

$^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_6): 2.75 (1H, dd, $J=17$, 3 Hz, H-3, cis), 3.00 (1H, dd, $J=17$, 13 Hz, H-3, trans), 5.00 (1H, d, $J=7.6$ Hz, 葡萄糖 H-1), 5.44 (1H, dd, $J=13$, 3 Hz, H-2), 5.46 (1H, bs, 芹菜糖 H-1), 6.35 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 6.50 (1H, dd, $J=8.7$, 2 Hz, H-6), 7.11 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.43 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', 6'), 7.72 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5)。根据以上数据, 鉴定化合物Ⅹ为甘草素-4'-芹糖苷^[5]。

化合物Ⅹ: 黄色结晶。质谱 m/z : 418 (M^+)。

$^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_6): 5.06 (1H, d, $J=7.4$ Hz, 葡萄糖 H-1), 5.46 (1H, d, $J=1.6$ Hz, 芹糖 H-1), 6.30 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-3'), 6.42 (1H, dd, $J=8.7$, 2.2 Hz, H-5'), 7.13 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3, 5), 7.68 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H- α), 7.71 (2H, d, $J=$

8.7 Hz, H-2, 6), 7.80 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H- β), 7.97 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-6')。根据以上数据, 鉴定化合物Ⅹ为异甘草素-葡萄糖芹菜糖苷。

References:

- [1] Kinoshita T, Saitoh T, Shibata S, *et al.* The occurrence of an isoflavene and the corresponding isoflavone in licorice root [J]. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24(5): 991-994.
- [2] Xu Q H, Zhu D Y, Song G Q, *et al.* Isolation and chemical structure of liconolignan [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(1): 45-49.
- [3] Yang S L, Liu Y L. Chemical constituents of *Glycyrrhiza inflata* Bat [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1988, 30(2): 176-182.
- [4] Kitagawa I, Chen W A, Hori K, *et al.* Chemical studies of Chinese licorice-roots I. Elucidation of five new flavonoid constituents from the root of *Glycyrrhiza glabra* L. collected in Xinjiang [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(5): 1056-1062.
- [5] Yahara S, Nishioka I. Flavonoid glycoside from licorice [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(9): 2108-2109.

白毛藤多糖的分离、纯化和鉴定

毛建山¹, 吴亚林², 黄 静², 潘远江^{2*}

(1. 浙江大学医学院附属二院消化内科, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江大学 化学系, 浙江 杭州 310027)

摘要:目的 分离、纯化和鉴定白毛藤 *Solanum lyratum* 中的多糖的成分。方法 经脱脂、沸水抽提、乙醇沉淀、酶-Sevag 法脱蛋白得到的粗多糖, 再经 DEAE-Sepharose fast flow 阴离子交换和 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶柱色谱分离得到纯化的白毛藤多糖(SLPS), 用红外光谱和紫外光谱分析鉴定该多糖, 凝胶渗透色谱(GPC)法测定其相对分子质量, 运用薄板色谱(TLC)和纸色谱(PC)法初步测其结构组成。结果 红外光谱分析具有典型的多糖特征吸收峰, 紫外光谱分析未见蛋白质(280 nm)与核酸(260 nm)的特征吸收峰。结论 本实验所提取的白毛藤多糖为单一组分的多糖。

关键词: 白毛藤; 多糖; 白毛藤多糖

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)05-0654-03

Isolation, purification, and identification of polysaccharide of *Solanum lyratum*

MAO Jian-shan, WU Ya-lin, HUANG Jing, PAN Yuan-jiang

(1. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Key words: *Solanum lyratum* Thunb.; polysaccharide; *Solanum lyratum* polysaccharide (SLPS)

白毛藤, 又名白英, 多年生草质藤本, 茎及叶密生有节长柔毛。叶互生, 多为琴形^[1]。产于黄河以南各地, 是我国的一种名贵中药材, 具有清热解毒, 利湿、祛风、抗肿瘤、调节身体免疫力之功效, 并对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌有明显的抑菌作用^[2~4]。其主要成分为生物碱(含 β -羟基甾体), 并有糖反应^[5]。本

