

蛹虫草多糖脱色工艺优化及其抗补体活性研究

胡政宇, 王佳鸣, 于瑞莹, 李 镐, 孙金凤*, 周 微*
(延边大学药学院, 长白山天然药物研究教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要: **目的** 优化蛹虫草多糖脱色工艺, 并评价其抗补体活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以多糖质量浓度、脱色温度、脱色时间、液料比为影响因素, 脱色率、多糖回收率、选择性系数的综合评分为评价指标, 响应面法优化脱色工艺。采用免疫溶血反应测定多糖抗补体活性。**结果** 最佳条件为 AB-8 大孔吸附树脂, 多糖质量浓度 28 mg/mL, 脱色温度 48 ℃, 脱色时间 97 min, 液料比 5 : 1, 综合评分为 6.42±0.54。多糖通过经典、旁路途径抑制补体活化, CH₅₀、AP₅₀ 值分别为 (0.63±0.08)、(0.47±0.13) mg/mL。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于脱色抗补体活性良好的蛹虫草多糖。

关键词: 蛹虫草多糖; 脱色工艺; 抗补体活性; 响应面法; 免疫溶血反应

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)06-1973-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.037

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link. 为麦角菌科虫草属模式种, 又名北冬虫夏草, 主产于我国吉林、辽宁等地, 富含虫草素、多肽、多糖等多种活性成分^[1], 多糖作为其主要活性成分之一, 约占比 4%~10%, 具有抗氧化、抗癌、免疫调节等作用^[2]。在蛹虫草多糖制备过程中, 色素严重会影响该成分进一步分离、结构表征及生物活性的研究, 故对其进行脱色有助于相关研究和提高品质^[3-4]。

大孔吸附树脂法脱色具有稳定性好、吸附效率高、可再生循环利用等优点^[5], 但影响脱色效果的评价指标较多, 导致其权重难以确定。层次分析法作为一种多准则定量决策分析技术, 可有效对多个指标进行合理的综合评价, 具有系统性强、简单实用、所需数据信息较少等优势, 而响应面法是一种统计建模技术, 用于复杂工艺的优化。

补体系统是天然免疫的主要组成部分, 其过度激活可导致多种疾病^[6], 但现有抑制剂存在不良反应多、价格昂贵等缺点^[7]。近年来, 天然多糖的补体抑制作用已得到广泛关注^[8], 但目前仍无关于蛹虫草多糖的抗补体活性的报道。因此, 本实验采用层析分析法结合与响应面法优化蛹虫草多糖脱色工艺, 并考察其抗补体活性, 以期为该成分开发利用奠定基础。

1 材料

GVB-Ca²⁺/Mg²⁺ 购于北京酷来搏技术有限公司; 溶血素购于南京森贝伽生物科技有限公司。羊红细胞、兔红细胞来自延边大学动物医院; 正常人血清来自健康志愿者。蛹

虫草来自延边林业科学研究所, 经延边大学药学院李镐教授鉴定为麦角菌科虫草属蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link., 保存于延边大学药学院生药学实验室 (凭证号 YB-SYC-140)。AB-8、D101、S-8、X-5、NKA-II 大孔吸附树脂均购于天津浩聚树脂科技有限公司。HERMLE-Z-326K 高速冷冻离心机; THZ-82A 水浴恒温振荡器; FA1004N 电子分析天平; SH-1000 酶标仪。

2 方法

2.1 粗多糖制备 采用水提醇沉法^[9]。取干燥蛹虫草适量, 在液料比 20 : 1、提取温度 90 ℃ 条件下提取 2 h, 滤过, 收集滤液, 浓缩至原体积的 20%, 加入 95% 乙醇至醇体积分数 80%, 醇沉, 5 000 r/min 离心 10 min, 沉淀加水复溶, 加入 Sevag 试剂 (氯仿-正丁醇=4 : 1), 振荡, 离心去除蛋白质, 干燥至恒重, 即得。

