

9 β), 3.48(1H, s, H-5 β), 4.74(1H, dd, $J=5.0, 10.0$ Hz, D₂O 交换后呈 d, $J=10.0$ Hz, H-1 β), 5.28(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3 α), 5.55(1H, dd, $J=3.0, 10.0$ Hz, H-2 α), 6.85(1H, t, $J=4.0$ Hz, H-11 α), 7.32(1H, d, $J=5.0$ Hz, D₂O 交换后消失, 1 α -OH)。MS (m/z): 492(M^+), 449[M-AC]⁺, 431[M-ACOH-H]⁺, 414[M-ACOH-H₂O]⁺, 404, 388, 372[M-2 $\times$ ACOH]⁺, 344[372-CO]⁺, 329[344-CH₃]⁺, 313, 284[M-3 $\times$ ACOH-CO]⁺, 271, 255, 218, ¹³C-NMR 值见表 1。

二氢化水解产物 IV: 185 mg II 溶于 40 mL 乙醇中, 加入 40 mL 2 mol/L NaOH, 回流水解 14 h, 蒸去乙醇, 用醋酸乙酯萃取 5 次, 萃取液水洗, 无水硫酸钠干燥, 滤过, 蒸去醋酸乙酯, 得 106 mg 白色残留物, 甲醇结晶得粒晶, mp 168~170 °C; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 400 (br. s, OH), 1 720 (五元环酮)。¹H-NMR δ : 1.34 (3H, s, H₃-19), 1.59 (3H, s, H₃-18), 1.64 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H₃-16 β), 2.05 (3H, s, H₃-20), 3.13(1H, s, H-5 β), 3.28(2H, s, H-9 β), 3.85

(1H, m, D₂O 交换后呈 d, $J=3.0$ Hz, H-3 α), 4.16, 4.40(2H, m, H-1 β , 2 α), 4.85(1H, dd, $J=4.0, 8.3$ Hz, H-6 α), 5.01~5.50(4H, br. s, 1 α -, 2 β , 3 β -, 11 β -OH), 6.65(1H, d, $J=4.0$ Hz, D₂O 交换消失, 6 β -OH), 6.06(1H, t, $J=4.0$ Hz, H-11 α)。MS (m/z): 368(M^+), 350[M-H₂O]⁺, 332[M-2 $\times$ H₂O]⁺, 314[M-3 $\times$ H₂O]⁺, 299[314-CH₃]⁺, 281[M-4 $\times$ H₂O-CH₃]⁺, 272, 259, 241 [259-H₂O]⁺, 234, 215, 317, 185, ¹³C-NMR 值见表 1。

齐墩果酸用甲醇重结晶得白色针晶, mp 306~308 °C。MS (m/z): 456(M^+), C₃₀H₄₈O₃, 其裂解规律与齐墩果酸相同, 红外光谱与齐墩果酸对照品的完全一致^[2,3], 混合熔点不下降, 证明为齐墩果酸。

References:

- [1] Li J C, Liu C J, An X Z, et al. The structure of henryin [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1984, 6(4): 453-456.
- [2] Li J C, Liu C J, An X Z, et al. The structure of Lushan rubesensin E [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1987, 9(4): 485-488.
- [3] Li J C, Yuan B M, Su J L, et al. Chemical structure of inflexusin B [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(6): 323-325.

板蓝根多糖分离纯化及其性质的研究

马 莉^{1,2}, 唐健元³, 李祖伦⁴, 刘 毅⁴, 金城¹, 赵艳玲¹, 肖小河^{1*}

(1. 解放军 302 医院 解放军中药研究所, 北京 100039; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 3. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038; 4. 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

