

致谢:沈阳药科大学代测核磁共振谱,辽宁中医药大学药学院中心实验室和有机教研室代测紫外和熔点。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.  
 [2] Mahato S B, Sahu N P, Pal B C. Constituents of *Euphorbia pulcherrima* Willid. [J]. *J Indian Chem Soc*, 1997, 54(4): 388-390.  
 [3] Okabe H, Miyahara Y, Yamauchi T, et al. Studies on the constituents of *Momordica charantia* L. III. Isolation and characterization of new cucurbitacin glycosides of the immature fruits. (1). Structures of momordicodiosides G, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and I. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(11): 3977-3986.

[4] Miyahara Y, Yamauchi T, Okabe H, et al. Studies on the constituents of *Momordica charantia* L. IV. Characterization of the new cucurbitacin glycosides of the immature fruits. (2). Structures of the bitter glycosides, momordicosides K and L [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(12): 4334-4340.  
 [5] Fatope M, Takeda Y, Yamashita H, et al. New cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(6): 1491-1497.  
 [6] Sucrow W. Über sterlinglucoside und ein neues stigmastadienol aus *Momordica charantia* L. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1965, 26: 2217.  
 [7] Si L H, Zhao Y Q. Isolation and identification of hypoglycemic constituents from *Momordica charantia* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 27(12): 922-923.  
 [8] Xiao Z Y, Chen D H, Si J Y, et al. Studies on chemical constituents of *Momordica charantia* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(8): 571-573.

## 海藻海蒿子褐藻糖胶的分离与组成分析

魏晓蕾, 王长云\*, 刘斌, 方玉春, 顾谦群, 张姗姗, 康凯

(海洋药物教育部重点实验室 中国海洋大学海洋药物研究所, 山东 青岛 266003)

**摘要:**目的 以海藻海蒿子为原料制备褐藻糖胶,并对不同的提取、分离方法进行比较,对多糖的组成和结构进行初步分析。方法 海蒿子脱脂干粉分别经水提取和酸提取以获得粗多糖,粗多糖分别经乙醇沉淀法和 CaCl<sub>2</sub> 沉淀法进行纯化。选取多糖组分 F4 用 Q-Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-200 凝胶柱进行分级分离,高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 鉴定纯度及相对分子质量,气相色谱分析多糖的中性单糖组成。结果 F4 经分级分离得到 3 个级分: P1、P2 和 P3。P1、P2 和 P3 均为均一组分,相对分子质量分别为: 494 400、61 500 和 167 600; P1 由岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖构成,摩尔百分比 43.4 : 33.3 : 6.2 : 4.3 : 12.8; P2 由岩藻糖、木糖、甘露糖和半乳糖构成,摩尔百分比 44.4 : 15.1 : 23.8 : 16.7; P3 由岩藻糖、木糖和半乳糖构成,摩尔百分比 68.9 : 3.7 : 27.4。结论 P1、P2 和 P3 的单糖含量均以岩藻糖为主,但其他单糖组成有较大差别。

**关键词:** 海藻; 海蒿子; 褐藻糖胶

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0011-04

## Isolation and composition analysis of fucoidan from algae *Sargassum pallidum*

WEI Xiao-lei, WANG Chang-yun, LIU Bin, FANG Yu-chun, GU Qian-qun,  
ZHANG Shan-shan, KANG Kai

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Institute of Marine Drugs, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract: Objective** Fucoidans from algae *Sargassum pallidum* were prepared and the composition and structure of the polysaccharides were elucidated. **Methods** Fucoidans were extracted and purified by different methods. The polysaccharide F4 was separated by chromatography on a Q-Sepharose Fast Flow column and a Sephadex G-200 column. The purity and molecular weight of polysaccharides were identified by HPGPC. The monosaccharide composition in the polysaccharides was analyzed by GC. **Results** Three polysaccharide fractions P1, P2, and P3 were obtained from F4. The molecular weight of P1, P2, and P3 were 494 400, 61 500, and 167 600, respectively. GC Analysis showed that all the content of monosaccharide of fucose in P1, P2, and P3 were the highest. P1 was composed of fucose, xylose, mannose, glucose,

