

方优选,有效减少了实验次数,同时根据优选条件制备的涂膜剂用于治疗风湿疼痛、跌打损伤,无皮肤过敏性,舒适度高,符合制剂预期释放要求。

目前,众多有关制剂的制备工艺优选报道中,多仅选择制剂成型性指标作为测评指标,显然这不利于制剂的内在质量控制。透皮给药系统研究中,药物自高分子储库材料中溶出的多少、快慢更是质量控制的关键。本实验将涂膜剂0.5、6、12 h的累积溶出率评分 $F_{0.5h}$ 、 F_{6h} 、 F_{12h} 作为控释涂膜剂质量的一个量化指标,显然是必要的。

将均匀实验中各组配方的累积释药率用非溶蚀型药物体系释放动力学0级模型进行拟合,通过获得参数 K_0 、 α ,对其比较分析,不仅得到了一个达到

预期释放目标的处方及其释放过程模型,以此作为制剂生产过程中的质量控制指标,同时也为今后临床需要选择相应的配方和模型奠定了基础。

参考文献:

- [1] 贵州省食品药品监督管理局. 贵州省中药和民间药物质量评价[M]. 贵阳:贵州科学技术出版社,2003.
- [2] 陈永康,刘茂坤. 家种与野生雪上一枝蒿总生物碱性及药理的比较研究[J]. 中国民族民间医药杂志,1997(1):38-42.
- [3] 杜利云. 雪上一枝蒿总生物碱及其注射液含量测定方法的改进[J]. 中国民族民间医药杂志,2000(5):301-302.
- [4] 林亚平. 中药制剂均匀试验设计微机软件的研制和应用[J]. 中国中药杂志,1995,20(8):473-476.
- [5] 林亚平,卢维伦. 非溶蚀型药物体系的释放动力学新模型—Fick第一扩散定律的修正[J]. 药学报,1997,32(11):869-873.

天花粉多糖的单糖组成和相对分子质量的测定

黄晓兰¹,吴惠勤¹,王蔚²,黄芳¹,林晓珊¹

(1. 中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室,广东 广州 510070;

2. 广州中一药业有限公司,广东 广州 510000)

摘要:目的 研究天花粉多糖的单糖组成、相对分子质量(M_r)及其分布。方法 天花粉用超声波振荡提取、乙醇沉淀分离出多糖,并用重结晶、色谱柱纯化后,采用气相色谱-质谱(GC-MS)、高效液相色谱(HPLC)分析天花粉多糖的单糖组成,用凝胶渗透色谱(GPC)分析天花粉多糖的 M_r 及其分布。结果 天花粉多糖是由鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成的杂多糖,经色谱柱纯化得到的天花粉多糖与未经纯化的天花粉粗多糖的单糖组成相同,但质量分数有所差别;天花粉多糖的GPC图有两个多糖峰,天花粉粗多糖的两个GPC峰的数均相对分子质量(M_n)分别为 1.8×10^5 和1460,天花粉多糖的两个GPC峰的 M_n 分别为 1.60×10^5 和4554。结论 两种天花粉多糖的 M_r 及单糖组成的质量分数有区别。

关键词:天花粉多糖;单糖组成;相对分子质量;HPLC;GC-MS;GPC

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)12-1810-03

天花粉又名栝楼,是葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥块根。天花粉在增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗艾滋病毒方面具有很好的功效^[1,2]。天花粉水提取物得到的天花粉多糖具有降血糖的活性^[3]。天花粉与其他中药配伍组成的药物,具有明显的降血糖功效^[4~6]。目前有关天花粉多糖的成分分析研究很少文献报道^[3,7]。笔者已对天花粉多糖的提取、分离和纯化方法进行了研究^[8]。本实验进一步采用气相色谱-质谱(GC-MS)、高效液相色谱(HPLC)、凝胶渗透色谱(GPC)对天花粉多糖的单糖组成、相对分子质量(M_r)及其分布等进行研究,对进一步探讨天花粉多糖的药理作用,以及天

