

三甲氧基异黄酮。

化合物Ⅳ：白色粉末(甲醇)，mp 221~222℃。ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR数据经与文献报道^[7]对照，确定化合物Ⅳ为7-甲氧基-5,3',4'-三羟基异黄酮，即檀黄素(santal)。

化合物Ⅴ：白色柱状结晶(甲醇)，mp 175~176℃。FeCl₃-K₃Fe(CN)₆(1:1)溴钾酚绿显黄色，提示该化合物中含有羧基和酚羟基。ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR数据经与文献报道^[8]对照，确定化合物Ⅴ为对羟基反式桂皮酸。

化合物Ⅵ：粉色针状结晶(甲醇)，mp 156~157℃。FeCl₃-K₃Fe(CN)₆(1:1)溴钾酚绿显黄色，提示该化合物中含有羧基和酚羟基。ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR数据经与文献报道^[8]对照，确定化合物Ⅵ为邻羟基苯甲酸。

化合物Ⅶ：白色针状结晶(甲醇)，mp 109℃。FeCl₃-K₃Fe(CN)₆(1:1)显蓝色，提示为酚性物质。ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR数据经与文献报道^[9]对照，确定化合物Ⅶ为对羟基苯乙酮。

化合物Ⅷ：无色针状结晶(甲醇)，mp 142~143℃。TLC的R_f值及显色行为与β-谷甾醇一致；将其与β-谷甾醇对照品混合后熔点不下降，¹H-NMR(CDCl₃)和¹³C-NMR(CDCl₃)数据与文献报道^[10]对照，确定化合物Ⅷ为β-谷甾醇。

化合物Ⅸ：无色片状结晶(甲醇)，mp 147~149℃。TLC的R_f值及显色行为与豆甾醇一致；将其与豆甾醇对照品混合后熔点不下降，¹H-NMR(CDCl₃)和¹³C-NMR(CDCl₃)数据与文献报道^[10]对照，确定化合物Ⅸ为豆甾醇。

化合物Ⅹ：白色粉末(甲醇)，mp 290~293℃。

TLC的R_f值及显色行为与胡萝卜苷一致；将其与胡萝卜苷对照品混合后熔点不下降，¹H-NMR(C₅D₅N)和¹³C-NMR(C₅D₅N)数据与文献报道^[11]对照，确定化合物Ⅹ为胡萝卜苷。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 43. Beijing: Science Press, 1997.
- [2] Jolad S D, Hoffmann J J, Cole J R, et al. Cytotoxic agent from *Penstemon deustus* (Scrophulariaceae): Isolation and stereochemistry of liriiodendrin, a symmetrically substituted furofuranoid lignan diglucoside [J]. *J Org Chem*, 1980, 45 (7): 1327-1329.
- [3] Anas S, Yoshiteru O, Hiroshi H. Isoflavans and a pterocarpan from *Astragalus mongholicus* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(8): 2777-2780.
- [4] Zheng Q H, John A F. Constituents of *Astragalus membranaceus* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(3): 810-815.
- [5] Nadia A E, Aya M A, Rokik M A, et al. Antimicrobial isoflavans from *Astragalus species* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(6): 1387-1389.
- [6] Gayland F S, Barry E J, Ronald D P, et al. A pterocarpan and two isoflavans from *Alfalfa* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(12): 4147-4149.
- [7] Zhao M, Duan J A, Huang W Z, et al. Isoflavans and isoflavone from *Astragalus hoantchy* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(4): 274-276.
- [8] Duan J A, Che Z T, Zhou R H, et al. The chemical constituents of flavonoids and phenolic acid compounds of leaves from *Nitraria tangutorum* Bor. in China [J]. *J Plant Res Environ*, 1999, 8(1): 6-9.
- [9] Yu D Q, Yang J S. *Handbook of Analytical Chemistry: NMR Analysis* (分析化学手册·核磁共振波谱分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1999.
- [10] Kojima H, Sato N, Hatona A, et al. Sterol glucoside from *Prunella vulgaris* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7): 2351-2356.
- [11] Ye W C, Zhao S X, Shen Y L, et al. Studies on the chemical constituents of *Anemone anhuiensis* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1990, 21(3): 139-141.

