

- acaulis* [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25 (6): 1411-1431.
- [6] Borghi D, Baumer L, Ballabio M, et al. Structure elucidation of helioscopinolides D and E from *Euphorbia calyptrata* cell cultures [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(6): 1503-1508.
- [7] Jia Z, Ding Y L. New diterpenoids from *Euphorbia sieboldiana* [J]. *Planta Med*, 1991, 57, 569-571.
- [8] Lal A R, Cambie R C, Rutledge P S, et al. Ent-atisane diterpenes from *Euphorbia fidjiana* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(6): 1925-1935.
- [9] Appendino G, Belloro E, Tron G C, et al. Polycyclic from *Euphorbia characias* [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71 (2): 134-142.

## 两种毛大丁草多糖 Gbp 和 Gcp 的组成研究

余志刚<sup>1</sup>, 唐小江<sup>2</sup>, 郭志勇<sup>1</sup>, 陈东淼<sup>1</sup>, 林永成<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2. 广东省职业病防治院 毒理科, 广东 广州 510300)

**摘要:** 目的 从毛大丁草的根中分离提取多糖, 测定其组成。方法 毛大丁草根的水提取物经脱蛋白、脱色、乙醇沉淀得两种粗多糖, 再经过 Sephadex G-75 和 Sephadex G-50 凝胶柱色谱纯化得到两种纯多糖 Gbp 和 Gcp, 用高效凝胶色谱 (HPGPC) 测定 Gbp 和 Gcp 相对分子质量, 通过完全酸水解后, 进行三甲基硅醚化的 GC-MS 分析, 测定两种多糖的组成。结果 Gbp 和 Gcp 重均相对分子质量分别为  $6.65 \times 10^5$  和  $7.45 \times 10^4$ 。Gbp 是由木糖、来苏糖、鼠李糖、核糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其比例约为 3 : 3 : 3 : 2 : 6 : 2; Gcp 主要由果糖组成, 还有少量葡萄糖和木糖, 其比例为 24 : 4 : 1。结论 通过凝胶柱色谱分析, 所提取两种多糖 Gbp 和 Gcp 均为单一、纯净的多糖。

**关键词:** 毛大丁草; 多糖; 三甲基硅醚化反应

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)06-0614-03

### Study on composition of two polysaccharides Gbp and Gcp from root of *Gerbera piloselloides*

SHE Zhi-gang<sup>1</sup>, TANG Xiao-jiang<sup>2</sup>, GUO Zhi-yong<sup>1</sup>, CHEN Dong-miao<sup>1</sup>, LIN Yong-cheng<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Toxicology, Guangdong Provincial Center for Occupational Disease Prevention and Treatment, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** **Object** To study the composition of two polysaccharides Gbp and Gcp which were isolated and purified from *Gerbera piloselloides* (L.) Cass. **Methods** The polysaccharides were 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 Sephadex-75 and Sephadex-50. The molecular weights of Gbp and Gcp were measured by HPGPC. Their compositions were studied by using GC-MS after acid hydrolysis and trimethylsilylation. **Results** The weight-average molecular weights of Gbp and Gcp are  $6.65 \times 10^5$  and  $7.45 \times 10^4$  respectively (with polyoxyethylene glycol as a reference). Gbp is consisted of xylose, xyllose, robitose, glucose, and galactose, the rate is 3 : 3 : 3 : 2 : 6 : 2. Gcp is composed of fructose, glucose, and xylose (24 : 4 : 1). **Conclusion** Gbp and Gcp are shown to be homogeneous by gel permeation chromatography.

