

- paeoniflorin and related compound by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, (33): 3838-3842.
- [7] Wang Y, Liu T H, Wang W, *et al*. Research on the transformation of ginsenoside Rg₁ by intestinal flora [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(3): 188-190.
- [8] Zhao J, Yang X W. Studies on the chemical constituents of Japanese Buckeye seed (*Aesculus turbinata*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 327-331.
- [9] Yang L, Zhao X A. Studies on triterpenoid saponins from seeds of *Aesculus wilsonii* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(10): 617-618.
- [10] Kyoichi K, Teruaki A. Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides [J]. *Bioscience Microflora*, 1997, 16(1): 1-3.

碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究

李 平, 王艳辉, 马润宇*

(北京化工大学 可控化学反应科学与技术基础教育部重点实验室, 北京 100029)

摘要: 目的 研究碱提山茱萸多糖的单糖组成及抗氧化活性。方法 经热水抽提后的山茱萸残渣用碱提取, 盐酸中和、浓缩、透析、乙醇沉淀、DEAE纤维素柱色谱分离, 再通过 Sephadex G-200柱色谱进一步纯化, 得到白色粉末状多糖 PFCCI。结果 该多糖经过完全酸水解、薄层色谱、红外光谱分析, 证明 PFCCI 由木糖和葡萄糖以 18.8 : 81.2 摩尔比组成, 平均相对分子质量为 7.57×10^4 。以羟基自由基 ($^{\circ}\text{OH}$) 清除剂苯甲酸和甘露醇为对照, 用 Fenton 反应检测 PFCCI 对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除作用, 三者对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除率达 50% 所需浓度为 18, 330, 80 $\mu\text{g/mL}$ 。PFCCI 可以有效抑制猪油和芝麻油的氧化, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率达 50% 所需浓度为 35.0 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 该多糖为首次提取制得, 具有良好的抗油脂氧化及清除自由基能力。

关键词: 山茱萸; 多糖; 理化性质; 抗氧化

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-0973-04

Study on physiochemical characteristic and antioxidation activity of polysaccharide extracted with sodium hydroxide from fruit of *Cornus officinalis*

LI Ping, WANG Yan-hui, MA Run-yu

(Key Laboratory of Science and Technology of Controllable Chemical Reactions, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract **Object** To study the chemical composition and antioxidation activity of polysaccharide from the fruit of *Cornus officinalis* Zieb. et Zucc. **Methods** The polysaccharide PFCCI was isolated from *C. officinalis* through NaOH extraction, neutral reaction, ethanol precipitation and DEAE-cellulose column chromatography. It was further purified by Sephadex G-200 column chromatography. **Results** The molecular weight of PFCCI was 7.57×10^4 . Monosaccharide composition analysis by TLC and HPLC showed that it was composed of xylose and glucose in a molar ratio of 18.8 : 81.2. PFCCI had strong activities of oxidation resistance to axunge and gingili. It also had an action to scavenging hydroxyl free radical ($^{\circ}\text{OH}$) generated by Fenton reaction and superoxide anion free radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generated by pyrogallol autoxidation system. The scavenging activity to $^{\circ}\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ was represented by the content scavenging 50% of all radicals or anion (E_{50}), which were 80 $\mu\text{g/mL}$ and 35.0 $\mu\text{g/mL}$ respectively. **Conclusion** This polysaccharide is isolated from *C. officinalis* for the first time, which could resist oxidation of axunge and gingili and scavenge free radical effectively.

