

用数论网格法对方程进行优化,各因素的考察范围分别为 $X_1(0\sim6\%)$, $X_2(0\sim10\%)$, $X_3(0\sim6\%)$, 计算次数 5 037 次,结果显示 X_1X_2 取试验范围内的最大值时为“最优”。 X_3 对初黏力的影响在逐步回归分析时被剔除,认为影响可忽略。关联度分析结果与数论网格法优化结果一致。

2.3.5 结果分析 由关联度分析、回归方程系数和数论网格法优化结果判断, $X_1(A)$ 和 $X_3(C)$ 是影响透皮速率常数 J 的主要因素,二者间存在相互作用。 $X_2(B)$ 对透皮速率常数无明显作用。 $X_1(A)$ 和 $X_2(B)$ 是影响初黏力的主要因素,二者间亦存在相互作用。 $X_3(C)$ 对初黏力无明显作用。对二个方程的优化结果均表明,自变量取值宜大。比较透皮速率常数和初黏力二者间的关系,应在保证一定初黏力的条件下,提高透皮速率常数。因此综合考虑,选择最优组合为月桂萘萘酮-油酸-丙酮=6%:5%:6%。

2.4 验证试验 按上述优化条件制备的 3 批广藿香酮巴布剂,测定其初黏力和透皮速率常数,3 批样品中初黏力和透皮速率常数平均值分别为 11.1235 g 和 5.4886 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}(n=3)$ 。结果均无明显差异($P>0.05$)。对巴布剂性能进行整体评价良好。

3 结论与讨论

3.1 关于压敏胶的选择 本研究所考察的压敏胶均为聚丙烯酸压敏胶,它是亲水性聚合物,与皮肤有良好的亲和性及优良的黏合性、耐老化性,是一种较好的压敏胶骨架材料^[5]。但国产的聚丙烯酸压敏胶是胶乳液,载药量低,药量超过一定限度即完全改变压敏胶性能,黏性大大降低,并析出药物结晶。同时亦存在不稳定问题,已有企业因为不同批次的压敏胶质量问题而使贴片黏性和释放度改变,影响产品质量。本研究曾拟用德国 Rohm 公司的 Eudragit E100,属阳离子型聚甲基丙烯酸酯类,最大的特点是具有较高的水蒸气通透性和高的载药量,所以可降低贴片对皮肤的刺激性,减小贴片厚度和尺寸。而且它为细粉形式,产品质量易控,并可通过加入交联剂调节贴片性能,是非常适合的压敏胶骨架材料,已应用于黄体酮、氯雷他定、吡罗昔康等多种透皮贴剂的研究开发。但由于来源问题,未能用于本项目研究。

3.2 关于压敏胶黏性的评价 参照中国药典 2005 年版附录一部增修订内容中的相关内容,评价透皮贴剂的黏性应包括初黏力、持黏力(内聚力)和剥离强度(黏附力)试验。实验研究中发现,以压敏胶为基质的贴片内聚力强,进行持黏力试验时,砝码质量为 1 kg,在长达 30 min 的时间内仍不脱落,故认为压敏胶贴片的内聚力和黏附力符合要求,不再进行持黏力和剥离强度测定。重点以初黏力作为黏性评价指标。

3.3 关于透皮促进剂的筛选 以透皮速率常数和初黏力为考察指标,分别对其单独分析,结果表明二者的主要影响因素各不相同。其中 $X_1(A)$ 和 $X_3(C)$ 是影响透皮速率常数的主要因素,二者间存在相互作用。估计是 A 能增加 C 在角质层的分配量,从而增加其对角质层的作用时间和作用强度。而 $X_1(A)$ 和 $X_2(B)$ 是影响初黏力的主要因素,二者间亦存在相互作用。由于加入促进剂的目的是增加药物的透皮

吸收,而且 A 与 B 合用亦可产生协同作用,因此综合考虑时以透皮速率常数为主,初黏力为辅,在初黏力达到一定范围内,选择较高的透皮速率常数。最优组合为 A:B:C=6%:5%:6%。

参考文献:

