

## 乙肝宁水提取物中糖类成分吸湿性考察

桂卉, 严航, 李静, 夏新华\*

(湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 探讨乙肝宁中糖类成分的吸湿性。方法: 以乙肝宁为模型药物, 采用不同分离纯化方法得到总多糖、总单糖、总低聚糖成分, 干燥, 粉碎, 测定吸湿百分率及临界相对湿度。运用 HPLC-ELSD 测定糖类组成。结果: 乙肝宁浸膏临界相对湿度为 67.3%, 总多糖、总单糖、总低聚糖的临界相对湿度分别为 78.4%、62.2%、68.3%。总单糖中主要含果糖, 低聚糖中小分子糖主要为果糖, 葡萄糖, 蔗糖。结论: 糖类是乙肝宁吸湿性增大的因素之一, 其中果糖吸湿性最大。

**[关键词]** 乙肝宁水提取物; 总多糖; 总单糖; 总低聚糖; 临界相对湿度; 高效液相色谱-蒸发光散射法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0032-04

## Investigate on Hygroscopicity of Carbohydrate Composition from Yiganning Aqueous Extract

GUI Hui, YAN Hang, LI Jing, XIA Xin-hua\*

(College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate hygroscopicity of carbohydrate composition in Yiganning aqueous extract. **Method:** With Yiganning grain as a model drug, total polysaccharides, total monosaccharides and total oligosaccharides were obtained by different separation and purification method, and then drying, crushing, hygroscopic percentage and critical relative humidity (CRH) were determined. HPLC-ELSD was used to detect carbohydrate composition by gradient elution method. **Result:** CRH of Yiganning extract was 67.3%, CRH of total polysaccharide, total monosaccharides and total oligosaccharides were 78.4%, 62.2%, 68.3%, respectively. Main components of total monosaccharides was fructose, small molecules carbohydrate in oligosaccharides was fructose, glucose and sucrose. **Conclusion:** Carbohydrate components was one factor of increasing hygroscopicity in Yiganning dry extract, hygroscopicity of fructose was largest.

**[Key words]** Yiganning aqueous extract; total polysaccharides; total monosaccharides; total oligosaccharides; critical relative humidity; HPLC-ELSD

吸湿性会影响中药固体制剂的成型、外观、稳定性、有效性、安全性等<sup>[1]</sup>。肖琼等<sup>[2]</sup>研究表明, 中药固体制剂吸湿的原因之一是药物本身存在一些极性基团, 能与水分子中的极性基团羟基结合, 尤其是其中活性羟基, 糖类化合物是多羟基醛或多羟基酮失

水结合而成的缩聚物, 具有很强的吸湿性。本课题以中药复方中糖类成分为研究对象, 运用 HPLC-ELSD 检测糖类的组成, 测定其吸湿性, 为中药浸膏固体制剂防潮中的应用提供实验依据。

### 1 材料

AR1140 型电子分析天平 (奥豪斯国际贸易有限公司), TD5A-WS 型台式低速离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司), DZF-6050 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司), SHH-150L 型生化培养箱 (重庆四达实验仪器有限公司制造), 1200 系列安捷伦高效液相色谱仪 (美国 Agilent), Alltech ELSD3300 型蒸发光散射检测器 (埃文森科技有限

**[收稿日期]** 20120227(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973955)

**[第一作者]** 桂卉, 博士, 教授, 从事新药开发研究, Tel: 13707488252, E-mail: guihui1993@126.com

**[通讯作者]** \*夏新华, 教授, 博士生导师, E-mail: xiaxinhua001@163.com

公司),XWK-Ⅲ型无油空气泵(天津市华生分析仪器厂)。

732型阳离子交换树脂(国药集团化学试剂有限公司),D101型大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所),聚酰胺树脂(30~60目,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),活性炭(天津市科密欧化学试剂有限公司),硅藻土(化学纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),鼠李糖、木糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为111683-200401,111508-200404,100231-200303,140651-200602,110833-200904,11507-200001,100287-200701),白花蛇舌草、茵陈、金钱草、党参、蒲公英、制何首乌、牡丹皮、丹参、茯苓、白芍、白术、川楝子均购于中药饮片来自安徽惠隆中药饮片有限公司,经本校药学院刘塔斯教授鉴定,质量检测皆符合2010年版《中国药典》一部的规定,乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 糖类成分的提取和纯化