花粉多糖的开发利用具有重要的意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Agilent 6890GC/5973MS 气相色谱/质谱联用仪,美国安捷伦公司;721N 型分光光度计,上海分析仪器厂。

乙腈,Merck 公司,HPLC 级;无水乙醇、丙酮、 KH_2PO_4 等试剂,AR 级;试验用水,Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 天花粉粗多糖提取与纯化^[8]:取天花粉 100 g,加入 500 mL 水,45 °C 浸提 2 h,再超声波振荡提取 2 h,静置沉淀后,经真空抽滤得到提取液。清液于

收稿日期:2008-03-28

基金项目:广东省科技计划资助项目(2006B35605009)

作者简介:黄晓兰(1964—),女,广东潮州人,研究员,主要从事药物及食品分析工作。Tel:(020)87686536 E-mail:wenhxl@126.com

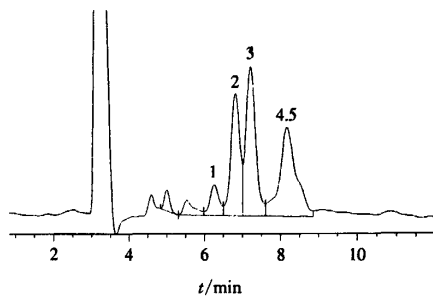
60 ℃水浴浓缩至100 mL,加入无水乙醇400 mL使乙醇的体积分数为80%,沉淀出多糖。用80%乙醇反复洗涤沉淀,于60 ℃水浴烘干,得到天花粉粗多糖。再经过Sephadex G-50葡聚糖凝胶色谱柱进一步纯化,收集第101~275 mL淋洗液,于60 ℃水浴烘干,得到天花粉多糖。

2.2 天花粉多糖的HPLC分析

2.2.1 多糖的水解:取500 mg天花粉多糖,加入2 mol/L H₂SO₄ 38 mL加热回流6 h,冷却,用饱和Ba(OH)₂溶液中中和至中性,滤过,清液浓缩定容至10 mL,进行HPLC法分析。

2.2.2 色谱条件:Kromasil NH₂色谱柱(250 mm×4.6 mm);流动相为乙腈-水(80:20);柱温为45 ℃;体积流量为1.2 mL/min;示差折光检测器;恒温45 ℃;进样量:20 μL。

2.2.3 天花粉粗多糖的HPLC分析结果:天花粉多糖水解后用高效液相色谱分析其单糖组成,并与单糖对照品进行对照,色谱图见图1。结果表明,天花粉多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、半乳糖组成,其鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、(葡萄糖+半乳糖)的质量比例为5.1:25.5:31.3:27.5。



1-鼠李糖 2-阿拉伯糖 3-果糖 4-葡萄糖 5-半乳糖
1-rhamnose 2-arabinose 3-fructose 4-glucose 5-galactose

图1 天花粉多糖的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of polysaccharide from *Radix Trichosanthis*

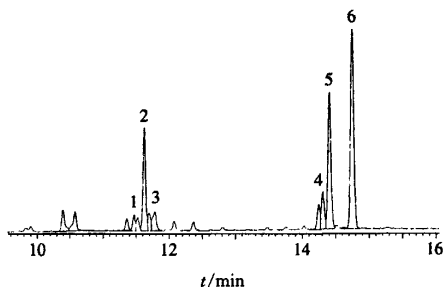
2.3 天花粉多糖的GC-MS分析

2.3.1 多糖水解产物的乙酰化:取天花粉多糖水解溶液,彻底蒸干水分,加入70 mg 盐酸羟胺,5 mL 吡啶,于90 ℃水浴加热1 h;取出稍冷,加入5 mL 醋酸酐,再于90 ℃水浴加热1 h;冷却,加10 mL 水破坏醋酐,用氯仿萃取乙酰化产物,氯仿萃取液用水洗涤,无水硫酸钠脱水,上清液通氮气浓缩定容至1 mL,进行GC-MS分析。

