

# 中华芦荟中性糖的分离与鉴定研究

宋 燕,李云政,秦海员,万玉清\*

(北京理工大学 材料科学研究中心,北京 100081)

**摘要:** 目的 为更深入地研究中华芦荟活性成分的组成及化学结构。方法 采用 DEAE-Sephadex A-25作为填料,通过离子交换柱层析分离。结果 从中华芦荟原始多糖中分离并提纯得到一种中性糖,经过 IR HPLC TGA  $^{13}\text{CNMR}$  碱性水解及元素分析测定,证明这是一种纯度较高的、部分乙酰化的  $\beta$ -1, 4-*D*-聚吡喃甘露糖,其中糖链中甘露糖与乙酰基的物质的量之比为 1.64:1。结论 该多糖为首次分得。

**关键词:** 中华芦荟;多糖;离子交换层析;HPLC

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0491-03

## Isolation and identification of neutral polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*

SONG Yan, LI Yun-zheng, QIN Hai-yuan, WAN Yu-qing

(Research Center of Materials Science, Beijing University of Science and Technology, Beijing 100081, China)

**Abstract** **Object** To carry out a deeper study on the active component and the structure of *Aloe vera* L. var. *chinensis*. (Haw.) Berg.. **Methods** The polysaccharide was isolated from the extract of the fresh leaf pulp of *A. vera* var. *chinensis* by means of DEAE-Sephadex A-25 ion exchange column chromatography and identified, through HPLC, IR, TGA,  $^{13}\text{CNMR}$  and elementary analysis. **Results** Alkaline hydrolysis proved that it is a neutral, linear polymer of a partially acetylated  $\beta$ -1, 4-*D*-mannopyranose of high purity. The molar ratio of *D*-mannose to the acetyl group in the polysaccharide was 1.64:1. **Conclusion** This is the first report to uncover the presence of such polysaccharide in *A. vera* var. *chinensis*.

**Key words** *Aloe vera* var. *Chinensis* L. (Haw.) Berg.; polysaccharide; ion exchange chromatography; HPLC

自古以来,芦荟作为一种传统药物在民间得到了广泛应用,被用来治疗烧伤、烫伤、便秘等多种疾病<sup>[1]</sup>。现代研究更科学而深入地证明,芦荟凝胶的活性成分——芦荟多糖,具有杀菌消炎、抗病毒、抗癌、调节免疫、护肤美容等多种功效<sup>[1]</sup>。

芦荟的种类繁多,化学成分复杂,且因产地、品种、种植加工条件的不同而有所差异。我们发现中华芦荟在提取方法、化学结构及生物活性方面均与库拉索芦荟和木立芦荟所有差异,这势必导致其在采集、加工、用法及药用剂量方面均有所变化。深入研究和认识中华芦荟的特点,是实现其产业化的基础。为了进一步研究中华芦荟多糖的组成及其生物活性,我们对制得的粗多糖进行了分离、提纯,得到了一种较纯净的中性糖——聚吡喃甘露糖 (Neural Mannopyranose简称 NMP)。本文主要报道这种多糖的分离提纯和结构鉴定。

## 1 材料和仪器

1.1 原料:中华芦荟鲜叶由云南元汇某公司空运。

1.2 试剂:DEAE-Sephadex A-25凝胶, Sepharose 6B凝胶为瑞典 Pharmacia 公司产品;其它试剂为国产分析纯。

1.3 仪器:752型紫外光栅分光光度计, P-E2000型红外光谱仪, Carlo Erab 1106元素分析仪 (C H N) ST-02元素分析仪 (O元素), LC-10AD高效液相色谱仪, RID-6A示差折光监测器,测糖专用 HPLC柱, IBM-PC Thermal Analyse 2000 TA差热失重分析器, BSZ-100自动部份收集器, HL-1恒流泵, FH-9704紫外检测仪。

