

1140,1605,1574,1510,1456,906,840。氢谱和碳谱数据与文献报道的 7-羟基香豆素完全相符^[6,10]。晶Ⅱ与 7-羟基香豆素标准品测混熔点不下降,共薄层 R_f 完全相符,确定晶Ⅱ为 7-羟基香豆素,即伞形花内酯。

晶Ⅴ:白色粉末,Molish 反应紫红色,L-B 反应阳性。与胡萝卜甙标准品测混熔点不下降,共 TLC 其 R_f 值完全相符,推定晶Ⅴ为胡萝卜甙。

晶Ⅲ:白色晶体,mp138~140℃,L-B 反应阳性,Molish 反应阴性。与 β -谷甾醇标准品测混熔点不下降,共 TLCR_f 值完全相同,确定晶Ⅲ为 β -谷甾醇。

致谢:红外、紫外光谱由辽宁中医学院中心实验室沙明、曹爱民代测;质谱、核磁共振

由辽宁省理化测试中心代测。

参考文献

- 1 江苏新医学院编. 中药大辞典. 下册. 上海:上海人民出版社,1977. 1898
- 2 申屠瑾,等. 中西医结合杂志,1984,4(1):46
- 3 杨宝印,等. 中药通报,1986,11(1):58
- 4 杨伟文,等. 兰州大学学报,1983,19(4):109
- 5 黄文魁,等. 科学通报,1977,3(4):50
- 6 吴玉德,等. 西北药学杂志,1988,3(3):20
- 7 Towner T, et al. J Pharm Sci, 1979, 68:664
- 8 国家医药局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册. 北京:人民卫生出版社,1986. 307
- 9 Leek H, et al. J Nat Prod, 1981, 44(5):530
- 10 陈德昌. 碳谱及其在中草药化学中的应用. 北京:人民卫生出版,1981. 348

(1994-09-06 收稿)

Studies on the Chemical Constituents of Chinese *Stellera* (*Stellera chamaejasme*) (I)

Liu Guifang, Zhao Chuanling, et al

Twelve compounds (I ~ XII) were isolated from the root of *Stellera chamaejasme* L. Five (Ⅱ, Ⅲ, V, Ⅶ, Ⅷ) of them were elucidated by spectroscopic and chemical methods as 7-methoxydaphnoretin (Ⅷ), daphnoretin (Ⅶ), umbelliferone (Ⅱ), daucosterol (V) and β -sitosterol (Ⅲ). Ⅷ is a new compound named isodaphnoretin. Ⅱ and V, Ⅶ, Ⅷ were isolated for the first time from this plant.

红参须根中多肽成分的分离与鉴定

白求恩医科大学(长春 130021)

吉林省中医中药研究院剂型室

焦连庆* 魏俊杰 徐景达

于敏

摘要 用反相高效液相色谱技术从红参须根中分得一个新的多肽化合物。根据氨基酸组成分析, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和高效排阻层析分子量测定结果, 鉴定为 33 肽。文中还报道应用组织培养技术和免疫手段, 研究了红参须根多肽的活性, 并与人参皂甙的活性进行了对比。

关键词 红参须根多肽 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 高效排阻层析

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 属五加科植物, 主要化学成分是人参皂甙, 迄今已有大量的研究和报道^[1~8]。近年来, 国内外学者开始对人参水溶性成分多肽类进行研究^[1~8], 但有关红参须根中多肽的研究尚未

见报道。

本文采用超滤、大孔树脂吸附、Sephadex G-25 柱层析、DEAE-cellulose 分步抽提和 RPHPLC 等研究方法, 从红参须根中得到一个多肽, 命名为 RGHP-Ⅱ_{B2}。将其

* Address: Jiao Lianqing, Norman Berthune Medical University, Changchun

完全水解,进行氨基酸组成分析,结果见表。

以 SDS-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 和 HPLC 两种方法测得 RGHP-Ⅱ_{B2} 的分子量分别为 3325 和 3380,与氨基酸组成分析结果相吻合。

表 RGHP-Ⅱ_{B2}的氨基酸组成

氨基酸	RGHP-Ⅱ _{B2}	数目	氨基酸	RGHP-Ⅱ _{B2}	数目
天冬氨酸	4.35	4	异亮氨酸	1.34	1
苏氨酸	1.89	2	亮氨酸	3.84	4
谷氨酸	4.17	4	苯丙氨酸	2.10	2
丝氨酸	1.33	1	赖氨酸	1.17	1
甘氨酸	4.14	4	精氨酸	1.83	2
丙氨酸	4.89	5	脯氨酸	1.28	1
缬氨酸	2.36	2			