Key words *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; polysaccharide; physiochemical characteristic; antioxidation

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 性平、味酸,

* 收稿日期: 2003-01-07

作者简介: 李 平 (1973-), 女, 山东济南人, 博士研究生, 研究方向为生化分离与制药工程

Tel (010) 64433790 E-mail lpxa@163.com

* 通讯作者 Tel (010) 64433790 Fax: (010) 64423610 E-mail r_ma@mail.buct.edu.cn

入肝、肾经,具有补肝肾、涩精气、固虚脱的功效^[1]。山茱萸具有增强免疫系统功能、抗休克、降血糖、抗癌、抗炎抑菌、利尿降压、抗氧化等作用^[2]。山茱萸除被用于医药外,还用于制作保健食品、果酱、酒及饮料^[3]。近年来关于山茱萸化学成分的研究报道较多,但有关山茱萸多糖的研究报道较少。本实验以四川产山茱萸为原材料,对山茱萸水提取后的残渣用碱提取,研究了碱提山茱萸多糖的理化特性和抗氧化活性。

1 仪器、材料与试剂

722型可见光栅分光光度计(北京光学仪器厂);Cintra 20紫外-可见扫描仪(GBC-Aus);FT-IR 170 SX红外光谱仪(Nicolet, US);山茱萸购自四川省绵阳市圣科天然药物研究所;DEAE-52(Whatman公司);Sephadex G-200(Piscataway公司);葡萄糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、半乳糖(生化试剂, Sigma公司);番红(生化试剂, Sigma公司);其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 多糖的提取、分离和纯化:将已干燥的山茱萸粉碎,依次过40目、40~60目和60~80目筛。将筛分后的山茱萸分别用8~10倍体积的95%乙醇回流8 h脱脂,降至室温,滤过,滤渣晾干即为多糖提取的原料。预处理后的原料先用水提取制备水提多糖,滤过,残渣晾干后用4倍体积2.5 mol/L NaOH 4℃提取4 h,重复提取两次。滤过,合并滤液,用2 mol/L HCl中和滤液至中性,减压浓缩,浓缩液经过醇沉、洗涤、真空干燥,得褐色山茱萸碱提粗多糖(PFCC)。

取少量PFCC溶于水,离心,上清液上DEAE-cellulose柱(2.6 cm×100 cm),依次以0.0.1,0.3,0.5,1.0,2.0 mol/L NaCl溶液洗脱,流速为1 mL/min。苯酚硫酸法跟踪检测,分部收集各高峰部分的洗脱液,洗脱液经过减压浓缩、透析、醇沉、洗涤、真空干燥,得白色山茱萸多糖。将此多糖继续以Sephadex G-200柱(1.5 cm×70 cm)纯化后得到白色山茱萸多糖(PFCCI)。

2.2 糖含量测定:苯酚硫酸法测定糖含量,以葡萄糖为对照品,校正系数取为0.9^[4]。

2.3 纯度及相对分子质量测定:将PFCCI纯品溶于0.2 mol/L NaCl溶液,上Sephadex G-200柱(1.5 cm×70 cm),0.2 mol/L NaCl溶液洗脱,苯酚硫酸法跟踪检测,绘制洗脱曲线。将5 mg Dextran T-2000溶于0.2 mol/L NaCl溶液并定容至

5 mL,上Sephadex G-200柱(1.5 cm×70 cm),0.2 mol/L NaCl溶液洗脱,洗脱体积为 V_e ;将Dextran T-500, T-70, T-40, T-10, PFCCI以同样的方法上Sephadex G-200柱,得到的洗脱体积分别为 V_i 。根据方程 $V_i/V_e = K(1 + K_0 \cdot 1/M_w)$ 及各标准Dextran T的相对分子质量计算PFCCI的相对分子质量。

2.4 单糖组成分析:精确称取多糖样品20 mg,加入2 mol/L H₂SO₄ 2 mL, 110℃水解8 h,用BaCO₃中和水解液,离心,上清液浓缩至20 mg/mL,备用。用硅胶板对水解浓缩液进行薄层色谱分析,点样量为5 μL,展开剂为醋酸乙酯-吡啶-冰醋酸-水(5:5:1:3),苯胺-邻苯二甲酸显色。HPLC分析:色谱柱:ZORBAX NH₂ Analytical column (5 μm, 4.6 mm×150 mm),数据处理采用面积归一法,单糖对照品溶液浓度1 mg/mL,水解样浓度为20 mg/mL,进样量为5 μL,流动相为水-乙腈(22:78),流速为1 mL/min,柱温为25℃。

