

- [2] Jiao G Y, Shang D W. Infection of ginseng process on bioactivities [J]. *J Handan Med Coll* (邯郸医学院学报), 2001, 14(6): 510.
- [3] Dong W C. Proceeding of studies on hepatic damages protection of ginsenosides [J]. *Spec Wild Econ Animal Plant Res* (特产研究), 1996, (3): 30-33.
- [4] Li X G, Zheng Y N, Cui Y L. Studies on the mechanism of forming maltol on processing red ginseng separating [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1994, 16(4): 57-65.
- [5] Li X G, Qing B, Zeng Y N, et al. The isolated of pyroglutamic from ginseng and transforming mechanism in processing [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1994, 16(2): 1-8.
- [6] Zhu D N, Yang L, Yan Y Q. Comparison of ginsenosides content between *Panax quinquefolius* and *Panax ginseng* [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2000, 9 (3): 1-4.
- [7] Li X G, Fu L, Lu Q. Studies on the hydrolysis reaction of ginsenosides and their products in red ginseng processing [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2000, 22(2): 1-9.
- [8] Li X G, Park H S. Decarboxylic degradation reaction of ginsenosides and their products in red ginseng processing [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2000, 18(5): 355.
- [9] Kite G C, Howes M J R, Leon C J, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry of malony-ginsenosides in the authentication of ginseng [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 238-244.
- [10] Fuzzati N, Gabetta B, Jayakar K, et al. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in *Panax ginseng* roots [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 854: 69-79.

## 正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究

陈景耀<sup>1,2</sup>, 吴国荣<sup>2\*</sup>, 王建安<sup>2</sup>, 陆长梅<sup>2</sup>, 张卫明<sup>3</sup>, 蒋继宏<sup>1\*</sup>

(1. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097; 3. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

**摘要:** 目的 优选白芨多糖硫酸酯化的最佳工艺。方法 采用氯磺酸-吡啶法合成白芨多糖硫酸酯, 以取代度和产物量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计对试剂比例、反应温度和反应时间进行优选。结果 吡啶和氯磺酸比例6:1, 反应温度85℃, 反应时间2h为比较适宜的工艺条件。结论 白芨多糖硫酸酯化优化的工艺条件方法可行, 为进一步扩大试验提供了有价值的参数。

**关键词:** 白芨多糖; 硫酸酯化; 正交设计

**中图分类号:** R284.2; R286.02

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2005)01-0043-04

### Sulfation techniques of *Bletilla striata* polysaccharide by orthogonal design

CHEN Jing-yao<sup>1,2</sup>, WU Guo-rong<sup>2</sup>, WANG Jian-an<sup>2</sup>, LU Chang-mei<sup>2</sup>,  
ZHANG Wei-ming<sup>3</sup>, JIANG Ji-hong<sup>1</sup>

(1. Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Medicinal Plants, Xuzhou 221116, China; 2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

**Abstract Objective** To optimize the sulfation-conditions of *Bletilla striata* polysaccharide (BSPS). **Methods** BSPS was sulfated with chlorosulfonic acid-pyridine. Reagent proportion, reaction temperature, and reaction time were selected with substitution degree and yield as index by  $L_9(3^4)$  orthogonal design. **Results** Results showed that the condition with 6:1 volume ratio of pyridine and chlorine sulfonic acid, reaction temperature of 85℃, reaction time of 2h was the optimum. **Conclusion** The optimal method for sulfation of BSPS is feasible, and it provides valuable parameters for further enlarged test.

**Key words:** *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f polysaccharide (BSPS); sulfation; orthogonal design

许多植物多糖具有提高免疫能力、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗凝血等生物学活性, 因此对植物多糖的研究越来越受到人们的重视, 其中带有酸性基团的多糖, 特别是带有硫酸基的硫酸酯多糖由于其具

有抗HM等多种病毒的作用, 尤为受到关注<sup>[1,2]</sup>。硫酸酯多糖中硫酸基的取代度对其活性的影响较大, 通常取代度较大的抗病毒活性更强。研究植物多糖包括硫酸酯化在内的化学修饰以增强和拓展其生物

\* 收稿日期: 2004-04-06

基金项目: 国家科技部科研院所科技开发专项资金(2002EG163191); 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放基金(KJS02118)

