

· 有效成分 ·

黄芪中一种新葡聚糖的分离纯化与化学结构研究

王莹, 赵毅民, 张起凤, 乔善义, 齐春会, 张永祥

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 从中药黄芪中提取免疫活性多糖并研究其化学结构。方法 用乙醇分级沉淀、脱蛋白、CTAB选择性沉淀、离子交换及凝胶过滤柱层析的方法从黄芪水提物提取均一多糖; 运用凝胶过滤法确定多糖的均一性和分子量; 运用糖组成分析、甲基化分析、Smith降解、IR及¹³C NMR等方法研究多糖的结构。结果 得到均一多糖 A2Nb, 其平均分子量为 360 000, 由 D-葡萄糖组成, 主要连接方式为 α -D-(1→4)-Glc, 在每 25 个葡萄糖中有一个 6-O 位上的分枝。结论 从黄芪中首次分离到具有促脾细胞增殖作用的高分子量葡聚糖 A2Nb。

关键词: 黄芪; 多糖; 葡聚糖; 脾细胞增殖作用

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)11-0962-03

Isolation and structure elucidation of novel glucan from *Astragalus mongholicus*

WANG Ying, ZHAO Yi-min, ZHANG Qi-feng, QIAO Shan-yi, QI Chun-hui, ZHANG Yong-xiang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract **Object** To isolate the immunoactive polysaccharide from *Astragalus mongholicus* Bunge and elucidate its chemical structure. **Methods** The polysaccharide was purified from water extracts of *A. mongholicus* by ethanol precipitation, deproteinization, selective precipitation with hexadecyltri-methylammonium bromide, ion-exchange and gel-filtration chromatography. Its homogeneity and molecular weight were estimated by gel-filtration chromatography, the structure was deduced from sugar analysis, methylation analysis, Smith degradation, IR and ¹³C NMR spectrophotometry. **Results** A homogeneous polysaccharide A2Nb was obtained with a molecular mass of 360 000, and composed of D-glucose with a major linkage form of α -D-(1→4)-glucose. Side chains were found at 6-O positions once in every 25 glucose residues. **Conclusion** A high molecular weight glucan A2Nb was obtained from *A. mongholicus* for the first time. It showed the ability of promoting the proliferation of the splenocytes of mice.

Key words *Astragalus mongholicus* Bunge; polysaccharide; glucan; splenocyte proliferation

中药黄芪 *Astragalus mongholicus* Bunge 为豆科黄芪属植物蒙古黄芪的干燥根。味甘, 性微温, 是一种常用扶正中药。对黄芪水溶性多糖的研究已有一些报道^[1-3], 在对黄芪水提液进行系统分离的过程中我们曾报道了其中的 2 种中性杂多糖的化学结构, 本文报道一种新的高分子量葡聚糖的分离、纯化及化学结构研究结果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂: 蒙古黄芪 *Astragalus mongholicus* Bunge 生药样品由总后药检所鉴定。

测定结构所用的仪器包括: Waters 600 型高效液相泵, Biosep sec S-3000 型液相色谱柱, Waters

410 型示差检测仪, BioRad FTS-65A 型红外光谱仪, JNM-GX400 超导核磁共振仪。GC 使用 PEX 1 型气相色谱仪, EC-5 毛细管柱。GC-MS 用 HP-5890/VG-TRIO2 气质联用仪, EC-5 毛细管玻璃柱。单糖标准品 Sephadex S-400 为 Pharmacia 出品。纤维素薄层板为 Merck 公司出品。T 系列 Dextran 标准品为 FLUKA 公司出品。硼氢化钠及三氟乙酸为 Aldrich 出品。其它试剂均为国产 AR 级。

1.2 分离与纯化: 10 kg 黄芪以 8 倍水煎煮 3 次, 水煎液合并浓缩至一定浓度, 用 Sevag 法除蛋白, 以 95% 的乙醇分级沉淀, 除去 30% 乙醇沉淀部分后,

