

西洋参多糖 PPQ I-4 的分离和表征

吉林大学化学系 (长春 130023) 马秀俐* 赵德超 孙允秀 刘举正
中国科学院长春应用化学研究所 郝春艳 刘树莹

摘要 为研究生物活性西洋参多糖的性质,采取热水提取乙醇分级沉淀、葡聚糖凝胶分离等手段从西洋参根中分得 4 个纯多糖 (PPQ I-4)。基质辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS) 测定分子量,乙酰化衍生结合 GC 分析测定糖组成。甲基化结合 GC-MS 分析测定糖苷键连接位点。结果表明,这 4 个多糖化合物都是杂多糖,分别由不同比例的阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、糖醛酸组成,糖醛酸含量为 30%~60%,分子量范围 2~7 万。

关键词 西洋参 多糖 MALDI-MS GC-MS

Isolation and Characterization of Four Polysaccharides from American Ginseng (*Panax quiquefolium*)

Department of Chemistry, Jilin University (Changchun 130023) Ma Xiuli, Zhao Dechao, Sun Yunxiu and Liu Juzheng
Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences Hao Chunyan and Liu Shuying

Abstract Four bioactive pure polysaccharides of *Panax quiquefolium* L (PPQ I-4) were isolated by Sephadex chromatography. The molecular weight of the polysaccharides were determined by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). The sugar compositions were analyzed by gas chromatography (GC). The position of the linkages of the component sugars were determined by methylation and GC-MS. The results showed that the four polysaccharides were all uronic acids containing heteropolysaccharide with the component sugar of arabinose, galactose and glucose in different molar ratios. Their molecular weights were in the range of $2 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$ Dalton.

Key words *Panax quiquefolium* L polysaccharide MALDI-MS GC-MS

西洋参 *Panax quiquefolium* L. 系五加科人参属多年生草本植物,具有悠久的药用历史。为了深入发掘这一重要的药用资源,我们对其活性成分西洋参多糖进行了系统的研究。采用多糖皂苷联合提取方法^[1],从西洋参根中提取出西洋参多糖 (PPQ)。小鼠体内活性实验结果显示,西洋参根粗多糖具有较好的抑制 S₁₈₀肉瘤生长活性;对抗癌化疗药环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下具有拮抗作用^[2]。以体外细胞因子刺激活性为指标进行活性跟踪实验,通过乙醇分级分离、Sephadex 凝胶过滤多次分离,得到 4 个西洋参活性多糖 (PPQ I-4)。它们具有较好的刺激小鼠脾淋巴细胞转化、诱导白介素-2 (IL-2) 生成等多种活性^[3,4]。本文报道 PPQ I-4 的分离纯化及表征。

1 材料、仪器和试剂

西洋参 *Panax quiquefolium* L. 根 (产于加拿大温哥华,大连天马洋参制药有限公司提供),白求

恩医科大学徐景达教授鉴定。Sephadex DE AE A50 Sephadex G200 为瑞典 Pharmacia 产品。半乳糖醛酸、间羟基联苯购自美国 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。

自动部分旋转接收仪 (上海无线电厂), 5DX-IR 红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司), 1890 气相色谱仪及 2350 数据积分仪 (惠普上海分析仪器有限公司), QP5000-GC/M SD (日本岛津公司), LDI-1700 质谱仪 (美国原 Linear Scientific 公司)。

2 方法与结果

2.1 西洋参多糖的提取与分离

西洋参根 1 kg 粉碎,过 80 目筛,加 8 L 水,浸泡过夜,沸水提取 3 次 (2, 1.5, 1 h)。合并提取液,浓缩至 1/10 体积,加入 95% 乙醇,至醇浓度 40%,离心 (3000 r/min, 15 min),弃去沉淀。上清液继续加乙醇至醇浓度 60%,离心 (同上),收集沉淀。所得沉淀用乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤,得西洋参多糖。

* Address: Ma Xiuli, Department of Chemistry, Jilin University, Changchun. 现地址: 北京沙河中国医药研究开发中心 (邮编 102206)。

