

合物 V 为槲皮素。

化合物 VI: 黄色粉末, mp 239~240 °C, ESI-MS: 433(M+H)<sup>+</sup>, 455(M+Na)<sup>+</sup>。三氯化铝、盐酸-镁粉反应均呈阳性。<sup>1</sup>H-NMRδ: 5.0(1H, d, J=10.0 Hz, H-1''), 6.2(1H, s, H-6), 6.8(1H, s, H-3), 6.9(2H, d, J=8.5 Hz, H-3', 5'), 8.0(2H, d, J=8.5 Hz, H-2', 6'), 3-4(糖上其他质子, m)。与文献数据基本一致<sup>[12~14]</sup>, 故确定化合物 VI 为牡荆苷。

化合物 VII: 黄色粉末, mp 256~258 °C, ESI-MS: 449(M+H)<sup>+</sup>, 471(M+Na)<sup>+</sup>。三氯化铝、盐酸-镁粉反应均呈阳性。<sup>1</sup>H-NMRδ: 5.0(1H, d, J=10.0 Hz, H-1''), 6.2(1H, s, H-6), 6.6(1H, s, H-3), 6.8(2H, d, J=8.1 Hz, H-5'), 7.4(1H, d, J=2.2 Hz, H-2'), 7.5(1H, dd, J=8.1, 2.2 Hz, H-6'), 3-4(m, 糖上其他质子)。与文献数据基本一致<sup>[12~13]</sup>, 故确定化合物 VII 为荭草苷。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.  
 [2] Wang P. Observation of the therapy effect to urethritis on Jinlianhua Granule [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1995, 17(8): 51.  
 [3] Wang P. Observation of the therapy effect to respiratory inflammation on Jinlianhua Granule [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996, 18(3): 50.

[4] Beijing Pharmacy Factory. The report of pharmacological activities and clinic observation and about *Trollius chinensis* Bunge [J]. *J New Med* (新医学杂志), 1973 (5): 191-194.  
 [5] Yang X C. Clinic observation and antimicrobe activity on *Trollius macropetalus* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1982, 4(5): 40.  
 [6] Li Y L, Ma S C, Yang Y T, et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79: 365-368.  
 [7] Wen Y H. Antiviral activity of crude aqueous extract on *Trollius chinensis* Bunge [J]. *Chin J Microbiol Immunol* (中华微生物学和免疫学杂志), 1999, 19(1): 21.  
 [8] Liu L J, Wang X K, Fu Q F, et al. Antimicrobe activity and content of total flavonoids on *Trollius macropetalus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(9): 461-462.  
 [9] Liu L J, Wang X K, Xu G, et al. Antimicrobe activity on stem and leaves of *Trollius macropetalus* [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医学报), 1992, 3: 33-34.  
 [10] Li Z. Isolation and identification on veratric acid in *Trollius chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1982, 13(3): 130.  
 [11] Yu D Q, Yang J S. *Handbook of Analytical Chemistry - NMR Analysis* (分析化学手册·核磁共振波谱分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1999.  
 [12] Ma B L. Chemical composition of *Trollius macropetalus* Fr. Schmidt [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1985, 16(8): 7-9.  
 [13] Kang S W, Yu W F, Wang P. Chemical composition of *Trollius macropetalus*. Fr. Schmidt [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1984, 15(6): 7-9.  
 [14] Lin L, Xie N, Cheng Z H, et al. Isolation and identification of vitexin and isovitexin from *Cajanus cajan* [J]. *J Guangzhong Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 1999, 16(1): 49-51.

## 葛根地连汤水溶性多糖的研究

王晓娟<sup>1</sup>, 曾和平<sup>2\*</sup>, 魏传晚<sup>1</sup>, 徐淑永<sup>2</sup>, 王 辉<sup>2</sup>

(1. 南华大学 化学化工学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 华南师范大学 化学系, 广东 广州 510631)

糖尿病是一种慢性进行性内分泌代谢紊乱性疾病, 分为 I 型和 II 型。全世界 II 型糖尿病占糖尿病总数的 85% 左右, 在我国占 95% 以上。目前, 国内外还没有根治糖尿病的特效药物和方法。自 1990 年研发葛根地连汤以来, II 型糖尿病的治愈率明显提高。据报道, 治疗 64 例, 临床治愈 56 例(其中 40 例为 2~10 年未见复发者), 好转 4 例, 总有效率 93.75%, 远期疗效满意<sup>[1,2]</sup>。葛根地连汤是由葛根(250 g)、生地黄(125 g)、黄连(50 g)、甘草(15 g) 4 味中药组成的复方。葛根地连汤水溶性多糖在治疗 II 型糖尿病应

