

川续断皂苷 溶出量与其绝对含量无显著性差异, 即在该条件下超微粉和细粉中川续断皂苷 均能充分溶出。但超微粉溶出速率常数 $T_{0.9}$ 仅为 0.23 min, 而细粉 $T_{0.9}$ 为 10.41 min, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明续断超微粉可显著增大川续断皂苷 的溶出速度。其原因可能是超微粉碎过程击碎川续断细胞壁, 药材比表面积增大, 导致其溶出速率增大。实验结果显示, 超微粉饮片具有“速释”的特

点, 如果想要药物迅速发挥药效, 则应采用“超微粉饮片”; 如果想让药物缓慢发挥药效, 则应采用“普通饮片”。但是, 药物的粒径和溶出速率之间的相关性, 尚需要深入进行研究。超微粉碎过程会使某些活性成分提高溶出速率, 是否也会让某些具有毒性作用的化学成份提高溶出速率也需要深入进行研究。

表 2 川续断超微粉和细粉中川续断皂苷 体外溶出拟合函数

Table 2 The fitting function of vitro dissolution of asperosaponin in the ultra-micro powder and the fine powder of Radix Dipsaci

数学模型	川续断超微粉	r	川续断细粉	r
零级动力学函数	$F = 0.0012t + 0.9533$	0.4007	$F = 0.0065t + 0.7831$	0.6798
Higuchi分布	$F = 0.0113t^{1/2} + 0.9341$	0.5175	$F = 0.0571t^{1/2} + 0.6923$	0.8070
威布尔分布	$\text{Lnln}(1/(1-F)) = 0.1513\text{ln}t + 1.0446$	0.7430	$\text{Lnln}(1/(1-F)) = 0.3933\text{ln}t + 0.0987$	0.9517
对数正态函数	$F = 0.0492\text{log}t + 0.9295$	0.6673	$F = 0.2210\text{log}t + 0.6884$	0.9275

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005: 231.
 [2] 王 岩, 周莉玲, 李 锐. 川续断的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(4): 233-234.
 [3] 罗付生, 韩爱军, 李 毅, 等. 超微粉体技术在中药行业中的应用[J]. 中草药, 2001, 32(10): 941-942.
 [4] 王宏洁, 司 南, 边宝林. 饮片超微粉碎前后主要有效成分溶出量的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 1111-1112.

大叶白麻叶多糖提取及组分分析

史俊友^{1,2}, 索有瑞¹, 李国梁^{1,2}, 孙志伟^{1,2}, 刘永军^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

关键词: 大叶白麻; 多糖; 单糖; 蒽酮-硫酸法; 毛细管电泳

摘要: 目的: 从大叶白麻中提取多糖, 测定多糖含量并分析其单糖组成。方法: 采用热水法提取大叶白麻叶多糖, 乙醇沉淀, Sevage法脱蛋白, 活性碳脱色, 采用蒽酮-硫酸比色法 620 nm处测定多糖含量, 高效毛细管电泳分析其单糖组分。结果: 经蒽酮-硫酸比色法测定大叶白麻叶中多糖含量为叶重的 0.97%; 经高效毛细管电泳分析发现, 大叶白麻含至少有 9种单糖, 其中含量较多的为半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖。结论: 本法分离大叶白麻叶多糖在 HPCE上易实现 9个单糖基线分离具有灵敏度高的特点。单糖种类丰富, 具有较高的研究和开发价值。

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528(2010)01-0102-05

Extraction of polysaccharide from *Poacynum Hendersonii* leaves and component analysis

收稿日期: 2009-06-14

基金项目: 中国科学院百人计划项目资助 (0729011211)

作者简介: 史俊友 (1981 -), 男, 博士研究生, 主要从事天然产物化学研究。Tel: (0971) 6143857. E-mail: shijunyou123@126.com

* 通讯作者: 刘永军 (1964 -), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然产物化学研究。Tel: (0971) 6143857 E-mail: yongjunliu123@163.com

com

SHI Jun-you^{1,2}, SUO You-rui¹, LI Guo-liang^{1,2}, SUN Zhi-wei^{1,2}, LU Yong-jun^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039, China)

KEY WORDS: *Poacynum hendersonii*; polysaccharide; monosaccharide; anthrone-H₂SO₄ colorimetry; HPCE