摘要:目的 从板蓝根中提取分离水溶性多糖, 并分析其理化性质, 为板蓝根质量控制与进一步开发利用提供参考。方法 主要采用 DEAE 纤维素离子交换色谱柱, Sephadex G 75 凝胶色谱柱分离纯化, 应用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC)、IR、TLC、UV 等方法对板蓝根多糖进行组成结构分析及理化性质研究。结果 从板蓝根水溶性多糖中分离纯化得到 4 种不同的均一多糖组分 PS1、PS2、PS3、PS4, 色谱分析表明均由单一木糖组成。其中 PS1、PS2、PS3、PS4 相对分子质量分别为 1.2×10^4 、 2.6×10^4 、 4.2×10^3 、 2.5×10^3 。结论 4 种均一多糖首次从板蓝根中分离得到。

关键词: 板蓝根; 多糖; 分离纯化; 性质

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1143-04

Isolation and purification of polysaccharides from *Radix Isatidis* and their properties

MA Li^{1,2}, TANG Jian-yuan³, LI Zu-lun⁴, LIU Yi⁴, JIN Cheng¹, ZHAO Yan-ling¹, XIAO Xiao-he¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Center for Drug Evaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100038, China; 4. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

收稿日期: 2006-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970911)

作者简介: 马 莉 (1977-), 女, 在读博士, 研究方向为中药学。E-mail: mary666@hotmail.com

* 通讯作者 肖小河 Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302@126.com

Abstract: Objective To study the physico-chemical properties of extracted hydrophilic polysaccharides in *Radix Isatidis* and give some suggestions for the quality control and further development of *Radix Isatidis*. **Methods** Polysaccharides in *Radix Isatidis* were fractionated by DEAE cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G 75 gel chromatography. HPGPC, IR, TLC, and UV were used to investigate the structural and physico-chemical properties of the homogeneous polysaccharide parts. **Results** Four different homogeneous hydrophilic constituents, PS1, PS2, PS3, and PS4, were extracted and isolated from *Radix Isatidis*. All of them were composed of Xyl. The relative molecular weights of PS1, PS2, PS3, and PS4 were 1.2×10^4 , 2.6×10^4 , 4.2×10^3 , and 2.5×10^3 , respectively. **Conclusion** It is the first time to get the four homogeneous polysaccharides from *Radix Isatidis*.

Key words: *Radix Isatidis*; polysaccharides; isolation and purification; property

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的根,具有清热解毒、凉血利咽的功能。据报道板蓝根多糖具有免疫调节作用^[1,2],对特异性免疫和非特异性免疫均有一定的促进作用,是较理想的免疫增强剂;同时板蓝根多糖能降低细菌脂多糖(LPS)刺激小鼠巨噬细胞株引起的 NF- κ B 与 DNA 的结合活性升高,对于抑制炎症反应相关基因的表达,减少炎性因子的产生,防治炎症性疾病有一定的疗效^[3]。多糖为板蓝根主要活性成分之一。

目前,板蓝根多糖大多采取水提醇沉法制备^[4]。多糖的种类和结构至今尚未完全明确,提取的粗多糖溶液多为胶体溶液,黏度大且不稳定,所含组分的相对分子质量差别悬殊,不同相对分子质量的组分之间药理活性差异大^[5],为多糖的质量控制与进一步开发利用造成困难。本实验采用 DEAE 纤维素离子交换色谱柱, Sephadex G 75 凝胶色谱柱分离纯化板蓝根多糖,并结合高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC)、IR、TLC、UV 等方法对其进行组成结构分析及理化性质研究。

1 仪器与试剂

HP8452A 型紫外分光光度计;傅里叶变换红外光谱仪;Agilent 1100 高效液相色谱仪;AE163 型电子分析天平;DEAE-52 纤维素(Fluka);Sephadex G 75(Sigma);标准葡聚糖 M2500(140638-2000-01)、M7100(140640-2000-01)、M21400(140642-2000-01)、M41100(140643-2000-01)、M84400(140644-2000-01)、M133800(140645-2000-01)购自中国药品生物制品检定所;葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、鼠李糖(北京化学试剂公司);其他试剂均为国产分析纯;板蓝根药材及饮片由解放军 302 医院中药房提供,经肖小河研究员鉴定为十字花科植物菘蓝 *I. indigotica* Fort. 的根。