- [1] 汪小根,莫小路,蔡岳文,等. 组培广藿香与扦插广藿香中百秋里醇和广藿香酮的含量对比分析[J]. 药物分析杂志,2009, 29(1):96-99.
- [2] 汪小根,邹玉繁,陈瑜珍,等. 均匀设计法筛选广藿香有效部位巴布剂的基质处方[J]. 中国中药杂志,2008, 33(6):638-641.
- [3] 张英丰,汪小根,周莉玲. 大鼠皮肤角质层对青藤碱脂质体贴剂透皮吸收的影响[J]. 中草药,2006, 37(9):1322-1324.
- [4] 汪小根,邹玉繁,王玉生. GC-MS 联用技术测定广藿香油中广藿香酮的含量[J]. 药物分析技术,2005, 25(5):582-584.
- [5] 陈阳,王宝华,伍丹. 聚丙烯酸树脂类辅料在制剂中的应用[J]. 中国药业,2007, 16(14):25-27.

[收稿日期]2010-10-17

毛细管气相色谱法测定黄精低聚糖的单糖组分

王俊敏,董晶晶,贺海花,杨云 (河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的:研究黄精低聚糖中单糖组分。方法:采用 80%乙醇回流提取得黄精小分子糖部位浸膏,通过 D101 大孔吸附树脂柱、活性炭柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶柱层析进行分离纯化,得到一个黄精低聚糖样品 RPO-1。经水解、还原、乙酰化后利用气相色谱仪分析,确定其单糖组分。结果:RPO-1 是由葡萄糖(Glu)组成的均一糖。结论:该方法灵敏、准确和重复性好,可以准确测定出黄精低聚糖中所含的各种单糖。

[关键词] 毛细管气相色谱;黄精低聚糖;单糖组分

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)17-1467-03

低聚糖作为糖生物学中重要研究对象,具有良好的保健作用,被产业界认为新一代功效食品,具有促进双歧杆菌增殖,抑制肠道病原菌繁殖,增强免疫、抗肿瘤、抗感染^[1]、降血糖、抗氧化、保护肝脏等多种药理活性^[2]。无论是低聚糖产品的开发,还是低聚糖生物功能的研究,都要求对低聚糖中的单糖组分进行分析。因此,确定其单糖组分是低聚糖结构研究的重要环节。毛细管气相色谱法测定单糖具有选择性强、分辨率好、灵敏度高以及分析速度快等优势。本实验采用糖醇乙酸酯气相色谱法,利用 HP-5 毛细管柱分析黄精低聚糖的单糖组分,为其开发及综合利用提供理论参考。

1 材料

安捷伦 7890A 气相色谱仪,配备氢火焰离子化检测器(美国 Agilent 公司);黄精药材采集于河南省洛阳市栾川龙峪湾,由河南中医学院董诚明教授鉴定为百合科黄精属鸡头

[基金项目] 河南省重大科技攻关项目(编号:200422030700) [作者简介] 王俊敏,女,讲师, [通讯作者] 杨云,女,硕士生导师,教授,电话:0371-65680605, E-mail: Yyun@china.com.cn

黄精的根茎,将采挖的新鲜黄精除去芦头、须根及泥沙,清蒸 1 h 后干燥,粉碎,过 20 目筛,备用。

2 方法

2.1 黄精低聚糖的提取、分离及纯化 黄精药材粉末用 80%乙醇 85℃水浴回流提取 2 次,提取时间分别为 3 h 和 2 h,合并 2 次滤液,减压浓缩,将浓缩液倒至蒸发皿中 40℃水浴挥尽乙醇,得黄精小分子糖部位浸膏。取浸膏适量过 D101 型大孔吸附树脂柱去除黄酮、皂苷等杂质,水洗脱液减压浓缩后过活性炭柱层析进行初步分离和纯化。取活性炭水洗脱部位浸膏约 1 g,少量纯化水溶解后上 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,于室温下用纯化水进行洗脱,流速为 0.5 mL·min⁻¹,每管收集 3.0 mL。采用苯酚-硫酸法隔管检测,在 490 nm 下比色检测峰位,收集主峰位的洗脱液,减压浓缩,真空冷冻干燥,得黄精低聚糖组分 RPO-1。

