

学试剂的使用会带来溶剂残留和环境污染等问题。微生物转化法对天然产物进行结构修饰,是通过生物酶对底物作用,获得更高活性、低不良反应的目标产物。研究表明,青霉菌培养过程所产酶能对叶黄素酯选择性降解,并能将其转化为游离态叶黄素,通过反应前后叶黄素及其酯的峰面积计算,叶黄素的质量分数可达到 91.6%。

本实验研究了微生物转化法制备叶黄素的可能性,为生产叶黄素提供一个新思路,但由于转化体系与化学方法完全不同,其后续分离纯化工作还有待进一步研究。

#### References:

- [1] Li M H. Lutein and its biological function [J]. *Chin Food Addit* (中国食品添加剂), 2001, 29 (4): 31-33.
- [2] Zhang C, Song H, he Z C, et al. Research of analysis method of lutein in *Tagetes erecta* L. [J]. *J Sichuan Univ, Eng Sci* (四川大学学报:工程科学版) 2001, 33 (6): 114-116.
- [3] Subagio A, Morita N. No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein [J]. *Food Res Int*, 2001, 34: 315-320.
- [4] Gregory Q, Chen G K. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Sci*, 2002, 51 (10): 1093-1094.
- [5] Chen L S, Zhou C S, Xiang H Y, et al. Determination of lutein in marigold flowers with high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2004, 21 (5): 866-868.

## 麦冬多糖的单糖组成研究

林 晓, 徐德生\*, 冯 怡, 沈 岚

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 具有养阴生津、润肺清心的功能, 可用于热病伤津、心烦口渴等症。药理学研究表明, 麦冬及其制剂具有一定的抗心肌缺氧、抗心肌缺血作用, 临床用于治疗冠心病、心绞痛取得一定疗效。麦冬含有甾体皂苷、高异黄酮、多糖、氨基酸等成分。小鼠<sup>86</sup>Rb心肌营养血流量实验表明, 麦冬皂苷、麦冬总多糖可能是麦冬抗心肌缺血的主要有效部位<sup>[1]</sup>, 相对分子质量小于  $1 \times 10^4$  的麦冬多糖有较显著的抗心肌缺血作用<sup>[2]</sup>。通过测定多糖全水解后水解液中的单糖种类和数量可以对多糖的组成有所了解, 目前常用 0.5~2 mol/L 硫酸或三氟乙酸进行全水解, 且一般不对水解程度进行监测。由于单糖在酸性条件下会脱水成糠醛, 且不同种类单糖的反应速率不同, 若水解条件下不合适或水解时间过长, 都会造成在确定单糖组成比例时产生误差或错误。因此, 本实验采用 HPGPC-ELSD 法监测多糖水解程度, 比较了两种全水解条件下麦冬多糖的单糖组成。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, PL-ELS 1000 蒸发光散射检测器(英国 Polymer 公司), LC-5A

液相色谱泵, CTO-2A 柱温箱, RF-530 荧光检测器(日本岛津公司), N2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所), Shodex Sugar KS-802 色谱柱(日本昭和电工株式会社)。

浙麦冬(产地: 浙江慈溪), 经上海中医药大学生药教研室鉴定。DEAE Sepharose™ Fast Flow, Sephadex G25 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 瑞典); 盐酸胍(上海化学试剂公司); 果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖对照品为 Fluka 产品。

### 2 实验方法

2.1 麦冬总多糖的提取: 取干燥麦冬块根 1 kg, 压扁, 水煎 3 次(每次加 10 倍量水, 每次煮沸 0.5 h), 合并水提液并减压浓缩至 1 g/mL, 加乙醇至乙醇体积分数为 80%, 静置过夜, 倾去上清液, 沉淀冷冻干燥, 即得(得率约为药材的 25%)。

2.2 麦冬多糖(POJ)的分离纯化: 取麦冬总多糖, 稀释 15 倍,  $1 \times 10^4$  相对分子质量膜超滤, 压力为 0.3 MPa, 取相对分子质量小于  $1 \times 10^4$  部分, 依次上 DEAE Sepharose 柱和 Sephadex G25 柱, 水洗脱, 蒽酮-硫酸法检测, 合并峰位, 冷冻干燥, 即得(得率约为总多糖的 35%)。

收稿日期: 2004-12-29

作者简介: 林 晓(1974—), 男, 福建莆田人, 博士, 讲师, 主要从事中西药药剂学研究。

\* 通讯作者 徐德生 Tel: (021) 51322493 E-mail: duotang@163.com

2.3 POJ 质量分数鉴定方法:用高效液相色谱法测定,色谱条件:色谱柱为 Shodex Sugar KS-802;流动相为水;体积流量为 1 mL/min;检测器为蒸发光散射检测器(ELSD)。

2.4 全水解

2.4.1 测定方法:用柱后荧光衍生化方法测定。测定条件参照文献报道方法<sup>[3]</sup>作适当修改。色谱柱:Lichrosorb 5 NH<sub>2</sub> 柱串联 Hypersil APS2 柱;流动相:85%乙腈水溶液;体积流量:0.6 mL/min;衍生化试剂:50 mmol/L 盐酸胍的 0.2 mol/L NaOH 溶液,体积流量:0.3 mL/min;柱温:室温;反应温度:80 ℃。