2 方法

2.1 多糖的提取、分离与纯化:参考有关文献方法^[6,7],并略有改动。取板蓝根饮片经石油醚回流脱脂 4 h,滤过,药渣加 10 倍量水加热提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至含生药 0.5 g/mL 的浓缩液。浓缩液加乙醇调整体积分数为 60%,冷藏 24 h,滤取沉淀,溶解于水,去离子水透析,去除小分子杂质,分别用 Sevag 法、TCA 法、鞣酸法除蛋白^[8],以茚三酮试液检识。除去蛋白的多糖加 3 倍体积乙醇,冷藏 24 h,离心,收集沉淀,50 °C 真空干燥,得板蓝根粗多糖。

板蓝根粗多糖以少量蒸馏水溶解,除去不溶物,在预处理好的 DEAE-52 纤维素柱(1.5 cm $\times$ 40 cm;柱高 30 cm)分离,以 0.01 mol/L 硼砂缓冲溶液,0.05、0.1、0.25、0.5、1 mol/L 氯化钠溶液依次分步洗脱,体积流量 20 mL/h,分段收集,每管 2 mL,用苯酚-硫酸法跟踪检测收集管中多糖的量。按洗脱峰分段收集合并洗脱液,浓缩后加入 4 倍量乙醇,冷藏 24 h,离心,收集沉淀,50 °C 真空干燥,得到白色或褐色表面有光泽多糖粉末。进一步用 Sephadex G 75(1.2 cm $\times$ 30 cm)凝胶色谱柱分离纯化,以磷酸缓冲溶液为洗脱流动相,分离得到 4 种板蓝根均一多糖:PS1、PS2、PS3、PS4。

2.2 多糖纯度和相对分子质量测定:参考有关文献方法^[9],并略有改动。待测定样品溶于超纯水中,使其质量浓度为 5 g/L,用高效凝胶过滤色谱法确定纯度。色谱条件为:Ultrasphere 凝胶色谱柱,示差折光检测器(Waters 410),流动相 0.2 mol/L NaNO₃,体积流量 0.5 mL/min,柱温 45 °C,进样量 10 μ L。用标准葡萄糖(Dextran)、系统标准葡聚糖 M2500、M7100、M21400、M41100、M84400、M133800 制备标准曲线,根据样品的保留时间计算相对分子质量。结果 PS1、PS2、PS3、PS4 的相对分子质量分别为 1.2×10^4 、 2.6×10^4 、 4.2×10^3 、

2.5×10^3 。

2.3 糖组成分析

2.3.1 多糖的单糖组成:分别取板蓝根 PS1、PS2、PS3、PS4 多糖样品 5 mg,用 1 mol/L 硫酸 5 mL 溶解,于 120 ℃封管水解 2 h,用 BaCO₃ 中和至中性。硅胶薄层色谱检识;正丁醇-丙酮-水(4:5:1)为展开剂,苯胺-邻苯二甲酸显色,105 ℃加热至斑点显色清晰。对照品为葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、乳糖(Gal)和鼠李糖(Rha),以上述标准单糖的 R_f 值及颜色作为定性依据。

2.3.2 红外光谱分析:分别取板蓝根 PS1、PS2、PS3、PS4 多糖样品 2 mg,加入 200 mg 经干燥的 KBr 晶体,研磨混合后压片,采用傅里叶变换红外光谱仪,于 4 000~500 cm⁻¹ 红外区扫描测定。

3 结果和分析

3.1 多糖不同方法除蛋白效果的比较:Sevag 法反应温和,但除蛋白的效率较低;鞣酸法引入色素,容易导致除蛋白后的多糖污染;TCA 法不仅能有效除去蛋白,还能除去部分色素,故选用 TCA 法除去板蓝根多糖中的蛋白。

