

## 四物汤中多糖部位的分离和相对分子质量分布测定

王玉华<sup>1</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 容蓉<sup>3</sup>, 袁久荣<sup>3\*</sup>

(1. 内蒙古医学院药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古药品检验所, 内蒙古 呼和浩特 010020;

3. 山东中医药大学 天然药物省重点实验室, 山东 济南 250014)

四物汤(SWT)是补血调血的基本方剂,由熟地黄、当归、白芍、川芎4味药组成,方中熟地滋阴补血为主药,辅以当归补血养肝、和血调经,白芍和营养肝,川芎活血行滞。四物汤中多糖所占比例较大,是主要有效成分之一。四物汤中多糖主要来自熟地黄和当归<sup>[1-3]</sup>。近年来的研究发现,熟地和当归中的多糖具有抗肿瘤、补血活血、增强免疫和抗放射性损伤等作用,预示良好的应用前景。本实验对四物汤中的多糖进行了分离纯化和分析鉴定,并采用凝胶HPLC法对不同多糖部位的相对分子质量分布进行了测定,为四物汤有效部位的确定奠定理论基础。

### 1 仪器和试剂

760CRT 双光束紫外可见分光光度计(上海分析仪器总厂);Mettler AE 240 电子天平(瑞士);电热恒温水浴锅(上海医疗器械三厂);真空减压干燥器(上海分析仪器总厂);IR-440 型红外分光光度计(日本岛津);RID-2A 示差折光检测器(日本岛津);LC-6A 液相色谱仪(日本岛津);CBL Model 100 恒温柱箱(菲罗门);ALL Chrom plus Client/Server SEC 专用软件。

右旋糖苷(中国药品生物制品检定所)、D<sub>0</sub> M180(批号:140637-2000-01);D<sub>1</sub> M2500(批号:140638-2000-01);D<sub>2</sub> M4600(批号:140639-2000-01);D<sub>3</sub> M7100(批号:140640-2000-01);D<sub>4</sub> M21400(批号:140642-2000-01);D<sub>5</sub> M130000(批号:140645-2000-01)。

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 均购自济南建联中药店,经姚庭芝主任药师鉴定。

### 2 方法与结果

2.1 粗多糖的提取:按四物汤处方(熟地黄 15 g、当归 10 g、白芍 10 g、川芎 6 g)称取药材 205 g,加水浸泡,加热提取两次,时间分别为 1 h 和 0.5 h。合并提取液,离心,上清液滤过,滤液浓缩至相对密度为

1.05~1.10(60℃),加入乙醇使体积分数达 80%,搅匀,冷处静置 24 h。沉淀于 60℃减压干燥。

2.2 粗多糖的净化和部位分离:取以上的粗多糖以水溶解(每毫升相当于 2 g 药材)转入锥形瓶中,用 Sevag 法去蛋白处理 5 次,分取水层,调至相对密度为 1.05~1.10(60℃),加入乙醇使体积分数达到 30%,搅匀,密闭,冷处静置 24 h,分取沉淀,依次用无水乙醇、丙酮洗涤,于 60℃减压干燥,获 T30 部位;分取 T30 部位上清液,加入乙醇使体积分数达 50%,其他操作同 T30 的制备,获 T50 部位;分取 T50 部位上清液,加入乙醇使体积分数达 75%,其他操作同 T30 的制备,获 T75 部位。

2.3 多糖部位的 IR 测定:T30、T50 和 T75 部位的红外光谱图显示,在 3 200~3 500 cm<sup>-1</sup> 有较宽的宽峰,证明有羟基且形成了氢键缔合,在 900~1 200 cm<sup>-1</sup> 有较弱的 ν<sub>C-O</sub> 峰,在约 2 900 cm<sup>-1</sup> 处显示弱的 ν<sub>C-H</sub> 峰。各个多糖部位的红外光谱图均显示较强的糖类特征。

### 2.4 相对分子质量分布测定

2.4.1 色谱条件:SHODEX OHPAK SB-804 HQ 凝胶高效液相色谱柱(8 mm×300 mm),相对分子质量排阻范围 3×10<sup>5</sup>;流动相:0.7% 硫酸钠水溶液;体积流量:0.5 mL/min;柱温:35℃;进样量:20 μL;灵敏度:0.5 AUFS。

2.4.2 标准曲线的制备:取已知相对分子质量的标准多糖 Dextran 各 50 mg,置 5 mL 量瓶中,分别加流动相稀释至刻度。分别精密吸取各溶液 20 μL,注入高效液相色谱仪。以相对分子质量(Y)的对数为纵坐标,保留时间(X)为横坐标,进行回归分析,绘制两条标准曲线。测定低相对分子质量多糖标准曲线的回归方程:lg Y = 10.531 - 0.390 X, r = 0.999 7,相对分子质量在 180~7 100;测定高相对分子质量多糖标准曲线的回归方程:lg Y = 8.105 - 0.252 X, r = 0.991 0,相对分子质量在 4 600~130 000。