## 2 分离与提纯

新鲜的中华芦荟叶,洗净后,小心地切去外皮,取出内部凝胶,磨碎、过滤、醇沉、过滤,沉淀物用乙醇洗涤 2~3次,冻干备用。

\* 收稿日期: 2000-09-15

作者简介: 李云政 (1964-),男,云南省牟定县人,工学博士,任职于北京理工大学材料科学研究中心。1995年破格晋升为研究员,现为硕士生导师。1986~1990年间,承担“863”项目光致变色光记录材料的研究,1990~1992年间,从事有机非线性光学材料的研究 (863课题),1996~2000年负责“863”及自然科学基金关于可降解树脂项目的研究工作,同时还展开了天然生物材料的利用研究,现正从事芦荟多糖的研究。

中华芦荟粗多糖冻干粉 1.0 g,溶于蒸馏水中,4℃下,搅拌使之充分溶胀,然后分别用 G-3, G-4型砂芯漏斗过滤,所得滤液用 0.02 mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  调节 pH 值至 7.8,加入 DEAE-Sephadex A-25 柱中,控制流速恒定为 110 mL/h,进行离子交换层析分离。紫外检测仪随时监测洗脱液在 280 nm 处的吸收。

淋出液分部收集 (8 mL/管),用苯酚-硫酸法检测多糖峰位,合并单一峰多糖。收集含糖部分,于 4℃下透析、冻干后,得到一白色、膨松、质软的物质,即为不被柱吸附的中性糖物质。

### 3 结构鉴定

3.1 纯度测定:一定量的多糖 NMP,充分溶于一定体积 0.3 mol/L NaCl 溶液中,加入 Sepharose 6B 柱中,以 0.3 mol/L NaCl 溶液作为淋洗液,控制流速为 60 mL/h,每 4 mL 收集,用苯酚-硫酸法<sup>[2]</sup>,在 490 nm 处测定其吸光度值。

3.2 高效液相色谱法测糖链组成:2.0 mg 样品,加入 1 mL,2 mol/L 浓度的三氟乙酸 (TFA) 溶液,于 120℃ 加热水解 1 h,蒸去剩余的三氟乙酸并加入 1 mL 异丙醇洗涤,加入 1 mL 去离子水溶解酸解后的产物,等待进样。

3.3 多糖的碱性水解<sup>[3]</sup>:4.0 mg 多糖 NMP,加入 2 mL,1 mol/L NaOH 溶液,在 90℃ 下水解约 1 h,然后对蒸馏水透析,未透过物冻干得去乙酰基多糖。

## 4 结果和讨论

### 4.1 NMP 的元素分析,结果见表 1

表 1 中华芦荟原始多糖与 NMP 的元素分析结果 (%)

| 样 品 | C     | H    | O     | N    | Total |
|-----|-------|------|-------|------|-------|
| 粗多糖 | 37.25 | 6.12 | 44.94 | 0.65 | 88.31 |
| NMP | 40.47 | 6.60 | 49.35 | <0.3 | 96.04 |

由表 1 可以看出,经过分离提纯以后得到的中性糖 (NMP),碳氢化合物总含量比原始多糖高 8.11%,而 N 元素的含量则明显降低 (<0.3%),在误差范围内也可以认为样品中已不含有 N 元素。这说明经过分离提纯以后,中性糖中碳氢化合物的含量有较大的提高,糖蛋白的含量则明显减少,以至被完全分离出去。另外 NMP 在 260 及 280 nm 处无紫外吸收也可以证明样品中不存在蛋白质。由此,可以说明,DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析法可以很好地分离提纯芦荟多糖。

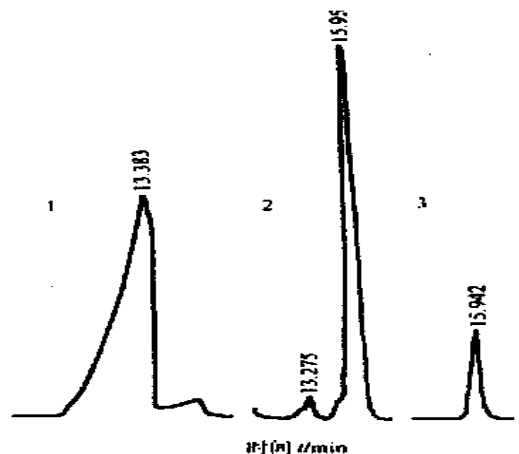
另外,在 NMP 中, C:H:O = 1:2:0.9,而甘露糖中 C:H:O = 1:2:1 相比之下,样品中氧