作者简介: 陈景耀(1974—), 男, 江苏泗阳人, 硕士研究生, 主要从事植物化学及天然活性物质的研究、新药开发。

Tel: (025) 83598216 E-mail: musiclike@163.com

\* 通讯作者

学效应,已成为当前实现中医药现代化的重要工作之一。香菇多糖、牛膝多糖、高山红景天多糖、黄精多糖的硫酸酯化的研究已经取得了一定的进展<sup>[3~5]</sup>。

白芨系兰科植物白芨 *B. letilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎。具有收敛止血、消肿生肌之功效,临床上广泛用于治疗咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、肺结核咳血、溃疡病出血等症。白芨块茎中含有丰富的白芨胶,白芨胶的主要成分是中性的白芨杂多糖,属吡喃型葡甘聚糖<sup>[6]</sup>。本实验选择来源丰富的白芨多糖进行硫酸酯化修饰研究,旨在寻找适用高效的修饰方法,以期找到高活性的修饰产物,为多糖的修饰及其构效关系的研究积累有价值的资料,白芨多糖硫酸酯化的研究也将为充分利用白芨的药用价值开辟新的途径。

## 1 材料与仪器

白芨块茎由南京野生植物综合利用研究院药材基地提供,并经该院张卫明研究员鉴定。葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品,离子交换纤维素 DE-52 为 Whatman 公司产品,考马斯亮蓝 G-250 为 Sigma 公司产品, TFA 为 Fluka 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

冷冻干燥器(日本岛津公司), 3k30 低温高速离心机(Sigma 公司), RE-52 旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂), UV-754 分光光度计(上海第二分析仪器厂), BD-RAD 低压色谱系统(美国 BD-RAD 公司), HP1100 高效液相色谱仪(美国 HP 公司)。

## 2 方法与结果

2.1 白芨多糖的制备<sup>[6,7]</sup>: 取干燥的白芨块茎,粉碎,过 20 目筛,干燥,称取 60 g 备用。10 倍蒸馏水 60 °C 浸提 4 h, 重复 3 次,合并提取液,滤过,离心(5 000×g) 10 min, 合并上清液,旋转蒸发器浓缩,3 倍无水乙醇沉淀,离心(5 000×g) 8 min, 取沉淀真空冷冻干燥,得白芨粗多糖。Sevag 法脱蛋白,考马斯亮蓝 G-250 法检测至无蛋白质被测出。以 3 倍体积的无水乙醇沉淀,离心,收集沉淀用自来水透析 3 d,再用蒸馏水透析 1 d,真空冷冻干燥,备用。经 DE-52 阴离子交换纤维素,仅得蒸馏水洗脱部位一个单峰,冷冻干燥后再上 Sephadex G-100 分子筛柱色谱分离,蒸馏水洗脱,仍得一单峰,为纯化白芨纯多糖,冻干备用。

### 2.2 白芨多糖的硫酸酯化<sup>[8]</sup>

2.2.1 因素水平的确立: 试剂比例、反应温度、反应时间对多糖硫酸酯化修饰的影响较大<sup>[6]</sup>, 因此选取氯磺酸与吡啶的体积比(A)、酯化温度(B)和反应时

间(C)作为因素,见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

| 水 平 | 因 素 |      |     |
|-----|-----|------|-----|
|     | A   | B/°C | C/h |
| 1   | 1:2 | 45   | 2   |
| 2   | 1:4 | 65   | 3   |
| 3   | 1:6 | 85   | 4   |

2.2.2 酯化试剂的制备: 因白芨多糖是一类吡喃型多糖,故采取氯磺酸-吡啶法进行酯化反应。在带有搅拌装置和冷凝装置的三颈烧瓶中加入预冷的无水吡啶,并将烧瓶置于冰盐水中,剧烈搅拌,再将氯磺酸于 40 min 内逐滴加入。反应结束后,撤去冰盐水中浴,将酯化试剂于 -20 °C 封存,备用。

2.2.3 酯化工艺操作及结果: 精确称取经冷冻干燥的白芨多糖 400 mg,溶于 25 mL 无水甲酰胺中,室温下搅拌 30 min,加入酯化试剂,置于水浴中搅拌反应,水浴温度及反应时间分别按照正交设计设定。反应结束后冷却至室温,反应液加入预冷的 100 mL 冰水中,用 1 mol/L NaOH 中和至 pH 7.5。加入 3 倍体积的无水乙醇,静置、离心,将沉淀用自来水透析 3 d,蒸馏水透析 1 d。透析液经冷冻干燥得硫酸酯化白芨多糖,其呈白色纤维状。

