

图 2 4 个产地赤芍干叶片提取 DNA 的 PCR 扩增电泳谱图

Fig. 2 Electrophoretogram of DNA extracted from dry leaves of *Radix Paeoniae Rubra* in four different habitats by PCR amplification

究方法提取的 DNA 做 PCR 扩增时,结果都较清晰,稳定效果好,说明该方法提取的 DNA 能用于 PCR 等生物技术,适用于毛茛科植物的遗传多样性分析。

### 3 讨论

高质量 DNA 的快速提取是决定分子生物学实验成败的关键因素。由于不同植物所含化学成分差异较大,因此对不同植物 DNA 提取应采取不同的方法。有时受条件限制,植物材料只能以干燥方式保存,其提取方法又应不同。由于要对不同产地的赤芍作比较,赤芍叶片只能以干燥方式保存,且因其含较多多糖、蛋白质和小分子杂质,常规方法不能很好地将杂质去除干净,影响后续分子生物学实验结果。因此本研究在常规 SDS 法基础上,优化各提取步骤,获得了一种快速提取赤芍干叶片 DNA 的方法。用该方法所提取的 DNA 完全能够达到分子生物学实验要求,应用于 PCR 分析,结果满意。说明如果受野外采集条件限制,用硅胶干燥叶片保存后带回实验室再提取也不失为一种补充手段,但硅胶干燥叶片不宜久存,否则 DNA 得率会降低。本

方法的一大特点就是快速,因为提取时间越长, DNA 越易受环境污染,快速有利于提高纯度。结果表明:该方法可快速地从富含多糖、蛋白质和小分子杂质的毛茛科药用植物干叶片中分离出高质量的 DNA。

使用此方法时应注意:PVP 以固体形式加入最好,PVP 与样品在液氮环境中共研要迅速和充分,磨碎后要尽快加入预热的提取缓冲液,以防止氧化;高浓度 SDS 可去除多糖,改良方法中提高了 SDS 浓度,多糖去除较干净;离心速度不宜太快,时间和次数也要尽量减少,以保证 DNA 的完整性;沉淀 DNA 不采用离心,而采用玻棒直接挑出也有利于提高 DNA 纯度;沉淀时间也要尽量缩短以防小分子盐共沉淀和 DNA 颜色变深而影响提取结果;用乙醇反复沉淀 3 次减少了 RNA 的污染;纯化后的 DNA 用氮气吹干以减少乙醇污染。

#### 参考文献:

- [1] Stelions S, Sean T M. Authentication of coffee by means of PCR-RFLP analysis and Lab-on-a-chip capillary electrophoresis [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 7466-7470.
- [2] Barbara A S, Kimberly A O. Genetic fingerprinting of grape plant (*Vitis vinifera*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and dynamic size-sieving capillary electrophoresis [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5903-5912.
- [3] 袁菊红,孙 视,彭 峰,等.石蒜属植物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 标记比较研究[J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1555-1561.
- [4] 张 杰,徐 涛,张建光,等.半夏栽培品遗传差异的 AFLP 分析[J]. *中草药*, 2007, 38(12): 1884-1889.
- [5] 陈大霞,李隆云,钱 敏,等.黄连药材 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. *中草药*, 2006, 37(8): 1233-1237.
- [6] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [7] 邵鹏著,曹 晖.中药分子鉴定[M]. 上海:复旦大学出版社, 2004.

## 吴茱萸多糖的分离和组成研究

徐继华<sup>1,2</sup>,刘文英<sup>1\*</sup>,屠旦来<sup>1</sup>

(1. 中国药科大学 药物分析教研室,江苏 南京 210009; 2. 江苏省南通市药品检验所,江苏 南通 226006)

**摘要:**目的 对吴茱萸中多糖进行提取、分离和纯化,进一步研究吴茱萸多糖主要组分的单糖组成。方法 采用水提醇沉法提取粗多糖, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色、Sevag 法除蛋白、透析制备精制品,用 DEAE-32 纤维素阴离子交换柱、Sephacryl S-400 SF 型凝胶柱分离纯化多糖,经酸水解后,1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化 HPLC 法分析单糖组成。结果 从吴茱萸中分离纯化得两个主要多糖组分 ERPS2a、ERPS3,二者的单糖组成均为甘露糖、鼠