收稿日期: 2006-04-13

基金项目: 国家自然科学基金(30572314); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(03BS109)

作者简介: 魏晓蕾(1981—), 女, 硕士研究生。

\* 通讯作者 王长云 Tel: (0532)82031503 E-mail: changyun@ouc.edu.cn

and galactose with a molar percentage ratio of 43.4 : 33.3 : 6.2 : 4.3 : 12.8; P2 was composed of fucose, xylose, mannose, and galactose with a ratio of 44.4 : 15.1 : 23.8 : 16.7; and P3 was composed of fucose, xylose, and galactose with a ratio of 68.9 : 3.7 : 27.4. **Conclusion** The three polysaccharides are mainly composed of fucose, while the other monosaccharides are very different.

**Key words:** algae; *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag.; fucoidan

海藻海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag. 是生长在暖温带水域的褐藻门(Brown algae)马尾藻科(*Sargassaceae*)植物,主产于辽宁、山东沿海。《中华本草》<sup>[1]</sup>中记载,海蒿子性“苦、咸、寒”,归“肝、胃、肾”经,具“软坚散结,消痰利水”之功效,有很高的药用价值。海蒿子中的褐藻糖胶是主要的活性成分之一。现代研究表明,褐藻糖胶具有抗肿瘤、抗病毒、抗血栓、抗氧化、调节血脂、抗辐射和抑制补体激活等多种生理功能<sup>[2]</sup>。复方海藻制剂是用海藻等传统中药,依据中医药组方原理制成的抗肿瘤复方制剂。临床应用显示,该复方可有效配合放疗和化疗治疗肺癌、消化道癌<sup>[3]</sup>。本实验对该复方中君药海藻海蒿子的褐藻糖胶进行分离鉴定,试为海蒿子褐藻糖胶构效关系以及复方物质基础的研究提供参考。

## 1 仪器、试剂及材料

高效液相色谱仪(美国安捷伦 1100 series 型);气相色谱仪(美国 HP5890 SERIESII 型);AKTA FPLC 全自动液相色谱仪(瑞典 Pharmacia Biotech 公司)。

单糖标准品:鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、半乳糖、葡萄糖均为 Sigma 公司产品;Dextran 系列标准品(相对分子质量分别为 5 900、11 800、22 800、47 300、112 000、212 000、404 000、800 000),Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱和 Sephadex G-200 均为瑞典 Pharmacia Biotech 公司产品;其他试剂为国产 AR 级。

海藻海蒿子购自山东鲁南制药厂,产地为威海近海区,经临沂市药品检验所鉴定为马尾藻科植物海蒿子 *S. pallidum* (Turn.) C. Ag.。

## 2 方法

### 2.1 褐藻糖胶的制备<sup>[4]</sup>

2.1.1 酸提法:海蒿子干粉经 90%乙醇回流脱脂 3 次,干燥后得到脱脂藻粉。脱脂藻粉经 0.17 mol/L 稀盐酸(1:10)于 70 °C 提取 2 h,重复 3 次;离心得水提取液,加乙醇至 70%醇沉,4 °C 静置过夜;离心得沉淀,依次用无水乙醇和丙酮冲洗脱水得粗多糖。粗多糖分别经乙醇沉淀法和 CaCl<sub>2</sub> 沉淀法纯化。乙醇沉淀法:粗多糖配成 5%水溶液,加乙醇至 30%,

离心得上清液;加乙醇至 70%,4 °C 静置过夜,离心得沉淀,依次用无水乙醇、丙酮冲洗脱水得多糖。CaCl<sub>2</sub> 沉淀法:粗多糖配成 2.5%水溶液,加 CaCl<sub>2</sub> 至 3 mol/L,离心得上清液,余下步骤同乙醇沉淀法。

2.1.2 水提法:脱脂藻粉经热水(1:10)于 70 °C 提取 2 h,重复 3 次,余下步骤同酸提法。水提粗多糖分别经乙醇沉淀法和 CaCl<sub>2</sub> 沉淀法进行纯化,方法同酸提法。

