)为沉淀剂,按浓缩液:沉淀剂(4:1)加入沉淀剂,搅拌7min,静置,离心10min,取上层多糖溶液以水透析24h。将透析后的溶液加入无水乙醇至含醇量70%,于4℃冰箱中静置24h后滤过,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤,60℃烘干,得浅褐色精多糖。

2.2.2 换算因子的测定 精密称取多糖20mg置于100mL容量瓶中,加双蒸纯化水定容至刻度,摇匀。精密吸取1.0mL溶液置于20mL离心管中,加入5%苯酚溶液1.0mL,快速加入浓硫酸5mL,混匀,于沸水

[收稿日期] 2006-09-19 [修回日期] 2006-11-29

[作者简介] 王瑞华(1984-),女,河南长葛人,在读硕士,主要从事中药制剂及新药研发。电话:027-83657550,E-mail:ruihua371519@sina.com。

[通讯作者] 李高(1955-),男,湖北咸宁人,博士生导师,教授,主要从事药物制剂与药动学研究。电话:027-83692892,E-mail:ligaojtj@163.com。

浴中加热 15 min, 放冷, 于 486 nm 波长处测定吸光度, 代入线性方程, 按下式计算换算因子为: $f = W / (C \times D) = 1.32$, 式中 W 为多糖重量, C 为葡萄糖浓度, D 为多糖的稀释倍数。

2.3 多糖的定量分析

2.3.1 供试品溶液的配制 取药材粉末约 0.2 g 置于具塞锥形瓶中, 精密称定, 加入 80% 乙醇提取, 滤过, 烘干残渣。于残渣中精密加入纯化水 16 mL, 密塞, 45 °C 超声提取 10 min, 抽滤, 残渣用纯化水反复洗涤, 合并滤液, 定容至 100 mL, 摇匀。精密吸取 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 纯化水定容至刻度, 摇匀, 精密吸取 1 mL 置于 20 mL 离心管中, 显色, 于 486 nm 波长处测定吸光度。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取 D-无水葡萄糖 5.0 mg 置于 25 mL 容量瓶中, 用纯化水定容至刻度, 得浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 纯化水定容至刻度, 得浓度为 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

2.3.3 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 1 mL 置于 20 mL 离心管中, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 快速加入浓硫酸 5 mL, 混匀, 于沸水浴中加热 15 min, 放冷, 于 486 nm 波长处测定吸光度, 以对照品溶液的浓度 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 X , 吸光度 (A) 为纵坐标 Y 绘制标准曲线, 得线性方程为: $Y = 0.0091X + 0.0318$, $r = 0.9998$ 。结果表明, 对照品溶液浓度在 10 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.3.4 回收率试验 精密称取 9 份药材粉末, 每份约 0.2 g, 按表 4 精密加入葡萄糖对照品, 按含量测定中供试品的制备及测定方法提取和测定, 计算加样回收率。结果如表 4 所示。

2.3.5 重复性 精密称取 6 份药材粉末, 每份约 0.2 g, 按含量测定供试品溶液的制备及测定方法进行提取和测定。结果表明, 本法具有良好的重复性, RSD 为 2.24%。

2.3.6 稳定性试验 取含量测定项下供试品溶液分别于 0, 20, 40, 60, 80 min 测定吸光度, RSD 为 1.95%。结果表明样品溶液在 80 min 内稳定。

2.3.7 样品的含量测定 测定 3 批药材 (批号: 20050103, 20050317, 20050929) 中多糖含量, 结果上述 3 批药材中多糖含量分别为 22.64%, 20.17% 和 23.54%。

表 4 回收率试验结果

	称样量/g	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%
I	0.4010	-		
II	0.4009	-		
1	0.2017	33.2	74.73	103.58
2	0.2014	33.1	72.56	97.52
3	0.2018	33.2	74.11	101.66
4	0.2015	41.5	81.13	98.38
5	0.2012	41.4	82.04	100.97
6	0.2003	41.2	80.76	98.79
7	0.2013	49.7	87.98	96.02
8	0.2003	49.5	88.52	97.90
9	0.2002	49.4	89.38	99.88
<i>RSD</i> /%				2.36

3 讨论

3.1 供试品提取方法的选择 进行了超声提取、回流提取、索氏提取 3 种提取方法比较, 结果在不同提取方法制备样品中多糖的质量分数基本不变, 但超声提取方法简便, 提取时间短, 故采用超声提取的方法。

3.2 供试品提取溶剂的选择 采用超声 10 min 处理的方法, 比较了水及不同浓度乙醇对多糖提取效果的影响。结果表明水提取率最高, 因此选择水作为提取溶剂。

3.3 除蛋白质方法的选择 多糖精制过程中, 除去蛋白质较为经典的方法为 Savag 法, 笔者分别考察了氯仿-正丁醇的比例、浓缩液与沉淀剂的比例及混合时间, 结果以氯仿: 正丁醇 (5:1) 为沉淀剂, 按浓缩液: 沉淀剂 (4:1) 加入沉淀剂, 搅拌 7 min, 除蛋白质效果最好。

[参考文献]

- [1] 韦会平, 肖波, 胡开始. 蛹虫草药用价值考[J]. 中药材, 2004, 27(3): 215.
- [2] 王洪. 虫草研究开发中几个问题的探讨[J]. 农牧产品开发, 1999, 6(1): 21.
- [3] 柴建萍, 白兴荣, 谢道燕. 蛹虫草主要有效成分及其药理功效[J]. 云南农业科技, 2003, 4(1): 22.
- [4] 郭随章. 中药多糖的抗癌研究与临床应用进展[J]. 医药导报, 2004, 23(11): 847.
- [5] KIM H O, YUN J W. A comparative study on the production of exopolysaccharide between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures[J]. *J Appl Microbiology*, 2005, 99: 728.
- [6] 李鹏, 李绍平, 龚元香, 等. 加压溶剂提取-高效液相色谱法测定天然和人工虫草中麦角甾醇、核苷及其碱基[J]. 药学学报, 2004, 39(11): 917.