起重要作用。本实验研究了葛根地连汤水溶性多糖, 探索了其分离、纯化及初级结构分析的方法, 初步分析了复方多糖与单方多糖<sup>[3~5]</sup>之间的组成关系和研究了葛根地连汤中水溶性多糖的组成及其初级结构。

### 1 材料、试剂及仪器

葛根地连汤复方中各药购于广州康华药店。试剂为分析纯。Sephadex G-100、G-150、G-200 为上海化学试剂二厂进口分装。UV-240 型紫外光谱仪(日本岛津); LC-6A 高效液相色谱仪(日本岛津); 红

收稿日期: 2004-06-25

基金项目: 广东省科技攻关项目资助(2002C30115)

作者简介: 王晓娟(1978-), 女, 山东荣成人, 讲师。 E-mail: youyou780207@hotmail.com

\* 通讯作者 E-mail: zenghp@sclu.edu.cn

外光谱仪 173 型(Perkin Elmer 公司)。可调微量移液器(上海求精玻璃仪器厂)。

## 2 实验

### 2.1 葛根地连汤复方多糖的分离与纯化

2.1.1 提取:分别称取葛根 250 g, 生地黄 125 g, 黄连 50 g, 甘草 15 g 粉碎, 加入 2 L 去离子水, 煎煮 4 h, 其间不断搅拌, 冷却后滤过; 滤渣再次水煮, 滤过。将两次滤液合并, 减压蒸馏, 浓缩至约 500 mL, 得到葛根地连汤复方多糖水提取液。取两滴浓缩液, 加入 2 mL 0.2% 硫酸-萘酚溶液, 呈现绿色, 说明其中含有糖。取两滴浓缩液稀释, 加入几滴 0.05% 茚三酮溶液, 加热约 10 min, 出现紫色, 说明含有蛋白质, 需要去蛋白。

2.1.2 去蛋白:在提取多糖的过程中部分蛋白质也一同被溶入水中。实验中, 采用 Sevag 法<sup>[6]</sup>[氯仿-正丁醇(4:1)]与蛋白酶法<sup>[7]</sup>结合脱蛋白多次, 水溶液用紫外光谱仪在 200~400 nm 扫描, 至其紫外光谱图在 280 和 260 nm 无吸收峰, 表明不含蛋白质和核酸。

2.1.3 纯化:将去蛋白后的水溶液加入同体积的 95% 乙醇, 沉淀, 离心后得半干状固体 RPC-A; 上清液加入与上同体积的 95% 乙醇, 沉淀, 离心后得半干状固体 RPC-B。将 PRC-A、PRC-B 盛于 CaCl<sub>2</sub> 的干燥器中真空干燥, 得粗多糖 PRC-A 4.66 g, 得粗多糖 PRC-B 2.78 g。

### 2.2 定性试验

2.2.1 溶解性试验:两种多糖各取少量, 分别加入水、二甲亚砜、乙醇、乙醚、丙酮, 结果都只溶于水, 不溶于二甲亚砜、乙醇、乙醚、丙酮。

2.2.2 硫酸-萘酚试验:各取少量多糖溶于水中, 加入适量新配制的 0.2% 硫酸-萘酚溶液, 出现绿色; 在紫外光谱仪进行扫描发现在 620 nm 处有最大吸收。

2.2.3 茚三酮试验:两种多糖各取少量溶于水中, 加入几滴 0.05% 茚三酮溶液, 加热约 10 min, 无紫色出现。

2.3 葛根地连汤水溶性多糖的精制:将葛根地连汤复方粗多糖 PRC-A 和 PRC-B 溶于水制成饱和溶液, 在 Sephadex G-150 柱(60 cm×2.7 cm)上进行纯化。用 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱。洗脱液经分步收集器收集后, 用 0.2% 硫酸-萘酚显色, 经紫外检测, 作 A-V 曲线, 依洗脱曲线合并洗脱液, 加入无水乙醇沉淀, 干燥, 由 PRC-A 得精制多糖 PRC-1、PRC-2; 由 PRC-B 得 PRC-3。