马秀俐 女,副教授,1982 年毕业于沈阳药学院 (现沈阳药科大学),获理学学士;1988 年毕业于白求恩医科大学,获医学硕士;1998 年毕业于吉林大学获理学博士。先后主持和参加了“白三烯的综合研究”、“三硫化物的合成及药用研究”、“木糖醇分离纯化工艺研究”、“西洋参多糖临床前研究”等国家和省级课题。发表科研论文 30 篇。

(PPQ)。取 PPQ 5 g,Sevage法脱蛋白,唾液淀粉酶除淀粉,用 Sephadex DEAE A50凝胶色谱进行分离。0~ 0.8 mol/L NH_4HCO_3 溶液梯度洗脱,自动部分接收仪收集,苯酚 硫酸法隔管检测收集液,绘制洗脱曲线。合并各次相同洗脱峰,分别以蒸馏水透析、浓缩、冻干,得到不同多糖组分,即西洋参多糖 I、II、III、IV、V (PPQ I、II、III、IV、V)。PPQ I 经 Sephadex G200 再次分离,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗脱,分管收集,检测,合并同一吸收峰,蒸馏水透析、浓缩、冻干,得西洋参多糖 I-1 I-2 I-3 I-4 (PPQ I-1~ 4)。葡聚糖凝胶 Sephadex G200(1× 80 cm)层析法和聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测纯度,以上 4 个多糖为纯多糖。

2.2 PPQ I-1~ 4 分子量的测定:基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)法^[5]和凝胶色谱法测定 PPQ I-1~ 4 的分子量分别为 61,47,39 和 28 万。

2.3 PPQ I-1~ 4 的糖组成分析:以上多糖样品(10 mg),加 2 mol/L 三氟乙酸(TEA),121℃ 水解 1.5 h,除尽 TFA,NaBH₄还原。吡啶-酸酐(1∶1)90℃ 酰化 1 h,直接进样进行气相色谱分析。GC 条件:毛细管色谱柱(0.25 mm× 30 m,0.22 μm SE54),氢火焰检测器,进样口 270℃,检测器 300℃,程序升温起始温度 170℃ 保持 1 min,5℃/min 升至 230℃ 并保持 6 min。各种单糖标准品同上进行衍生化和 GC 分析。根据保留时间和峰面积进行定性和定量。结果见表 1。

表 1 PPQ I-1~ 4 的糖组成及糖醛酸的含量			
多糖	残基类型	残基含量(mol%)	糖醛酸含量(%)
PPQ I-1	Ara	31.5	38
	Gal	58.5	
	Glu	10.0	
PPQ I-2	Ara	34.3	32
	Gal	59.5	
	Glu	5.5	
PPQ I-3	Ara	43.6	
	Gal	46.2	
	Glu	10.0	
PPQ I-4	Ara	29.3	60
	Gal	70.2	
	Glu		

2.4 PPQ I-1~ 4 的甲基化分析:采用 Hakomori 法^[6]进行甲基化,用红外光谱跟踪检测甲基化完全与否,3 400 cm⁻¹附近羟基吸收峰完全消失,说明甲基化完全,可继续下面操作。完全甲基化的样品用 88% 甲酸于 110℃ 水解 8 h,去除甲酸,NaBH₄室温还原 2 h,吡啶-酸酐(1∶1)90℃ 酰化 1 h。以上所得部分甲基化部分乙酰化产物进行气质联机分

析。GC 条件:QP5000-GC/MSD(Shimadzu Instrument Co.),BD-17 毛细管色谱柱(0.25 mm× 30 m),进样口 270℃,程序升温其始温度 170℃ 保持 1 min,5℃/min 升至 250℃ 并保持 5 min。MS 条件:EI 源,电子能量 70 eV,源温度 250℃,扫描范围 35.00~ 350.00。根据有效碳响应系数计算各糖残基摩尔比^[7]。结果如表 1。根据甲基化结果,PPQ I-1~ 4 的中性糖部分以糖残基实验式表述如下:

PPQ I-1 (Ara→)₅(→3,5Ara)₅(→5Ara→)₄(→6Glc→)₂(Glc→)(→6Gal→)₃(→4Gal→)₇(→3,6Gal→)₆(Gal→)

PPQ I-2 (Ara→)₄(→3,5Ara→)₄(→5Ara→)₄(→4,6Glc→)(Glc→)(→6Gal→)₁₂(→3,6Gal→)₆(→4Gal→)₃(Gal→)

PPQ I-3 (Ara→)₅(→3,5Ara→)₅(→5Ara→)₄(→4Glc→)₃(Glc→)(→6Gal→)₆(→3,6Gal→)₄(4Gal→)₄(Gal→)

PPQ I-4 (Ara→)(→5Ara→)₃(→6Gal→)₅(→3,6Gal→)₁₅(Gal→)

2.5 PPQ I-1~ 4 的糖醛酸含量分析:糖醛酸含量的测定采用间羟基联苯法^[8],半乳糖醛酸为标准品制作标准曲线。PPQ I-1~ 4 的糖醛酸含量见表 1。

2.6 PPQ I-1~ 4 比旋光: MZZ-2 旋光仪测比旋光。PPQ I-1~ 4 的比旋光 [α]_D²⁰分别是: +78.8°, +100.7°, +84.0°, +47.0°。

表 2 PPQ I-1~ 4 的甲基化 GC-MS 分析结果						
糖残基	甲基位置	糖键	组成(mol%)			
			PPQ I-1	PPQ I-2	PPQ I-3	PPQ I-4
Ara	2,3,5	Terminal(f)	12.0	10.6	15.9	4.1
	3,5	2	7.9	11.2	12.1	-
	2	3,5	11.4	11.2	15.5	11.3
Gal	2,3,4,6	Terminal(p)	3.3	2.1	2.9	2.9
	2,3,4		6.1	35.0	18.5	19.6
	2,3,6	4	16.7	7.5	11.7	-
	2,4	3,6	28.9	16.0	11.5	62.5
Glc	2,3,4,6	Terminal(p)	2.0	2.2	2.9	-
	2,3,4	6,	5.0	-	-	-
	2,3,6	4	4.5	-	8.8	-
	2,3	4,6	-	2.7	-	-

3 讨论

西洋参多糖 PPQ I-1~ 4 是活性跟踪下分离得到的 4 个纯多糖,它们均具有刺激淋巴细胞转化活性,并可协同亚剂量 ConA 诱生白介素-2(IL-2),其作用强度差别不大。本文对它们的理化性质进行了研究,以其进一步考察构效相关性。研究结果表明,PPQ I-1~ 4 均为含有糖醛酸的杂多糖。糖醛酸含量在 30%~ 60% 之间。这些活性多糖的分子量范

围为 2~7 万。基质辅助激光解吸电离质谱作为一种新的“软电离”技术,由于其在分子量测定等方面快捷、直接、优质及良好的软电离型近年来在生物化学领域得到广泛应用。本试验在对应用该技术测定多糖分子量研究^[5]基础上,成功地测定了 PPQI-1~4 的分子量。糖组成分析显示,它们的中性糖部分组成糖主要是阿拉伯糖和半乳糖,有的含有少量葡萄糖。进一步的甲基化分析测定了各组成糖在多糖结构中的连接位点。借鉴化学实验式概念以糖残基实验式表述不同连接位点的糖残基在多糖结构中所占比例,如此表述方便于比较复杂的多糖化合物结构上的差异。研究结果显示,PPQI 系列多糖的组成糖中,末端、2-3 或 5 位分支的阿拉伯糖残基数目基本相当,半乳糖的连接位点则有较大差别,PPQI-1 中 3 或 6 位分支的半乳糖占较大比例,PPQI-2 中 1,6 连接半乳糖为主,PPQI-1~3 中 1,6 连接半乳糖多于其它方式连接,PPQI-4 则以

