

· 有效成分 ·

肉苁蓉多糖的分离、纯化和鉴定

曾群力¹, 霍亚楠¹, 毛俊浩², 郑一凡^{1*}

(1. 浙江大学医学院 公共卫生系, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310027)

摘要: 目的 分离、纯化和鉴定壮阳中药肉苁蓉 *Cistanche deserticola* 中的多糖成分。方法 经脱脂、沸水抽提、乙醇沉淀、Sevag法脱蛋白得到的粗多糖, 再经 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析和 Sephacryl S-200 凝胶柱层析得到纯净的肉苁蓉多糖 (CDPS), 用红外光谱和紫外光谱分析鉴定该多糖。结果 红外光谱分析具有典型的多糖特征吸收峰, 紫外光谱分析未见核酸和蛋白质的特征吸收峰。结论 本实验所提取的肉苁蓉多糖为单一、纯净的多糖。

关键词: 肉苁蓉多糖; 柱层析; 光谱分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1057-03

Isolation, purification and identification of polysaccharide of *Cistanche deserticola*

ZENG Qun-li¹, HUO Ya-nan¹, MAO Jun-hao², ZHENG Yi-fan¹

(1. Department of Public Health, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract **Object** The polysaccharide (CDPS) was isolated, purified and identified from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma, a Chinese materia medica. **Methods** The polysaccharide was extracted with hot water and precipitated by alcohol. Protein in the precipitates was removed by Sevag method. The products were further purified with column chromatography on DEAE-Sephadex A-50 and Sephacryl S-200. The CDPS was identified by IR spectrum and UV (200-400 nm) scanning spectrum. **Results** IR spectrum indicates that there are typical characteristic absorption peaks of polysaccharides. UV scanning spectrum shows that there are no absorption peaks of protein and nucleic acid at point 280 nm and 260 nm. **Conclusion** The CDPS was identified as homogeneous one.

Key words polysaccharide of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma (CDPS); column chromatography; spectrum analysis

肉苁蓉别名大云、寸云, 为列当科多年寄生草本植物苁蓉的干燥肉质茎^[1], 是我国稀有的名贵中药材, 具有益精血、补肾助阳、润肠通便、延缓衰老之功能。据报道, 其主要成分为生物碱、有机酸, 并有糖反应^[2]。本实验主要进行了肉苁蓉多糖的提取, 并进一步纯化和鉴定了该多糖。

1 材料和仪器

1.1 材料: 肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma (浙江产) 购自杭州药材公司。

1.2 试剂: DEAE-Sephadex A-50 Sephacryl S-200 为 Pharmacia 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器: 常压低温液相层析系统 (LKB 公司),

UV-120-02 紫外-可见分光光度计 (Shimadzu 公司), IR-470 型红外分光光度计 (Shimadzu 公司), DU-50 型紫外分光光度计 (BECKMAN 公司), 日立 SCR20BC 高速冷冻离心机 (日立公司), NEO-COOL 冷冻干燥仪 (YAMATO 公司), AEG220 型电子天平 (IBROR 公司)。

2 方法与步骤

2.1 肉苁蓉多糖的提取^[3]: 肉苁蓉生药片, 经热乙醇浸泡 3 h 后, 用纱布过滤, 弃滤液。药渣加水煎煮 3 次, 每次 1~2 h, 过滤, 合并滤液 (呈棕红色)。蒸发浓缩后, 离心去沉淀, 上清液加 2~3 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 4℃静置 24 h, 次日, 于 4℃离心 20 min (6 000 r/min), 收集沉淀。沉淀经水复溶、脱蛋白、

* 收稿日期: 2002-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39300174)

作者简介: 曾群力 (1969-), 女, 浙江大学医学院公共卫生系讲师, 硕士, 主要从事多糖与蛋白的研究。

Tel (0571) 87217094 E-mail zengql@cmu.zju.edu.cn or zengqunli@hotmail.com

透析,冷冻干燥后获粗多糖(灰棕红色)。

2.2 标准葡聚糖曲线制作及糖含量制定:按文献方法^[4]制作标准葡聚糖曲线。同法吸取适当浓度样品液 1.0 mL,测吸光度,以标准曲线计算多糖含量。

2.3 几种脱蛋白方法的比较^[3-6]:采用醇或其他溶剂沉淀获得的粗多糖中常含有较多的蛋白质。为使后续的实验能排除蛋白质的干扰,故需要进行脱蛋白。为了寻求脱蛋白的最有效的方法,本实验设计了3种方法进行比较:①单纯的 Sevag法:在样品液中加入等体积的 Sevag液(氯仿:异戊醇为 4:1)混匀后静置几十小时,弃下层有机相(蛋白质与氯仿和异戊醇生成的凝胶物),反复多次。② 4%三氯醋酸+Sevag法:先在样品加入一定体积 4%三氯醋酸,使其终浓度为 4%,混匀后于 4℃冰箱静置过夜。次日离心去沉淀(4℃、6 000 r/min 20 min),上清液再用上述 Sevag法脱蛋白。③中性酶+Sevag法:称取链霉蛋白酶 100 mg溶于 100 mL蒸馏水中,吸取木瓜蛋白酶 100 μL加蒸馏水至 100 mL,两者混合均匀后加入到样品液中,于 37℃保温数小时,再用 Sevag法脱蛋白。