2.2 大孔吸附树脂筛选 采用静态吸附实验。称取预处理后的 AB-8、D101、S-8、X-5、NKA-II 树脂各 5 g, 加入 30 mg/mL 粗多糖溶液 100 mL, 在 45 ℃ 摇床上 150 r/min 振荡 90 min, 滤过, 取滤液, 苯酚-硫酸法测定多糖含量, 计算回收率 R_r ^[10], 然后在 420 nm 波长处测定吸光度, 计算脱色率 D_r ^[11], 再根据文献 [12] 计算分配系数 K_d 、选择性系数 K_c , 公式分别为 $D_r = [(A_{D0} - A_{D1}) / A_{D0}] \times 100\%$ 、 $R_r = A_{R1} / A_{R0} \times 100\%$ 、 $K_{d1} = \frac{(A_{D0} - A_{D1}) / M}{A_{D1}}$ 、 $K_{d2} = \frac{(A_{R0} - A_{R1}) / M}{A_R}$ 、 $K_c = \frac{K_{d1}}{K_{d2}}$, 其中 A_{D0} 、 A_{D1} 分别为吸附前后

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 吉林省中医药科技项目 (2020140)

作者简介: 胡政宇 (1994—), 男, 博士生, 从事天然药物活性成分及资源研究。Tel: 15043263603, E-mail: huzhengyu1994@163.com

* 通信作者: 孙金凤 (1990—), 女, 博士, 讲师, 从事天然药物活性成分及资源研究。Tel: 13844364888, E-mail: 416370030@qq.com

周 微 (1984—), 女, 博士, 副教授, 从事天然药物活性成分及资源研究。Tel: 15526774486, E-mail: zw2015@ybu.edu.cn

样品 420 nm 处吸光度, A_{R0} 、 A_{R1} 分别为吸附前后苯酚-硫酸测得490 nm处吸光度, K_{d1} 、 K_{d2} 分别为色素、多糖在树脂上的分布系数, M 为树脂质量。

2.3 权重系数计算 采用层次分析法 (AHP)^[13], 以脱色率、多糖回收率、选择性系数为指标, 多糖脱色效果为目标, 构建层析结构模型, 对各指标进行成对比较, 矩阵 N 如下。再根据九级标度法评价 w_i 、 w_j 之间的相对权重, 同等重要时程度值为 1, 一般重要为 3, 重要为 5, 非常重要为 7, 极其重要为 9, 两相邻程度的中间值可用 2、4、6、8 表示。

$$N = [N_{ij}]_{n \times n} = \begin{bmatrix} w_1/w_1 & w_1/w_2 & \cdots & w_1/w_n \\ w_2/w_1 & w_2/w_2 & \cdots & w_2/w_n \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ w_n/w_1 & w_n/w_2 & \cdots & w_n/w_n \end{bmatrix}, i, j = 1,$$

2, ..., n

然后, 计算矩阵最大特征值、特征向量, 归一化后得到权重系数, 通过一致性指数 (CI)、一致性比 (CR) 评估成对比较矩阵相关的一致性, 衡量各标准权重系数的合理性, 计算公式分别为 $CI = (\lambda_{\max} - n)/(n - 1)$ 、 $CR = CI/RI$, 其中 λ_{\max} 为最大特征值, n 为矩阵阶数, RI 为随机一致性指数 (矩阵阶次为 3 时, $RI = 0.58$)。当 $CR \leq 0.1$ 时, 比较矩阵、权重系数合理; $CR > 0.1$ 时, 两者不合理, 说明评估没有价值或需重新评估。

2.4 单因素试验 按“2.2”项下方法脱色, 分别考察了不同多糖质量浓度 (10~40 mg/mL)、脱色温度 (35~75 ℃)、脱色时间 (10~170 min)、液料比 (1:1~16:1), 测定 D_r 、 R_r 、 K_e , 按“2.3”项下方法计算权重系数。

2.5 响应面法 在单因素试验基础上, 以多糖质量浓度 (X_1)、脱色温度 (X_2)、脱色时间 (X_3)、液料比 (X_4) 为影响因素, 以 D_r 、 R_r 、 K_e 综合评分为评价指标。

表 1 不同型号大孔吸附树脂参数

型号	极性	粒径/mm	孔径/nm	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	D_r /%	R_r /%	K_e
AB-8	弱极性	0.3~1.25	13.0~14.0	480~520	45.21	74.33	2.39
D101	非极性	0.2~0.6	10.0~12.0	400~600	42.22	42.39	0.54
S-8	强极性	0.3~1.25	28.0~30.0	100~120	44.61	64.23	1.45
X-5	非极性	0.3~1.25	29.0~30.0	500~600	45.81	60.16	1.28
NKA-II	极性	0.3~1.25	14.5~15.5	160~200	47.31	55.40	1.12