1 材料与仪器

红参须根购自抚松第一参场。Sephadex G-25 瑞典 Pharmacia 公司产品。DEAE-cellulose (DE32) 瑞典 Whatman 公司产品。精细分离使用 Waters 高效液相色谱仪 (Model HPLC510 型 高压泵), YWG-C₁₈ (5 × 200mm), 色谱柱 (大连色谱技术开发中心制造)。层析检测仪为 XZ-87-1 型紫外检测仪, 浙江温州鹿城生化仪器厂。垂直板电泳仪 2001, LKB 公司产品。分子量测定 Protein Pak 60 色谱柱, Waters 公司产品。氨基酸组成分析用日立 835 型氨基酸自动分析仪。

2 提取和分离

2.1 提取:红参须根粗粉 2.5kg,用蒸馏水浸提 48h,提取液经高速离心 12000r/min,取上清液真空薄膜浓缩至原体积的 1/10。浓缩液经超滤,得超滤液。

2.2 大孔吸附树脂吸附:大孔吸附树脂 (D4020) 以文献^[9]的方法反复处理后,装柱 (10×60cm),然后将超滤液分次置于柱中反复进行吸附,以蒸馏水洗脱,流出液用紫外检测仪 220nm 进行检测,收集紫外有吸收部分进行真空冷冻干燥,得浅黄色粉末。

2.3 Sephadex G-25 柱层析:用蒸馏水平衡柱子,上述浅黄色粉末 1g 溶于少量蒸馏水

中,离心后上清液上样。蒸馏水洗脱,第 3~10 管峰Ⅱ为小分子多肽类化合物,同条件层析 100 次,峰Ⅱ合并后,真空冷冻干燥。

2.4 DEAE-cellulose 分步抽提:以 0.01mol/LNH₄HCO₃ 溶液平衡柱子。样品为 Sephadex G-25 层析的峰Ⅱ。用 0.01~1mol/L NH₄HCO₃ 线性梯度洗脱,根据峰Ⅱ_A (第 8~17 管)、Ⅱ_B (第 18~25 管)、Ⅱ_C (第 26~27 管)、Ⅱ_D (第 28~34 管) 中第 17, 25, 27, 34 管的电导强度相应由 NH₄HCO₃ 电导强度与浓度的线性关系 $y = 4.05x + 0.77$, 求出峰Ⅱ_A、Ⅱ_B、Ⅱ_C 及Ⅱ_D 的洗脱溶液浓度 (mol/L) 分别为峰Ⅱ_A (0.07), 峰Ⅱ_B (0.33), 峰Ⅱ_C (0.43), 峰Ⅱ_D (0.51)。根据各个峰的洗脱浓度进行分步抽提。分步抽提后,将抽提液真空冷冻干燥。

2.5 RP-HPLC 分离:将 RGHP-Ⅱ_B 100mg 溶于 2ml 流动相中,离心 (12000r/min, 20min) 后进样,进样量 30μl。组分Ⅱ_B 经 RP-HPLC [柱: YWG-C₁₄ (5 × 200mm), 流动相: 60%CH₃CN, 40%H₂O (1.5%TFA), 压力: 2256Pa, 检测: UV215nm] 分离成 4 个部分: Ⅱ_{B1}, Ⅱ_{B2}, Ⅱ_{B3}, Ⅱ_{B4}。重复进样 40 次,分别收集后冻干。

3 鉴定

3.1 以高效排阻层析系统进行检验, Ⅱ_{B2} 为单峰, 见图 1。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳为一条谱带见图 2。

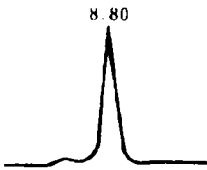


图1 RGHP-Ⅱ_{B2}的高效排阻层析
柱: Protein Pak 60
流动相: 0.08mol/L 磷酸钠缓冲液, 20% (V/V) 乙醇, 0.32mol/L NaCl
流速: 1ml/min
压力: 1122Pa
检测: UV215nm