**Key words:** *Gerbera piloselloides* (L.) Cass.; polysaccharide; trimethylsilylation

多糖是一类重要的生命大分子物质, 在生物体内有重要的生物功能和良好的生物活性, 在生命科学和医药科学中有广泛的应用, 因而多糖成为具有吸引力的研究领域<sup>[1]</sup>。我们从鲍鱼和海洋微生物的

菌体中分离出多种有生物活性的多糖, 并对其组成、结构和药理活性进行了研究<sup>[2,3]</sup>。近来又从中药毛大丁草的根部分离出两种多糖 Gbp 和 Gcp, 药理实验显示这两种多糖是良好的免疫调节作用。毛大丁草

\* 收稿日期: 2003-10-19

基金项目: 广东省中医药局科研资助项目 (101028)

\* 通讯作者 E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

*Gerbera piloselloides* (L.) Cass. 是一种传统的中药,具有清热解毒,理气和中的功效,临床常用作镇咳、祛痰、平喘<sup>[4]</sup>。我们对毛大丁草的化学成分及药理活性进行了研究,其脂溶性成分及药理活性另文报道,本文将报道两种多糖的分离纯化方法及组成分析结果。

## 1 实验部分

1.1 仪器和试剂:美国 Finnigan 公司 Vayager GC-M S 气相色谱质谱联用仪, Waters- 991- GPC 高效凝胶色谱仪,上海沪西分析仪器厂 HL- 2 恒流泵,上海青浦沪西仪器厂 BXZ- 100 自动部分收集仪。毛大丁草采自罗霄山脉禾山段,经中山大学生命科学院植物系张宏达教授鉴定;氯化三甲基硅烷六甲基二硅烷, Merck 公司产品; Sephadex G50, G75, Sigma 公司产品,其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 提取和分离:将毛大丁草去叶和茎,根部粉碎,用水提取,减压浓缩,用 3 倍体积 95% 乙醇沉淀,4

放置过夜,离心,将沉淀加水溶解,多次用 Sevag 法除蛋白后,调 pH 9~ 10,加 1/10 倍 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,脱色,用自来水透析,浓缩,加 1 倍乙醇沉淀,4 放置过夜,离心,分别用乙醇、丙酮和乙醚洗涤沉淀,真空干燥,得粗毛大丁草多糖 G<sub>b</sub>;其上清液加乙醇至 75% (体积比),冷置过夜,离心,脱水,干燥得另一种多糖粗品 G<sub>c</sub>。

1.3 两种毛大丁草多糖的纯化:取 G<sub>b</sub> 和 G<sub>c</sub> 各 50 mg,分别溶于适量的水,过 Sephadex 凝胶柱,G<sub>b</sub> 进行 Sephadex G75 柱色谱,G<sub>c</sub> 用 Sephadex G50 进行柱色谱,用恒流泵调节流速,自动部分收集仪收集,20 min 一管,5 mL/管,硫酸苯酚法检验,收集单一峰部分,冷冻干燥得两种纯多糖 G<sub>bp</sub> 和 G<sub>cp</sub>。

1.4 相对分子质量测定:选用 Waters Ultrahydro-gel 250 凝胶柱,配制样品浓度 0.1%,用 0.1 mol/L NaCl 作洗脱剂,恒流速度 1.0 mL/min,进样量:10.0 μL, Waters 410 示差检测。进行 GPC 分析。

1.5 多糖的酸水解:分别取两种多糖 G<sub>bp</sub> 和 G<sub>cp</sub> 各 10 mg 加入 2 mol/L 三氟乙酸 5 mL,封管,120 反应 6 h,反应结束,用氮气流吹干,用 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 干燥。

1.6 三甲基硅醚衍生化:将已知单糖和干燥的多糖酸水解产物,分别注入 1 mL 无水吡啶,待完全溶解后,再注入 0.4 mL 六甲基二硅氮烷和 0.2 mL 氯化三甲基硅烷,摇匀,室温放置 0.5 h,加水后,用氯仿萃取,蒸去大部分氯仿后,用作 GC-M S 分析。

1.7 三甲基硅醚衍生物的 GC-M S 分析:分别取三甲基硅醚衍生物的上清液 1~ 5 μL 进样,GC 条件:

SE-54 石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm),进样口温度 270 ,程序升温 150 ,保持 1 min,以 10 /min 升温至 230 ,保持 4 min。MS 条件:接口 230 ,离子源 E<sup>+</sup>, Energer: 70 eV, 检测器电压: 280 eV, 质谱扫描 43.00~ 650.00。进行 GC-M S 分析。

## 2 结果与讨论

2.1 多糖的分离提取:毛大丁草的水提取物中,除多糖外,还含有蛋白质、肽、多酚类物质、苷类及小分子水溶性物质(氨基酸、单糖等),溶液呈红棕色,经脱蛋白、脱色、水透析、乙醇分级沉淀后可以除去这些杂质。用 Sevag 法除蛋白时,要经过多次才能除尽。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱色须在碱性条件进行,在此条件下,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不易分解,且有较强的氧化能力,还可以防止多糖的降解(酸性条件下,多糖易水解),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 把多酚类有色物氧化成无色的酸性化合物时,溶液的 pH 值会降低,因此,每隔一段时间,须用碱调溶液的酸碱性。

2.2 多糖的纯化及相对分子质量测定:多糖的纯化是测定多糖组成和结构的关键。我们采用不同型号的葡聚糖凝胶对用乙醇粗分的两种多糖 G<sub>b</sub> 和 G<sub>c</sub> 进行纯化,用 Sephadex G75 纯化 50% 乙醇沉淀 G<sub>b</sub> 得 G<sub>bp</sub>, G<sub>bp</sub> 的水溶性较差;用 Sephadex G50 纯化 75% 乙醇沉淀 G<sub>c</sub> 得 G<sub>cp</sub>, G<sub>cp</sub> 在水中有较好的溶解性。以聚乙二醇为标准,通过高效凝胶色谱 (HPGPC) 测定相对分子质量, G<sub>bp</sub> 的重均相对分子质量  $M_w = 6.65 \times 10^5$ , 离散度  $D = 1.44$ ; G<sub>cp</sub> 的  $M_w = 7.45 \times 10^4$ ,  $D = 1.21$ 。

2.3 多糖的组成测定:多糖的完全酸水解时,过去常使用不同浓度的盐酸、硫酸等,文献报道<sup>[5]</sup>这些酸能使水解后的单糖发生部分降解,目前多使用三氟乙酸,该方法能减少对单糖的降解,而且反应完后,多余的三氟乙酸易除去,用氮气吹干即可。

单糖组成的测定有多种方法,三甲基硅醚化是最简单的测定单糖的组成方法之一,该方法操作简便,衍生物易于气化,但是每种糖会出现多峰现象,这是由于单糖三甲基硅醚衍生物的异构体造成的,这种多峰现象并不影响单糖组成确定。两种多糖完全酸水解后的三甲基硅醚衍生物进行 GC-M S 分析,用已知单糖作标准,GC-M S 分析结果见表 1。从表中可以看出,每种单糖有 1~ 5 个峰,除 α-、β-吡喃型、呋喃型外,还有链状结构的衍生物。分析结果表明 G<sub>bp</sub> 是由木糖、来苏糖、鼠李糖、核糖、葡萄糖和半乳糖组成,其比例约为 3 3 3 2 6 2; G<sub>cp</sub> 主要由果糖组成,还有少量葡萄糖和木糖,其比例为 24 4 1。

表 1 Gbp 和 Gcp 完全酸水解后三甲基硅醚  
衍生物的 GC-MS 分析结果

Table 1 GC-MS results of trimethylsilyl ether derivatives  
of acid hydrolysis for Gbp and Gcp