2.2 RPO-1 的水解 精密称取 RPO-1 样品 5.0 mg 于安瓿瓶中,加入 2 mol·L⁻¹三氟醋酸(TFA)4 mL,安瓿瓶封口,样品溶解后置于 110℃烘箱中加热水解 5 h,水解液于 40℃减压蒸干,用甲醇反复洗以除去残留的 TFA,得单糖放置于干燥箱中备用。

2.3 RPO-1 的单糖组分分析

2.3.1 标准单糖的衍生化 准确称取标准单糖样品(鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、果糖)各 5.0 mg 于 100 mL 鸡心瓶中,加入 30.0 mg 硼氢化钠,缓慢加入 2.0 mL 纯化水,振荡溶解,于室温条件下间歇振荡反应 2.0 h。加冰醋酸中和过量硼氢化钠,振荡至溶液不再产生气泡为止,此时溶液的 pH 应在 4.0~5.0 之间,加甲醇 2.0 mL 振荡溶解后减压蒸干,反复 5 次以除去硼酸根和水分,直至壁上为透明物质。将鸡心瓶置于 100℃烘箱中干燥 15 min 以除去残余水分,冷却后加入 2.0 mL 醋酸酐,密塞,100℃下反应 1 h,冷却至室温,加甲苯 5 次(每次 3.0 mL),减压蒸干除去多余的醋酸酐。将乙酰化产物用 1 mL 氯仿溶解,0.45 μm 微孔滤膜过滤并收集滤液,残渣再用 1 mL 氯仿溶解,合并两次滤液,备用。

2.3.2 样品单糖的衍生化 将上述 RPO-1 水解所得单糖按照“2.3.1”项下方法衍生化,反应产物经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行气相色谱分析。

2.3.3 气相色谱分析 色谱柱:HP-5 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);检测器:氢火焰离子化检测器(FID);程序升温:起始温度 170℃,以 3℃·min⁻¹升温至 200℃,再以 0.6℃·min⁻¹升温至 210℃;柱温:进样口温度 280℃,检测器温度 280℃;基本参数:载气为氮气,恒流模式,流量为 1 mL·min⁻¹,空气、氢气和加尾吹氮气流速分别为 400,40,25 mL·min⁻¹;进样口采用分流模式,分流比为 10:1,进样量 0.2 μL。

3 结果

RPO-1 水解衍生化产物气相色谱图如图 2 所示,将各色谱峰和标准品的保留时间对照(图 1),可知 RPO-1 样品的气相色谱图只出现 1 个色谱峰,由图 1 和表 1 可以看出该样品是由葡萄糖组成的均一糖。尽管果糖的一部分衍生化产物与葡萄糖的衍生化产物相同,但果糖衍生化后产生两个色谱峰,而黄精低聚糖样品经水解、乙酰化后的气相图谱中只出现 1 个色谱峰,因此可以确定其样品中含有葡萄糖。

经过后期紫外、红外、核磁共振等现代仪器分析方法进一步确定该样品由均一葡萄糖组成的结果是准确的。

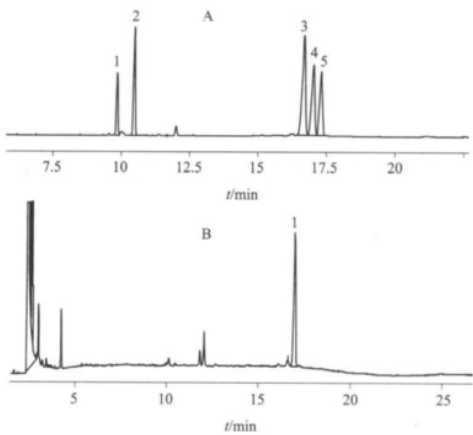


图 1 气相色谱图
A. 混合标准单糖衍生化;B. RPO-1 水解衍生化产物;1-鼠李糖;2-木糖;3-甘露糖;4-葡萄糖(果糖);5-半乳糖
Fig 1 Gas chromatogram of mixed standard monosaccharides
A. mixed standard monosaccharides; B. aldoonitrile acetates of hydrolysis products from RPO-1; 1-Rhamnose; 2-Xylose; 3-Mannose; 4-Glucose(Fructose); 5-Galactose

表 1 标准单糖及 RPO-1 水解衍生物的保留时间(min)
Tab 1 Retention time of standard monosaccharides and RPO-1 hydrolysis derivatives(min)