3.2 权重系数计算 成对比较矩阵 N 为 $N = \begin{bmatrix} 1 & 3 & 1/4 \\ 1/3 & 1 & 1/6 \\ 4 & 6 & 1 \end{bmatrix}$, w_1' 、 w_2' 、 w_3' 分别为 0.908 5、0.381 5、2.884 5, 最大特征值 (λ_{\max}) 为 3.053 6, 一致性比 $CR = 0.046 2 < 0.1$, 符合要求。

$w = [w_1 \ w_2 \ w_3]^T = [0.217 \ 6 \ 0.091 \ 4 \ 0.691 \ 0]^T$, 表明该模型合理, 综合评分 = $0.217 \ 6 \times D_r + 0.091 \ 4 \times R_r + 0.691 \ 0 \times K_e$ 。

2.6 抗补体活性研究

2.6.1 经典途径补体抑制实验 参考文献 [14] 报道, 将 6% 绵羊红细胞用 GVB-Ca²⁺/Mg²⁺ 缓冲液定容至 2×10⁹/mL, 与溶血素按 1:1 比例混匀, 37 ℃水浴 30 min 后离心去除未结合的溶血素, 得敏化细胞, 并以正常健康成年人血清 (NHSP) 为补体来源。精密称取多糖适量, GVB-Ca²⁺/Mg²⁺ 缓冲液配制成不同浓度, 加入 1:80 NHSP, 37 ℃水浴预孵育 30 min, 加入敏化细胞, 37 ℃水浴 30 min, 离心, 取上清液, 在 540 nm 波长处测定吸光度, 以肝素为阳性对照, 测定溶血抑制率及其半抑制浓度值 (CH₅₀值)。

2.6.2 旁路途径补体抑制实验 正常健康人血清通过 GVB-Mg²⁺/EGTA 缓冲液冰上孵育 15 min, 作为旁路途径的补体来源。取 2% 兔红细胞。GVB-Mg²⁺/EGTA 缓冲液定容至 5×10⁸/mL 后, 加入 NHSP、稀释成不同浓度的多糖预孵育 15 min, 加入兔红细胞, 37 ℃水浴孵育 30 min, 冰上冷却, 终止反应, 离心, 取上清液, 置于 96 孔板中稀释, 在 412 nm 波长处测定吸光度, 以肝素为阳性对照, 计算多糖溶血抑制率及其半抑制浓度值 (AP₅₀值)。

3 结果

3.1 大孔吸附树脂筛选 表 1 显示, 在相同静态吸附条件下, 5 种树脂 D_r 相近, 而 AB-8 树脂 R_r 、 K_e 最高。前期报道, 树脂吸附、解吸能力与其极性、粒径、比表面积、溶质极性相关, 溶质与极性越相近, 其吸附能力越强^[15], 本实验所用 5 种树脂中 AB-8、D101、X-5 为弱极性、非极性, 与多糖中色素分子极性相似, 故有较强的吸附能力, 其中 AB-8 是一种交联聚苯乙烯树脂, 其苯环易与多糖发生 π - π 共轭, 而且具有亲水基团, 对多糖的纯化能力更优^[16], 同时其粒径 (0.3~1.25 mm)、比表面积 (480~520 m²/g) 更有利于多糖的脱色纯化。因此, 本实验选择 AB-8 树脂进行脱色。

3.3 单因素试验 图 1A 显示, 随着多糖质量浓度增加综合评分升高, 这是因为树脂对色素的吸附能力与其功能基团数量成正比^[17]; 大于 30 mg/mL 时综合评分反而降低, 这是因为树脂量不变的情况下多糖质量浓度过高时易达到饱和, 促使多糖吸附造成损失, 不利于色素吸附^[18], 导致脱色效果下降。

图 1B 显示, 随着脱色温度增加综合评分先升后降, 在 45 ℃时最高, 这是因为温度升高加速了分子扩散速度, 导致多糖黏度下降, 有利于色素分子吸附; 高于 45 ℃后综合