**2.1.1 乙肝宁干粉浸膏的制备** 按取方量称取2010年版《中国药典》乙肝宁颗粒<sup>[3]</sup>中12味中药材共533g,加量水浸泡30min,水蒸气回流法提取2h,过滤,滤渣加量水回流提取2h,过滤,合并滤液,浓缩至生药-药液比1:3(0.9kPa,65℃),得到乙肝宁浓缩液。取其中适量,水浴挥干至稠膏状,真空干燥,即得。

**2.1.2 总多糖的制备** 取乙肝宁浓缩液200mL,石油醚脱脂2次,摇匀,静置3h,取水相,加入无水乙醇使其乙醇体积分数为80%<sup>[4-5]</sup>,摇匀,置冰箱内静置过夜,离心,过滤,收集滤液备用;滤渣置真空干燥箱中以60℃恒温干燥至恒重,得粗多糖至干燥器内备用。精确称取上述粗多糖2g,置于100mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,加入等体积5%三氯乙酸溶液,混合振荡后放于4℃冰箱静置4h,3000r·min<sup>-1</sup>离心15min,取上清液,浓缩至100mL,加无水乙醇使其乙醇体积分数为80%,摇匀,置冰箱内静置过夜,过滤,取沉淀,依次用乙醚,无水乙醇,丙酮各洗2次,得到精制多糖,60℃烘干至恒重,即得<sup>[6]</sup>。

**2.1.3 总单糖和总低聚糖的制备** 将2.1.2项下得到醇沉离心过滤的滤液,回收乙醇,残留水溶液用硫酸酸化至pH3.0,加于732型氢型阳离子交换树脂柱上,用水冲洗至无糖显色反应。收集水洗液,浓

缩至100mL,加于聚酰胺树脂柱上,用水冲洗至无糖显色反应,收集水洗液,浓缩至适量,加于D101型大孔树脂柱上,用水冲洗至无糖显色反应,收集水洗液,浓缩至适量,加于活性炭<sup>[7]</sup>与天然硅藻土等量混合的吸附柱上,水洗,继而用体积分数分别为5%,10%,20%,50%的乙醇洗脱,分别收集水洗液与不同体积分数乙醇洗脱液,采用HPLC-ELSD检测糖类组成。水洗液浓缩干燥即得总单糖,合并醇洗脱液浓缩干燥即得总低聚糖。

### 2.2 吸湿性的考察

**2.2.1 吸湿率的测定** 取乙肝宁干粉浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖等适量,每种样品平行做3份,分别置五氧化二磷干燥器内干燥48h至恒重。将底部盛有氯化钠过饱和溶液的玻璃干燥器放入25℃恒温培养箱内恒温24h,此时干燥器内的相对湿度为75%。在已恒重称量瓶底部放入厚约2mm的乙肝宁浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖,准确称重后置于上述玻璃干燥器内(称量瓶盖打开)于25℃保存,定时称定质量,分别于0,2,4,6,10,16,24,36,48,60,72,84,96,108,148h各称量1次,每种样品平行做3份,分别记录质量,取平均值。计算吸湿率=(吸湿后药粉质量-吸湿前药粉质量)/吸湿前药粉质量×100%,以吸湿率为纵坐标,时间为横坐标绘制吸湿曲线。结果见图1。

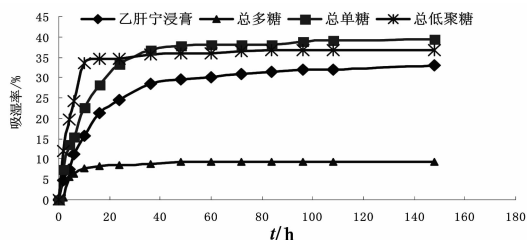


图1 乙肝宁干粉浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖吸湿曲线

由图1可知,平衡吸湿率排序为总单糖>总低聚糖>乙肝宁浸膏>总多糖。其中总多糖达吸湿平衡时间最短,总低聚糖次之,乙肝宁浸膏和总单糖达到吸湿平衡时间非常接近。

**2.2.2 吸湿数据回归分析** 中药提取物的吸湿曲线<sup>[8]</sup>类似于 $Y = aX^2 + bX + c$  ( $a < 0$ ) 曲线中的左半部分,故对于中药提取物个别样品吸湿曲线数据可进行二项式回归处理,吸湿二项式方程为 $W = at^2 + bt + c$ ,求导 $r = d_w/d_t = 2at + b$ ,求导 $r' = d_r/d_t = 2a$ 。其中 $Y$ 为吸湿率, $t$ 为时间, $r$ 为吸湿速度, $r'$ 为吸湿加速度, $a, b, c$ 为常数。对不同样品吸湿曲线回归处理,记录乙肝宁浸膏及糖类的外观变化,结果见表1。