ABSTRACT: **A M:** To extract and isolate polysaccharide from *Poacynum Hendersonii* leaves, determine its content and analyze the monosaccharide composition. **METHODS:** *Poacynum Hendersonii* leaves was extracted with hot water, crude polysaccharide was precipitated with ethanol, deproteinated according to Sevage method, coloured with acticarbon. Then of polysaccharide contents were measured by anthrone-H₂SO₄ colorimetry at the wavelength of 620 nm. The monosaccharide composition was determined by HPCE. **RESULTS:** The polysaccharide content was 0.97% of leaf weight, and Gal, Ara, and Man contents were three higher monosaccharides. **CONCLUSION:** The method is easy to carry out the baseline resolution in HPCE and has highly sensitivity.

大叶白麻 (*Poacynum hendersonii* (Hook f) Wodson), 俗称大花罗布麻, 夹竹桃科白麻属多年生草本植物, 是一种优质的纺织纤维材料。由于大叶白麻具有延缓衰老、降压、降脂、抗感冒、镇静安神等功效^[1-5], 大叶白麻已被广泛应用于药用保健业。大叶白麻叶中的黄酮、木脂素、香豆素、萜类和维生素等成分已有研究^[6-9], 但对大叶白麻叶中多糖的提取分离和相关成分的研究尚未见报道。多糖的分析方法主要包括化学方法、气相色谱法 (或气相色谱-质谱法)、液相色谱法和毛细管电泳法, 其中化学方法只能测定含糖量且结果准确度较差, 高效液相色谱法具有同时分离检测多种糖^[10]等优点, 但该方法须有专门的分离柱, 价格昂贵, 操作较繁琐且主要利用分离物质的紫外吸收特性进行检测, 灵敏度较低。毛细管电泳 (CE) 作为一种新兴的分离分析技术已在食品分析中已引起广泛关注。CE的主要优点是分离效率高、速度快, 仅需要价廉的石英毛细管, 试剂、样品消耗也很小, 因而成本低。本文首先采用硫酸蒽酮法对大叶白麻的多糖含量进行了测定, 然后用本课题组自制的衍生试剂 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP)^[11,12] 对该多糖中的单糖组分进行了柱前衍生毛细管电泳分析, 以期为大叶白麻多糖的开发利用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

实验用大叶白麻叶于 2008 年 8 月中旬采摘于青海格尔木地区; 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) (自制); 单糖标准品: 葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl)、甘露糖 (Man)、鼠李糖 (Rha) (国药集团化学试剂公司), 葡萄糖醛酸 (GlcUA)、半乳糖醛酸 (GalUA)、阿拉伯糖 (Ara) (Fluka 公司), 岩藻糖 (Fuc) (Sigma 公司); 硼砂 (分析纯, 徐州试

剂二厂), 其它试剂皆为分析纯。纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 主要仪器

752 型紫外分光光度计 (上海光谱仪器厂); HP-3D 毛细管电泳仪 (美国 Agilent 公司); 毛细管: 总长 58.5 cm, 有效柱长为 50 cm, 内径为 50 μm (河北省永年锐泽色谱器件有限公司); PHS-3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 大叶白麻多糖提取纯化

将自然风干的大叶白麻叶粉碎, 过 40 目筛。称取 50 g, 置于圆底烧瓶中, 依次用石油醚 (60~90)、乙醚提取 4 h, 挥干溶剂, 加 80% 乙醇 400 mL 回流提取 2 次, 2 h 次, 滤纸过滤, 滤渣置圆底烧瓶中, 加蒸馏水 600 mL, 沸水浴回流提取 2 h, 滤纸过滤, 再以 600 mL 蒸馏水重复提取一次, 合并滤液, 真空浓缩 (60℃, 真空度 0.095 MPa) 至 200 mL, Sevage 法除蛋白, 反复进行至无蛋白层, 按固液比 1:5 加入活性炭 40 g, 80℃ 条件下对多糖进行脱色, 加入无水乙醇使乙醇浓度达到 80%, 冰箱中过夜, 离心 (6 000 r/min, 5 min), 多糖沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗两次, 60℃ 干燥至恒重, 即得大叶白麻精制多糖, 称重备用。