采取硫酸钡比浊法测定硫酸基质量分数<sup>[9,10]</sup>。

$$\text{硫酸基取代度(DS)} = (1.62 \times S\%) / (32 - 1.02 \times S\%)$$

式中 S 表示硫元素的质量分数

正交试验数据及结果分析<sup>[11]</sup>见表 2。

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果

Table 2 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

| 试验号            | A     | B     | C     | D(误差) | DS   | 产物量/g |
|----------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 1              | 1     | 1     | 1     | 1     | 1.14 | 0.516 |
| 2              | 1     | 2     | 2     | 2     | 0.86 | 0.605 |
| 3              | 1     | 3     | 3     | 3     | 0.66 | 0.598 |
| 4              | 2     | 1     | 2     | 3     | 0.76 | 0.701 |
| 5              | 2     | 2     | 3     | 1     | 1.09 | 0.703 |
| 6              | 2     | 3     | 1     | 2     | 1.25 | 0.768 |
| 7              | 3     | 1     | 3     | 2     | 0.85 | 0.498 |
| 8              | 3     | 2     | 1     | 3     | 1.21 | 0.460 |
| 9              | 3     | 3     | 2     | 1     | 1.28 | 0.651 |
| DS             |       |       |       |       |      |       |
| K <sub>1</sub> | 0.89  | 0.92  | 1.20  |       |      |       |
| K <sub>2</sub> | 1.03  | 1.05  | 0.97  |       |      |       |
| K <sub>3</sub> | 1.11  | 1.06  | 0.87  |       |      |       |
| R              | 0.22  | 0.14  | 0.33  |       |      |       |
| 产物量            |       |       |       |       |      |       |
| K <sub>1</sub> | 0.573 | 0.572 | 0.581 |       |      |       |
| K <sub>2</sub> | 0.724 | 0.589 | 0.652 |       |      |       |
| K <sub>3</sub> | 0.536 | 0.672 | 0.600 |       |      |       |
| R              | 0.188 | 0.101 | 0.071 |       |      |       |

结果表明,以取代度为指标,由于时间因素的极差大,所以反应时间的影响较大,各因素对取代度的

影响程度依次为  $C > A > B$ , 即依次是反应时间、酯化试剂比例、反应温度。最佳组合为  $A_3B_3C_{10}$ 。以产物量为指标, 试剂比例因素的极差大, 试剂比例的影响较大, 各因素对产物量的影响程度依次为  $A > B > C$ , 即依次是酯化试剂比例、反应温度、反应时间, 最佳组合为  $A_3B_3C_{20}$ 。

对上述两个指标的结果分析进行方差分析, 各因素对取代度影响差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 由表 3 的结果看试剂比例对产物量的影响显著 ( $P < 0.05$ ), 综合考虑取代度和产物量的情况下, 试剂比例对取代度影响不显著, 对产物量影响显著, 故选择 1:4。反应温度选择两者一致的  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 从实际结果和节省时间考虑, 反应时间选择 2 h。所以最佳组合选择  $A_3B_3C_1$ , 即试剂比例 1:4, 反应温度  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 反应时间 2 h, 取代度达到 1.25, 产物量为 0.768 g。该反应组合在 9 个试验中产物量最高, 取代度与最高的 1.28 差异无显著性。

表 3 以产物量为指标的方差分析

| Table 3 Variance analysis based on yield as index |         |     |         |       |            |
|---------------------------------------------------|---------|-----|---------|-------|------------|
| 方差来源                                              | 离均差平方和  | 自由度 | 均方      | F 值   | 显著性        |
| A                                                 | 0.059 4 | 2   | 0.029 7 | 21.49 | $P < 0.05$ |
| B                                                 | 0.017 3 | 2   | 0.008 7 | 6.27  |            |
| C                                                 | 0.008 2 | 2   | 0.004 1 | 2.95  |            |
| D                                                 | 0.002 8 | 2   | 0.001 4 |       |            |