元素的含量偏低,分析其中原因,我们认为,这说明样品中很可能含有富碳成分或基团,从而导致了氧元素的含量相对偏低,最直接的解释是 NMP 中大量乙酰基团的存在,这由红外光谱中 1738.83  $\text{cm}^{-1}$  处的强吸收峰得到验证,另外, NMP 碱性水解后得到去乙酰基多糖, IR 测定无 1730  $\text{cm}^{-1}$  及 1250  $\text{cm}^{-1}$  处吸收,进一步证明了样品中乙酰基团的存在。

凝胶层析和热失重分析均表明该多糖纯度较高,因此可以从元素分析中近似推算出糖链中糖苷和乙酰基之比约为: 1.64:1

4.2 NMP 的红外光谱分析: 3431.83  $\text{cm}^{-1}$  处的宽峰是 O-H 的伸缩振动, 2923.97, 1376.79 以及 1032.62  $\text{cm}^{-1}$  处较大的吸收均为糖的特征吸收。1738.83  $\text{cm}^{-1}$  的吸收,表明乙酰酯基的存在,而且该吸收峰较大,说明化合物中乙酰酯基含量较高,根据美国科学家 McAnalley 的研究,多糖中乙酰基含量越高,糖的活性越高。808.80, 874.64 和 900.04  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收非常接近于 (810, 870, 898  $\text{cm}^{-1}$ ),初步判断其中含有吡喃甘露糖苷,而该糖样品酸解后的 HPLC 谱图更进一步验证了甘露糖苷的存在。

4.3 NMP 的 HPLC 结果分析:见图 1 对照标准样品谱图和中性糖酸解后的 HPLC 谱图,我们可以断定位于 15.95 处的峰值为 D-甘露糖的峰值;而位于 13.275 处的峰为残留的乙酸。由此说明该样品的糖链主要由 D-甘露糖构成,即这是一种聚甘露糖。



1-NMP 2-乙酸标准图谱 3-D 甘露糖的标准图谱

图 1 HPLC 图谱

4.4 NMP 的  $^{13}\text{C}$  NMR 分析:  $\delta$ 100.6 C<sub>1</sub> 和  $\delta$ 77.1 C-4 的化学位移,与未发生取代的  $\beta$ -D-mannose<sup>[4]</sup> 相比,向低场移动了  $\delta$ 5~9,说明多糖 NMR 糖链中发生了 1,4 取代,因此可确定, NMP 是由  $\beta$ -1,4 键构

成的。

4.5 NMP的差热失重分析(TGA):从图中可以看出,除了水的失重温度峰外,样品的失重温度范围都在 200℃~ 400℃内,没有其它杂质峰,说明该样品的纯度较高,从元素分析也可以得到验证。

综上所述,我们可以得到这样的结论,采用DEAE-Sephades A-25阴离子柱层析法可以较好地分离和提纯中华芦荟原始多糖,凝胶层析得到的淋洗曲线为一单一的正态分布曲线,以及元素分析和热失重分析均表明该多糖的纯度较高;提取得到的多糖经过 HPLC IR <sup>13</sup> CNMR测定证明为一种部分

乙酰化的 $\beta$ -1, 4-D聚吡喃甘露糖。该多糖是否具有生物和药理活性有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Bill H M, Grand P R, *et al.* Uses of Aloe products [P]. US Patent 5, 308, 838.
- [2] Michel D G, Gilles K A, Hamilton J K. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 1956, 28: 350-356.
- [3] Akira Yagi, Hiroshi Nishimura, Takao Shida, *et al.* Structure determination of polysaccharides in *Aloe arborescens* var [J]. Planta Med, 1986, 3: 213-218.
- [4] Gorin P A. Assignment of signals of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of selected polysaccharide. Comments on methodology [J]. Carbohydrate Research, 1975, 39: 3-10.