2.2 大叶白麻多糖的含量测定

2.2.1 样品溶液的制备

精密称取各样品粉末 (过 40 目筛) 1 g, 分别置于圆底烧瓶中, 加 80% 乙醇 100 mL, 回流提取 1 h, 趁热过滤, 滤渣用 80% 热乙醇洗涤 (8 mL × 3)。滤渣连同滤纸置于烧瓶中, 加蒸馏水 50 mL, 沸水浴提取 1 h, 趁热过滤, 滤渣用热蒸馏水洗涤 (10 mL × 3), 洗液并入滤液中, 放冷后, 定容至 100 mL, 制得各样品溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制

精确称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 24.6 mg,置于 100 mL 量瓶中,以蒸馏水定容至刻度,配成 0.246 mg/mL 的标准液。分别精确吸取标准液 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中,以蒸馏水稀释定容得系列标准溶液。精确吸取各标准溶液 1 mL,置 10 mL 具塞试管中,加入 0.2% 硫酸-萘酮试液 4 mL,摇匀,冰水浴 10 min,立即置于沸水浴加热 15 min,取出用冷水冷却至室温并放置 10 min,于 620 nm 处测定吸光度。另精密吸取蒸馏水 1 mL,同法操作,作为空白对照。以吸收度 A 为纵坐标,葡萄糖浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标作标准曲线,得回归方程为: $A = 0.0948C + 0.0382$, 其中 $r = 0.9987$ 。

2.2.3 换算因子的测定^[13]

称取干燥至恒重的大叶白麻精制多糖 22.2 mg,置于 100 mL 的量瓶中,加入蒸馏水定容(可以稍微加热助溶多糖),制得大叶白麻多糖贮备液。按照 2.2.2 项的方法测定大叶白麻多糖贮备液的吸光度(A),由回归方程求出大叶白麻多糖贮备液中葡萄糖浓度,按下式计算换算因子 f : $f = W/CD$, 式中 W 为称取多糖的重量(mg); C 为精制大叶白麻多糖贮备液中葡萄糖的浓度(mg/mL); D 为多糖的稀释因素。实验测得换算因子为 3.53。

2.2.4 精密度试验

平行取 6 份葡萄糖稀释液和大叶白麻粗多糖试液,萘酮-硫酸法显色后测定吸光度,计算结果表明葡萄糖与大叶白麻多糖的 RSD 分别为 1.2% 和 1.7%。

2.2.5 重复性试验

取同一批样品,按粗多糖贮备液的制备方法平行制备 6 份,按上述方法进行含量测定,分别测定吸光度并计算浓度。RSD 为 0.8%,表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验

精确量取 1.0 mL 葡萄糖稀释液和大叶白麻粗多糖试液,置于具塞试管中,各加入 0.2% 萘酮试剂 4.0 mL,按 2.2.2 项的方法操作,于室温自然光下放置 2 h,每 10 min 测定一次。结果表明样品溶液在 2 h 内显色稳定, $RSD = 3.78\%$ 。

2.2.7 样品中多糖含量测定

吸取样品贮备液 1 mL,按照 2.2.2 项的方法测定吸光度(A),由回归方程计算样品液中葡萄糖浓度(C),按下式计算样品中大叶白麻多糖的含量:多

糖含量 (%) = $\frac{CDf}{W} \times 100\%$ 。式中 C 为样品贮备液

中葡萄糖的浓度(mg/mL); D 为多糖的稀释因素; f 为换算因子; W 为称取样品的重量(mg)。按照此公式计算,大叶白麻多糖含量为 0.97%。

2.3 单糖组成的分析

2.3.1 衍生试剂的配制:准确称量 NMP 0.112 g,用乙腈定容至 10 mL,其浓度为 0.05 mol/L。

2.3.2 标准溶液的配制^[14]

准确称量标准品葡萄糖、半乳糖、甘露糖各 18.0 mg,阿拉伯糖、木糖各 15.0 mg,鼠李糖、岩藻糖各 16.4 mg,葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸各 21.2 mg,用水溶解并定容至 10 mL,得到各单糖浓度均为 0.01 mol/L 的单糖标准品混合液。

2.3.3 多糖水解液的制备

称取大叶白麻多糖样品 11.1 mg,加 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 1 mL,封口后 110 °C 水解 6 h,放冷后氮气吹干,加 2.000 mL 水溶解备用。