表 1 乙肝宁干粉浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖等的吸湿方程

样品	吸湿方程	R <sup>2</sup>	吸湿速度方程	吸湿初速度 /%·h <sup>-1</sup>	r'/%·h <sup>-2</sup>	外观变化
乙肝宁浸膏	$Y = -0.010 3X^2 + 1.086 3X + 3.527 1$	0.963 5	$r = -0.020 6t + 1.086 3$	1.086	-0.041 2	全部液化
总多糖	$Y = -0.003 6X^2 + 0.337 7X + 2.532 5$	0.725 2	$r = -0.007 2t + 0.337 7$	0.338	-0.014 4	保持颗粒性
总单糖	$Y = -0.013 8X^2 + 1.396 1X + 6.187 4$	0.945 1	$r = -0.027 6t + 1.396 1$	1.396	-0.055 2	全部液化
总低聚糖	$Y = -0.001 4X^2 + 1.253 3X + 12.462$	0.736 5	$r = -0.027 4t + 1.253 3$	1.253	-0.054 8	全部液化

根据吸湿加速度越大,在相同时间内吸湿速度就越快。由表 1 结果可知,乙肝宁浸膏及其糖类的吸湿加速度顺序为总单糖 > 总低聚糖 > 乙肝宁浸膏 > 总多糖。与平衡吸湿率相比,样品与平衡吸湿率排序一致。说明总单糖平衡吸湿率最大,其吸湿速度也最大。

### 2.2.3 临界相对湿度(CRH)的测定 分别取适量

表 2 乙肝宁干粉浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖在不同相对湿度下的吸湿率

盐过饱和溶液	RH	乙肝宁浸膏	总多糖	总单糖	总低聚糖
CH <sub>3</sub> COOK 过饱和溶液	22.45	0.22	0.2	2.14	0.60
54% 硫酸溶液	29.55	0.65	1.29	3.05	1.76
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 过饱和溶液	43.20	0.78	3.20	4.80	4.95
44% 硫酸溶液	48.52	1.95	3.71	5.80	6.06
NaBr 过饱和溶液	57.7	7.83	5.25	11.49	11.15
NaCl 过饱和溶液	75.28	33.08	9.31	39.38	29.31
KCl 过饱和溶液	84.26	47.93	16.71	61.54	46.58
KNO <sub>3</sub> 过饱和溶液	92.48	69.76	27.82	81.58	66.44

### 2.2.4 CRH 的确定

2.2.4.1 作图法 以表 2 中的吸湿率为纵坐标, RH 为横坐标作图,两切线交点对应的横坐标即为 CRH,结果见图 2,3。结果可知,乙肝宁浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖的 CRH 分别为 67.3%, 78.4%, 62.2%, 68.3%。

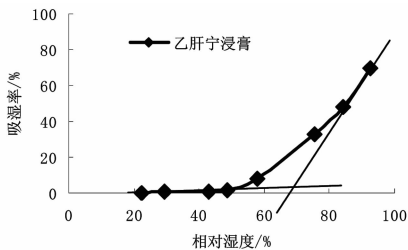


图 2 乙肝宁浸膏的 CRH 测定

2.2.4.2 算法 根据吸湿曲线特点,水溶性物质在高相对湿度和低相对湿度条件下的实验取点在同一条直线上,利用曲线的前 2 点和后 2 点分别求出 2 条直线方程  $Y = a + bX$ , 求出 2 条直线的交点,交点横坐标即为 CHR。结果乙肝宁浸膏、总多糖、总单

乙肝宁干粉浸膏、总多糖、总单糖、总低聚糖,每种样品平行做 3 份,分别置五氧化二磷干燥器内干燥 48 h 至恒重后,在已恒重的称量瓶底部放入厚约 2 mm 颗粒,准确称量后置于分别盛有 8 种不同盐过饱和溶液的干燥器内(称量瓶盖打开,见表 2),于 25 ℃ 恒温培养箱中保持 7 d 后称量,计算吸湿率。