3.2 多糖的柱色谱分离:板蓝根多糖经 DEAE-52 纤维素色谱,分离到 4 个亚级;ISP1、ISP2、ISP3、ISP4,其中 ISP1 的量最多,约占上样粗多糖量的 60%,其次分别为 ISP4、ISP2 和 ISP3,见图 1。可以比较清晰地看出盐洗脱部分的 3 个洗脱峰,3 个洗脱峰中第 4 峰相对较高。这 4 种多糖经 Sephadex G 75 凝胶柱色谱分离,得到 PS1、PS2、PS3、PS4 等 4 种均一多糖。

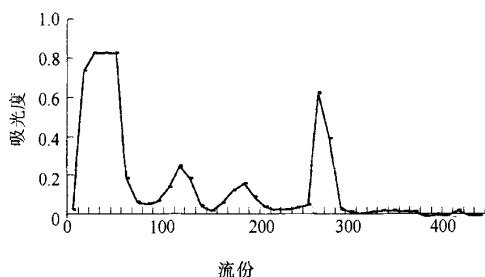


图 1 板蓝根多糖的 DEAE 纤维素柱色谱分离

Fig. 1 Elution curve of polysaccharides in *Radix Isatidis* fractionated by DEAE cellulose ion exchange chromatography

3.3 多糖薄层色谱分析:板蓝根各多糖组分薄层分析结果可以看出,PS1、PS2、PS3、PS4 均由单一木糖组成。

3.4 多糖红外特征峰分析:PS1 在 3 357.81、2 916.73、1 666.57、1 347.61、1 007.78 cm⁻¹ 的吸

收峰为多糖特征吸收峰,850 cm⁻¹附近的吸收峰是 α-吡喃糖苷键的特征吸收峰;PS2 在 945.65、826.44、707.63 cm⁻¹ 以及 PS3 在 947.47、828.20 cm⁻¹ 是 D-吡喃糖类化合物的特征吸收峰;PS4 在 3 345.66、2 917.52、1 615.68、1 416.07、1 331.64、1 143.54 cm⁻¹ 的吸收峰为多糖特征吸收峰,955.37 cm⁻¹ 为吡喃环的非对称环伸缩振动。

4 讨论

4.1 多糖进行完全水解的目的是获得多糖的单糖成分信息,多糖水解的难易与单糖的性质、单糖环的形状和糖苷键的构型有关,水解的条件必须严格控制,否则发生不必要的降解反应。本实验中对可能影响酸水解的水解时间、水解方式、水解温度、硫酸浓度、中和试剂进行考察,结果以 1 mol/L 硫酸 5 mL 于 120 ℃封管水解 2 h,用 BaCO₃ 中和至中性,水解条件最好,色谱斑点圆整清晰。

4.2 离子交换色谱对除去多糖提取物中的酸、碱性成分和无机离子十分有效,留下中性糖可作进一步分离。由于强碱性的树脂能与还原糖结合,用水不能洗脱;而强酸性树脂易使不稳定的糖苷键裂解,所以在分离多糖时宜采用弱酸弱碱的离子交换树脂。DEAE 纤维素(二乙氨基纤维素, Diethylaminoethyl)在纤维素上结合了 DEAE,含有带正电荷的阳离子纤维素-O-C₆H₄N⁺H,它的反离子为阴离子,可与带负电荷的阴离子进行交换。在离子交换色谱中,交换剂对多糖和无机盐离子都具有交换吸附的能力,两者同时存在于一个色谱过程中,一般采用两种方法达到分离多糖的目的。一种是增加洗脱液的离子强度,一种是改变洗脱液的 pH 值。试验采用不同离子强度 NaCl 进行洗脱,分离效果好。