### 2.4 纯度鉴定及相对分子质量测定

2.4.1 纯度鉴定:凝胶色谱法:PRC-1、PRC-2、PRC-3 各 5 mg 分别溶于 2 mL 去离子水中, 依次进行 Sephadex G-200 凝胶柱色谱分离测其纯度, 用去离子水洗脱, 体积流量 6~8 mL/10 min, 按 2 mL 每管分部收集, 用 0.2% 硫酸-萘酚显色法跟踪鉴定, 绘制洗脱体积与多糖含量之间的关系曲线。结果表明, PRC-1、PRC-2、PRC-3 多糖的洗脱峰为单一对称峰, 说明都为均一组分。

2.4.2 相对分子质量测定:Sephadex G-200 凝胶柱色谱测定多糖的相对分子质量。将标准 Dextran 葡萄糖(量均相对分子质量分别为  $5.8 \times 10^5$ 、 $7.1 \times 10^4$ 、 $3.77 \times 10^4$ 、 $1.15 \times 10^4$ )分别测得洗脱体积  $V_e$ , 用标准蓝色葡聚糖(平均相对分子质量为  $2 \times 10^6$ )测出柱的外水体积  $V_o$ , 绘制量均相对分子质量标准曲线( $\lg M - V_e/V_o$ ), 然后将所测多糖在相同条件下洗脱一次。以去离子水洗脱, 得  $V_e/V_o$  值, 查标准曲线, 求得样品多糖的量均相对分子质量分别为  $1.22 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $7.62 \times 10^3$ 。

2.5 单糖的组成分析:分别称取多糖 10 mg, 加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mL, 用 N<sub>2</sub> 除氧封管, 100 °C 水浴水解 10 h, 水解后用 BaCO<sub>3</sub> 中和至中性, 离心, 上清液进行 HPLC 测定。色谱条件为 Hypersil-NH<sub>2</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(大连依利特科学仪器有限公司), 流动相:乙腈-(80:20), 体积流量:0.8 mL/min, 进样量:10 μL, 室温:25 °C。PRC-1 的单糖组成为 L-鼠李糖(35%)、D-木糖(11.5%)、L-阿拉伯糖(11.5%)、葡萄糖(35%)、D-半乳糖(7%)、PRC-2 的单糖组成为 L-鼠李糖(5.3%)、D-木糖(2.8%)、D-果糖(16.3%)、葡萄糖(73.9%)、D-半乳糖(1.7%), PRC-3 的单糖组成为 L-鼠李糖(12.4%)、D-木糖(16%)、L-阿拉伯糖(11.3%)、D-果糖(43%)、葡萄糖(17.3%)。

### 2.6 糖苷键类型分析

2.6.1 红外光谱(IR):取 PRC-1、PRC-2、PRC-3, 用 1% KBr 进行压片, 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 扫描。可以看出 3 种多糖在 3 400 cm<sup>-1</sup> 附近都有 O-H 伸缩振动的强吸收, 2 900 cm<sup>-1</sup> 附近有 C-H 伸缩振动峰 1 400~1 200 cm<sup>-1</sup> 是 C-H 的变角振动吸收峰, 1 200~1 000 cm<sup>-1</sup> 的一组强峰, 是吡喃糖环的 C-O (属于 C-O-C 和 C-O-H 类) 伸缩振动引起的。由 IR 图可初步判断<sup>[9]</sup>:对于 PRC-1, 920 cm<sup>-1</sup> 是 β 异头物中的 1b 型的特征吸收光谱, 760 cm<sup>-1</sup> 是 α 异头物中的 3a 型的特征吸收光谱, 说明多糖分子中同时存在

$\alpha$  和  $\beta$  糖苷键;对于 PRC-2 和 PRC-3 在  $930\text{ cm}^{-1}$  和  $760\text{ cm}^{-1}$  有吸收,说明多糖分子中存在  $\alpha$  糖苷键。

2.6.2 高碘酸氧化:高碘酸可以选择性地断裂糖分子中 2 个或 3 个羟基连接处,生成相应的多糖醛、甲醛或甲酸。反应定量地进行,每开裂一个 C-C 键消耗一分子高碘酸。通过测定高碘酸消耗量及甲酸的释放量,可以判断糖苷键的位置。分别称取 20 mg 多糖溶解于 25 mL 0.02 mol/L  $\text{NaIO}_4$  中,于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  避光氧化,每次依时取样,稀释 250 倍,用紫外光谱仪在 233 nm 处测定  $\text{NaIO}_4$  的消耗量,直至吸光度不再改变。用 0.01 mol/L NaOH 测甲酸的释放量,可以初步判断糖苷键的位置。反应 144 h 后,高碘酸氧化达最大值。PRC-1 平均每摩尔己糖残基消耗 1.14 mol 高碘酸,释放甲酸 0.38 mol,说明其中一定含有 1 $\rightarrow$ 6 糖苷键,还可能含有 1 $\rightarrow$ 2 或 1 $\rightarrow$ 4 或 1 $\rightarrow$ 3 糖苷键;PRC-2 平均每摩尔己糖残基消耗 0.84 mol 高碘酸,没有甲酸释放,说明其中不含有 1 $\rightarrow$ 6 糖苷键。PRC-3 平均每摩尔己糖残基消耗 0.80 mol 高碘酸,释放甲酸 0.4 mol,说明多糖中只含有 1 $\rightarrow$ 6 糖苷键。