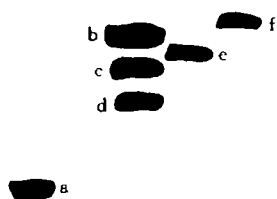


图2 标准多肽及RGHP-Ⅱ_{B2} SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

a-细胞色素C b-胰岛素A链 c-胰岛素B链
d-胰岛素 e-RGHP-Ⅱ_{B2} f-促黄体生成素

3.2 分子量的测定和氨基酸组成分析

3.2.1 试剂:a)分离胶缓冲液,并用作下槽缓冲液的贮存液;b)上槽缓冲液;c)分离胶贮存液;d)层积胶贮存液;e)2.4%(NH₄)₂SO₄溶液;f)染色液;g)脱色液的配制及制胶过程。

标准蛋白:细胞色素C、胰岛素、胰岛素B链、胰岛素A链、促黄体生成素。

取适量RGHP-Ⅱ_{B2}及标准多肽分别溶于样品缓冲液中,60℃保温10min,加样10μl,立即通电,电流20mA。待染料前沿进入分离胶后加大电流至40mA,全部电泳约需12h。图2为电泳图谱。电泳完成后,立即取出凝胶,并在染料前沿做标记,然后直接浸入染色液中,染色1.5h,换成脱色液,在室温下浸洗,至本底清亮色带清晰。标准多肽电泳迁移率与分子量对数线性关系为 $y=4.98-2.30x$ ($r=0.9920$),RGHP-Ⅱ_{B2} $T_{RD}=0.63$ 代入方程,计算其分子量为3325。

3.2.2 高效排阻层析分子量测定:采用高效排阻层析系统,使多肽和固定相离子和极性作用降低到最小。样品保留时间只和分子量大小有关。标准多肽为细胞色素C、胰岛素、杆菌肽、促黄体生成素。标准多肽保留时间和

分子量对数的线性关系为 $y=6-0.82x$ ($r=0.9985$),RGHP-Ⅱ_{B2}保留时间8.80代入方程,计算其分子量为3380。

3.2.3 氨基酸组成分析:约1mmol/L样品以5.7mol/L HCl(重蒸馏水配制)溶解,置于封管中,于110℃恒温水解,24h后进行自动分析。

本文还采用组织培养方法研究了RGHP-Ⅱ_B对胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)的生长、增殖的影响,发现RGHP-Ⅱ_B(10μg/cm³)对2BS细胞的生长增殖具有促进作用。对比研究了RGHP-Ⅱ_B和人参总皂甙对小鼠脾细胞及由ConA和LPS诱导小鼠脾细胞增殖的影响。结果表明RGHP-Ⅱ_B(75~600μg/cm³)在体外有直接激活小鼠脾细胞增殖作用。这与人参皂甙(75~600μg/cm³)的显著抑制作用相反。RGHP-Ⅱ_B对ConA诱导的小鼠脾细胞增殖有显著的抑制作用,对于LPS诱导的脾细胞增殖只在高浓度(600μg/cm³)时有显著的抑制作用,而人参皂甙对ConA诱导的脾细胞增殖也只在高浓度时有显著抑制作用,对于LPS诱导的脾细胞增殖在75~600μg/cm³浓度范围内均有较强的抑制作用。RGHP-Ⅱ_B的活性研究报告将另文发表。

参考文献

- 1 Gstiner F, et al. Archivs der Parmazie, 1966, 299(1): 936
- 2 Ando T, et al. Planta Medica, 1980, 38(1): 18
- 3 张今,等. 高等学校化学学报, 1985, 61(4): 376
- 4 张今,等. 科学通报, 1988, 12: 952
- 5 魏俊杰,等. 白求恩医科大学学报, 1990, 16(5): 436
- 6 王本祥,等. 药学报, 1990, 25(6): 401
- 7 王本祥,等. 药学报, 1990, 25(10): 725
- 8 吴庆夫,等. 药学报, 1991, 26(7): 499
- 9 中国医学科学院药物研究所植化室. 中草药, 1980, 11(3): 138

(1994-12-06 收稿)

Isolation and Determination of Polypeptide from Red Ginseng Root Hair

Jiao Lianqing, Yu Min, et al

A new polypeptide(RGHP)was isolated from red Ginseng root hair by Rp-HPLC. It was identified as triacont peptide on basis of analysis of amino acid composition and determination of molecular weight by SDS-PAGE and high performance size-exclusion chromatography. The activities of RGHP were studied by means of tissue culture and immunoassay, and compared with ginsenosides.