2.4.2 样品处理方法:POJ 经 0.05 mol/L 三氟乙酸(TFA) 110 ℃封管水解 2、3、4、5 或 6 h,或 2 mol/L TFA 110 ℃封管水解 2 h,水解液减压浓缩至干,再加甲醇 3 mL,蒸干,重复 3 次,以除尽 TFA。加少量水溶解水解产物,过 0.45 μm 微孔滤膜,取滤液 20 μL 用于液相分析,与果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖对照品的色谱图比较确定单糖的种类。

3 结果与讨论

麦冬总多糖与 POJ 的色谱图见图 1,可见 POJ 为相对分子质量均一的多糖,POJ 经完全水解后可检测到果糖和葡萄糖(图 2)。果糖和葡萄糖经 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 110 ℃封管处理 2 h,前者呈黄褐色,色谱峰高较处理前减小了 38.5 倍,后者仅略显淡黄色,色谱峰高仅较处理前减小了 4.6 倍,说明在此处理条件下果糖、酮糖大部分脱水成糠醛衍生物,而葡萄糖、醛糖则较稳定。POJ 水解条件为 2 mol/L TFA 110 ℃封管水解 2 h 时,所得水解产物也呈黄褐色,说明水解产物果糖已大部分被破坏,此时果糖与葡萄糖的色谱峰高比推算出的两单糖摩尔比为 1.16 : 1 (图 2-B),已不能代表它们在 POJ 中所占的比例。当水解条件为 0.05 mol/L TFA 110 ℃封管水解 5 h 时,Shodex Sugar KS-802 凝胶柱分析表明 POJ 已完全水解(图 1-C),所得水解产物仅略显淡黄色,此时的色谱峰高比可近似地代表果糖和葡萄糖在 POJ 中所占的比例,经计算得 POJ 中果糖与葡萄糖的摩尔比为 35 : 1(图 2-C),可见 POJ 为一果聚糖。

POJ 按《中国药典》2000 年版附录 VH 法测得的数均相对分子质量为 3 400,重均相对分子质量为 4 800,峰尖相对分子质量为 5 000。POJ 的 IR 图(图 3)呈典型的多糖吸收特征,在波数 933 cm<sup>-1</sup>和 820

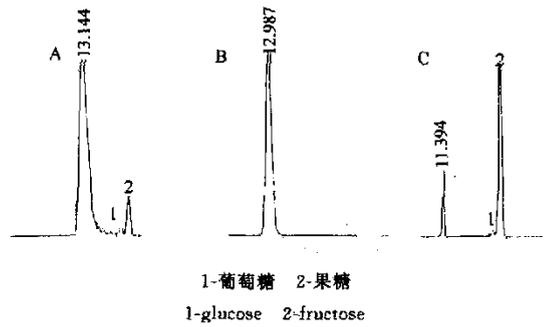
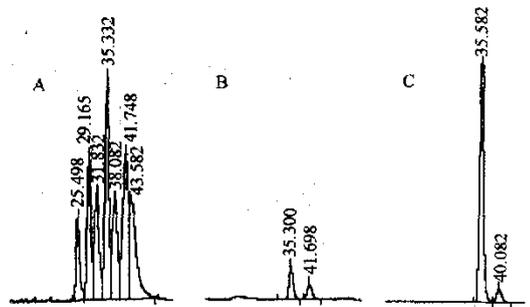


图 1 麦冬总多糖(A)、POJ (B)和 POJ 经 0.05 mol/L TFA 110 ℃水解 5 h 产物(C)的 Shodex Sugar KS802 柱分离-ELSD 检测图谱

Fig. 1 Chromatograms of crude polysaccharides of *O. japonicus* (A), POJ (B), and POJ hydrolyzed by 0.05 mol/L TFA at 110 ℃ for 5 h (C) determined by Shodex Sugar KS802 as column, ELSD as detector



从左至右依次为:鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖  
From left to right: rhamnose, xylopyranose, arabinose, fructose, mannose, glucose, galactose

图 2 混合对照品(A)、POJ 经 2 mol/L TFA 110 ℃水解 2 h 产物(B)和 POJ 经 0.05 mol/L TFA 110 ℃水解 5 h 产物(C)的 Lichrosorb 5 NH<sub>2</sub> 柱串联 Hypersil APS2 柱分离柱后荧光衍生化检测图谱