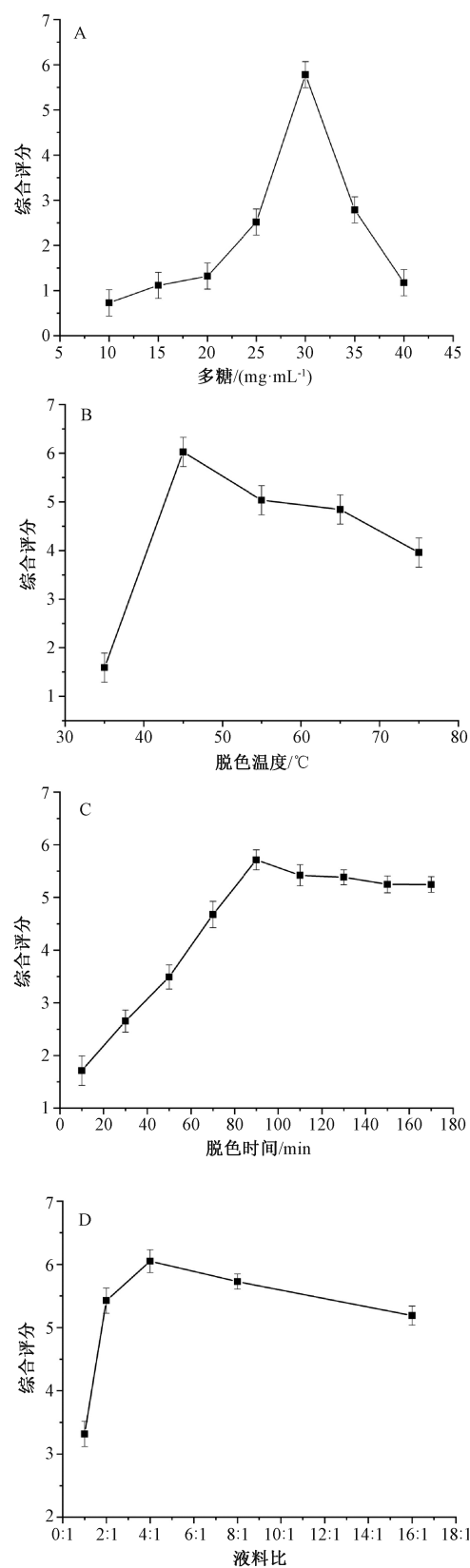


图 1 单因素试验结果

评分反而降低，这是因为温度过高时色素分子吸附力减弱，

解吸率增加^[19]，导致脱色效果下降。

图 1C 显示，随着脱色时间延长综合评分升高，在 90 min 时最高，这是因为时间越长，色素分子与树脂之间的作用越久，但同时多糖也被吸附，故时间过长会导致其回收率降低，导致脱色效果下降。

图 1D 显示，随着液料比增加综合评分升高，这是因为树脂用量越大时功能基团增多，吸附能力增加；大于 4 : 1 时综合评分反而降低，这是因为继续提高多糖用量时树脂吸附量达到饱和，导致脱色效果下降。

3.4 响应面法 在单因素试验基础上，设计 29 组响应面试验，结果见表 2。

采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表 2 数据进行多项式回归，得方程为 $Y=6.39-0.94X_1+0.27X_2+0.24X_3+0.52X_4-0.64X_1X_2-0.92X_1X_3+0.34X_1X_4+0.29X_2X_3-0.81X_2X_4-0.60X_3X_4-2.03X_1^2-0.94X_2^2-1.02X_3^2-1.14X_4^2$ ，方差分析见表 3。由此可知，失拟项 $P>0.05$ 不显著，表明模型拟合度良好； $R^2>0.985\ 0$ ，Adj R^2 与 Pred R^2 之间的差值 >0.2 ，CV $<10\%$ ，表明模型在变量范围内可行，实验可靠性、精密度较高；各因素及其交互项、二次项均有显著或及选择影响 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)。