2.5 油脂过氧化值测定:采用强化实验法进行PFCCI对油脂的抗氧化性能研究。将样品置于65℃的恒温烘箱中,每隔一定时间取样检测其过氧化值(POV)。POV测定方法按GB5009.37-85标准执行。

2.6 清除·OH实验方法^[5]:·OH由EDTANa₂-Fe(II)-H₂O₂体系产生,由于·OH可特异地使番红褪色,根据褪色程度用比色法来衡量·OH的含量。反应体系中加入pH7.4的磷酸缓冲液1.0 mL,番红溶液(520 μg/mL)0.2 mL, EDTANa₂-Fe(II)1.0 mL,再加入不同浓度的样品溶液7.0 mL,最后加入6% H₂O₂ 0.8 mL,混合均匀后于40℃水浴保温30 min,在520 nm波长处测吸光度(A)值。空白组以等体积的重蒸水代替样品溶液;对照组以等体积的重蒸水代替样品溶液和EDTANa₂-Fe(II)溶液。实验结果以清除率E表示: $E = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) \times 100 / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$, E_{50} 表示清除率为50%时的样品浓度。

2.7 清除O₂⁻实验方法^[6]:先测定邻苯三酚自氧化吸收光谱,确定自氧化速率最大值及最大吸收波长。在此条件下测定加入样品后反应系统的吸收光谱。各系统自氧化的速率为S, $S = \Delta A / \Delta t$,清除率 $E = (S_{\text{对照}} - S_{\text{样品}}) \times 100 / S_{\text{对照}}$ 。

3 结果与讨论

3.1 分离纯化与组成分析:粗多糖PFCC用DEAE-cellulose柱进行分离,用0~2 mol/L NaCl溶液洗脱得到3种不同的组份,将主要组份经过Sephadex G-200纯化后得到PFCCI。

PFCCI经过Sephadex G-200柱的洗脱曲线

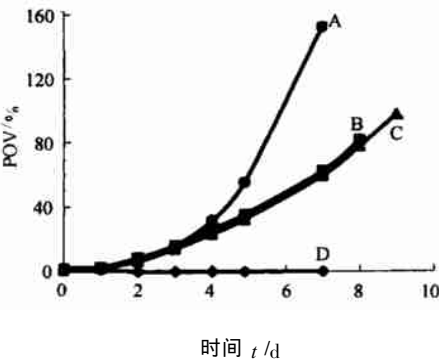
为单一对称峰,可知 PFCCI 为相对分子质量均一的纯品。经凝胶渗透色谱分析,可知 PFCCI 的重均相对分子质量为 7.57×10^4 。

将 PFCCI 水溶液在 200~ 400 nm 波长进行紫外光谱扫描,在 260 nm 和 280 nm 处未见吸收峰,表明 PFCCI 中不含核酸和蛋白质。PFCCI 完全酸水解后用 TLC 和 HPLC 分析其单糖组成。薄层色谱图中出现木糖和葡萄糖的斑点, HPLC 色谱图中出现与木糖 (3.17 min) 和葡萄糖 (3.90 min) 保留时间相同的特征峰,二者的摩尔比为 18.8:81.2。

红外光谱检测结果表明: PFCCI 在 3 408 (O-H 伸缩振动)、2 887 (C-H 伸缩振动)、1 642 (C=O 伸缩振动)、1 371, 1 424 (C-H 变角振动) 及 1 022, 1 150 cm^{-1} (C-O 伸缩振动) 处有多糖的特征吸收峰。其中 1 022, 1 150 cm^{-1} 的吸收峰提示葡萄糖残基为吡喃型, 890 cm^{-1} 处的吸收峰为 β -端基差向异构的 C-H 变角振动。