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.05}(2, 6) = 5.14$$

2.3 酯化产物纯度鉴定: 色谱条件: Shodex OHPak SB-802HQ (300 mm  $\times$  7.8 mm), 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8), 体积流量为 0.5 mL/min, 柱温为  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , HP1100 折光示差检测器。精密称取样品适量, 用流动相配制成 3 mg/mL 溶液, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 见图 1。可见酯化产物为一个单一峰, 即得到的样品是均一的多糖硫酸酯。

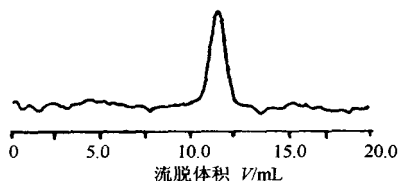


图 1 白芨多糖硫酸酯的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of sulfated BSPS

2.4 工艺验证试验: 按照优化工艺条件制备 3 批样品, 结果硫酸基取代度为 1.27 ( $RSD = 1.77\%$ ), 产物质量为 0.759 g ( $RSD = 1.54\%$ ), 说明该工艺条件下, 产物得率和取代度均较高, 明显优于正交试验的其他组。

### 3 讨论

白芨多糖是吡喃型多糖, 实验结果表明采取硫酸-吡啶法进行酯化效果较好。由于对多糖硫酸酯化程度影响起主要作用的因素有酯化试剂比例、反应温度和反应时间等。因此选择了这 3 个因素进行考察, 采取了 3 因素 3 水平的正交设计试验。从实验结果看, 如果以产物量考察的话, 最好的组合方式是  $A_3B_3C_2$ , 同时也能看出, 酯化试剂的比例对产物得率的影响已达显著水平。而如果单独以硫酸基取代度为指标, 则最好的组合方式是  $A_3B_3C_1$ , 其中反应时间对结果的影响较大, 但未达显著影响。综合考虑硫酸基取代度和产物量的情况下选择  $A_3B_3C_1$  为最佳组合。其后进行的工艺验证实验表明这 3 个参数对酯化产物的取代度较高且稳定, 产物量亦高。对进一步扩大实验有指导和参考价值。

白芨含有丰富的白芨胶——中性杂多糖, 对其进行硫酸酯化的修饰, 旨在生产成本低廉、产物量大、生物学活性高、应用广泛的白芨硫酸多糖, 为白芨和白芨多糖的深度开发和其在医药方面的应用, 展示出深远的前景。

关于白芨硫酸多糖理化性质的测定和分析都已完成, 细胞水平和动物学的生物学活性的实验及硫酸酯化的白芨多糖和未酯化的白芨多糖生物学活性的比较也都在顺利进展之中。

### References

- [1] Xiang D B, Li X Y. Sulfated polysaccharide, a new kind of drugs for AIDS [J]. *Foreign Med Sci-Pharm* (国外医学·药学分册), 1992, 19(1): 1-5.
- [2] Zhou L, Meng Y W. Studies on antiviral effects of polysaccharides and their derivatives [J]. *Chin J Appl Environ Bio* (应用与环境生物学报), 1997, 3(1): 82-90.
- [3] Wang S C, Fang J N. Preparation and structural analysis of sulfated derivatives of *Lentinan* [J]. *Acta Biochem Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1999, 31(5): 594-597.
- [4] Tian G Y, Li S T. Synthesis of *Achyranthes bidentata* polysaccharide sulfate and its antiviral activity [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30(2): 107-111.
- [5] Zhang L P, Han L P, Wang Y Q, et al. Preparation and characterization of polysaccharides sulfate from *Rhodiola saohalinensis* A. Bor [J]. *J Mol Sci* (分子科学学报), 1999, 15(4): 205-209.
- [6] Rui H Y, Wu G R, Zhang W M, et al. Research on extraction of polysaccharide from *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2001, 20(1): 14-16.
- [7] Rui H Y, Wu G R, Chen J Y, et al. Isolation, purification and structural characterization of neutral heteropolysaccharide from *Bletilla striata* [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 2004 (1): 35-38.
- [8] Ueno Y, Okamoto Y, Yamauchi R, et al. An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide and its derivatives obtained from the *Scleria of Grifora umbellata* (Fr.) PLAT [J]. *Carbohydr Res*, 1982, 101: 160-167.