2.4.3 四物汤各多糖部位的相对分子质量分布测定:称取供试品约 50 mg,置 5 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液。吸取供试品溶液 20  $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,在与标准曲线制备完全相同的条件下测定,根据保留时间从曲线上查出多糖相对分子质量的对数值,再求出相对分子质量( $M_r$ )。结果见表 1。

表 1 四物汤中多糖部位的相对分子质量分布( $n=4$ )

Table 1 Distribution of relative molecular weight about SWT polysaccharides position ( $n=4$ )

供试品	保留时间/ min	各峰所占 比例/%	lg $M_r$	$M_r$
T30	12~18	馒头峰	5.081~3.511	120 503~3 243
	18.233	5.190	3.420	2 631
	19.350	94.81	2.985	966
T50	14.870	19.20	4.358	22 803
	16.814	31.38	3.868	7 379
	19.400	49.01	2.965	923
	23.330	0.41	1.432	27.04
T75	19.350	97.97	2.985	966
	23.278	2.03	1.453	28.38

### 3 讨论

3.1 四物汤的多糖部位分成 3 个部分,分别为 T30、T50 和 T75。本实验的目的是确定多糖的有效

部位,因而不需要特别强调分离出分布均一的多糖组分。结果可见,3 个部位均为不同相对分子质量的混合体。

3.2 相对分子质量为近 1 000(保留时间约为 19 min)的低相对分子质量多糖在 3 个部位中均有分布,但分布随乙醇沉淀的体积分数的增加而趋于集中。

3.3 T50 和 T75 部位均在约 23 min 时有一小峰,该成分的相对分子质量约为 27,是非糖类的杂质产生的峰。

3.4  $(2.5\sim 12)\times 10^4$  高分子多糖分布在 T30 部位,  $2.5\times 10^4$  以下的高分子多糖分布在 T50 部位,各部位的活性及四物汤多糖有效部位的确定有待于药效学试验做出结论。

### References:

- [1] Shang P, Yang T H, Jia M, et al. The separation, purification and identification of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Acta J Fourth Med Univ PLA* (第四军医大学学报), 2001, 22(14): 1311-1314.
- [2] Ni M Y, Bian B L. Survey on the study about *Rehmannia glutinosa* Libosch. chemistry composition [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1989, 14(7): 425-427.
- [3] Cui Y. Advances in study on pharmacology about *Rehmannia glutinosa* Libosch. polysaccharide [J]. *China J Nat Med* (中国自然医学杂志), 2000, 9(3): 186-188.

## 迷迭香化学成分研究

程伟贤<sup>1</sup>, 陈鸿雁<sup>2</sup>, 张义平<sup>2</sup>, 高树鹏<sup>1</sup>, 陶云海<sup>1</sup>, 古 昆<sup>1\*</sup>

(1. 云南大学 应用化学系生物制药创新人才培养基地, 云南 昆明 650091; 2. 云南警官学院, 云南 昆明 650223)

迷迭香 *Rosmarinus officinalis* L. 系唇形科迷迭香属植物,是目前公认的具有较高抗氧化作用的一种植物。20 世纪 60 年代末和 70 年代初先后由德国和日本科学家从迷迭香中分离出具有高效抗氧化能力的成分<sup>[1]</sup>。中国科学院植物研究所于 1981 年成功地引种了迷迭香,通过 CO<sub>2</sub> 超临界萃取法从迷迭香的茎叶中萃取出了芳香油,提取出了食用抗氧化剂(rosemary antioxidant,简称 Rao)<sup>[2]</sup>。迷迭香中的抗氧化成分主要为迷迭香酚、表迷迭香酚,异迷迭香酚、迷迭香酸及黄酮、黄酮苷等成分。

对于迷迭香的研究,国外已有大量文献报道和专利,但国内对迷迭香化学成分及相关报道较少,迄

今未见系统研究迷迭香化学成分的报道。本课题组从云南玉溪地区引种栽培的植物迷迭香中分离得到了 15 个化合物,运用现代波谱技术分析,确定其结构为:迷迭香酚(I)、7-甲氧基迷迭香酚(II)、鼠尾草酸(III)、鼠尾草酚(IV)、对甲氧基没食子酸(V)、丹皮酚(VI)、乌索酸(VII)、黄芩苷(VIII)、槲皮素(K)、山柰酚-3-O-葡萄糖苷(X)、6,7-二甲氧基-5,4'-二羟基黄酮醇-3-O-葡萄糖苷(XI)、木樨草素(XII)、芹菜素-7-O-葡萄糖苷(XIII)、3'-甲氧基-5,4'-二羟基黄酮-7-O-葡萄糖苷(XIV)、木樨草素-7-O-葡萄糖苷(XV)。

### 1 实验原材料及仪器

收稿日期:2005-02-14

基金项目:云南省省院省校合作项目(2000YK01)

作者简介:程伟贤(1979-),男,云南楚雄人,博士研究生,从事生物有机化学研究。

\* 通讯作者 古 昆 Tel:(0871)5034623 E-mail:gukun@ynu.edu.cn