三七多糖的分离纯化及理化性质研究

盛卸晃, 王 健, 郭建军, 龚兴国

(浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310027)

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 又名田七、参三七, 为五加科人参属植物, 是祖国医学中常用的理血类药物, 传统上主要用于活血、化

瘀、补血和止血。近年来对三七药性成分的研究主要集中在皂苷类成分上, 而有关三七多糖的研究较少^[1~3]。三七粗多糖具有促进抗体生成, 增强巨噬细

收稿日期: 2006-10-26

作者简介: 盛卸晃(1983-), 男, 浙江金华人, 硕士研究生, 主要从事分离纯化和分子生物学研究。

Tel: (0571) 88206549 E-mail: liwiggle@yahoo.com.cn

胞吞噬活性的作用^[4]。本实验采用色谱技术对三七多糖进行纯化分级,获得 PNPS I a、I b 组分并对分离的单一成分进行光谱学分析,表明其是一种典型的多糖,水解后对其分子组成的研究发现,该多糖组分由阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等单糖组成。

1 仪器和材料

2023 MinicoldLab 色谱系统(LKB 公司),SCR 20BC 高速冷冻离心机(日本日立公司),紫外/可见光分光光度计(日本岛津公司),NEOCOOL 冷冻干燥机(Yamato 公司),WZZ-1 自动指示旋光仪(上海物理光学仪器厂),ZFQ 85A 旋转蒸发仪(上海机械专机厂),UV/Vis Lambda Bio 40(PE 公司),红外光谱仪 470 FT-IR (NEXUS 公司),AVANCE DMX500 核磁波谱仪(Bruker 公司)。

三七(购自云南);DEAE-Cellulose-32,DEAE-Cellulose-52 (Waterman 公司);DEAE-Sepharose Fast Flow,CM-Sepharose Fast Flow,Sephadex G-200(Pharmacia 公司)。其余试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 三七粗多糖的提取:将粉碎后的三七用无水乙醇浸泡抽去油脂和色素,药渣风干后水煮 60 min,离心,沉淀中加入蒸馏水再煮 60 min,重复 2~3 次,弃沉淀,合并上清液(棕黄色),减压浓缩,上清液加入 3 倍体积 95%乙醇,静置 24 h,离心收集沉淀。沉淀经无水乙醇、丙酮分别洗涤 2 次,用抽滤漏斗抽干,P₂O₅ 干燥,中性蛋白酶结合 Sevag 法^[5]脱蛋白得粗多糖。

2.2 三七多糖的纯化:500 mg 粗多糖溶解在 10 mL PBS 中,离心除去不溶物,上清液过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子色谱柱进行色谱分离,用 0~0.8 mol/L NaCl-PBS 溶液梯度洗脱(pH 7.6),以苯酚-硫酸法测 490 nm 处吸光度值(A₄₉₀),做洗脱曲线,合并主峰部分,冻干,获得粗多糖 PNPS I、PNPS II 组分。

分别称取 PNPS I、PNPS II 组分 200 mg,溶于少量蒸馏水,过 CM-Sepharose Fast Flow 阴离子色谱柱,用 pH 5.0 的缓冲液(2.5 mmol/L NaAc-HAc)梯度洗脱,盐梯度为 0~0.5 mol/L NaCl,收集组分,以苯酚-硫酸法^[5]测定 A₄₉₀,作洗脱曲线,合并主峰,冻干备用。

2.3 理化性质的研究

2.3.1 糖的测定:苯酚-硫酸法测定糖的量^[6]。

2.3.2 纯度鉴定:采用比旋光度法,将配制 15 mg/mL PNPS I a、PNPS II b 溶液,分别用 30%、60%、

80%乙醇沉淀,然后分别测定乙醇沉淀下的旋光度,判断其纯度。

2.3.3 相对分子质量测定:采用凝胶渗透色谱(GPC)分析^[7],色谱柱为 μ -Bondagel-2Elinear (30 cm×7.8 mm),柱填料为 Ultrahydrogel™ 2000 13 μ m,以环氧己烷(PEO)为标准相对分子质量,制作标准曲线。样品配制质量浓度为 2 mg/mL,上样量 1.5 mL,用双蒸水洗脱,流速控制在 0.8 mL/min,用自动分析仪记录洗脱峰,积分算出样品的相对分子质量。