2.3.4 单糖标准品的 NMP 衍生

取各浓度单糖标准品混合液或多糖水解液 50 μL 于 2 mL 安瓿瓶中,依次加入 200 μL 0.05 mol/L 的 NMP 乙腈溶液、40 μL 17% 氨水,封口后于 70 °C 水浴中反应 35 min,取出放冷后用氮气吹干,加 500 μL 乙腈水溶液(体积比为 4:1)超声溶解供毛细管电泳分析。具体衍生过程见图 1。

2.3.5 电泳条件

按照我们以前得到的优化条件进行实验^[11],具体如下:柱温 25 °C;工作电压 10 kV;进样 8 s,进样压强 3.45 kPa;缓冲溶液:硼酸盐浓度 55 mmol/L, pH = 9.46;检测波长:254 nm。实验前对缓冲溶液进行超声脱气 5 min,每次进样之前,分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、超纯水、硼砂缓冲液冲洗毛细管柱 5 min。

2.3.6 标准曲线的制备

将衍生化的单糖对照品混合液精确稀释 2、4、8、16 倍,得到浓度分别为 5×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} 、 1.25×10^{-4} 、 6.25×10^{-5} mol/L 的溶液,取适量上述浓度的衍生物在选定电泳条件下进样 10 μL ,测定峰面积。以单糖标准品峰面积(Y)对相应浓度(X , mol/L)进行线性回归分析,求出各单糖标准品的直线回归方程,结果见表 1。

2.3.7 对照品、样品的测定

将衍生化的样品液经 0.45 $\mu\text{mol/mg}$ 微孔滤膜滤过,然后在 2.3.5 项所示的条件下进行毛细管电

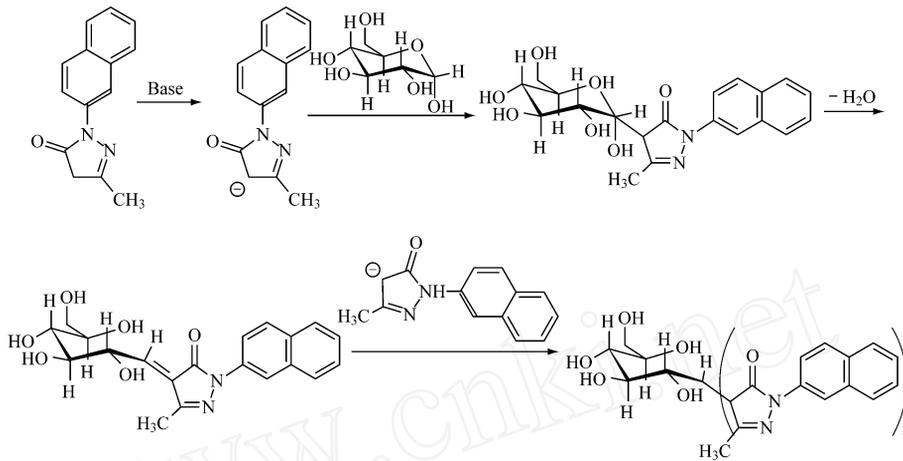


图 1 单糖标准品的 NMP 衍生

表 1 单糖衍生物的线性回归方程、相关系数及检测限

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of saccharide derivatives

单糖	线性回归方程	相关系数	检测限 / (μmol/L)
木糖 (Xyl)	$Y = 1.90591X - 0.25684$	0.99961	0.886
阿拉伯糖 (Ara)	$Y = 2.0458X + 0.42542$	0.99967	0.850
葡萄糖 (Glc)	$Y = 1.41938X + 0.78782$	0.9991	1.263
鼠李糖 (Rha)	$Y = 1.54032X - 1.63403$	0.99803	1.488
甘露糖 (Man)	$Y = 1.73246X - 1.76493$	0.99888	1.344
岩藻糖 (Fuc)	$Y = 1.87222X - 0.30456$	0.99953	1.602
半乳糖 (Gal)	$Y = 2.23051X - 0.30982$	0.99976	1.016
葡萄糖醛酸 (GlcUA)	$Y = 1.27261X - 1.89004$	0.99981	2.193
半乳糖醛酸 (GalUA)	$Y = 2.15725X - 3.32697$	0.99965	1.437