3种方法获得的粗多糖分别取一定量溶于一定体积蒸馏水中,均取 4 mL进行紫外分光光度测定(A_{280} 、 A_{260}),计算溶液中蛋白质浓度及蛋白含量。

2.4 Cl型 DEAE-A-50弱阴离子交换层析:DEAE-Sephadex A-50经 0.5 mol/L NaOH、HCl和双蒸水依次处理至中性,抽气,装柱(2.6 cm×23 cm)。

称取 100 mg肉苁蓉多糖以 10 mL双蒸水溶解后,上样,以 pH 8.0的 PBS、0.1 mol/L NaCl-PBS、0.5 mol/L NaCl-PBS分别洗脱(流速 1 mL/min, 5 mL/管),以苯酚-浓硫酸法测定 A_{490} ,并作洗脱曲线,合并主峰,冻干备用。

2.5 Sephacryl S-200凝胶过滤层析:Sephacryl S-200减压抽气,装柱(1.6 cm×110 cm),以 pH 8.0 PBS平衡柱 48 h。

将 4 mg离子交换中 PBS洗脱组分溶于 10 mL蒸馏水中,上样,以 pH 8.0 PBS洗脱(5 mL/管, 0.5 mL/min),以苯酚-浓硫酸法测 A_{490} ,作洗脱曲线,合并主峰,冻干备用。

2.6 紫外光谱检测:取多糖 1 mg,以蒸馏水溶解,用波长 200~400 nm进行紫外扫描,以蒸馏水为对照。

2.7 红外光谱检测:取干燥多糖 1 mg,与 100 mg干燥 KBr粉末混后在研钵中轻轻研磨至极细,经压机压片后上机测定红外光谱。

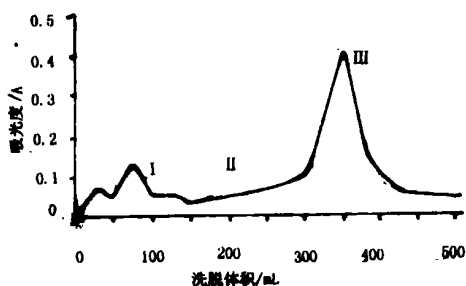
3 结果与讨论

3.1 肉苁蓉多糖的物理性质:肉苁蓉多糖为白色粉末,无味,易溶于水,不溶于有机溶剂,其溶液呈中性。

3.2 糖含量测定:根据实验作出的葡萄糖标准曲线测得多糖的绝对含量为 60%。

3.3 脱蛋白方法比较:实验测得 3种方法脱蛋白后,样品中蛋白质浓度分别为:① 1.1 mg/mL;② 0.98 mg/mL;③ 0.6 mg/mL。即蛋白质的含量为:① 40%、② 30%、③ 20%左右。同时测得样品中的多糖含量分别为① 60%、② 62%、③ 75%。从上述结果可见,以中性酶+Sevag法最好,这是由于中性酶(如链霉蛋白酶)可切断蛋白链,使与多糖结合的蛋白脱下来,再用 Sevag法将蛋白去掉。方法①、②差别不太,因为无论是三氯醋酸,还是 Sevag剂都是与游离蛋白结合,将其沉淀或萃取,对结合蛋白无作用。故实验中应考虑将几种方法结合应用。

3.4 Cl型 DEAE-A-50弱阴离子交换层析:多糖分子由于其糖基组成一般为中性或酸性带负电荷的糖分子,故考虑采用阴离子交换层析。由洗脱曲线(图 1)可知,多糖主要集中在 pH 8.0 PBS和 0.5 mol/L NaCl-PBS两个洗脱组份上。



I 为 pH 8.0 PBS洗脱;II 为 0.1 mol/L NaCl-PBS洗脱;
III 为 0.5 mol/L NaCl-PBS洗脱

图 1 DEAE-Sephadex A-50阴离子交换层析图谱

3.5 Sephacryl S-200凝胶过滤层析:我们因下一步实验的需要,选用第一个洗脱组份,进行分子筛 Sephacryl S-200纯化。从洗脱曲线可知,洗脱主峰为对称峰,已是单一组份。

3.6 紫外光谱检测:CDPS的 200~400 nm紫外扫描图谱显示为末端吸收,280、260 nm处无吸收,表明多糖中无蛋白、多肽及核酸。

3.7 红外光谱检测:红外光谱表明 CDPS具有典型的多糖特征吸收峰:3 425, 2 915, 1 635, 1 291, 1 081, 536 cm^{-1} 。

参考文献:

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(上)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1975.
- [2] 金秀莲,张庆荣. 肉苁蓉化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(11): 695-697.