## 西南银莲花的活性三萜皂苷

廖 循<sup>1</sup>,李伯刚<sup>1</sup>,高小平<sup>1</sup>,官家发<sup>1</sup>, 丘生<sup>1</sup>,陈耀祖<sup>2\*</sup>

(1. 中国科学院成都生物研究所,四川 成都 610041; 2. 浙江大学 化学系,浙江 杭州 310027)

**摘 要:**目的 研究西南银莲花 *Anemone davidii* 根状茎和地上部分的活性三萜皂苷。方法 用甲醇室温提取,大孔树脂 D101 硅胶及反相硅胶柱层析分离纯化,NMR分析并结合化学降解鉴定结构,体外抑菌和人癌细胞生长抑制实验测试抗菌和抗癌活性。结果 从该植物根状茎中分离鉴定出三萜皂苷I ~ VII,从地上部分分离鉴定出三萜皂苷V ~ VIII,其中II ~ IV对人癌细胞体外生长有抑制作用,V,VI和VIII有一定的抗菌活性。结论 上述化学成分均为首次从该植物中分离得到,并首次进行抗癌活性测试,其中II,IV和VI在该属植物中为首次报道。

**关键词:** 西南银莲花;三萜皂苷;生物活性

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0493-04

### Bioactive triterpenoid saponins from *Anemone davidii*

LIAO Xun<sup>1</sup>, LI Bo-gang<sup>1</sup>, GAO Xiao-ping<sup>1</sup>, GUAN Jia-fa<sup>1</sup>, DING Li-sheng<sup>1</sup>, CHEN Yao-zu<sup>2</sup>

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu Sichuan 610041, China; 2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027, China)

**Key words** *Anemone davidii* Franch.; triterpenoid saponins; bioactivity

西南银莲花 *Anemone davidii* Franch.,又名铜钱草(湖北)、铜骨七(四川)和钻骨风(贵州),属毛茛科银莲花属植物,生长于海拔 950~ 3 500 m的山地中,分布于西南及湖北西部和湖南西北部。其根状茎具有活血止痛、祛瘀消肿和补肾之功效,可用于治疗跌打损伤、风湿痛、劳伤、阳痿和腰痛<sup>[1]</sup>。该植物的化学成分还未见报道,我们对其根状茎和地上部分分别用甲醇提取,脱脂后用大孔树脂 D101柱层析得到总皂苷。通过反复硅胶柱层析和反相硅胶柱层析从根状茎总皂苷中分离出化合物I ~ VII,从地上部分总皂苷中分离出化合物V ~ VIII。

化合物I ~ VII经薄层酸水解后,苷元经薄层展开,其 R<sub>f</sub>值与齐墩果酸标准品相同;而化合物VIII经相同的处理后,苷元的 R<sub>f</sub>值与常春藤配基标准品相同。从 8个化合物的<sup>13</sup>CNMR谱可知,化合物I ~ IV的苷元除 C-3外与齐墩果酸的基本一致,只是 C-3( $\delta$  88)的化学位移比齐墩果酸向低场移动约  $\delta$ 11,说明它们是仅 C-3接糖链的齐墩果酸糖苷。化合物V ~ VIII的苷元<sup>13</sup>CNMR化学位移与齐墩果酸或常春藤配基标准品相比,除 C-3向低场移动约  $\delta$ 10外,C-28( $\delta$  176)还向高场移动约  $\delta$ 4,同时,碳谱中还出现以酯苷键与苷元相连的糖基异头碳特征信号。

\* 收稿日期: 2000-04-03

作者简介: 廖 循 (1972-),男,四川省成都市人,中国科学院成都生物研究所助理研究员,博士 Tel (028) 5229227