从 60% 乙醇沉淀部分得到粗多糖 A2, 取 2.5% 的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 10 mL 对粗多糖 A2 100 mg 进行选择沉淀, 从中得到 CTAB 沉淀部分 A2A 和上清部分 A2N。A2N 经 (Cl⁻) DEAE 纤维素柱层析, 以 H₂O 和不同浓度的 NaCl 梯度洗脱, 按峰合并, 得到水洗脱部分和多个盐洗脱部分。水洗脱部分浓缩干燥得中性多糖 A2N-1 经 Sephacryl S-400 纯化, 从 A2N-1 中分离得到 A2Nb。

1.3 结构鉴定

1.3.1 纯度与分子量的测定^[4]: 样品 A2Nb 及标准多糖 Dextran T 系列分别经 HPLC (流动相为 0.01 mol/L 的 NaCl 溶液) 分离, 根据峰型判断样品纯度, 由标准多糖的分子量对数与洗脱体积求得标准曲线, 再由标准曲线求得样品的平均分子量。

1.3.2 糖组成分析^[5]: A2Nb (5 mg) 溶于 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 3 mL 中, 120℃ 水解封管 2 h, 除去 TFA 后, 水解产物溶于 H₂O 一部分进行纤维素薄层板 TLC 法分析, 展开溶剂 EtOAc-C₂H₅N-HOAc-H₂O (5: 5: 1: 3), 苯胺-邻苯二甲酸显色。TLC 表明仅含有葡萄糖。剩余水解产物经硼氢化钠还原, 制备成乙酰化衍生物进行气相色谱分析, 结果表明含有葡萄糖及微量的阿拉伯糖。

1.3.3 甲基化分析^[6,7]: 采用改良的 Hakomori 法进行甲基化, 甲基化产物用 90% 甲酸 110℃ 水解 6 h, 蒸干, 再用 2 mol/L 的 TFA 100℃ 水解 6 h, 去酸后用 NaBH₄ 还原, 乙酰化 (Ac₂O, 100℃ 1 h) 后进行 GC 和 GC-MS 分析。

1.3.4 高碘酸氧化^[8]: 多糖样品 5 mg 溶于 0.01 mol/L 的高碘酸钠溶液 10 mL 中, 避光于 4℃ 氧化。间隔一定的时间取样用分光光度法测定高碘酸钠的消耗量, 直至氧化不再进行为止。在氧化完全的多糖溶液中加入乙二醇 5 滴, 用水透析 24 h, 加 NaBH₄ 于室温还原 12 h, 再用 0.5 mol/L 醋酸调至 pH 5.0, 透析 24 h, 浓缩至干, 加 1 mol/L TFA, 封管水解 6 h, 乙酰化后进行 GC 分析。

1.3.5 红外光谱和核磁共振波谱测定: A2Nb 2 mg 用 KBr 压片, 在 BioRad FTS-65A 型红外光谱仪上测定。碳谱的测定使用 JNM-GX400 超导核磁共振仪。样品 20 mg 溶于 0.5 mL D₂O 中, TMS 为内标, 常温测定。

2 结果与讨论

2.1 A2Nb 为白色粉末, 易溶于水及 DM SO 凝胶柱层析显示单一对称洗脱峰, 表明为均一组分。由其

洗脱时间从标准曲线上求得分子量为 360 000。紫外扫描无 260 nm 的核酸特征吸收峰和 280 nm 的蛋白特征吸收峰。与碘试剂反应不呈蓝色, 说明该多糖结构有别于直链淀粉。

2.2 该多糖以 2 mol/L 三氟乙酸完全水解后进行纤维素薄层层析, 只检测到一个斑点, R_f 值与葡萄糖一致, 提示它由单一葡萄糖组成。酸水解产物经硼氢化钠还原, 制成全乙酰化衍生物, 进行 GC 分析, 只显示全乙酰化葡萄糖醇一个峰, 证明其仅含有葡萄糖, 确认该多糖为葡聚糖。

