

FeCl₃ 反应阳性, 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 薄层酸水解检测有葡萄糖, 提示为黄酮苷类化合物。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 256, 332 (MeOH)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ : 12.63 (1H, s, OH-5), 10.83 (1H, s, OH), 9.68 (1H, s, OH), 9.18 (1H, s, OH), 7.58 (2H, m, H-2', 6'), 6.85 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-6), 5.46 (1H, d, $J=7.2$ Hz, glu H-1), ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ : 177.4 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-9), 156.2 (C-2), 148.4 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.6 (C-6'), 121.1 (C-1'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-2'), 104.0 (C-10), 98.6 (C-6), 93.5 (C-8), 100.9 (glu-C-1), 77.5 (glu-C-5), 76.5 (glu-C-3), 74.1 (glu-C-2), 69.9 (glu-C-4), 60.9 (glu-C-6)。将该化合物碳氢谱数据准确归属, 鉴定此化合物为异槲皮苷。该化合物首次从蓝萼香茶菜中分离得到。

化合物 VI: C₂₇H₃₆O₁₆, 黄色粉末, mp 190~192 °C。易溶于甲醇。FeCl₃ 反应阳性, 盐酸-镁粉反应阳

性。Molish 反应阳性, 提示为黄酮类化合物。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 259, 359。经与芦丁对照品薄层比较, R_f 值及显色行为一致, 鉴定此化合物为芦丁。

References:

- [1] Kim D, Chang R, Shen X Y. Diterpenoids from *Rabdosia japonica* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(2): 697.
- [2] Gui M Y, Ji Y R, Wang B Z. Chemical constituents of *Rabdosia japonica* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, 34(8): 516-518.
- [3] Gui M Y, Ji Y R, Wang B Z, et al. Chemical constituents of *Rabdosia japonica* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35(6): 374-375.
- [4] Yang X W, Zhao J. Studies on the chemical constituents from *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim) Hara [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(6): 490-493.
- [5] Zhang B, Long K, Jiang Y Y. Effects of glaucocalyxin A on PAF biosynthesis and arachidonic acid metabolism in washed rabbit platelets [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1992, 6(1): 52-55.
- [6] Zhang B, Long K. Effects of glaucocalyxin A on aggregation and cAMP levels of rabbit platelets *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1993, 14(4): 347-350.
- [7] Liu L D, Zhang T Z, Yang H, et al. Effects of varglaucoalyx on c-fos gene expression during global myocardial ischemia-reperfusion in rat [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(4): 358-361.

不同生长年限栽植黄芪中黄芪多糖的量、相对分子质量及 对人外周血 T 细胞增殖的影响

张善玉, 康东周, 朴惠善

(吉林省延边大学医学院, 吉林 延吉 133000)

黄芪是一种常用中药, 具有补气升阳、固表止汗、托脓排毒和生肌的功效^[1]。近年来研究发现黄芪中除黄芪皂苷、黄酮类等小分子化学成分具有较强的生物活性外, 大分子化学成分如黄芪多糖 (*Astragalus Polysaccharide*, APS) 也具有增强免疫功能、抗肿瘤、降血糖等多种生物活性^[2,3], 已广泛用于保健和医学领域。本实验对不同生长年限的栽植黄芪中黄芪多糖进行量和相对分子质量的测定, 并观察对人外周血 T 细胞增殖的影响, 为黄芪的栽培、采集提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器: LC-10AT 高效液相色谱仪 (日本岛津); RID-10A 示差检测器 (日本岛津); GPCW 32.6.11 色谱数据处理工作站 (北京龙智达公司); SB-804 hQ 凝胶色谱柱 (日本岛津); RT-2100C 型酶标仪

(美国 Rayto 公司); TC-2323 型 CO₂ 培养箱 (美国 Sheldon Manufacturing 公司); LDZ5-2 型离心机 (北京医用离心机厂)。