3.2 抗氧化性能研究

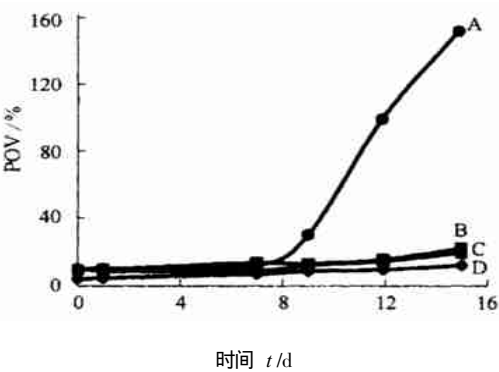
3.2.1 油脂的抗氧化性能: 实验以抗氧化剂 VC 及 TBHQ 作为对比组, 不加任何抗氧化剂的油脂作对照组, 研究了 PFCCI 对新鲜猪油和芝麻油的抗氧化性能, 实验结果见图 1 图 2。由图 1, 2 可知, 在几种抗氧化剂对新鲜猪油的抗氧化实验中, TBHQ 的抗氧化能力最高, PFCCI 的抗氧化能力与 VC 相近; 在对新鲜芝麻油的抗氧化实验中, PFCCI 与 TBHQ 及 VC 的抗氧化能力接近, 说明 PFCCI 可以有效抑制植物油氧化。



A 空白 (control) B-PFCCI C-VC D-TBHQ
图 1 不同抗氧化剂对猪油的抗氧化作用

Fig. 1 Antioxidation to axunge by different antioxidants

3.2.2 清除自由基: 实验研究了 PFCCI 对油脂的抗氧化性能后, 又进行了多糖清除自由基实验。以甘露醇和苯甲酸作对比, 研究了 PFCCI 清除羟基自由基能力, 实验结果见表 1。由表 1 可知, 苯甲酸清



A 空白 (control) B-PFCCI C-VC D-TBHQ
图 2 不同抗氧化剂对芝麻油的抗氧化作用

Fig. 1 Antioxidation to gingili by different antioxidants

除羟基自由基的能力最强, PFCCI 清除羟基自由基的能力比苯甲酸稍弱, 比甘露醇强, 三者达 50% 清除率所需浓度 (EC_{50}) 分别为 18, 80, 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

以 VC 作对比研究了 PFCCI 清除活性氧自由基的能力, 实验结果见表 2。由表 2 可知, PFCCI 有一定的清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力, 但其清除能力比 VC 稍弱, 二者达 50% 清除率时所需浓度分别为 35.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 22.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 不同抗氧化剂对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Table 1 Scavenging effect to $\cdot\text{OH}$ by different antioxidants			
抗氧化剂	浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	E/%	$EC_{50} /(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
甘露醇	200	43.3	330
	300	46.9	
	400	55.1	
	500	64.0	
	600	66.9	
	700	76.0	
苯甲酸	12.5	43.1	18.0
	25.0	58.3	
	50.0	68.6	
	75.0	82.3	
PFCCI	12.5	23.0	80
	25	26.7	
	50	38.0	
	75	48.0	
	100	60.1	
	12.5	71.9	

表 2 不同抗氧化剂对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

Table 2 Scavenging effect to $O_2^{\cdot-}$ by different antioxidants			
抗氧化剂	浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	E/%	$EC_{50} /(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
VC	20	43.7	22.7
	30	67.1	
	50	82.1	
	60	82.6	
PFCCI	25	38.1	35.0
	50	68.0	