2.3 该多糖按改良的 Hakomori 法^[6]全甲基化, 以红外光谱检测, 甲基化产物在 3 400 cm⁻¹ 附近的羟基吸收峰完全消失, 表明甲基化完全。经酸水解还原、乙酰化处理后, 做 GC-MS 分析, 结果见表 1。将 GC 的保留时间 (t_R) 及 MS 主要碎片 (m/z) 与文献值^[9]比较, 显示反应产物中有 1, 4, 5-三乙酰基-2, 3, 6-三甲基葡萄糖, 1, 5-二乙酰基-2, 3, 4, 6-四甲基葡萄糖及 1, 4, 5, 6-四乙酰基-2, 3-二甲基葡萄糖, 其摩尔比为 25: 1: 1, 另有极微量的 1, 4, 5-三乙酰基-2, 3-二甲基阿拉伯糖。表明 1→4 连接葡萄糖构成了该多糖的基本骨架, 在 6-O 位上有少量的分支结构。

表 1 A2Nb 甲基化产物的 GC-MS 数据

化合物	t _R	克分子比	MS (m/z)	连接方式
1, 4, 5-O-Ac ₃ -2, 3-O-Me ₂ -Ara	0.8	Trace	43, 87, 101, 117, 129, 161, 189	5 → 1 Ara-
1, 5-O-Ac ₂ -2, 3, 4, 6-O-Me ₄ -Glc	1.0	1.0	43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	1 Glc-
1, 4, 5-O-Ac ₃ -2, 3, 6-O-Me ₃ -Glc	1.6	25.0	43, 45, 71, 87, 107, 129, 145, 161, 205, 233	4 → 1 Glc-
1, 4, 5, 6-O-Ac ₄ -2, 3-O-Me ₂ -Glc	2.4	1.0	43, 45, 85, 101, 117, 129, 145, 161, 205	4 ↓ 6 4 → 1 Glc-

* Retention time of alditol acetate relative to 1, 5-di-o-acetyl-2, 3, 4, 6-tetra-o-methyl-D-glucitol

2.4 A2Nb 用高碘酸钠完全氧化, Smith 降解产物的 GC 分析结果主要是赤藓醇及少量的丙三醇。其摩尔比约为 26: 1。赤藓醇为 1, 4-及 1, 4, 6-葡萄糖残基的降解产物, 丙三醇为非还原末端葡萄糖残基的降解产物。这一结果与甲基化分析的结果一致。

2.5 A2Nb 的 IR 谱中除含有多糖的特征吸收峰外, 在 840 cm⁻¹ 有一个 α-葡聚糖的特征吸收峰。¹³C NMR 中端基碳信号在 δ 101.7, 表明 A2Nb 的糖苷键为 α-型。将所得结果与文献^[2,10]相对照, 确定了¹³C NMR 中各信号的归属 (表 2)。表明多糖 A2Nb 的结构与文献^[2]中的葡聚糖 AG-1 结构相似。

表 2 A2Nb和其它多糖的 ¹³ CNMR数据						
样品	化学位移					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A2Nb	101.7	73.4	75.2	78.8	73.0	62.2
AG-I	101.4	73.3	75.1	78.7	73.1	62.3

上述分析结果表明，A2Nb为α构型的葡萄糖，分子量360 000主链由1,4连接的葡萄糖构成的，每25个葡萄糖残基有一个6-O上的分枝。分子中还有少量的端基葡萄糖存在。

以α-D-(1→4)-Glc为主链的黄芪葡聚糖已有报道^[1,2]，但其分子量均在100 000以下，且6-O位分支点的比例与A2Nb不同。药理活性评价表明，A2Nb具有较强的促小鼠脾细胞增殖的作用，其药效作用机制正在进一步的研究中。

参考文献:

[1] 方积年. 黄芪葡聚多糖的化学结构[J]. 化学学报, 1988, 46(11): 1101-1104.