### 2.2 褐藻糖胶的分级分离

2.2.1 离子交换色谱分离:多糖样品用 Q-Sepharose Fast Flow 凝胶柱(20 cm × 5 cm, V<sub>e</sub> = 300 mL)色谱分离,依次以 0.6、1.2、2.0 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,苯酚-硫酸法跟踪检测,分部收集,透析,浓缩冻干。

2.2.2 凝胶渗透色谱分离:多糖样品用 Sephadex G-200 凝胶柱(100 cm × 3.0 cm)色谱分离,0.2 mol/L NaCl 溶液为洗脱液,苯酚-硫酸法跟踪检测,分别收集主峰,透析,浓缩冻干。

2.3 高效凝胶渗透色谱法测定纯度与相对分子质量<sup>[5,6]</sup>:多糖样品用 Shodex OHPak SB-804 HQ 柱进行分析,0.025% NaN<sub>3</sub> 为流动相,柱温 45 °C,体积流量 0.5 mL/min,示差检测。用 Dextran 系列标准品标定色谱柱,作标准曲线,用公式  $\log Mr = (V_e - V_0)/(V_1 - V_0)$  计算相对分子质量。Mr, 相对分子质量;V<sub>e</sub>, 洗脱体积;V<sub>0</sub>, 柱空体积;V<sub>1</sub>, 柱总体积。

2.4 气相色谱法分析中性单糖组成:多糖样品 5 mg,用 2 mol/L 三氟乙酸 2 mL,105 °C 水解 4 h<sup>[7]</sup>,得完全酸水解样品;经糖腈乙酸酯衍生化<sup>[8]</sup>后,进行气相色谱分析。单糖标准品同法衍生化并气相色谱分析。HP5890 SERIESII 型气相色谱仪;Fused Silica Capillary Column 30 Serial No. QC3 AC225 色谱柱;柱温 210 °C;进样口温度 250 °C;检测器温度:250 °C;氢火焰离子化检测器(FID);载气:氮气。

2.5 其他分析方法:苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>测定总糖质量分数;Lowry 法<sup>[9]</sup>测定蛋白质质量分数;硫酸钡比浊法<sup>[7]</sup>测定硫酸基质量分数。

## 3 结果与讨论

3.1 海蒿子褐藻糖胶的制备和分级分离:褐藻糖胶

是一种水溶性多糖,提取方法主要有酸提法和水提法<sup>[4]</sup>。本实验用这两种方法提取海蒿子褐藻糖胶,分别得到粗多糖 C1 和 C2。C1 分别经乙醇沉淀法和 CaCl<sub>2</sub> 沉淀法纯化得到糖组分 F1 和 F2;C2 同法得到 F3 和 F4。F4 经离子交换色谱分离,得 3 个级分 R1、R2 和 R3,分别经凝胶柱色谱再次分离纯化,得到组分 P1、P2 和 P3(图 1)。

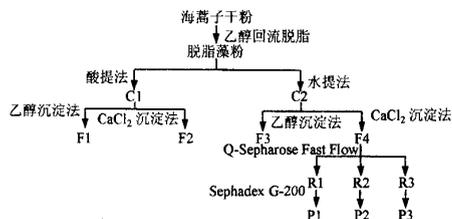


图 1 褐藻糖胶制备和分级分离流程图

Fig. 1 Preparation and separation processing chart of fucoidans from *S. pallidum*

酸提法粗多糖 C1 得率 6.15%(相对于干藻粉),水提法粗多糖 C2 得率 7.08%。酸提法粗多糖 C1 的总糖量较水提法粗多糖 C2 略高,但蛋白量也较高(表 1)。纯化后获得的多糖样品 F1~F4 的总糖量显著提高,蛋白质量有所降低(表 1)。其中,F1 与 F2 的蛋白质量相近,而 F1 较 F2 总糖量高,表明对酸提法粗多糖宜采用乙醇沉淀法进行纯化;F3 与 F4 的蛋白质量相近,而 F4 较 F3 总糖量高,表明对水提法粗多糖宜采用 CaCl<sub>2</sub> 沉淀法进行纯化。由于水提多糖的蛋白量较低,选择组分 F4 进行进一步的分级分离。