衍生物名称	保留时间		
	标准单糖	混标	低聚糖
鼠李糖	9.92	9.86	
木糖	10.64	10.50	
甘露糖	16.85	16.71	
葡萄糖	17.13	17.04	16.964
果糖	16.77/17.15	—	
半乳糖	17.50	17.33	

4 讨论

气相色谱法作为重要的仪器分析方法,在糖的组分分析中广泛使用。但它要求试样能够气化,且在高温下不分解,碳水化合物均难达到要求。因此,气相色谱法测定低聚糖组分和含量时就必须先将不具挥发性的单糖转化成单糖的挥发性衍生物。目前经常采用的衍生方法有三甲基硅烷衍生法、糖腈乙酰酯衍生法和糖醇乙酰酯衍生法。由于硅烷化在生成糖腈三甲基硅醚衍生物时会产生衍生物的异构体,对 D-甘露糖、D-葡萄糖、D-核糖、D-阿拉伯糖分离和鉴定都较差,色谱峰复杂,给定性和定量带来困难^[3-4]。糖腈乙酰酯衍生法操作繁琐,时间长,需要反复去除衍生化试剂^[5]。因此目前普遍采用糖醇乙酸酯衍生法^[6],其原理为单糖首先被硼氢化钠还原为糖醇,接着糖醇与醋酸酐反应生成具有挥发性的糖醇乙酸酯衍生物,最后用毛细管柱和程序升温技术对挥发性成分进行定性定量分析。不足之处在于所用的气相分析方法只适合中性糖的测定,不适合糖醛酸和氨基糖的测定。

果糖的乙酰化衍生物图谱显示 2 个峰,其中一个峰的保留时间与葡萄糖的保留时间相一致,可能是糖的异构化导致一部分果糖在硼氢化钠的作用下和葡萄糖一样都被还原为葡萄糖醇,另外一个峰产生的具体机制有待于进一步研究。

鉴于以上原因,果糖的一个峰与葡萄糖的峰重叠,另外一个峰的保留时间因与甘露糖的保留时间相近,导致混合标准单糖的色谱图上只出现 5 个峰。

RPO-1 水解后样品中残留的 TFA 会使还原反应时加入的硼氢化钠分解,故要用甲醇反复洗至中性,以完全除去 TFA,还原反应结束后,加入冰醋酸分解未反应完的硼氢化钠,生成醋酸钠和硼酸钠。醋酸钠是无色透明晶体,是乙酰化反应的催化剂,硼酸钠呈白色而不透明状,并且硼酸根会减慢糖醇乙酰化的反应速率,故必须反复用甲醇以除去硼酸根,直到管壁上无白色物质为止。

糖醇乙酸酯衍生化方法能够较好地实现 RPO-1 水解产物的衍生化,衍生物经干燥及氯仿溶液溶解后没有出现色谱峰拖尾现象,各峰分离效果较好,而且该方法具有反应时间短、试剂易得、定性简单、可靠和定量准确等优点,适于单糖衍生化产物气相色谱分析的前处理。目前,在国内外临床上使用较为普遍的植物多糖,如香菇多糖、裂褶菌多糖、茯苓多糖等都是葡萄糖为主聚合形成的葡聚糖,具有较好的抗癌及抗菌消炎等生物活性^[7]。本实验通过气相分析所得出的结果与之相类似,黄精低聚糖具体结构与生物活性的关系有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Roller M, Rachkemmer G, Watzl B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats[J]. J Nutr, 2004, 13(4): 153-156.
[2] 郭丽民, 张汝学, 贾正平, 等. 寡糖的药理作用和机制研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1353-1355.
[3] Debrecq G, Domon B, Fournet B. Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents [J]. Carbohydrate Res, 1996, 290: 175.
[4] 田福利, 其木格, 高安社, 等. 糖醇乙酸酯衍生物制备方法的改进-气相色谱法分离木糖, 核糖, 阿拉伯糖, 葡萄糖和甘露糖[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1995, 26(2): 181-184.
[5] 张威, 何红波, 张明, 等. 糖腈乙酸酯衍生气相色谱法测定土壤水解性单糖[J]. 土壤通报, 2008, 39(4): 913-916.
[6] 韩丽, 欧阳臻. 茅苍术多糖的分析[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1841-1843.
[7] 陈惠黎. 糖复合物的结构和功能[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 336-339.