2.3.2 GC-MS条件:SE-30弹性石英毛细管柱(15 m×0.2 mm×0.33 μm);柱温初温100 ℃,以10 ℃/min程序升温至280 ℃,保持10 min;载气He,

柱前压70 kPa,分流比10:1,溶剂延迟2 min,进样量1.0 μL。EI离子源,电子能量70 eV,四极杆温度150 ℃,离子源温度230 ℃,电子倍增器电压2 300 V,GC-MS接口温度280 ℃,质量扫描范围m/z 29~500。

2.3.3 天花粉多糖的GC-MS分析结果:天花粉多糖水解并乙酰化后用GC-MS分析其单糖组成,将单糖对照品同时乙酰化进行对照。结果表明,天花粉多糖主要是由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成的杂多糖(图2)。由于果糖不能发生乙酰化反应,故无法用GC-MS测定;而HPLC图谱中由于甘露糖与果糖分不开,未能测定出甘露糖。综合HPLC及GC-MS的分析结果,天花粉多糖的单糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,采用苯酚-硫酸分光光度法测定天花粉多糖的量^[8],结果天花粉粗多糖和天花粉多糖质量分数分别为58.8%、90.5%。其单糖组成的相对质量分数见表1。



1-鼠李糖 2-阿拉伯糖 3-木糖 4-甘露糖 5-葡萄糖 6-半乳糖
1-rhamnose 2-arabinose 3-xylose 4-mannose 5-glucose 6-galactose

图2 天花粉多糖的GC-MS总离子流色谱图

Fig. 2 TIC Chromatogram of polysaccharide from *Radix Trichosanthis*

表1 天花粉多糖的单糖组成及质量分数

Table 1 Monosaccharide composition and relative contents in polysaccharide of *Radix Trichosanthis*

组成	质量分数/%	
	天花粉粗多糖	天花粉多糖
鼠李糖	1.89	2.10
阿拉伯糖	17.34	13.29
果糖	28.91	24.14
甘露糖	2.32	7.24
葡萄糖	33.34	21.23
半乳糖	16.07	31.95

2.4 天花粉多糖的GPC分析

2.4.1 GPC色谱条件:TSK-GEL G3000SWXL色谱柱(300 mm×7.8 mm),柱温35 ℃;流动相:0.05 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲液(pH 6.7,加

0.05% NaN₃); 体积流量: 0.5 mL/min; 示差折光检测器, 恒温 35 °C; 进样量: 20 μL。

2.4.2 GPC 校正曲线的建立: 取 Mr 为 738、5 800、1.22×10⁴、2.37×10⁴、4.8×10⁴、1.0×10⁵、1.86×10⁵、3.8×10⁵、8.53×10⁵ 的多糖对照品, 用 0.05 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 6.7, 加 0.05% NaN₃) 溶解, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 进行 GPC 分析。已知 Mr 多糖对照品的相应保留时间见表 2。以多糖对照品的淋洗体积为横坐标, Mr 为纵坐标做 GPC 的校正曲线, 见图 3。

表 2 多糖对照品的保留时间

Table 2 Retention time of polysaccharides reference substance

多糖相对分子质量	保留时间/min	多糖相对分子质量	保留时间/min
738	22.6	1.0×10 ⁵	12.3
5 800	20.1	1.86×10 ⁵	11.9
1.22×10 ⁴	18.3	3.8×10 ⁵	11.7
2.37×10 ⁴	16.3	8.53×10 ⁵	11.7
4.8×10 ⁴	13.8		