响应面分析见图 2~3，可知多糖质量浓度与脱色温度、多糖质量浓度与脱色时间、脱色温度与液料比、脱色时间与液料比的交互作用对脱色效果有显著影响。

3.5 验证试验 根据“3.3”“3.4”项下结果，得到最优脱色工艺为多糖质量浓度 28.17 mg/mL，脱色温度 48.36 ℃，脱色时间 96.86 min，液料比 4.89 : 1，综合评分为 6.64，考虑到实际操作，将其修正为多糖质量浓度 28 mg/mL，脱色温度 48 ℃，脱色时间 97 min，液料比 5 : 1。按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得平均综合评分为 6.42±0.54，与预测值 6.64 接近，表明该工艺稳定可行。

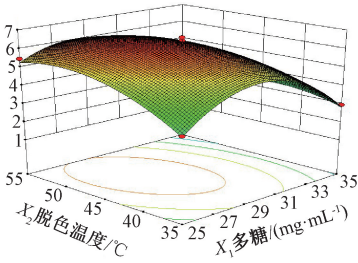
3.6 抗补体活性研究 图 4 显示，溶血抑制率随着多糖质量浓度增加升高，并呈剂量依赖性，在 1 mg/mL 时通过经典途径、旁路途径者分别达 (91.31±2.12)%、(92.82±1.94)%，与阳性对照（肝素）相当，CH₅₀、AP₅₀ 值分别为 (0.63±0.08)、(0.47±0.13) mg/mL，与阳性对照 [(0.25±0.02)、(0.30±0.03) mg/mL] 接近，表明在优化工艺下多糖抗补体活性良好，可作为潜在补体抑制剂。

4 结论

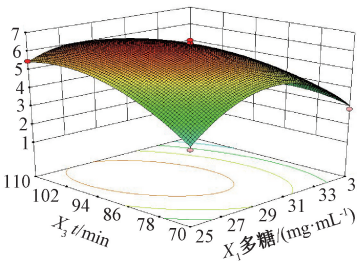
本实验将层析分析法与响应面法相结合，优化了蛹虫草多糖脱色工艺，发现最适大孔吸附树脂型号为 AB-8；最优工艺为多糖质量浓度 28 mg/mL，脱色温度 48 ℃，脱色时间 97 min，液料比 5 : 1，并且该方法稳定可靠，可为该成分工业化生产提供参考依据。同时，蛹虫草多糖在经典途径、旁路途径中对补体激活均具有一定的抑制作用，将有助于将该成分开成治疗补体过度激活相关疾病的药物，但其补体抑制作用的靶点及构效关系仍需作进一步研究。

表 2 试验设计与结果

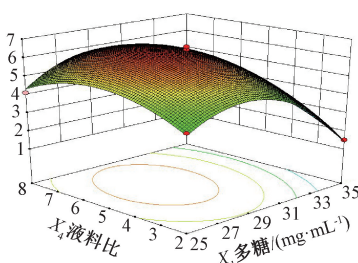
试验号	X_1 多糖/(mg·mL ⁻¹)	X_2 脱色温度/℃	X_3 脱色时间/min	X_4 液料比	D_r /%	R_r /%	K_c	综合评分/分
1	30	35	70	5∶1	0.51	0.85	6.00	4.34
2	30	35	110	5∶1	0.56	0.81	5.51	4.01
3	35	35	90	5∶1	0.48	0.81	4.03	2.96
4	30	35	90	2∶1	0.51	0.76	3.35	2.50
5	25	35	90	5∶1	0.61	0.75	4.77	3.50
6	30	35	90	8∶1	0.57	0.85	7.62	5.47
7	25	45	70	5∶1	0.50	0.80	4.00	2.95
8	30	45	90	5∶1	0.60	0.86	9.02	6.45
9	30	45	110	8∶1	0.58	0.82	6.33	4.57
10	25	45	90	8∶1	0.55	0.82	5.70	4.14
11	30	45	90	5∶1	0.60	0.85	8.74	6.25
12	35	45	90	2∶1	0.58	0.58	1.93	1.51
13	30	45	90	5∶1	0.60	0.86	9.24	6.60
14	25	45	90	2∶1	0.47	0.86	5.67	4.10
15	35	45	70	5∶1	0.59	0.73	3.88	2.87
16	30	45	110	2∶1	0.68	0.75	6.53	4.73
17	25	45	110	5∶1	0.57	0.85	7.62	5.47
18	30	45	90	5∶1	0.60	0.85	8.89	6.35
19	30	45	70	8∶1	0.53	0.87	7.32	5.25
20	35	45	90	8∶1	0.58	0.74	3.93	2.90
21	35	45	110	5∶1	0.59	0.60	2.21	1.71
22	30	45	70	2∶1	0.67	0.67	4.03	2.99
23	30	45	90	5∶1	0.60	0.85	8.85	6.32
24	30	55	70	5∶1	0.60	0.80	5.73	4.16
25	30	55	90	2∶1	0.54	0.84	6.40	4.61
26	25	55	90	5∶1	0.54	0.87	7.63	5.47
27	35	55	90	5∶1	0.47	0.78	3.17	2.37
28	30	55	110	5∶1	0.62	0.81	6.94	5.00
29	30	55	90	8∶1	0.56	0.82	5.99	4.34