[收稿日期] 2010-09-16

高效液相色谱法测定黔不同产地的续断中川续断皂苷Ⅵ的含量

杨武德, 彭娇平, 冯静 (贵阳中医学院药学院, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 用 HPLC 法测定黔不同产地的中药材续断中川续断皂苷Ⅵ的含量, 为评价贵州省药材续断的质量标准提供参

考。方法: 采用高效液相色谱法测定 16 个贵州省不同地区的续断药材, 色谱柱为 Hypersil ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (30:70); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 212 nm; 柱温 35 ℃。结果: 川续断皂苷Ⅵ在该色谱条件下获得良好分离, 线性范围为 0.007 41~0.051 87 mg · L⁻¹, r=0.999 6, 平均加样回收率为 96.82%, RSD 为 2.4%, 重复性 RSD 为 2.7%。结论: 方法快速简便, 结果准确可靠。
[关键词] 黔不同地区; 续断; 川续断皂苷Ⅵ; 高效液相色谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)17-1469-03

续断为常用中药材, 始载于《神农本草经》, 列为上品, 性微温, 味苦、辛、甘, 归肝、肾经。本种为广布种, 全国各省区多数都有分布; 我省主产毕节、大方、兴义、安顺、贵阳、遵义、都匀、独山、松桃、镇远、凯里、雷山及江口(梵净山)等, 并有栽培种植, 资源丰富。生于山坡下部草丛、沟边、路旁、田埂及撂荒土地等潮湿处, 资源十分丰富。具有补肝肾、强筋骨、调血脉、续折伤、止崩漏、安胎等功效^[1]。主治风湿性骨疼, 腰膝酸疼, 肝肾虚弱, 遗精, 尿频, 胎动不安, 先兆流产, 月经不调, 崩漏, 跌打损伤^[2]。

已有研究表明, 续断补肝肾、强筋骨、续折伤的主要活性成分是三萜皂苷类成分, 其中川续断皂苷Ⅵ为主要的有效成分^[3], 具有抗骨质疏松、增加骨密度的作用^[4]。随着对续断研究及应用的不断深入(贵州仙灵骨葆胶囊的生产等), 对资源需求量不断增加, 我省种植面积也不断扩大。本文用 HPLC 测定贵州省不同产地的续断中川续断皂苷Ⅵ的含量, 为更好地评价黔产续断药材质量, 合理开发利用贵州续断药材资源提供参考。

1 材料

高效液相色谱仪 SPD—20A (日本岛津公司) (二元泵, 手动进样器, 柱温箱, 紫外检测器, 化学色谱工作站); Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 对照品: 川续断皂苷Ⅵ Asperosaponin Ⅵ (纯度 ≥ 98%, 供含量测定用, 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 1051-100810); 甲醇为分析纯; 乙腈为色谱纯; 水为纯化水。

续断药材采于贵州各地, 产地: 盘县红果, 龙里那榜, 威宁哈喇河乡, 开阳禾丰乡, 赫章韭菜坪, 扎佐林场, 盘县大平地, 大方, 龙里职校, 水城野钟, 息烽县南极, 水城赫章交界, 施秉双锦, 龙里猫猫头, 龙里湾寨, 盘县板桥镇梅子冲基地 (种植一年生); 经贵阳中医学院鉴定教研室副教授魏升华鉴定为正品续断 (*Dispsacus aspercides* C. Y. Cheng et T. M. Ai)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温: 35 ℃, 流动相: 乙腈-水 (30:70); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 212 nm, 进样体积: 20 μL。色谱图见图 1。
2.2 对照品溶液的制备 精密称取川续断皂苷Ⅵ对照品 7.40 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈-水 (30:70) 至刻度, 摇匀, 使成每 1 mL 含川续断皂苷Ⅵ 0.148 2 mg 的对照品溶液。
2.3 供试品溶液的制备 取药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈-

[作者简介] 杨武德, 男, 学士, 副教授, 电话: 13885078995, E-mail: ywd_680708@sina.com