多糖	保留时间/min	单糖	峰面积/%
Gbp	5.29	木糖	16.32
	7.59	木糖	
	9.34	木糖	
	9.78	木糖	
	5.73	来苏糖	13.47
	6.77	来苏糖	
	10.03	来苏糖	
	11.38	来苏糖	
	5.45	鼠李糖	15.69
	7.88	鼠李糖	
	8.28	鼠李糖	
	5.63	核糖	
	8.53	核糖	11.61
	10.51	核糖	
	10.84	核糖	
	8.42	葡萄糖	
9.18	葡萄糖	32.49	
10.33	葡萄糖		
9.94	半乳糖		
Gcp	6.18		果糖
	6.23	果糖	
	6.27	果糖	
	6.42	果糖	
	6.68	木糖	3.34
	6.77	木糖	
	7.03	木糖	
	7.11	葡萄糖	
7.83	葡萄糖	14.53	

从 GC-MS 分析结果看,在相同水溶液中,用不同浓度的乙醇分级沉淀,经纯化得到的两种多糖 Gbp 和 Gcp, 不仅只是相对分子质量和溶解度的差别,它们的组成完全不同,Gbp 中戊糖约占 58%, 而 Gcp 主要以己酮糖-果糖为主。

#### References:

- [1] Hurtley S, Service R, Szurumi P. Cinderella's coach is ready [J]. *Science*, 2001, 291: 2373-2376.
- [2] She Z G, Hu G P, Wu Y W, et al. Study on the methanolysis of the sulphated polysaccharide Hal-A from *Halimolobos diversicolor* Reeve [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2002, 2(5): 367-370.
- [3] She Z G, Hu G P, Wu Y W, et al. The study on the methanolysis of the polysaccharide from the marine mangrove fungus (strain # 1356) from the South China Sea [J]. *J Sun Yat-sen Univ - Nat Sci (中山大学学报·自然科学版)*, 2001, 40(6): 123-124.
- [4] Tang X J, Zhang R, Huang H R, et al. Analysis and comparison of the essential oil from the leaves, caudexes and roots of *Gerbera piloselloides* (L.) Cass [J]. *J Sun Yat-sen Univ - Nat Sci (中山大学学报·自然科学版)*, 2003, 42(2): 124-125.
- [5] Zanetta J P, Timmman P, Leroy Y. Determination of constituents of sulphated proteoglycan during a methanolysis procedure and gas chromatography/mass spectrometry of heptafluoroborate derivatives [J]. *Glycoconjugate J*, 1999, 16: 617.

## 川明参须根中的化学成分

李帮经, 彭树林, 梁 健, 丁立生\*

(中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

川明参 *Chuamm inshen violaceum* Sheh et Shan 属于伞形科川明参属, 是我国特有的单种属植物, 主要分布在四川, 多为栽培<sup>[1]</sup>。其根作为滋补用药, 具有润肺化痰、和胃生津和解毒的功效, 在民间常常用作滋补药材<sup>[2]</sup>。饶高雄、周燕等曾经对不同产地、不同部位的川明参化学成分进行过研究, 得到多为香豆素和黄酮类化合物<sup>[2-4]</sup>。川明参须根在市场上也作为滋补品出售, 且价格较低。为了进一步探索川明参的活性成分, 为综合开发利用这一特有资源提供依据, 我们对川明参须根的化学成分进行研究, 从其乙醇提取物中分离鉴定出 10 个化合物, 主要成分为

线性呋喃香豆素类化合物, 另外还有黄酮、甾体和三萜酸, 其中化合物 I ~ IV、VIII 和 IX 为首次从该种植物中分离得到。川明参须根的化学成分与主根以及茎叶的化学成分在结构上类似, 但又不完全相同, 应引起注意。

#### 1 仪器与试剂

熔点用 XRC-1 型显微熔点仪测定(温度计未校正); ESI-MS 用 Finnigan LCQ<sup>DECA</sup> 型质谱仪测定; <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 用 Bruker AC-400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标。薄层色谱用硅胶和柱色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品。反相硅胶

\* 收稿日期: 2003-10-16

作者简介: 李帮经(1973-), 男, 在读博士生, 现从事天然药物研究。