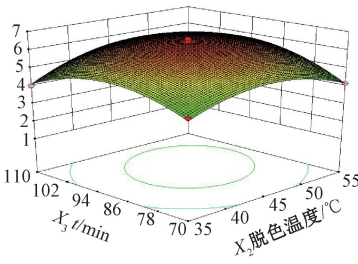
A. 多糖质量浓度与脱色温度的交互作用



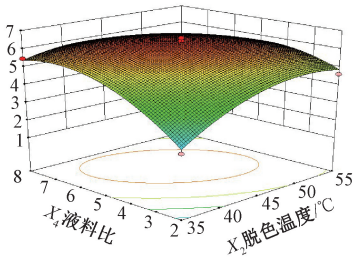
B. 多糖质量浓度与脱色时间的交互作用



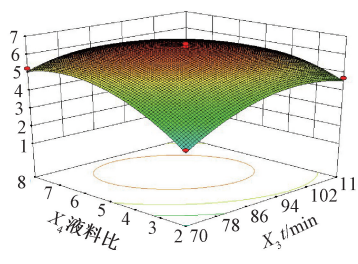
C. 多糖质量浓度与液料比的交互作用



D. 脱色温度与脱色时间的交互作用



E. 脱色温度与液料比的交互作用



F. 脱色时间与液料比的交互作用

图 2 各因素三维曲面图

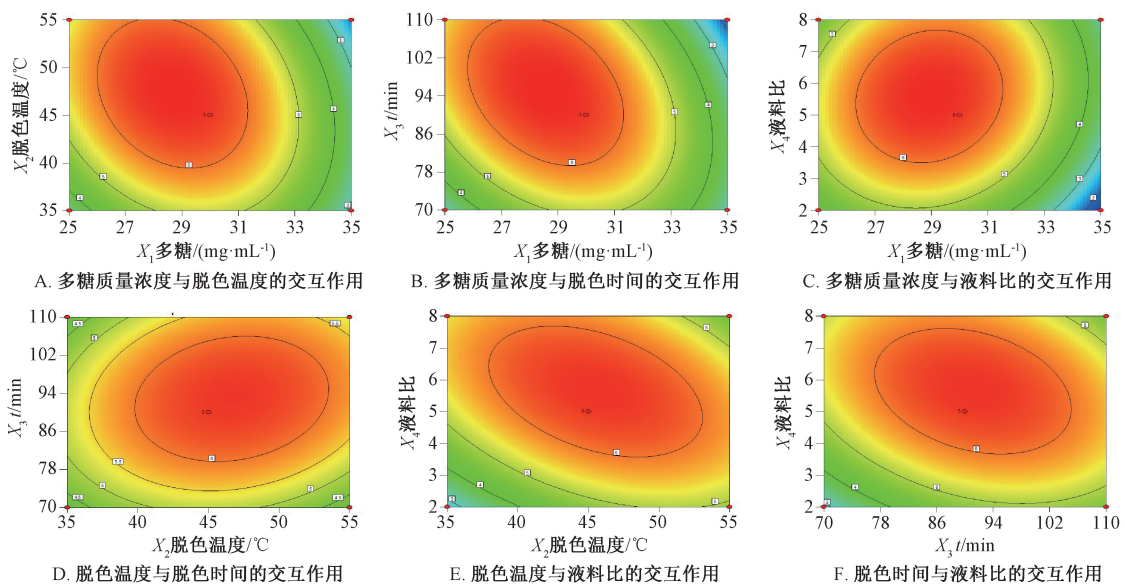


图 3 各因素等高线图

表 3 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	58.74	14	4.20	85.00	<0.000 1
X_1	10.62	1	10.62	215.23	<0.000 1
X_2	0.85	1	0.85	17.22	0.001 0
X_3	0.71	1	0.71	14.44	0.002 0
X_4	3.24	1	3.24	65.60	<0.000 1
X_1X_2	1.64	1	1.64	33.29	<0.000 1
X_1X_3	3.38	1	3.38	68.53	<0.0001
X_1X_4	0.46	1	0.46	9.28	0.008 7
X_2X_3	0.34	1	0.34	6.92	0.019 8
X_2X_4	2.63	1	2.63	53.38	<0.000 1
X_3X_4	1.46	1	1.46	29.54	<0.000 1
X_1^2	26.85	1	26.85	543.86	<0.000 1
X_2^2	5.68	1	5.68	114.99	<0.000 1
X_3^2	6.74	1	6.74	136.58	<0.000 1
X_4^2	8.39	1	8.39	169.95	<0.000 1
残差	0.69	14	0.049	—	—
失拟项	0.62	10	0.062	3.37	0.126 5
误差项	0.073	4	0.018	—	—
总离差	59.43	28	—	—	—
R^2	0.988 4		Adj R^2	0.976 7	
CV/%	5.20		Pred R^2	0.938 2	

参考文献:

[1] Zhang J X, Wen C T, Duan Y Q, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 906-914.

[2] 钟 文,郭丽新,齐 彦. 蛹虫草多糖提取及其生物活性研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(9): 219-221.

[3] 朱 静,贾毓宁. 白牛肝菌多糖脱色工艺的优化及其抗氧化活性[J]. *中成药*, 2018, 40(4): 825-830.

[4] 赵浩晨,王婉婷,雷佳美,等. 银杏果外种皮多糖的脱色工

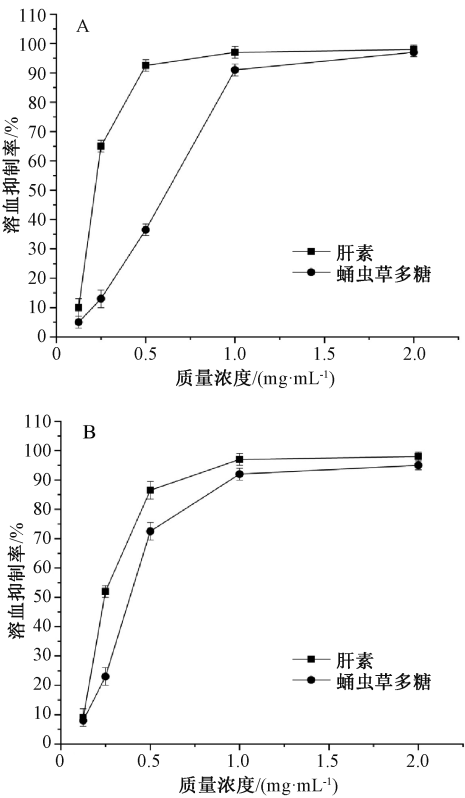


图 4 蛹虫草多糖通过经典途径 (A)、旁路途径 (B) 的溶血抑制率

艺及抗氧化活性研究[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(10): 228-231.

[5] 刘富岗,冯素香,张 杰,等. 白屈菜多糖纯化工艺的优化[J]. *中成药*, 2018, 40(2): 475-477.

[6] Harboe M, Thorgersen E B, Mollnes T E. Advances in assay of complement function and activation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(12): 976-987.

[7] 徐小娜,陈亮宇,赵心清. 天然抗补体活性物质研究进展

[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(2): 355-359; 327.

[8] Xia L, Li B B, Lu Y, *et al.* Structural characterization and anticomplement activity of an acidic polysaccharide containing 3-*O*-methyl galactose from *Juniperus tibetica* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 1244-1251.

[9] 师景双, 袁 超, 程月红, 等. 水提醇沉法提取蛹虫草多糖的工艺优化及体外抗氧化效果研究[J]. 食品与药品, 2020, 22(2): 124-129.