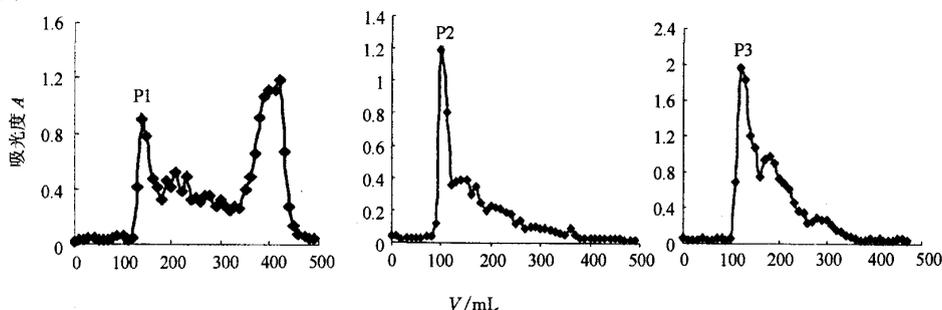


图 3 P1、P2 和 P3 的凝胶色谱图(490 nm)

Fig. 3 Chromatogram of P1, P2, and P3 (490 nm)

### 3.2 相对分子质量与单糖组成分析

3.2.1 相对分子质量测定:经高效凝胶渗透色谱法检测,P1、P2 和 P3 均呈单一对称峰,表明三者纯度较高;由葡聚糖标准曲线求得相对分子质量分别为 494 400、61 500、167 600。

3.2.2 中性单糖组成分析:多糖 P1、P2 和 P3 先经完全酸水解,经糖腈乙酸酯衍生化后进行气相色谱

表 1 多糖样品总糖和蛋白质量分析

Table 1 Analysis of total sugar and protein contents in polysaccharides

提取样品	多糖样品	总糖质量分数/%	蛋白质量分数/%	
提取样品	C1	13.91	10.12	
	C2	12.78	8.73	
	纯化样品	F1	21.16	8.33
		F2	18.54	8.47
F3		15.54	5.83	
F4		18.87	5.47	
分级分离样品	P1	47.66	3.21	
	P2	79.77	1.11	
	P3	68.22	2.59	

F4 经离子交换色谱分离,其 Q-Sepharose Fast Flow 柱色谱图显示 3 个级分 R1、R2 和 R3(图 2);分别经 Sephadex G-200 柱色谱再次分离纯化,得到组分 P1、P2 和 P3(图 3)。P1、P2 和 P3 的总糖量均显著提高,蛋白质的量进一步降低(表 1)。硫酸基质量分数分析显示,P1 硫酸基量最低,为 4.78%;P2 较高,为 15.34%;P3 最高,达 18.71%。

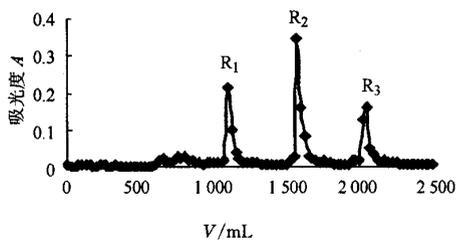


图 2 F4 的离子交换色谱图(Q-Sepharose Fast Flow)

Fig. 2 Chromatogram of F4 on Q-Sepharose Fast Flow

分析。结果表明,3 者的岩藻糖量均为最高。其中,P1 由岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖构成,以岩藻糖和木糖为主,摩尔百分比 43.4 : 33.3 : 6.2 : 4.3 : 12.8;与 P1 相比,P2 不含葡萄糖,以岩藻糖和甘露糖为主,岩藻糖、木糖、甘露糖和半乳糖摩尔百分比 44.4 : 15.1 : 23.8 : 16.7;P3 不含葡萄糖和甘露糖,以岩藻糖和半乳糖为主,岩藻糖、木糖和半

乳糖摩尔百分比 68.9 : 3.7 : 27.4(表 2)。

文献报道<sup>[10]</sup>,褐藻 *S. stenophyllum* 中的褐藻糖胶主要成分为岩藻糖,其次还伴有半乳糖、甘露糖、木糖和少量葡萄糖,其主链为 1→6 连接的半乳糖和 1→2 连接的甘露糖,分支以 1→3 或 1→4 连接的岩藻糖为主,并伴有 1→4 连接的葡萄糖。本研究发发现海蒿子中褐藻糖胶的单糖组成与文献报道<sup>[10]</sup>相似,但相对比值不同。