2.6.3 Smith 降解:将多糖高碘酸氧化后的溶液装入透析袋中,对流水透析 48 h,加入 20 mg 硼氢化钠以还原糖醛,于室温暗处搅拌 24 h,用醋酸调节 pH 值 5~6,以分解剩余的硼氢化钠。溶液透析后减压蒸发至干,残留物用 1.3 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  在室温水解 96 h,水解液用  $\text{BaCO}_3$  中和,滤过、离心,上清液进行 HPLC 分析。结果 PRC-1 水解产物有乙二醇、丙三醇和葡萄糖醇,其摩尔比为 11:37:5,说明其连接方式为 1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6 和 1 $\rightarrow$ 2,主要以 1 $\rightarrow$ 6 和 1 $\rightarrow$ 2 方式连接;RPC-2 水解产物有丙三醇、乙二醇、丁四醇和葡萄糖醇,其摩尔比为 62:5:5:14,说明其连接方式为 1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 2,主要以 1 $\rightarrow$ 2 方式连接;PRC-3 水解产物只有乙二醇和丙三醇,说明糖苷键连接方式是 1 $\rightarrow$ 6 连接。

### 3 讨论

葛根地连汤原料中所含蛋白质比较丰富,单独采用 Sevag 法[氯仿-正丁醇(4:1)处理]脱蛋白反复次数多,工作量很大,易损失提取液。本实验采用了 Sevag 法与蛋白酶法结合的方法,时间大大减少了。

进行凝胶柱色谱分离,柱的装填好坏对分离效果及分离所需时间有很大影响。分离前,要将凝胶进行充分溶胀,利用倾泌的办法去掉一些微小颗粒,可进行分级,所得颗粒分布更均匀。一般要一次装柱,平衡时流速要慢且稳定;另外,在分离过程中要注意操作压不要太高,这样才能保证流速不会太慢。

将实验结果和各单味药的研究情况进行比较,可以发现葛根地连汤水溶性多糖的相对分子质量及糖苷键类型与各单味药都各不相同,这说明葛根地连汤水溶性多糖中不含有甘草多糖、地黄多糖;但其单糖组成及功能却与各单味药有相似之处,这说明其兼具有甘草多糖、地黄多糖各自活性作用,同时还具有配伍协调作用,疗效显著,作用机制复杂。

### References:

- [1] Jing M Y. *Column Chromatography and Application* (凝胶柱层析及其应用) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1975.
- [2] Gong Q W, Jian C J. 64 Examples of II-diabetes treating by *Pueraria locata*, *Rehmannia glutinosa* and *Copis chinensis* [J]. *Sichuan J Tradit Chin Med* (四川中医), 2002, 20(5): 29-30.
- [3] Yue W W, Hai B Z, Yu R S, et al. Isolation, purification and analysis of a polysaccharide from residues of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Acta J Sci Nat Univ Nankai* (南开大学学报), 1999, 32(4): 36-38.
- [4] Yun Y, Jian N C. Chemical study on polysaccharide constituents of *Rehmannia Glutinosa* Libosch. F. Hwei chinensis Hsiao [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1999, 10(8): 564-568.
- [5] Ying C. The progress in pharmacological research of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides (RPS) [J]. *Chin J Nat Med* (中国自然医学杂志), 2000, 2(3): 186-188.
- [6] Staub A. Carbohydrate polymers [J]. *Methods Carbohydr Chem*, 1965, 5(1): 5-9.
- [7] Fukuda K, Syda Y. Colorimetric method for determination of sugar and related substances [J]. *Chem Pharm Bull*, 1975, 23: 1955-1962.
- [8] Dong R W. *Biochemistry of Saccharide* (糖类的生物化学) [M]. Beijing: Higher Education Publishing House, 1987.

## 《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青