[10] 来永斌, 王 琦, 孙 月. 蛹虫草多糖含量的测定与分析[J]. 中成药, 2001, 23(7): 51-52.

[11] He Z, Li X, Chen Z Y, *et al.* Decolorization and antioxidant assay of polysaccharide from white wax scale using macroporous resin[J]. *Forest Res*, 2014, 27(1): 31-37.

[12] Shi Y Y, Liu T T, Han Y, *et al.* An efficient method for decoloration of polysaccharides from the sprouts of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem by anion exchange macroporous resins [J]. *Food Chem*, 2017, 217: 461-468.

[13] Cheng X H, Cheng Y W, Zhang N J, *et al.* Purification of flavonoids from *Carex meyeriana* Kunth based on AHP and RSM: Composition analysis, antioxidant, and antimicrobial activity[J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 157: 112900.

[14] Wang R S, Sun J F, Jin M, *et al.* Two new phenolic glycosides with anti-complementary activity from the roots of *Sanguisorba officinalis* L[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 35(22): 4423-4432.

[15] Hu Z Y, Zhou H L, Li Y P, *et al.* Optimized purification process of polysaccharides from *Carex meyeriana* Kunth by macroporous resin, its characterization and immunomodulatory activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 76-86.

[16] Wang Y F, Shu X, Chen Y Y, *et al.* Enrichment, purification and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Umbilicaria esculenta* macrolichen [J]. *Biochem Eng J*, 2018, 130: 10-20.

[17] Desbrieres J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 342-349.

[18] 刘 伟, 刘倩楠, 张 良, 等. 草莓多糖树脂法脱色工艺优化及其化学性质研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 38-46; 51.

[19] 张春燕, 吴美儒, 周毅峰, 等. 利用大孔树脂对莼菜多糖脱色的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 154-157; 164.

HPLC 法同时测定不同厂家断血流制剂中 3 种成分

田京歌, 倪 倩, 周娟娟, 冯有龙
(江苏省药品监督管理局, 江苏 南京 210019)

摘要：目的 建立 HPLC 法同时测定断血流软胶囊、胶囊、片剂中香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷Ⅳb 的含量。
方法 该药物 75% 乙醇提取液的分析采用 Agilent 5 TC-C₁₈₍₂₎ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相甲醇-水，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 250、283、330 nm。
结果 香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷Ⅳb 分别在 10.39~103.9、10.50~105.0、9.985~99.85 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$)，平均加样回收率分别为 99.37%、99.73%、100.31%，RSD 分别为 1.11%、1.20%、1.43%。
结论 该方法简便准确，重复性好，可用于断血流制剂的质量控制。

关键词：断血流软胶囊；断血流胶囊；断血流片；香蜂草苷；蒙花苷；醉鱼草皂苷Ⅳb；HPLC

中图分类号：R927.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2023)06-1978-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.038

断血流为唇形科植物荫风轮或风轮菜的干燥地上部分^[1]，功效清热解毒、凉血止血活血，其化学成分主要有黄酮、皂苷、挥发油等。研究表明，断血流醇提物有小剂量止血、大剂量活血的双向作用，其代表性成分是黄酮、皂苷^[2-4]；文献 [5-6] 报道，不同产地该植物中总黄酮含量为 2.09%~2.32%，总皂苷含量为 1.29%~2.13%。

目前，断血流相关制剂主要有胶囊剂、片剂、颗粒剂等，但其质量控制标准仅以醉鱼草皂苷Ⅳb 为指标^[1,7-8]，并且相关文献对其皂苷类成分的研究较多，鲜有涉及黄酮类成分。因此，本实验首次对断血流软胶囊、胶囊、片剂中香蜂草苷、蒙花苷、醉鱼草皂苷Ⅳb 含量同时进行测定，以期为该类药物全面质量控制研究提供参考。

收稿日期：2022-06-25
基金项目：江苏省市场监管局 2020 年度第 2 批科技计划项目 (KJ204121)
作者简介：田京歌 (1988—)，男，硕士，主管药师，从事药品检验与质量研究。Tel: (025) 86251210, E-mail: tianjingge2011@163.com