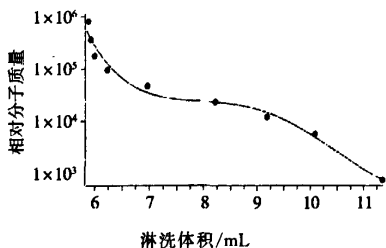


图 3 多糖对照品的凝胶色谱校正曲线

Fig. 3 GPC Curve of polysaccharides reference substance

2.4.3 样品分析: 取一定量的天花粉多糖样品, 用 0.05 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 6.7, 加 0.05% NaN₃) 溶解, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 进行 GPC 分析。根据样品的出峰时间在校正曲线上求得多糖峰的平均 Mr 及其分布。根据峰面积归一化求得该多糖的相对质量分数, 结果见表 3。天花粉粗多糖和多糖的凝胶渗透色谱图见图 4。结果表明天花粉粗多糖有 3 个峰, 第 3 个峰为溶剂及小分子杂质的混合峰, 前 2 个峰为多糖峰。峰 1 的保留时间为 11~16 min, Mr 较大, 数均相对分子质量 (Mn) 达 1.81×10⁵, 其质量分数为 7.8%; 峰 2 的保留时间为 21.9 min, Mr 较小, 数均相对分子质量为 1 460, 其质量分数为 45.3%。天花粉多糖也有 3 个峰, 但第 3 个峰即溶剂及小分子杂质峰仅少量残留, 样品中大部分为前 2 个多糖峰。峰 1 的保留时间为 11~13 min, Mr 较大, Mn 为 1.60×10⁵, 其质量分数为 12.6%; 峰 2

表 3 天花粉多糖的相对分子质量和质量分数

Table 3 Molecular weight and contents in polysaccharide of Radix Trichosanthis

样品	峰	保留时间/min	Mn	Mw	D	质量分数/%
天花粉粗多糖	1	12.58	181 320	256 154	1.41	7.8
	2	21.92	1 460	1 781	1.22	45.3
天花粉多糖	1	12.65	160 262	203 532	1.27	12.6
	2	19.80	4 554	6 874	1.51	78.9

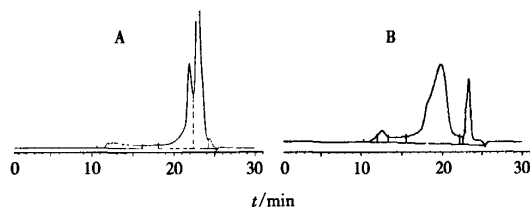


图 4 天花粉粗多糖(A)和多糖(B)的凝胶色谱图

Fig. 4 GPC Chromatograms of polysaccharide (A), and purified polysaccharide (B) from Radix Trichosanthis

的保留时间为 19.8 min, Mr 较小, Mn 为 4 554, 其质量分数为 78.9%。

3 讨论

天花粉多糖主要是由鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖 6 种单糖组成的杂多糖, 经过 SephadexG-50 葡聚糖凝胶色谱柱纯化后得到的天花粉多糖的单糖组成, 与未经色谱纯化的天花粉粗多糖相同, 但质量分数有所差别; 而天花粉多糖的 GPC 谱图主要有两个多糖峰, 天花粉粗多糖的两个 GPC 峰的 Mn 分别为 1.81×10⁵ 和 1 460, 天花粉粗多糖的两个 GPC 峰的 Mn 分别为 1.60×10⁵ 和 4 554。其功效有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975.
- [2] 洪 纓, 顾海鹏. 天花粉药理研究进展[J]. 北京医药, 1994 (3): 32-35.
- [3] Hikino H, Yoshizawa M, Suzuki Y, et al. Isolation and hypoglycemic activity of trichosans A, B, C, D, and E: Glycans of Trichosanthes kirilowii roots [J]. Planta Med, 1989, 55: 349-350.
- [4] 张尊听, 刘谦光, 库尔班江. 高效薄层色谱扫描法测定玉泉丸中葛根素的含量[J]. 中草药, 2000, 31(7): 519-520.
- [5] 李明炬, 孙明玉. 用蒸发光散射检测器的 HPLC 测定缘糖舒胶囊中黄芪甲苷含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 813-814.
- [6] 张丽娟, 李 锦, 何 翱, 等. 微量定量法测定消渴生津胶囊中的天花粉[J]. 中草药, 1998, 29(5): 316.
- [7] 田庚元, 李寿桐, 唐天宝, 等. 天花粉多糖的研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1985, 17(5): 582-586.
- [8] 黄晓兰, 吴惠勤, 王 蔚, 等. 天花粉多糖的提取、分离与纯化研究[J]. 中草药, 2008, 39(11): 1662-1665.