1.2 材料: 不同生长年限栽植黄芪, 均在 2003 年 10 月末采集于吉林省和龙市, 由吉林省延边大学医学院生药学教研室吕惠子副教授鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.); 葡聚糖 (Dextran) 系列对照品购于中国药品生物制品检定所; 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 华美生物工程公司北京分公司); 植物血凝素 (PHA, 广州市医药工业研究所); 二甲基亚砜 (DMSO) 等其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 黄芪多糖提取: 分别称取干燥粉碎的不同生长年限 (一年生、二年生、三年生) 黄芪药材 100 g, 加水

(20 倍、10 倍、10 倍), 80 ℃ 下提取 3 次(2、1、1 h), 滤过, 滤液浓缩至约 200 mL, 加 95% 乙醇至醇度达 80%, 放置过夜, 沉淀加水溶解, 滤过, 经 Sevag 法^[4]除蛋白 7 次, 用氨水调 pH 至 8, 加 3% 过氧化氢后放置 37 ℃ 水浴 12 h, 滤过, 滤液置透析袋中流水透析 12 h, 液体浓缩再醇沉, 放置过夜, 沉淀用无水乙醇和丙酮洗涤, 干燥, 得到 3 种类白色的黄芪多糖, 即一年生黄芪中提取的黄芪多糖(APS-1)、二年生黄芪中提取的黄芪多糖(APS-2)和三年生黄芪中提取的黄芪多糖(APS-3)。

2.2 黄芪多糖测定: 采用硫酸-苯酚法^[5]测定 APS-1、APS-2 和 APS-3 多糖的量, 并计算干燥药材含多糖的量(mg/g)。

2.3 黄芪多糖相对分子质量测定

2.3.1 GPC 色谱条件: 色谱柱: 凝胶色谱柱; 工作站: 龙智达 GPCW 32.6.11; 流动相: 0.7% 硫酸钠溶液; 体积流量: 0.5 mL/min; 柱温: 36 ℃; 进样体积: 20 μ L。

2.3.2 柱的标定: 将相对分子质量为 10 000、21 400、41 100、84 400 和 133 800 的葡聚糖分别配制 0.5% 溶液; 照 2.3.1 项色谱条件, 由小分子到大分子依次进样, 每个样品平行进样 3 次, 正确记录各样品的相应保留时间 t_R 和色谱图。

2.3.3 黄芪多糖相对分子质量及其分布测定: 分别称取 APS-1、APS-2 和 APS-3 各 20 mg, 加 2 mL 流动相溶解, 放置过夜, 滤过; 照 2.3.1 项色谱条件, 进样测定。

2.4 对人外周 T 细胞增殖反应的影响(MTT 法)^[6]: 取正常人抗凝外周血 30 mL, 按常规分离淋巴细胞, 用完全培养液调整细胞的密度为 1×10^6 / mL, 台盼蓝染色检测细胞存活率 > 95%。取 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板中, 加入终质量浓度为 10 μ g/mL PHA, 并按实验分组加入 APS-1、APS-2 和 APS-3 溶液或生理盐水(同时每组分别以培养液代替细胞液作为空白对照), 每组设 3 个复孔, 置 37

℃、5% CO₂ 培养箱中培养。48 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)10 μ L, 继续培养 4 h, 离心, 弃上清液, 加入 DMSO 150 μ L, 充分振荡后静置 20 min, 用酶标仪于波长 490 nm 处测定吸光度(A)值, 结果以 3 个复孔的平均 A 值和细胞增殖百分率表示。(细胞增殖率 = 实验组 A / 对照组 A $\times$ 100%)。

3 结果

3.1 不同生长年限黄芪中黄芪多糖的量: 不同生长年限黄芪中黄芪多糖的量分别为: 一年生 32.13 mg/g, 二年生 23.42 mg/g 和三年生 16.86 mg/g。

3.2 标样与保留时间: 各标样的相对分子质量与 HPLC 的保留时间综合见表 1。以 t_R 为横坐标, 标样相对分子质量的常用对数(log Mw)为纵坐标, 得回归方程: $\log Mw = -0.344 1 t_R + 10.142 3$ ($r = 0.999 8$)。