[2] 黄乔书, 吕归宝, 李雅臣, 等. 黄芪多糖的研究[J]. 药学学报, 1982, 17(3): 200-206.
[3] 方圣鼎, 徐小异, 叶纯渠, 等. 中药黄芪有效成分的分析[J]. 有机化学, 1982, (2): 26-31.
[4] 魏运安, 方积年. 高效凝胶色谱法测定多糖纯度及分子量[J]. 药学学报, 1989, 24(7): 532-536.
[5] Jacob L. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldoses and alduronic acids[J]. J Chrom, 1987, 408: 245-253.
[6] 方积年. 多糖的甲基化分析方法[J]. 国外医学药学分册, 1986, 13(4): 222-226.
[7] Narui Takao, Takahashi Kunio, Kobayashi Miyoko, et al. Permethylation of polysaccharides by a modified Hakomori method[J]. Carbohydr Res, 1982, 103(2): 293-295.
[8] 刘方明, 李志孝, 孟廷发, 等. 红芪多糖 RHG的分离纯化与化学结构[J]. 药学学报, 1997, 32(8): 603-606.
[9] Bjørndal H, Hellerqvist C G, Lindberg B, et al. Gas liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharide[J]. Angew Chem (Int Ed), 1970, 9(9): 610-619.
[10] 张维杰. 糖复合物生化技术研究[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.

多歧沙参化学成分的研究

赵奎君¹, 刘锁兰¹, 杨隽¹, 李秀青¹, 颜小林¹, 郑成贵¹, 屠鹏飞², 陈虎彪²
(1. 北京军区医学院药系, 北京 100071; 2. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要: 目的 对多歧沙参 *Adenophora wawreana* 的根进行较系统的化学成分研究。方法 采用系统溶剂分离法和硅胶柱色谱法进行提取分离, 用光谱法 (IR, ¹HNM R, ¹³CNM R, MS等) 进行结构鉴定。结果 从石油醚提取部位分离得到12个化合物, 鉴定了其中9个化合物的结构, 它们分别为十六酸-β-谷甾醇酯 (β-sitosteryl hexadecanoate, I), 十八酸-β-谷甾醇酯 (β-sitosteryl octadecanoate, II), α-香树脂醇乙酸酯 (α-amyrin acetate, III), 羽扇豆烯醇乙酸酯 (lupenol acetate, IV), 羽扇豆烯酮 (lupenone, VI), 木栓酮 (friedelin, VII), β-谷甾醇 (β-sitosterol, IX), 1-羟基β-谷甾醇 (1kshustero1, X) 和胡萝卜苷 (daucosterol, XII)。结论 9个化合物均首次从本植物中分离得到, 其中化合物I、II、III、IV、VII为首次从沙参属植物中分离得到。

关键词: 多歧沙参; 沙参属; 化学成分

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-0964-03

Studies on chemical constituents of *Adenophora wawreana*

ZHAO Kui-jun¹, LIU Suo-lan¹, YANG Jun¹, LI Xiu-qing¹, YAN Xiao-lin¹,
ZHENG Cheng-gui¹, TU Peng-fei², CHEN Hu-biao²

(1. Department of Pharmacy, Beijing Medical College of PLA, Beijing 100071, China; 2. College of Pharmacy, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract **Object** To study systematically on the chemical constituents of the roots of *Adenophora wawreana* Zahibr.. **Methods** The chemical constituents were extracted and isolated systematically with solvents and silica gel chromatography. Their structures were determined on the basis of spectral data (IR, ¹HNM R, ¹³CNM R and MS). **Results** Twelve compounds were obtained, nine of them were identi-

收稿日期: 2000-12-13
基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 No. 9501023
作者简介: 赵奎君 (1959-), 男 (满族), 辽宁省抚顺市人, 副教授, 硕士学位。毕业于中国药科大学生药专业, 现任中国人民解放军北京军区医学院药系副主任, 从事生药学方面研究。Tel (010) 66947773