3 或 6 位分支半乳糖为主,不含葡萄糖。不同多糖的糖组成分析与甲基化分析结果显示中性糖组成比例大体一致,甲基化分析过程较为复杂,造成误差的机会加大,但却提供了糖组成分析中无法提供的单糖间连接位点的信息。西洋参多糖结构的复杂性和作用的相似性,阐明构效关系比较困难,本研究为进一步的构效关系研究提供了基础数据,有待进一步深化。

参考文献

- 1 马秀俐,等.中国发明专利,1998,13(52):CN116838A
- 2 李岩,等.白求恩医科大学学报,1996,22(2):137
- 3 朱伟,等.白求恩医科大学学报,1997,23(3):236
- 4 朱伟,等.中国药理学通报,1997,13(1):76
- 5 Hao Chunyan, et al. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 1998, 12:345
- 6 Stanb A M. Method in Carbohydrate Chemistry (V). 1956:5
- 7 Sandford P A, et al. Biochemistry, 1966, 5:1508
- 8 Blumenkrantz N, et al. Analytical Biochemistry, 1973, 54:84

(1999-04-15 收稿)

太白米的甾体生物碱类成分研究

北京医科大学药学院(100083) 吴卫中* 田晶 屠鹏飞 郑俊华

摘要 从太白米 *Notholirion bulbuliferum* 干燥小鳞茎的正丁醇提取物中分离并鉴定了 3 个甾体生物碱苷,经 IR、¹³CNMR、MS 等方法分别鉴定为茄次碱-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(solanidine-3-O-β-D-glucopyranoside, I),茄次碱-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷(solanidine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranoside, II),茄次碱-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-[β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)]-β-D-吡喃葡萄糖苷(solanidine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-β-D-glucopyranoside, III)。其中化合物 I 为首次从本植物中分得。

关键词 太白米 假百合属 甾体生物碱

太白米为百合科假百合属假百合 *Notholirion bulbuliferum* (Lingelsh.) Stearn 的干燥小鳞茎,主产于我国秦岭及西南高山地区。本品性温,味辛,微甘苦。具有宽胸理气,健胃,镇痛等功效,临床用于治疗胃腹胀痛,呕吐,咳嗽等症。近年来,用于治疗胃癌、食道癌,取得了较好的效果。据报道,本品含有甾体生物碱及其苷类成分^[1~3]。为了阐明其抗癌、镇痛活性成分,我们对其进行了较系统的化学成分研究,分离鉴定了 17 个化合物,主要为酚酸类^[4]和甾体生物碱苷类成分。本文报道 3 个甾体生物碱苷类成分

的分离与结构鉴定。

化合物 I 为白色颗粒状结晶,与生物碱试剂反应呈阳性。FAB-MS *m/z* 560(*M*+1), 396, 380(*M*-葡萄糖基)。IR 显示有 OH(3 384 *cm*⁻¹), C=C(1 643 *cm*⁻¹), C-O(1 071 *cm*⁻¹)。¹HNMR 显示有 1 个烯氢 δ5.33(1H, brs)和 4 个甲基 δ0.68(3H, s), 0.82(3H, d, *J*=7 Hz), 0.91(3H, d, *J*=7 Hz), 0.95(3H, s), 此为茄次碱类甾体生物碱的特征信号, FAB-MS 中的 204 和 150 碎片也支持了该推断;同时显示有 β-D-葡萄糖的端基质子 δ4.92(1H, d, *J*=

* Address: Wu Weizhong College of Pharmacy, Beijing University of Medical Sciences, Beijing

屠鹏飞,男,1963 年出生,北京医科大学药学院教授,博士生导师。1990 年毕业于中国药科大学,获博士学位,期间 1988 年至 1989 年在日本富山医科药科大学和汉药研究所学习,1990 年至 1992 年在北京医科大学药学院进行博士后研究。主要从事中药和天然药物的活性成分、质量评价等方面研究。先后承担国家“七五”、“八五”攻关项目、国家自然科学基金青年基金项目和重点项目、原国家教委、卫生部等项目 10 多项,研究成果获国家科技进步一等奖、三等奖各一项,国家中医药管理局科技进步一等奖二项。发表科研论文 50 余篇。