- [9] Zhang H F, Li B C, Fan J H. Determination of sulfate radical content in sulfated polysaccharides (SPS) by gravimetric analysis of hydrochloric acid hydrolysis and barium sulfate precipitation [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2002, 23(5): 107-111.
- [10] Zhang W J. *Biochemical Technology of Study on Carbohydrate Complex* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994.
- [11] Li S G. *Practical Biostatistics (实用生物统计)* [M]. Beijing: Peking University Press, 2002.

## 不同炮制方法对泽泻中泽泻醇 B23-乙酸酯的影响

段 启<sup>1</sup>, 王少军<sup>2</sup>, 龚千锋<sup>1</sup>, 杨世林<sup>2</sup>, 曹 君<sup>1</sup>, 李创军<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077)

**摘要:**目的 探讨不同炮制方法对泽泻中泽泻醇 B23-乙酸酯的影响。方法 采用 RP-HPLC 法。反相 Hypersil ODS C<sub>18</sub> 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水(70:30)为流动相, 检测波长为 208 nm。结果 樟帮麸炒法的质量分数为 0.156 5%, 生品为 0.155%, 而其他炮制品质量分数均低于生品。结论 不同炮制方法, 辅料对泽泻各炮制品中泽泻醇 B23-乙酸酯含量有一定的影响。

**关键词:** 泽泻; 泽泻醇 B23-乙酸酯; 炮制; 高效液相色谱

**中图分类号:** R 284.1; R 286.02

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2005)01-0046-03

### Effects of different processings on alisol B23-acetate in *Alisma orientale*

DUAN Qi<sup>1</sup>, WANG Shao-jun<sup>2</sup>, GONG Qian-feng<sup>1</sup>, YANG Shi-lin<sup>2</sup>, CAO Jun<sup>1</sup>, LI Chuang-jun<sup>1</sup>

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330077, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of different processing methods on alisol B23-acetate in *Alisma orientale*. **Methods** The contents of alisol B23-acetate were determined by RP-HPLC. Chromatographic conditions included Hypersil C<sub>18</sub> column, mobile phase: acetonitrile-water (70:30), detecting wavelength: 208 nm. **Results** The content of alisol B23-acetate in processing sample stir-baked with bran by the method of Zhangbang was 0.156 5%, the crude sample was 0.155%, and the content of alisol B23-acetate in other processing samples was less than the crude sample. **Conclusion** Different processing methods and ajuvants show a certain influence on the contents of alisol B23-acetate in its different processed products.

**Key words:** *Alisma orientale* (Sam.) Juzep; alisol B23-acetate; processing; HPLC

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎, 味甘、性寒, 归肾、膀胱经, 具有利小便、清湿热的功能, 主要用于小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、痰饮眩晕、热淋涩痛、高血脂等。泽泻经盐炙后可引药下行, 并能增强泻热作用, 利尿而不伤阴。经麸炒后寒性稍缓, 长于渗湿和脾, 降浊以升清, 且泽泻醇 B23-乙酸酯在各主产区的泽泻中质量分数较高<sup>[1]</sup>, 故以之作为控制泽泻质量的指标性成分。近年来泽泻的研究多限于化学成分及药理研究, 其炮制工艺研究则较少。本实验采用《中华人民共和国药典》盐炙法、建昌帮盐炙法、樟帮盐炙法、酒炒法、烘法、清炒法、樟帮麸炒法、盐麸法对泽泻进行炮制, 测定其炮制品中泽泻醇 B23-乙酸酯

的质量分数, 以期探讨泽泻不同炮制品中有效成分变化的规律, 完善泽泻饮片质量标准提供参考。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 色谱工作站, METTLER AE 240 电子天平, KQ 318T 型超声波清洗仪。泽泻 *A. orientale* (Sam.) Juzep. 干燥块茎, 于 2003 年 2 月采收于江西广昌, 经本校鉴定教研室鉴定。泽泻醇 B23-乙酸酯为本课题组自制, 经色谱分析纯度大于 98%。乙腈、甲醇为色谱纯, 丙酮、醋酸乙酯为分析纯。

### 2 样品的制备

2.1 药典盐炙法泽泻: 先将食盐加适量的水溶解后, 滤过备用。取泽泻片, 加盐水拌匀, 闷透, 置锅内,