实验主要进行了白毛藤多糖的提取, 并进一步纯化和鉴定了该多糖。

1 材料和仪器

白毛藤 *Solanum lyratum* Thunb., 浙江产, 购自杭州华东医药股份有限公司中药材分公司, 经浙江大学生命科学院倪世峰博士鉴定。DEAE-

Sephadex fast flow、Sephadex G-200 为 Pharmacia 公司产品,乙醇(医用级),其他试剂均为国产分析纯 Water R-401 示差折光检测器, JASCO V-530 UV/VIS 分光光度计, Thermo Nicolet nexus 470 红外分光计 Water-208 和岛津 LC-4A 高效液相色谱,日立 SCR20BC 高速冷冻离心机,冷冻干燥机(北京博医康技术公司)。

2 方法

2.1 白毛藤多糖(SLPS)的提取:干燥的白毛藤全草 1.8 kg,粉碎,以 95%乙醇室温浸泡,至浸出液接近无色。残渣于通风处自然阴干,晾干后的药材加水 10 L,100 ℃提取 4 h,重复提取多次,用苯酚-硫酸法跟踪检测,至无明显颜色反应为止。合并提取液,浓缩,离心除去不溶物。上清液在不断搅拌下,缓缓加入 3 倍量左右的 95%乙醇沉淀,4 ℃静置 24 h,次日,于 4 ℃、6 000 r/min,离心 30 min,收集沉淀。合并上清液,减压回收乙醇,重复以上操作,依次加入 90%、85%、80%、75%乙醇再沉淀,收集合并沉淀,经水复溶、脱蛋白、透析、冷冻干燥后获粗多糖,得率为 22%。

2.2 酶-Sevag 法除蛋白:称取链酶蛋白酶、木瓜蛋白酶各 100 mg 溶于 100 mL 蒸馏水中,两者混匀后以 1:100 体积比加入多糖水溶液中,于 37 ℃水浴中恒温 6 h,再用 Sevag 法^[6]按 1:1 的体积加 Sevag 液(氯仿与正丁醇体积比 5:1),反复振荡,静置 24 h 以上直至清晰分层,保留水相,反复除蛋白 5 次以上直至无蛋白层。

2.3 DEAE-Sephadex fast flow 阴离子交换:纤维素阴离子交换剂 DEAE-Sephadex fast flow 经 0.5 mol/L NaOH、HCl 和蒸馏水依次处理至中性,重复处理 3 次后用蒸馏水洗至中性,抽气装柱,用 pH=7.6 PBS 溶液平衡 48 h。称取粗多糖 1 g,溶于少量蒸馏水中,离心除去不溶物,上清液过 DEAE-Sephadex fast flow 阴离子交换柱进行分离,用 0.1~2.0 mol/L NaCl-PBS 溶液梯洗脱,控制体积流量为 1 mL/min,每管收集 5 mL,以苯酚-硫酸法测吸光度值(A_{490}),作洗脱曲线,合并主峰部分,冻干,获得两个粗多糖 SLPS-1(331 mg)和 SLPS-2(286 mg)。

2.4 标准曲线制作及粗多糖测定:按文献方法制作标准葡聚糖曲线^[7]。同法吸取粗多糖 SLPS-1 和 SLPS-2 的 4%水溶液 2.0 mL 在 490 nm 处测 A_{490} ,以标准曲线计算多糖含量。

2.5 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶滤过色谱:

Sephadex G-200 葡聚糖凝胶用适量蒸馏水浸泡 12 h,再以 100 ℃溶胀 4 h 后,抽气装柱,用 0.1 mol/L NaCl 溶液平衡 48 h。称取 200 mg 粗多糖 SLPS-1,溶于少量蒸馏水中,上样。以 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,控制体积流量为 1 mL/min,每管收集 5 mL,以苯酚-硫酸法测 A_{490} ,作洗脱曲线,合并主峰,冻干,得精多糖 SLPS-1(21.3 mg),得率为 0.78%。同法对粗多糖 SLPS-2 进行分离,得精多糖 SLPS-2(18.7 MG),得率为 0.59%。接着再将精多糖 SLPS-1、SLPS-2 依照上述步骤分别进行 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶柱色谱分离,作出洗脱曲线。

2.6 精多糖的测定:按 2.4 所述方法。同法吸取精多糖 SLPS-1 和 SLPS-2 的 4%水溶液 2.0 mL,在 490 nm 处测 A_{490} ,计算多糖含量。

2.7 紫外光谱检测:取精多糖 1.5 mg,以适量蒸馏水溶解,用波长 200~400 nm 进行紫外扫描,以蒸馏水为对照。

2.8 红外光谱检测:取干燥精多糖 1 mg,与适量干燥 KBr 粉末混后在研钵中研磨至极细,经压片后,测定红外光谱。

2.9 多糖相对分子质量的测量:采用凝胶渗透色谱(GPC)法^[7]。色谱条件:色谱柱为 μ -Bondagel-Elinar(7.8 mm×30 cm,相对分子质量范围 $2\times 10^3\sim 2\times 10^6$),样品质量浓度为 0.6%,进样量为 60 μ L,洗脱剂为双蒸馏水,温度为环境温度,体积流量 0.5 mL/min,检测仪器为示差折光检测器。

2.10 薄层色谱(TLC)和纸色谱(PC)初步结构鉴定:精多糖 SLPS-1、SLPS-2 各 2 mg 加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)2 mL,封管,于 110 ℃水解 1.5 h,减压蒸干后加少量水溶解,展开剂为醋酸乙酯-吡啶-醋酸-水(5:5:1:3),苯胺-邻苯二甲酸显色,进行硅胶薄层色谱和中华滤纸纸色谱分离。对照单糖为葡萄糖、甘露糖、果糖、岩藻糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖。

3 结果与讨论

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

3.2 酶-Sevag 法除蛋白:与单纯的 Sevag 法相比,中性酶结合 Sevag 法,除蛋白的处理次数明显减少。本实验仅用 Sevag 法处理了 6 次,即无蛋白层,大大节省了时间,但是所需蛋白酶价格较高,不易保存,且使用条件较为苛刻,需要恒温。不过由于所需酶量极少,且节约了有机溶剂的用量,因此从功效和成本上来说,酶-Sevag 法要适用一些。

3.3 DEAE-Sepharose fast flow 阴离子交换色谱: 由洗脱曲线(图 1)可知,DEAE-Sepharose fast flow 阴离子交换柱的分离效果较好,两个组分也达到了满意的分离效果,且峰形比较对称。

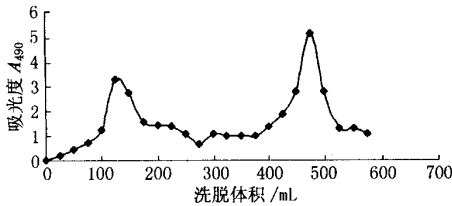


图 1 DEAE-Sepharose fast flow 阴离子交换图谱
Fig. 1 Chromatogram of DEAE-Sepharose fast flow

3.4 粗多糖的测定:根据制作的标准曲线,测得粗多糖 SLPS-1 及 SLPS-2 的质量分数分别为 89% 和 93%。

3.5 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶滤过色谱:粗多糖 SLPS-1、SLPS-2 的洗脱曲线见图 2。由精多糖 SLPS-1、SLPS-2 洗脱曲线(图 3)可知,两个精多糖 SLPS-1、SLPS-2 的洗脱曲线显示单一对称峰,说明精多糖 SLPS-1、SLPS-2 已是单一组分。