表 1 各标样的保留时间($n=3$)

Table 1 Retention time of standard substances ($n=3$)

样品相对分子质量	t_R /min	log Mw
10 000	17.897	3.99
21 400	16.87	4.33
84 400	15.14	4.92
133 800	14.61	5.13

3.3 不同生长年限黄芪中黄芪多糖的相对分子质量及其分布: 对 APS-1、APS-2 和 APS-3 进行 GPC 测定, 所得相对分子质量分布图谱, 如图 1, 分别以 A 区+B 区和 B 区为计算区间计算得到的相对分子质量如表 2; 对不同生长年限黄芪中黄芪多糖的 GPC 图谱进行综合解析, 如表 3。

GPC 色谱图所示, APS-1、APS-2 和 APS-3 主

表 2 不同生长年限黄芪中黄芪多糖相对分子质量

Table 2 Molecular weights of GPC from *A. membranaceus* growing for various years

样 品	重均相对分子质量(Mw)	
	A 区+B 区	B 区
APS-1	160 836	70 630
APS-2	129 028	60 163
APS-3	90 355	31 718

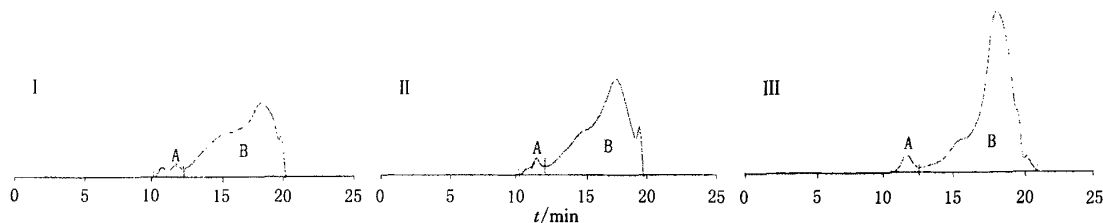


图 1 一年生(I)、二年生(II)、三年生(III)黄芪中提取的黄芪多糖 GPC 色谱图

Fig. 1 GPC Chromatogram of APS from *A. membranaceus* growing for annual (I), biennial (II), and triennial (III)

表 3 不同生长年限黄芪中黄芪多糖 GPC 图谱综合解析
Table 3 Synthetical analysis of GPC of APS from *A. membranaceus* growing for various years

保留时间 /min	峰位相对分 子质量/ $\times 10^4$	相对质量分数		
		APS-1	APS-2	APS-3
10~12	>30	6.07	6.05	5.51
15~16	3~8	42.66	25.00	8.16
17~18	0.8~1	47.10	62.99	84.4
19~20	0.2~0.3	4.35	5.25	2.29

要由 3.0×10^5 以上相对分子质量范围的多糖(A区)和 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 相对分子质量范围的多糖(B区)组成,而B区面积远远大于A区。结果表明,随着生长年限的增加多糖相对分子质量降低,三年生的较一年生和二年生将近减少 50%。

3.4 不同生长年限黄芪中黄芪多糖对人外周 T 细胞增殖反应的影响:用 MTT 法测定结果,正常人外周 T 细胞在 PHA 激活的条件下,APS-1、APS-2 和 APS-3 各组的淋巴细胞 A 值与增殖率均较生理盐水组有增高的趋势,其中 APS-1 的 25 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、APS-2 的 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组及 APS-3 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 A 值显著高于生理盐水组,而且 APS-1、APS-2 和 APS-3 的增殖率较高的组分别为 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,表明生长年限越少质量浓度越低。

4 讨论

不同产地、不同生境和不同生长年限均是影响黄芪化学成分的因素^[7],本研究中不同生长年限栽植黄芪中黄芪多糖量差异很大,一年生中含的量较三年生高 1 倍多;另外,生长年限对黄芪多糖的相对分子质量也有非常大的影响,随着生长年限的增长相对分子质量降低,一年生中 $3 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 的多糖偏多,三年生中 1 万左右的多糖占 80% 以上。