Fig. 2 Chromatograms of seven types of monosaccharose reference substance (A), POJ hydrolyzed by 2 mol/L TFA at 110 ℃ for 2 h (B), and POJ hydrolyzed by 0.05 mol/L TFA at 110 ℃ for 5 h (C) determined by using Lichrosorb 5 NH<sub>2</sub> and Hypersil APS2 as columns with postcolumn fluorescence derivatization

cm<sup>-1</sup>的吸收峰为果聚糖特有的吸收信号,进一步证明该多糖为一果聚糖<sup>[4]</sup>。POJ 的<sup>1</sup>H-NMR 谱(图 4)中在异头氢区无强信号,这再次说明该多糖为果聚糖,因为果糖是酮糖,其 2 位异头碳上没有质子。氢谱中有一个较弱的异头信号,来源于 POJ 中的微量葡萄糖基。该葡萄糖基可能位于 POJ 的还原末端,

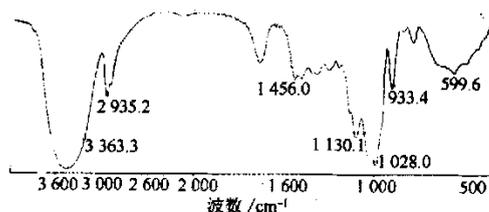


图 3 POJ 的 IR 图谱

Fig. 3 IR spectrum of POJ

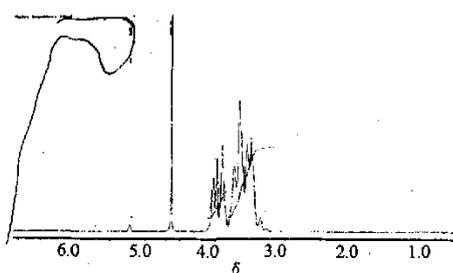


图 4 POJ 的 ¹H-NMR 图谱

Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of POJ

因为这在果聚糖中较为常见。

References:

[1] Zhou Y H, Xu D S, Feng Y, et al. Effects on nutrition blood flow of cardiac muscle in mice by different extracts in *Radix Ophiopogonis* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2003, 9 (1): 22-24.  
 [2] Xu D S, Feng Y, Zhou Y H, et al. Active components of polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* on acute myocardial ischemia [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26 (10): 832-837.

[3] Huang Y, Washio Y, Hara M, et al. Simultaneous determination of dermatan sulfate and oversulfated dermatan sulfate in plasma by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization [J]. *Anal Biochem*, 1996, 240: 227-234.  
 [4] Zhang W J. *Biochemical Technology of Compound Polysaccharide* (复合多糖生化技术) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987.

## 树脂法分离纯化喜树果中喜果苷的研究

欧来良<sup>1</sup>, 王瑞芳<sup>2</sup>, 史作清<sup>1\*</sup>, 仇农学<sup>2</sup>

(1. 南开大学 生物活性材料教育部重点实验室, 分子生物研究所, 天津 300071;  
 2. 陕西师范大学 食品系, 陕西 西安 710004)

自从 1966 年 Wall 等首次从喜树中分离出喜树碱并发现其具有显著抗癌活性后<sup>[1]</sup>, 至今已有 20 多种化学成分从中分离出来, 包括喜树碱 (camptothecine, CPT)、10-羟基喜树碱、11-羟基喜树碱、10-甲氧基喜树碱、喜树次碱、白桦脂酸、喜果苷 (vincoside-lactam VCS-LT) 等<sup>[2,3]</sup>。人工合成也取得了可喜的进展<sup>[4]</sup>。研究发现喜树果中喜果苷明显高于喜树碱及其他类似物<sup>[5]</sup>。目前由喜树果中分离提取喜果苷采用溶剂萃取和氧化铝柱色谱法, 过程复杂, 收率很低, 且尚处于实验室阶段。大孔树脂具有理化性质稳定、吸附选择性独特, 吸附效率高、易再生等优点。本实验采用树脂吸附分离法从喜树果中分离纯化喜果苷。

### 1 材料与仪器

乙腈 (色谱纯), 喜树果由四川雅达药业公司提供, 产地为广西, 经鉴定符合《广西中药材标准》1990 年版“喜树果”项下规定; 喜树碱对照品 (质量分数为

98%, ACROS organics); 喜果苷对照品 (自制, 质量分数 > 98.5%); ME-1、ME-3 树脂 (天津欧瑞生物科技有限公司)。

Waters484 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), HL-2 恒流泵 (上海沪西仪器厂), BSZ-2 型部分收集器 (上海沪西仪器厂), THZ88-1 台式多用恒温振荡器 (江苏太仓鹿河生化仪器厂), 真空干燥箱 (天津实验仪器厂), DT-100A 型分析天平 (北京光学仪器厂)。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 30% 乙腈水溶液; 体积流量: 0.8 mL/min; 紫外检测波长: 256 nm。

#### 2.2 标准曲线的制备

2.2.1 喜果苷标准曲线的制备: 精密称取喜果苷对照品 10.2 mg, 用 50% 乙醇溶液定容于 50 mL 量瓶中。精密吸取 0.5、1.2、2.4、8 mL 此溶液分别置于 10

收稿日期: 2005-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29974015)

作者简介: 欧来良, 男, 讲师。Tel: (022) 23500660 E-mail: ouyll@nankai.edu.cn

\* 通讯作者 史作清