2.3.4 糖基组成:糖组成分析采用薄层色谱法:以 2 mL 2 mol/L H₂SO₄ 溶解 5 mg 多糖样品,封管 100 ℃,水解 8 h,65 ℃ BaCO₃ 中和,离心收集上清液,浓缩备用。水解样品液浓缩后点硅胶板,展开剂为正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-醋酸-水(7:20:12:7:6),苯胺-邻苯二甲酸显色。

2.3.5 波谱分析

红外光谱(IR):样品与 KBr 以 1:10 混和压片,上机测定红外光谱。

核磁共振谱(NMR)分析:¹H-NMR、¹³C-NMR 以 D₂O 为溶液,以 TMS 为参考进行测定。

3 结果与分析

3.1 三七多糖的提取与纯化:三七经沸水提取,醇沉,中性蛋白酶+Sevag 法脱蛋白得到的粗多糖中糖的量为 83%。三七粗多糖经 DEAE-Sepharose Fast Flow 色谱分离,以苯酚-硫酸法跟踪检测,得 2 个组分 PNPS I、PNPS II。两组分再分别过 CM-Sepharose Fast Flow 阳离子色谱柱,以苯酚-硫酸法跟踪检测,发现 PNPS I 为单峰,而 PNPS II 含有 2 个组分(PNPS II a、PNPS II b),将获得的样品 PNPS II a、PNPS II b 分别经 Sephadex G-200 凝胶色谱柱纯化,由洗脱曲线可知,PNPS II a 洗脱峰为双峰重叠,表明其组分为非单一组分,由洗脱曲线(图 1)可知,PNPS II b 洗脱峰为单一对称峰,表明已是单一组分。

3.2 三七多糖的理化性质

3.2.1 三七多糖的一般理化性质:三七多糖 PNPS I a 为白色黏稠物,溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,其溶液呈中性,pH 7.0。三七多糖 PNPS II b 为淡黄色粉末,易溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,其溶液呈中性,pH 7.0。

3.2.2 纯度分析:在溶液浓度为 15 mg/mL 条件下,采用比旋光度法测定三七多糖 PNPS II 的比旋光度,结果见表 1。可见 PNPS II a 在 3 种乙醇体积

分数沉淀下的比旋光度相差较大,说明 PNPS I a 为非均一组分。而 PNPS I b 在 3 种沉淀下的比旋光度基本相同,由此可知 PNPS I b 为均一组分。

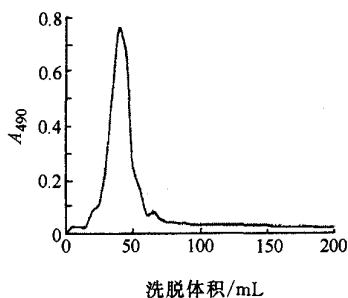


图 1 PNPS I b 的 Sephadex G-200 凝胶纯化洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of PNPS I b on a gel column of Sephadex G-200

表 1 三七多糖在不同体积分数乙醇下沉淀的比旋光度

Table 1 Specific rotation of PNPS I a and PNPS I b from *P. notoginseng*, precipitated with different ethanol concentrations

样品	比旋光度			均值
	30%乙醇	60%乙醇	80%乙醇	
PNPS I a	+190.8	+198.1	+191.3	+193.4
PNPS I b	+131.4	+131.2	+131.2	+131.3

3.2.3 相对分子质量:经 GPC(300 mm×7.8 mm)分析^[8],测得样品 PNPS I a 含相对分子质量为 9.98×10^5 和 2.83×10^4 的混合物,PNPS I b 的相对分子质量为 2.07×10^4 。

3.2.4 糖基组成:三七多糖 PNPS I b 经酸水解后,薄层色谱结果表明:PNPS I b 主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成。