- [3] 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]. 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
- [4] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.

- [5] 周慧萍, 朱海燕, 陈琼华. 苣荬多糖的分离、纯化和分析 [J]. 生物化学杂志, 1995, 11(1): 91-94.
- [6] 张冀伸. 有关糖复合物的分级纯化、结构确定、生物活性的几个问题 [J]. 生命的化学, 1994, 14(6): 42-44.

大蒜有机硫化物的研究 (II)

陆茂松¹, 闵吉梅^{2*}, 王 夔^{2*}

(1. 启东市药品检验所, 江苏 启东 226200 2. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要: 目的 对大蒜的有机硫化物进行了研究. 方法 利用硅胶柱层析、硅胶薄层层析、高效液相进行分离, 根据化合物的光谱数据鉴定其结构. 结果 从大蒜乙醚和环己烷提取物中分得 2 个化合物和 1 组混合物, 分别鉴定为: *E*-丙烯醛基烯丙基二硫化物 (I), 3-乙烯基-4H-1, 2-二硫杂苯-1-氧化物 (II), (*E/Z*)-1-丙烯基烯丙基硫代亚磺酸酯 (III). 结论 化合物 I 和 II 为新化合物.

关键词: 大蒜; 有机硫化物; *E*-丙烯醛基烯丙基二硫化物; 3-乙烯基-4H-1, 2-二硫杂苯-1-氧化物
中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1059-03

Studies on organosulfur compounds of *Allium sativum* II

LU Mao-song¹, MIN Ji-mei², WANG Kui²

(1. Qidong Institute for Drug Control, Qidong 226200, China; 2. National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract **Object** To study the organosulfur compounds of *Allium sativum* L. **Methods** Compounds were separated by silica gel column and TLC, HPLC. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis. **Results** One disulfide, 3-allyldisulfanyl-propenal (I) and one dithiin, 3-vinyl-3, 4-dihydro-[1, 2] dithiin-1-oxide (II) and one thiosulfinate, (*E/Z*)-1-propenyl allyl thiosulfinate (III) were identified. **Conclusion** Compounds I and II are new.

Key words *Allium sativum* L.; organosulfur compounds; 3-allyldisulfanyl-propenal; 3-vinyl-3, 4-dihydro-[1, 2] dithiin-1-oxide

大蒜为百合科植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎, 是一种常用民间草药, 现代研究表明大蒜具有杀菌、抗病毒、抗肿瘤、调血脂等多种药理活性^[1~4]. 大蒜破碎后所生成的大蒜素 (allicin) 是大蒜药理活性的化学基础, 但大蒜素在室温下不稳定, 易转化为阿霍烯类 (ajoenes)、乙烯基二硫杂苯类 (vinyl dithiins) 和硫醚类 (sulfides) 等有机硫化物^[3~5]. 前文我们曾报道从大蒜环己烷提取物中得到了阿霍烯类及乙烯基二硫杂苯类等 9 个有机硫化物^[6], 现又从大蒜乙醚和环己烷提取物中分得了 2 个新的有机硫化物和 1 组混合物, 根据波谱数据分析确定了它们的结构.

化合物 I: 无色油状液体 EI-MS 给出分子离

子峰为 160 [M]⁺, 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 推出分子式为 C₆H₈S₂O. IR 光谱中 1 667 cm⁻¹ 吸收峰表明分子中存在羰基, 1 118 cm⁻¹ 吸收峰表明分子中存在二硫键, 2 918, 1 558, 943 cm⁻¹ 吸收峰表明分子中存在端乙烯基. ¹H NMR 显示 1 个醛质子信号, δ 9.54 (1H, d, J = 7.5 Hz), 结合 ¹³C NMR 中羰基碳信号 δ 189.33, 推断该化合物存在醛基. ¹H NMR 谱表明化合物 I 中有 1 个烯丙基 [δ 3.40 (2H, d, J = 7.2 Hz); 5.82 (1H, d, d, t, J = 14.7, 10.8, 7.2 Hz); 5.19 (1H, d, J = 10.8 Hz); 5.20 (1H, d, J = 14.7 Hz)], 1 个双键 [δ 6.59 (1H, d, d, J = 15.6, 7.5 Hz); 7.52 (1H, d, J = 15.6 Hz, E-CH=CH)] 从其偶合情况及偶合常数看, δ 6.59 应为 2 位质子信号, 其发

* 收稿日期: 2002-04-29

基金项目: 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室客座研究资助项目

* 通讯作者