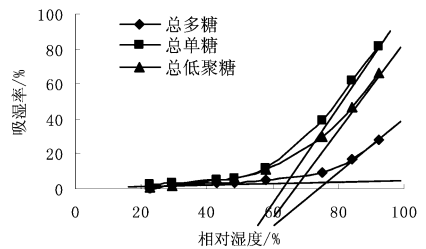


图 3 总多糖、总单糖和总低聚糖的 CRH 测定

糖、总低聚糖的 CRH 分别为 67.3%, 78.4%, 62.2%, 68.3%。

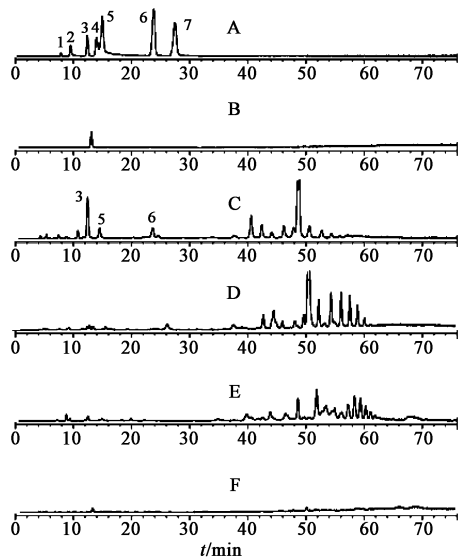
### 2.3 游离单糖种类的组成

2.3.1 色谱条件 Boston Crest Amino 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 30 min, 15% A; 30 ~ 45 min, 22% A; 45 ~ 60 min, 50% A; 60 ~ 76 min, 55% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, ELSD 参数 60 ℃, 空气流速 1.8 L·min<sup>-1</sup>, 增益 1。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密称取适量鼠李糖、木糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等对

照品 1.88,1.34,4.88,14.10,24.50,27.70 mg,超纯水定容至 1.0 mL,摇匀,即得。

**2.3.3 样品溶液的制备** 分别精密称取适量 2.1.3 项下得到的水洗脱液、5% 乙醇洗液、10% 乙醇洗液、20% 乙醇洗液、50% 乙醇洗液,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,即得。见图 4。



A. 对照品;B. 水洗脱液;C. 5% 乙醇洗液;D. 10% 乙醇洗液;  
E. 20% 乙醇洗液;F. 50% 乙醇洗液;1. 鼠李糖;2. 木糖;  
3. 果糖;4. 甘露糖;5. 葡萄糖;6. 蔗糖;7. 麦芽糖

图 4 乙肝宁 HPLC-ELSD

由图 4 可知,水洗液主要含有果糖,且物质峰纯度较高;5% 乙醇洗液中含有果糖、葡萄糖、蔗糖,40 min 后有很多低聚糖混合物;10%,20% 乙醇洗液主要含有低聚糖;50% 乙醇洗脱液含糖量非常少。

### 3 讨论

本试验主要考察糖类成分的吸湿性,对于《中国药典》2010 年版中收录乙肝宁颗粒处方中黄芪药

材暂不考虑,故从药材提取操作开始,选择乙肝宁中除黄芪的其他 12 味药材。

CHR 的 2 种算法得到的数据接近,故可用计算法代替作图法确定 CRH。CRH 越大,则该物质的吸湿性越小。乙肝宁复方提取液中的总单糖主要由果糖组成,其吸湿性最强,总低聚糖中的小分子糖主要由果糖、葡萄糖、蔗糖组成,吸湿性较前者略低,总多糖吸湿性最低。3 种糖类相互作用影响,使得乙肝宁浸膏的吸湿性居中,说明糖类是乙肝宁处方中吸湿性增大的因素之一,其中果糖的吸湿性最大,证实小分子糖吸湿说理论;而多糖对中药吸湿性的影响有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:403.
- [2] 陆彬. 固体制剂吸湿性研究进展[J]. 中国药师,2007,10(5):446.
- [3] 肖琼,沈平嫄,朱莲华. 中药固体制剂防潮技术与辅料应用的研究[J]. 中成药,2007,29(2):208.
- [4] 蔡亚平,赵蕊,朱丹. 丹参多糖的组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):88.
- [5] 刘光建,王璐,王菲菲,等. 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):207.
- [6] 李春玲,高艳艳,王贵平,等. 白花蛇舌草多糖的提取工艺研究[J]. 中兽医医药杂志,2008(6):26.
- [7] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版,2003:58.
- [8] 李小芳,何倩灵,向永臣,等. 黄芪多糖颗粒防潮辅料的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,5(17):11.

[责任编辑 仝燕]