3.2.5 红外光谱:从 PNPS I b 红外图谱可以得到以下信息,PNPS I b 在 3422.52 cm^{-1} 和 2888.46 cm^{-1} 处具有多糖的特征吸收峰, 1636.98 cm^{-1} 的吸收峰可能为水饱和峰, 1467.62 cm^{-1} 的吸收峰可能是饱和 C-H 的弯曲振动, 1148.76 cm^{-1} 和 1060.67 cm^{-1} 的峰可能分别为 $>\text{CH-OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-OH}$ 中的 $\nu_{\text{C-O}}$ 振动, 981.85 cm^{-1} 处的吸收峰可能是 C-C 的伸缩振动。PNPS I b 在 842.98 cm^{-1} 处有吸收峰,表明其存在 α 型糖苷键。

3.2.6 核磁共振:PNPS I b 的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图表明,PNPS I b 存在 α 、 β 两种苷键构型;在糖异头碳 C1 区有 3 个峰,结合薄层色谱结果,推测 PNPS I b 主要由 3 种多糖残基组成。 β -D-葡萄糖吡喃糖中各个碳的化学位移可能分别为 $\delta 100.89(\text{C-1})$, $\delta 72.62(\text{C-2})$, $\delta 74.36(\text{C-3})$, 70.65

(C-4) , $\delta 72.78(\text{C-5})$, $\delta 61.79(\text{C-6})$ 。 α -D-吡喃半乳糖中各个碳的化学位移分别为 $\delta 100.75(\text{C-1})$, $68.53(\text{C-2})$, $71.01(\text{C-3})$, $70.49(\text{C-4})$, $72.29(\text{C-5})$, $62.19(\text{C-6})$, α -D-吡喃阿拉伯糖中各个碳的化学位移为 $\delta:105.44(\text{C-1})$, $71.22(\text{C-2})$, $73.79(\text{C-3})$, $70.89(\text{C-4})$, $64.43(\text{C-5})$, $54.12(\text{C-6})$ 。

4 讨论

近年来,大量药理及临床研究表明,多糖类化合物是一种免疫调节剂,它能激活免疫受体,提高机体的免疫功能。许多实验已经证明它们与感染、肿瘤、炎症和一些自身免疫性疾病有密切关系^[9],且临床报道应用三七治疗慢性肝炎,收到很好的效果^[10]。这说明三七不单是活血化瘀、改善肝脏的血液循环,还可能与其抗炎、抗病毒及调节机体免疫功能有关。故本实验对三七多糖成分进行了分析,成功纯化了两种三七多糖组分(PNPS I, PNPS I b),并对单一组分 PNPS I b 结构进行了初步解析。今后将对 PNPS I b 的构效进行深入的分析,同时展开 PNPS I b 的免疫学研究。

References:

- [1] Zhang C G, Huang Q Q. Effect of *Panax notoginseng* polysaccharide on cellular immune function of rats traumatized [J]. *Chin J Trauma* (中华创伤杂志), 2005, 21(9): 771-772.
- [2] Gao H, Wang F, Lien E J, et al. Immunostimulating polysaccharides from *Panax notoginseng* [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(8): 1196.
- [3] Wu Y L, Huang J, Pan Y J. Isolation, purification and identification of polysaccharide of *Ficus carica* [J]. *J Zhejiang Univ: Sci* (浙江大学学报:理学版), 2004, 31(2): 177-179.
- [4] Zheng G Z, Yang C R. *Panax notoginseng Biology and Its Application* (三七生物学及其应用) [M]. Beijing: Science Press, 1994.
- [5] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Analytical chemistry colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350.
- [6] Si S L. The use of phenol-sulfuric acid colorimetric method to measure the sugar contents [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1986, 13(5): 68-69.
- [7] Zhang W J. *The Technology of Polysaccharide Complex Biochemical Research* (多糖复合物生物研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994.
- [8] Fang J N. Isolation, purification of polysaccharide and determining its molecular weight [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1984, 19: 10.
- [9] Dong Q, Fang J N. The application of polysaccharide complex in medicine [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(10): 649-652.
- [10] Duan J M. 60 Cases of *Panax notoginseng* capsule in curing chronic hepatitis and fiberization [J]. *Henan Med Inf* (河南医药信息), 2002, 10: 62.