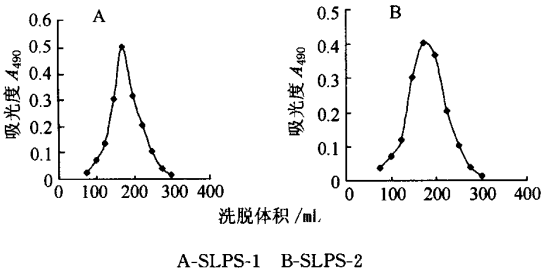


图 2 粗多糖的 Sephadex G-200 凝胶柱色谱分析洗脱曲线
Fig. 2 Analytic elution curve on Sephadex G-200 for crude polysaccharide

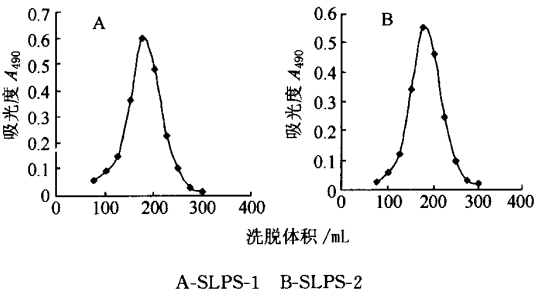


图 3 精多糖的 Sephadex G-200 凝胶柱
色谱鉴定洗脱曲线

Fig. 3 Identification elution curve on Sephadex G-200 for purified polysaccharide

3.6 精多糖含量测定:根据葡聚糖标准曲线,测得精多糖 SLPS-1 及 SLPA-2 的质量分数分别为 97% 和 99%。

3.7 紫外光谱检测:精多糖 SLPS-1、SLPS-2 在 200~400nm 紫外扫描图谱均显示为末端吸收,280、260 nm 处无紫外吸收,表明多糖中无蛋白、多肽及核酸。

3.8 红外光谱检测:红外光谱图表明精多糖 SLPS-1、SLPS-2 具有典型的多糖特征吸收峰,见表 1。

表 1 白毛藤多糖的红外光谱数据

Table 1 Data of IR spectrum of SLPS			
SLPS-1/cm ⁻¹	SLPS-2/cm ⁻¹	说 明	归 属
3 410	3 413	很强的宽峰	O-H 的伸缩振动
2 950、2 855	2 952、2 856	较弱的两组峰	C-H 的伸缩振动
1 244、1 325	1 247、1 327	较弱的两组峰	C-H 的变角振动
1 110、1 015	1 111、1 018	较强的两组峰	C-O 的伸缩振动

3.9 多糖相对分子质量检测:凝胶渗透色谱(GPC)法测定精多糖 SLPS-1、SLPS-2 的平均相对分子质量分别为 2.0×10^5 、 1.3×10^5 。

3.10 薄板色谱(TLC)和纸色谱(PC)初步鉴定多糖结构:通过精多糖 SLPS-1、SLPS-2 三氟乙酸水解产物与单糖对照品的比较发现,两者均含有葡萄糖,另外,SLPS-1 还含有木糖,SLPS-2 还含有果糖和阿拉伯糖。

References:

[1] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection, *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.

[2] Zhang G G. *Handbook New Use of Common Chinese Herbal Medicine* (常用中草药新用途手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House (中国中医药出版社), 1994.

[3] Lee K B, Hong E H, Lee I, et al. Abolition of anaphylactic shock by *Solanum lyratum* Thunb. [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1998, 19(11-12): 729-734.

[4] Kim H M, Kim M J, Li E, et al. The nitric oxide-producing properties of *Solanum lyratum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 1999, 67(2): 163-169.

[5] Pu J C. Study on *Solanum lyratum* Thunb. of Chinese medicine [J]. *J Jiangsu Teachers Acad* (江苏师范学院学报), 1996, 8(2): 3.

[6] Staub A M. Methods in carbohydr [J]. *Phytochemistry*, 1965, 15(5): 5.

[7] Zhang W J. *Investigative Technology of Biochemistry on Glycoconjugat* (糖复合物生化研究技术) [M]. 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994.