\* 收稿日期:2008-07-04

作者简介:徐继华(1978—),男,江苏南通人,硕士研究生。Tel: 13912274510 E-mail: xujihua45@hotmail.com

\* 通讯作者 刘文英 Tel: (025) 83271251 E-mail: lwcpu@126.com

季糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖, ERPS2a 的单糖物质的量比为 2.1 2.6 3.4 1.0 7.9 4.9, ERPS3 的单糖物质的量比为 1.0 17.6 2.7 3.2 19.8 9.4。结论 吴茱萸多糖得到有效分离纯化, 两纯组分所含单糖种类相同, 仅各单糖的组成比例不同。

关键词: 吴茱萸; 多糖; 柱前衍生化 HPLC; 单糖组成  
中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)04-0573-04

吴茱萸为芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodineri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实, 为《中国药典》2005 年版一部收载品种, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 具散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻等功效。吴茱萸中含有生物碱、苦味素、挥发油、多糖、氨基酸和黄酮等多种有效成分, 其中多糖的量丰富<sup>[1]</sup>。初步研究表明吴茱萸多糖具有抗氧化作用<sup>[2]</sup>, 预示其作为抗衰老作用新药或保健品开发的可能性。本实验对吴茱萸中多糖进行提取、分离和纯化研究, 同时分析吴茱萸多糖中主要组分的单糖组成。

## 1 仪器与试剂

BT00—100M 兰格蠕动泵, YZ1515 泵头(保定兰格恒流泵有限公司); UV—260 紫外-可见分光光度计(日本岛津); HP1050 高效液相色谱仪(美国); SEDEX 75 L T-ELSD 蒸发光散射检测器(法国); 江申 JS-3050 型色谱工作站(含 GPC 软件); Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, ChemStations 色谱工作站。

吴茱萸药材购于先声药店, 产地为贵州, 经中国药科大学中药学院生药研究室张朝凤副教授鉴定为芸香科吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实; DEA E-32 纤维素(Whatman 公司); Sephacryl S-400 SuperFine (Pharmacia Fine Chemicals AB 公司); D-葡萄糖(D-glucose, Glu, AR, 上海惠生生化试剂有限公司); L-阿拉伯糖(L-arabinose, Arab, Sigma 公司)、D-半乳糖(D-galactose, Gal) (Amresco 公司, 北京经科公司分装); L-鼠李糖(L(+)-rhamnose, Rha, England B. D. H Laboratory Chemicals Group]; D-甘露糖(D-mannose, Man) (Supelco 公司); 半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA, Fluka 公司); 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP) (甲醇重结晶两次, 上海化学试剂采购供应站试剂厂); 乙腈(色谱纯, Merck 公司), 其他试剂均为分析纯, 重蒸水(自制)。

## 2 方法与结果

2.1 粗多糖的提取: 将吴茱萸药材粉碎, 过 24 目筛。称取药材粉末 100 g, 5 倍量石油醚回流脱脂, 挥干药粉, 分别加 15、12、10 倍量水, 分 3 次采用 90 水浴浸提 2 h, 用 2 层纱布滤过。收集 3 次滤液, 减压浓缩至 200 mL, 离心, 取上清液加乙醇至 80%, 静置沉降, 抽滤, 沉淀物加水 200 mL 溶解, 加乙醇至 80% 再醇沉 1 次, 依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤, 沉淀物 60 真空干燥, 得灰褐色粗多糖约 5 g。

2.2 粗多糖的精制: 取吴茱萸多糖粗品, 加水 500 mL, 加热使完全溶解, 加氨水调 pH 7.8, 有沉淀产生, 继续滴加氨水至不再产生沉淀, 此时溶液 pH 值维持在 7.8, 4 000 r/min 离心。取上清液加 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (糖溶液体积的 20%)<sup>[3]</sup>, 于 40 保温 4 h, 溶液由褐色转为淡黄色透明液, 放冷至室温。脱色素后的糖溶液, 加入 1/4 体积的氯仿-正丁醇(1:4) 振荡, 弃去下层凝胶样物质。取上层溶液同法处理, 直至下层溶液不再出现白色凝胶样物质。将除完蛋白的糖溶液置透析袋中流水透析 24 h, 蒸馏水透析过夜。将保留液(透析内液) 浓缩至原体积的 1/3。透析内液加入乙醇, 使含醇量达到 80%, 静置沉降, 抽滤, 依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤, 沉淀物 60 真空干燥, 得类白色多糖精制品<sup>[4]</sup>。