多糖的活性与其相对分子质量有一定关系,不同的多糖产生生物活性有其最佳相对分子质量范围^[8,9]。本研究结果来看,各年生黄芪中黄芪多糖对人淋巴细胞的增殖均有促进作用,但有一定的差异,各年生黄芪中的黄芪多糖增殖率高低依次为 APS-1 (144.56%) > APS-2 (139.14%) > APS-3 (133.43%),产生最高效率的质量浓度为 APS-1 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < APS-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < APS-3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。提示一年生黄芪中的黄芪多糖免疫活性成分可能较高,由相对分子质量分布情况分析时,相对分子质量在 $3 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 的黄芪多糖可能是最重要的免疫活性成分。

近年来,国内外学者在对黄芪扶正固本的医药研究过程中,发现黄芪多糖具有显著增强机体免疫、扩张冠状动脉、改善心肌功能、增强抗氧化能力、防止脂质过氧化、改善肾脏功能、防止肝糖原减少、抗衰老等多种功能^[3],黄芪多糖具有调节机体免疫功能及抗肿瘤作用已得到学术界的普遍认可。21 世纪的医学模式将从治疗型向预防型转变,天然药物免疫促进剂和调节剂的研究和应用越来越受到重视,黄芪多糖将具有广泛的应用前景。在进行实验时,也测定了不同生长年限黄芪的根平均质量(一年生、二年生和三年生分别为 4.55、11.77 和 18.80 g/根),并按相同栽植密度(33.3 万株/ hm^2)^[10]估算了 6 年内可获得的多糖产量(多糖产量=多糖的质量 $\times$ 平均根质量 $\times$ 栽植密度 $\times$ 采集次数),结果,一年生、二年生和三年生中可获得的多糖分别为 292.1、275.4 和 208.8 kg/hm^2 ,如果再考虑一年生和/或二年生平均根质量和粗细时,完全可以增加栽植密度并提高产量。认为以黄芪多糖的利用为主要目的时可考虑利用一年生和/或二年生的黄芪,尤其是保健食品的开发中一年生和/或二年生黄芪的利用也许会带来更好的经济和社会效益。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 2000.
- [2] Zhang X M. The progress in the study on immunoloregulate effect and anti-tumor of *Astragali* Polysaccharide [J]. *J Dalian Univ* (大连大学学报), 2003, 24(6): 101-104.
- [3] Chen Q, Liu J C. The progress in the study on ginseng, *Astragali* and *Lycium barbarum* polysaccharide [J]. *J Huainan Teach Coll* (淮南师范学院学报), 2001, 3(2): 39-41.
- [4] Yang Y J, Jiang D Z, Chen H Y, et al. Study on chemical composition of *Hericium erinaceus* polysaccharide HEP-2 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16(3): 194-197.
- [5] Ma L, Ma Q, He Y L, et al. Determination of polysaccharide in *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodea*, *Astragali* and *Lucium barbarum* extracts [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 167-168.
- [6] Lin Z N, Dong S Z, Dong S Y, et al. Methodological study on detecting proliferation of T lymphocytes by MTT assay [J]. *Chin J Healt Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2000, 10(1): 8.
- [7] Zhang Q Z, Wu X J, Liu D, et al. Study on factors of affecting the amounts of active components of *Astragali* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(4): 314-315.
- [8] Gao X L, Liu P X. The Progress in the study on structure-activity rationshiop of polysaccharide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 229-231.
- [9] Deng J X, Li X B. The progress in the study on structure-activity rationshiop and anti-tumor of polysaccharide [J]. *Chin New Med* (中华新医学), 2004, 5(2): 141-142.
- [10] Zhang D X. Effect of planting desity on *Astragali* yields and profit [J]. *Gansu Sci Technol* (甘肃科技), 2003, 32(1): 44.