表 2 P1、P2 和 P3 的单糖组成分析

Table 2 Monosaccharide composition in P1, P2, and P3

多糖样品	岩藻糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
P1	43.4	33.3	6.2	4.3	12.8
P2	44.4	15.1	23.8	—	16.7
P3	68.9	3.7	—	—	27.4

海蒿子是历代沿用的传统中药材海藻的一种,是目前《中国药典》收载的少数几种海洋中药材之一。从海蒿子中分离鉴定褐藻糖胶,对阐明海藻药用作用基础具有重要的学术价值。本实验所得褐藻糖胶的精细结构与生物活性正在测定中。

#### References:

[1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草)

草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.

- [2] Chen H L, Shi F. Study progress on pharmacological activities and mechanism of fucoidan [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2005, 24(6): 485-488.
- [3] Fang Y C, Gu Q Q, Xin X L, et al. Studies on pharmacodynamics of algae preparation [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2000, 78(6): 18-19, 27.
- [4] Zhao Y, Li Z F, Ren S H, et al. The research On the extraction methods of crude polysaccharide from *Sargassum pallidum* [J]. *J Taishan Med Coll* (泰山医学院学报), 2004, 25(5): 429-430.
- [5] Wang Z, Fang J N. Studies on the polysaccharide H3 of *Cuscuta chinensis* Lam [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(3): 192-195.
- [6] Wei Y A, Fang J N. Determination of homogeneity and molecular weight of polysaccharides [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(7): 532-536.
- [7] Jia L M, Fang J N. Main polysaccharide fractions isolated from fruiting bodies of *Hericium erinaceus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 10-12.
- [8] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folinphenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [10] Duarte E R, Cardoso M A, Nosedá M D, et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* [J]. *Carbohydr Res*, 2001, 333: 281-293.

## 狗肝菜的化学成分研究

高毓涛, 杨秀伟, 艾铁民\*

(北京大学药学院, 北京 100083)

**摘要:**目的 对狗肝菜 *Dicliptera chinensis* 全草的化学成分进行研究。方法 采用硅胶柱色谱和制备性薄层色谱进行分离、纯化, IR、NMR 和 MS 等方法进行结构鉴定。结果 从环己烷萃取部分得到 13 个化合物, 分别鉴定为正三十六烷醇(I)、硬脂酸(II)、羽扇烯酮(III)、羽扇豆醇(IV)、谷甾烷-4-烯-3-酮(V)、豆甾烷-5-烯-7-酮-3 $\beta$ -棕榈酸酯(VI)、 $\beta$ -谷甾醇(VII)、齐墩果酸(VIII)、3 $\beta$ , 6 $\beta$ -豆甾烷-4-烯-3, 6-二醇(IX)、6 $\beta$ -羟基-豆甾烷-4-烯-3-酮(X)、3 $\beta$ -羟基-豆甾烷-5-烯-7-酮(XI)、去氢催叶萝芙叶醇(XII)和催叶萝芙叶醇(XIII)。结论 除化合物 II 和 VI 外, 皆为首次从该属植物中发现。

**关键词:** 狗肝菜; 三萜; 甾醇

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0014-04

### Chemical constituents of whole herb of *Dicliptera chinensis*

GAO Yu-tao, YANG Xiu-wei, AI Tie-min

(School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract: Objective** To study the chemical constituents in the whole herb of *Dicliptera chinensis*.

**Methods** Separation and purification were conducted by silica gel column chromatographic and preparative TLC methods, the structures were identified by IR, NMR, and MS. **Results** Thirteen compounds were

收稿日期: 2006-07-30

作者简介: 高毓涛(1979-), 男, 辽宁丹东人, 北京大学 2002 级硕士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。

\* 通讯作者 艾铁民 Tel: (010)82802685 Fax: (010)82802685 E-mail: atmin@mail.bjmu.edu.cn