2.3 多糖组分的分离纯化<sup>[5,6]</sup>: 取吴茱萸多糖精制品约 100 mg, 加蒸馏水 5 mL 溶解, 采用 DEA E-32 纤维素柱(22 cm × 2.5 cm), 先用蒸馏水洗脱, 自动收集器收集, 2 mL/管, 每管 5 min, 然后依次用 0.05、0.1、0.2、0.5、2 mol/L NaCl 溶液做阶段洗脱, 用苯酚-硫酸法逐管测定多糖, 直至多糖呈阴性反应, 洗脱曲线见图 1。合并主峰部分, 透析除盐, 减压浓缩至小体积, 80% 乙醇沉淀, 砂芯漏斗抽滤, 用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤, 60 真空干燥, 得主要组分 ERPS2、ERPS3。ERPS2、ERPS3 分别为 0.2、0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱部分。

## 2.4 高效凝胶色谱(HPGPC) 检查质量分数

2.4.1 色谱条件: 色谱柱为 Shodex Ohpak SB-805 HQ 与 Shodex Ohpak SB-804 HQ 串联(300 mm × 8 mm, 日本昭和电工); 流动相: 重蒸水; 体积流量: 0.6 mL/min; ELSD 检测器漂移管温度: 50 ,

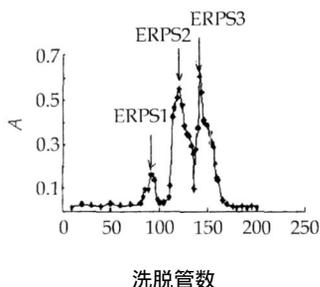


图 1 DEAE-32 纤维素阴离子交换柱对多糖的洗脱曲线  
Fig. 1 Eluting curve of polysaccharides on DEAE-32 cellulose anion exchange column

ELSD 检测器压力:  $3.5 \times 10^5$  Pa, ELSD 检测器 gain 值 7。

2.4.2 结果: ERPS3 为均一性成分, 色谱图见图 2。ERPS2 含相对分子质量不同的两个组分, 色谱图见图 2。

2.4.3 进一步纯化、鉴定: 采用 Sephacryl S-400 SF 凝胶对 ERPS2 进行纯化。取 ERPS2 100 mg, 溶解于 1 mL 水中, 高速离心, 取上清液上样, 重蒸水以 16 mL/h 洗脱, 分部收集洗脱液, 2 mL/管, 以 HPGPC 跟踪检测, 合并主峰部分, 透析除盐, 减压浓缩至小体积, 80% 乙醇沉淀, 砂芯漏斗抽滤, 用无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤, 60℃ 真空干燥, 得主要组分 ERPS2a, 色谱图见图 2。

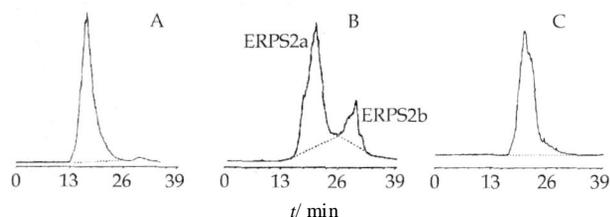


图 2 ERPS3 (A)、ERPS2 (B) 和 ERPS2a (C) 高效凝胶色谱图  
Fig. 2 HPGPC of ERPS3 (A), ERPS2 (B), and ERPS2a (C)

2.5 理化性状: ERPS2a 为白色粉末, ERPS3 为灰白色粉末, 都溶于水, 尤其是热水, 而不溶于丙酮、乙醇、乙醚, 苯酚-硫酸反应呈阳性, 糖醛酸检查呈阳性。