4 结论

研究表明,碱提山茱萸多糖 PFCCI 是由木糖和葡萄糖以 18.8: 81.2 的摩尔比聚合而成的杂多糖,其水溶性较好。对油脂抗氧化性能实验表明,该多糖具有较好的抗氧化能力,是一种较好的天然抗氧化剂:对猪油的抗氧化能力接近于 VC,稍弱于 TBHQ;对植物油的抗氧化能力与 VC 及 TBHQ 接近。以 $^{\circ}\text{OH}$ 清除剂苯甲酸和甘露醇为对照,用 Fenton 反应检测 PFCCI 对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除作用,三者对 $^{\circ}\text{OH}$ 的清除率达 50% 所需浓度为 18,330, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明该多糖对 Fenton 体系产生的羟基自由基有较强的清除作用;PFCCI 对邻苯三酚体系产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有一定的清除作用,但清除率低于相同条件下 VC 对超氧阴离子自由基的清除率,二者达 50% 清除率所需浓度分别为 35.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 22.7 $\mu\text{g}/$

mL

References

- [1] Pan Y, Wang T S. Review of research on constituents of *Fructus Corni* [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(1): 61-62.
- [2] Wang Y M, Yang Y, Liu C P. Clinical application and pharmacological action of *Fructus Corni* [J]. *Henan J Tradit Chin Med* (河南中医杂志), 1999, 14(1): 61-62.
- [3] Zhu M Y, Huang Z M, Yang T B, et al. Development on healthcare beverage of *fructus Corni* [J]. *J Zhengzhou Institute Light Ind* (郑州轻工学院学报), 1998, 13(2): 66-70.
- [4] Dong Q, Zheng L Y, Fang J N. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31(9): 550-553.
- [5] Qin D A, Su D, Wang X L. Scavenging action to hydroxyl free radical of hesperidin [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 3(1): 396-398.
- [6] Ren D, Wang Y F, Yao Y X, et al. Influence of *Aloe* on superoxide anion chain reaction [J]. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 1999, 9(6): 22-24.

长柄梭罗细胞毒活性部位的化学成分研究

朱 慧¹, 屠鹏飞^{1*}, 陈 琪², 徐安龙^{2*}

(1. 北京大学药学院中医药现代研究中心, 北京 100083; 2. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要:目的 对长柄梭罗 *Reevesia longipetiolata* 树皮具细胞毒活性的醋酸乙酯部分化学成分进行研究。方法 采用常压、加压硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相色谱进行分离和纯化,通过理化和波谱分析方法鉴定化合物结构。结果 从其醋酸乙酯部分分离得到 5 个化合物,分别鉴定为 β -谷甾醇(β -sitosterol, I)、胡萝卜苷(daucosterol, II)、白桦脂酸(betulinic acid, III)、羽扇豆醇(lupeol, IV)和(+)-儿茶素[(+)-catechin, V]。结论 5 个化合物均为首次从该属植物中分得,并分别讨论了它们的细胞毒活性。

关键词:长柄梭罗;细胞毒;化学成分

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0976-03

Studies on chemical constituents of cytotoxicity portion in bark of *Reevesia longipetiolata*

ZHU Hui¹, TU Peng-fei¹, CHEN Qi², XU An-long²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Modern Research Center of TCM, Peking University, Beijing 100083, China;

2. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract **Object** To study the chemical constituents of cytotoxicity portion in the bark of *Reevesia longipetiolata* Merr. et Chun. **Methods** The constituents were isolated and purified by various chromatographic methods, such as gel column chromatography under normal pressure and increased pressure, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC, and the structures were identified by physicochemical properties and spectral analysis. **Results** Five compounds were obtained in the ethyl acetate fractions and identified as β -sitosterol (I), daucosterol (II), betulinic acid (III), lupeol (IV) and (+)-catechin (V). **Conclusion** All above compounds are obtained from the plants of *Reevesia* Lindl. for the first time, and their cytotoxicity is discussed.

Key words *Reevesia longipetiolata* Merr. et Chun; cytotoxicity; chemical constituent

* 收稿日期: 2002-10-24

* 通讯作者 Tel (010) 82802750 E-mail pengfeitu@bim.u.edu.cn