X. 浓度 μmol/L Y. 峰面积

泳,分别平行做 3 份,根据各吸收峰的峰面积来计算各单糖组成的物质质量浓度,结果见图 2。如图 2 和表 2 所示,大叶白麻实际样品中均含有 9 种单糖成分,其中半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara)、甘露糖 (Man) 的含量较高,葡萄糖 (Glc)、半乳糖醛酸 (GalUA)、鼠李糖 (Rha) 的含量居中,木糖 (Xyl)、葡萄糖醛酸 (GlcUA)、岩藻糖 (Fuc) 等的含量较低,另外在鼠李糖 (Rha) 和甘露糖 (Man) 之间还存在一种未知的成分,有待进一步研究。

3 结论

本实验采用硫酸-蒽酮法对大叶白麻多糖含量进行了测定,其原理是大叶白麻多糖在浓硫酸的作用下,先水解为单糖,单糖迅速脱水形成糠醛衍生物,然后与蒽酮缩合为有色化合物,其在 620 nm 处有特征吸收。本法操作简单,显色稳定,灵敏度高,重现性好。在本实验中应注意以下两点: 在用此方法进行测定时,若样品中含有蛋白和色素往往会影

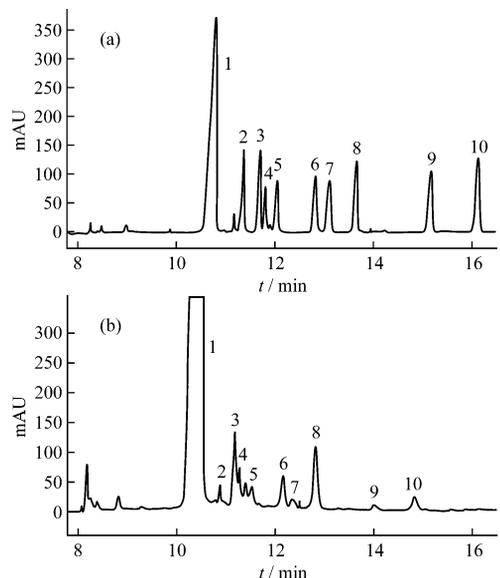


图 2 9 种糖类衍生物 (a) 和大叶白麻多糖实际样品 (b) 的毛细管区带电泳分离图

Fig 2 Chromatograms of nine derivatized carbohydrates (a) and *Poacynum hendersonii* sample (b) by capillary zone electrophoresis

1. 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP)
2. 木糖 (Xyl)
3. 阿拉伯糖 (Ara)
4. 葡萄糖 (Glc)
5. 鼠李糖 (Rha)
6. 甘露糖 (Man)
7. 岩藻糖 (Fuc)
8. 半乳糖 (Gal)
9. 葡萄糖醛酸 (GlcUA)
10. 半乳糖醛酸 (GalUA)

表 2 大叶白麻多糖中各单糖的含量

Table 2 The contents of the respective monosaccharides of polysaccharite from *Poacynum hendersonii* leave

成分	含量 Content	成分	含量 Content
Component	/(mg/g)	Component	/(mg/g)
半乳糖 Gal	1.79	鼠李糖 Rha	0.53
阿拉伯糖 Ara	1.41	木糖 Xyl	0.30
甘露糖 Man	1.19	葡萄糖醛酸 GlcUA	0.35
葡萄糖 Glc	1.11	岩藻糖 Fuc	0.24
半乳糖醛酸 GalUA	0.57		

制纯化。为此,本实验首先采用 Sevage 法对蛋白进行了较为彻底的去除,直至无蛋白层产生。另外本实验运用固液比为 1:5 活性炭 80 条件下对多糖进行了脱色,取得了较好的效果;在实验过程中发现温度对显色具有重要影响,在沸水浴恒温 15 min 后立即用冷水冷却至室温,能得到重现性较好的测定结果。

利用本课题组合成的衍生试剂 (NMP) 对大叶白麻多糖中的单糖成分进行衍生,然后进行毛细管电泳,在不加任何添加剂的情况下,高效、快速地实现 9 种单糖的基线分离,其优点为检测限低,灵敏度高。

经实验测定大叶白麻叶多糖含量为 0.97%, 种类较丰富 (已测出 9 种), 其中半乳糖 Gal、阿拉伯糖 Ara、甘露糖 Man 的含量较多。

参考文献:

[1] 顾振纶,钱增年,王兆钱. 大花罗布麻叶的药理学研究-1. 对血小板聚集性的影响 [J]. 中成药, 1991, 11(11): 27-29.
[2] 钱增年,顾振纶,方几希. 大花罗布麻叶的药理学研究- 大花罗布麻叶延缓衰老作用的实验观察 [J]. 中成药, 1990, 12(3): 28-30.
[3] 钱增年,顾振纶,金黎清. 大花罗布麻叶的药理学研究- 对

心血管系统的影响 [J]. 中成药, 1991, 13(7): 27-29.

[4] 全 燕. 罗布麻及大叶白麻叶中黄酮化合物的含量及其脂质过氧化抑制作用 [J]. 国外医学中医中药分册, 1996, 18(1): 49.
[5] 陈妙华,刘凤山. 罗布麻叶镇静化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1991, 16(10): 609-611.
[6] 雷振环,台宝山. 大叶白麻叶化学成分的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报, 2002, 18(1): 99-100.
[7] 魏锦萍,刘恩荔,李青山. 大叶白麻化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 32.
[8] 张云峰,魏 东. 大花罗布麻的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 954-957.
[9] 李曼玲,刘美兰. 罗布麻叶氨基酸成分研究 [J]. 中成药, 1987, 23(1): 1001-1528.
[10] 周 红,杨祥良,张晓昱. 高效液相色谱同时分析测定南瓜中的单糖 [J]. 食品科学, 2002, 23(4): 95-96.
[11] 盛 筱,丁晨旭,尤进茂. 糖类衍生物在毛细管区带电泳下的分离研究 [J]. 分析化学, 2008, 36(3): 280-284.
[12] 孙学军,孙志伟,户宝军,等. 单糖衍生物的电喷雾质谱裂解规律研究 [J]. 分析化学, 2008, 36(10): 1309-1315.
[13] 韩阳花,高 莉,刘丽艳,等. 酸浆果实中多糖的提取及含量测定 [J]. 食品科学, 2006, 27(2): 154-156.
[14] 孙志伟,刘凌君,户宝军,等. 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡唑啉酮衍生试剂的制备及其在高效液相色谱-质谱法测定糖类化合物中的应用 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 200-205.

HPLC同时测定珍珠菜提取物中芦丁和柚皮素-7-O-葡萄糖苷的含量

潘海敏, 游本刚, 唐丽华*, 李新章, 杨世林
(苏州大学药学院,江苏 苏州 215123)

关键词: HPLC; 珍珠菜; 芦丁; 柚皮素-7-O-葡萄糖苷

摘要:目的:建立同时测定珍珠菜中芦丁和柚皮素-7-O-葡萄糖苷含量的高效液相色谱方法。方法:以 Diamonsil C₁₈柱 (4.6 mm ×250 mm, 5μm) 为色谱柱,流动相采用乙腈 (A)-0.1%磷酸 (B)梯度洗脱:0~18 min, 83%~80% B; 18~30 min, 80%~86% B。芦丁和柚皮素-7-O-葡萄糖苷的检测波长分别为 254 nm 和 281 nm,流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃,进样量为 20 μL。结果:用梯度洗脱得到了较好的分离效果,芦丁在 1.00~48.00 μg/mL 之间线性关系良好, r=0.999 3;柚皮素-7-O-葡萄糖苷在 0.64~40.72 μg/mL 之间线性关系良好, r=0.999 8。结论:该方法准确,简便,可用于珍珠菜中芦丁和柚皮素-7-O-葡萄糖苷含量的同时测定。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2010)01-0106-04

Simultaneous determination of rutin and naringin-7-o-glucoside in extraction

收稿日期: 2009-01-11

基金项目:苏州市社会发展科技项目 (SSY0703),苏州大学医学发展基金项 (EE132609),国家科技支撑计划子课题 (2006BA D6A01-01),国家自然科学基金项目 (30873362)

作者简介:潘海敏 (1984-),女,硕士研究生,研究方向为中药新剂型。

*通讯作者:唐丽华 (1952-),女,硕士生导师,研究方向为中药新剂型, Tel: (0512) 65880029 E-mail: tanglihua@suda.edu.cn