2.6 柱前衍生化 HPLC 法测定单糖的组成

2.6.1 完全酸水解溶液的制备: 取多糖组分各 20 mg 分别置于安瓿中, 各加入 1 mol/L  $H_2SO_4$  2 mL 溶解后封管, 于 105℃ 条件下水解 8 h。切开封管, 用  $BaCO_3$  中和水解液, 4 000 r/min 离心, 即得组分的完全酸水解溶液。

2.6.2 样品的衍生化处理<sup>[7,8]</sup>: 取单糖对照品或样品完全酸水解溶液 80  $\mu$ L, 置于 2 mL 离心管中, 加入 80  $\mu$ L 0.25 mol/L PMP 甲醇溶液和 80  $\mu$ L 0.2 mol/L NaOH 溶液, 涡旋 30 s 后置于 70℃ 水浴 30

min, 取出, 室温放置 10 min, 再加入 80  $\mu$ L 0.2 mol/L 盐酸溶液中和, 涡旋 30 s 后, 用 0.64 mL 乙酸异戊酯萃取, 涡旋 3 min, 12 000 r/min 高速离心 5 min, 小心弃去上层有机层, 取水层再用乙酸异戊酯萃取 1 次得下层水层, 加 0.64 mL 氯仿, 同法萃取 1 次, 小心弃去下层氯仿层, 取上层水层进行 HPLC 法分析。

2.6.3 色谱条件与系统适用性试验: Phenomenex  $C_{18}$  色谱柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 柱温 30℃; 流动相: A 乙腈-20 mmol/L 乙酸铵水溶液 (15:85), B 乙腈-20 mmol/L 乙酸铵水溶液 (40:60), 0-25 min, B: 0% - 50%; 检测波长: 250 nm; 体积流量: 1.2 mL/min; 进样量: 20  $\mu$ L。

2.6.4 试验结果: 取 1 mmol/L 单糖对照品溶液、单糖混合对照品溶液和样品完全酸水解溶液, 衍生化后进行 HPLC 分析, HPLC 图见图 3。

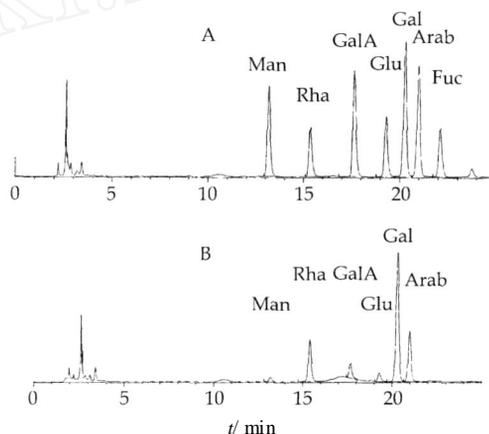


图 3 混合单糖对照品溶液 (A) 和样品水解液 (B) 衍生化后的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mixed monosaccharide reference solution (A) and monosaccharide derivatives in acidic hydrolysis sample (B)

2.7 样品单糖组成分析: 取组分 ERPS2a、ERPS3 完全酸水解溶液 80  $\mu$ L, 进行衍生化和 HPLC 分析。同时取 1 mmol/L 混合单糖对照品溶液进行衍生化和 HPLC 分析。将样品水解液衍生化后 HPLC 图与混合单糖对照品溶液衍生化后 HPLC 图进行对照, 判断单糖组成。计算样品中各单糖的浓度, 根据所得各单糖浓度, 以浓度最小者比值设为 1, 从而得出样品中各单糖组成比例。结果多糖组分 ERPS2a、ERPS3 的单糖组成均为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖, ERPS2a 的单糖物质的量比为 2.1 2.6 3.4 1.0 7.9 4.9, 组分 ERPS3 的单糖物质的量比为 1.0 17.6 2.7 3.2 19.8 9.4。

### 3 讨论

由于药材中可能含有黏液质,粗多糖提取前药材粉碎不可过细,否则细胞壁破裂黏液质流出难以滤过。多糖在高温下容易发生裂解,因此提取和浓缩时温度不可过高,否则多糖可能易被破坏,本实验采用 90 ℃ 水浴浸提。

粗多糖精制中,采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色法可以脱除与蛋白质、多糖等大分子结合的色素,效果明显。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色时温度为 40~50 ℃,温度过高多糖易被破坏;温度过低达不到脱色的效果。除蛋白采用经典的 Sevag 法,效果较明显,Sevag 法除蛋白需反复多次,直至分层处无白色凝胶状物质出现。

本实验采用 DEAE-32 纤维素阴离子交换柱、Sephacryl S-400 SF 凝胶柱分离纯化了吴茱萸多糖主要组分,得到两个多糖组分 ERPS2a、ERPS3。蒸馏水洗脱部分未见多糖组分,ERPS2a、ERPS3 分别为 0.2、0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱组分。推断吴茱萸多糖中基本不含中性多糖,含有酸性多糖,该结果与预试中季铵盐 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)沉淀法结果吻合。从组分单糖组成测定结果看 ERPS2a、ERPS3 中均含有一定量的半乳糖醛酸,也证实了组分为酸性多糖。

在单糖组成分析方法中,气相色谱法分离单糖繁琐费时,易出现色谱峰异构化裂分。HPLC 法测

定单糖可用糖分析柱和氨基键合相柱,但其价格昂贵,分析成本高。同时单糖没有 C=C 双键和共轭结构等生色团,分离后直接进行紫外检测比较困难。本实验采用 PMP 衍生化方法将单糖转化成具有紫外活性的物质,然后采用反相 HPLC-UV 法进行单糖组成研究,同时分离测定了 6 种单糖和 1 种糖醛酸,改善了分离特性,提高了检测灵敏度。同时 PMP 与单糖衍生时条件温和,操作简单,该方法可推广应用到其他多糖。

#### 参考文献:

- [1] 杨凤珍,甄攀,庞茂林,等. 中药吴茱萸中多糖的测定[J]. 张家口医学院学报,1996,16(1):17-18.
- [2] 甄攀,王治宝,张万明,等. 吴茱萸多糖的提取及其抗氧化作用研究[J]. 中成药,2005,27(4):491-492.
- [3] 王卫国,王继花,吴强. 灰树花多糖脱色技术研究[J]. 中国食用菌,2003,22(6):49-51.
- [4] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983.
- [5] 吴梧桐. 生物制药工艺学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第2版. 杭州:浙江大学出版社,1999.
- [7] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultra-violet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180:351-357.
- [8] Strydom D J. Chromatographic separation of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-derivatized neutral, acidic and basic aldoses [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 678:17-23.

## HPLC 法测定复方紫草颗粒中咖啡酸四聚体异构体

秦冬梅<sup>1</sup>, 买尔旦<sup>2\*</sup>, 李静<sup>3</sup>, 王新兵<sup>1</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 石河子大学第一附属医院, 新疆 石河子 832000)

**摘要:**目的 建立 HPLC 法测定复方紫草颗粒剂中咖啡酸四聚体异构体的方法。方法 YMC ODS-A C-18 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.5%磷酸水(40:60); 体积流量:1 mL/min; 检测波长:252 nm, 柱温:室温; 进样量:10 μL。结果 咖啡酸四聚体异构体在 0.052~1.65 μg 与峰面积值呈良好的线性关系。平均回收率为 101.8%, RSD 为 2.46%。结论 本方法简便可靠, 结果稳定, 重复性好, 可用于测定复方紫草颗粒剂中咖啡酸四聚体异构体。

**关键词:** 复方紫草颗粒; 咖啡酸四聚体异构体; 高效液相色谱

**中图分类号:** R286.02 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2009)04-0576-03

复方紫草颗粒是由紫草、丹参、黄芪、人参组成, 具有抗病毒、增强机体免疫之功效。咖啡酸四聚体

及其旋光异构体是紫草中的活性成分。经体外抗 HIV 药效筛选发现:咖啡酸四聚体及其旋光异构体

\* 收稿日期:2008-07-28

作者简介:秦冬梅(1976—),女,江苏省赣榆县人,讲师,2007年获新疆医科大学药学院医学硕士,主要从事药剂学教学及中药民族药研究。Tel:13999738518 E-mail:dongmeiqinli@163.com

\*通讯作者 买尔旦