4.3 多糖溶液作为胶体溶液,黏度不但随浓度的增大而升高,而且与相对分子质量的大小有关系^[8]。多糖的相对分子质量分布一般比较分散,所以一般所称的相对分子质量是大小分子的平均数,即平均相对分子质量。常用于多糖相对分子质量的测定方法有:渗透压法、蒸气压渗透计法、端基法、黏度法、光散射法、凝胶色谱法和超滤法等。用不同性质的测定方法,所得结果往往存在差异,因此在说明多糖的相对分子质量时,应当把测定方法的性质说明。本实验用高效凝胶渗透色谱法测定板蓝根多糖相对分子质量,其中 PS1、PS2、PS3、PS4 相对分子质量分别为 1.2×10^4 、 2.6×10^4 、 4.2×10^3 、 2.5×10^3 。

4.4 多糖为生物大分子,存在一、二、三、四级结构的概念^[10]。研究表明多糖的活性与相对分子质量、

溶解度、黏度和糖链结构有关。本实验对板蓝根中的多糖进行了初步分离纯化,得到4个均一多糖。全水解产物的分析表明,它们的糖组成均为单一木糖。有关板蓝根多糖的溶解度和黏度、多糖 ^{13}C -NMR和质谱的测定以推断糖绝对构型、连接位置和端基碳相对构型的分析工作^[11,12]将做后续报道。

References:

- [1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [2] Lu P C, Xu Y M, Wang Y Z, *et al.* The mouse' immunological regulation function of polysaccharide in *Radix Isatidis* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1991, 7(2): 22.
- [3] Wu H P, Chen J W, Li X, *et al.* Influence of Banlangen polysaccharide on binding activity of NF- κ B [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2001, 8(5): 276-278.
- [4] Lu J J, Wang L, Gu C Z, *et al.* Extraction and content determinations of polysaccharide of Indigowoad root [J]. *Guangdong Pharm* (广东药学), 2001, 11(4): 16-18.
- [5] Shida M, Haryu K, Matsuda K, *et al.* On the water-soluble heterogalactan from the fruit bodies of *Lentinus edodes* [J]. *Carbohydr Res*, 1995, 41(5): 211-218.
- [6] Qian S Y, Wang L Y, Zhao Y M, *et al.* Extraction, isolation, and structural determination of the polysaccharides from *Dioscorea opposita* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物杂志), 2003, 1(3): 155-157.
- [7] Chen Y L, He G Q, Hua Y F, *et al.* Extraction isolation and characterization of polysaccharide from *Dendrobium moniliforme* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(7): 494-497.
- [8] Zhang W J. *Biochemical Research Techniques of Compound Polysaccharides* (复合多糖生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999.
- [9] Dong Q, Fang J N. Characterization of polysaccharides from the roots of *Sophora subprostrata* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2001, 36(2): 85-87.
- [10] Tang R X. *Botanical Component Analysis* (植物成分分析) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [11] Ye Z N, Shao J P, Lu H W. Extraction, isolation, and structural researches of crude polysaccharide [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2000, 14(5): 329-332.
- [12] Anello J D, Baugher J E, Paul E, *et al.* Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of haemophilus influence type [J]. *Anal Biochem*, 1997, 250: 228.

金不换的化学成分研究

李创军, 张东明*, 庾石山

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

金不换 *Polygala glomerata* Lour. 为远志科远志属植物, 主要分布于福建、广东、四川和云南, 以全草入药。具有止咳、消积和活血散瘀的功效, 是广西民间常用药, 主要用于治疗咳嗽胸痛、咽喉痛、肺癆、顿咳、小儿疳积、黄疸、痢疾、小儿麻痹后遗症、目赤、痈疽疔肿、跌打损伤等^[1,2]。已从本植物中分离得到了皂苷、寡糖多酯类成分^[3,4], 为了更好的开发和利用我国远志属的资源, 本实验对其全草的化学成分进行了研究, 从其全草的乙醇提取物的醋酸乙酯和丙酮部分中, 采用硅胶、ODS C_{18} 、Sephadex LH-20 和大孔吸附树脂柱色谱, 分离得到8个化合物。根据光谱数据和理化性质鉴定其结构, 分别为: 芦丁(I)、芒果苷(II)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(III)、紫云英苷(IV)、山柰酚(V)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷(VI)、胡萝卜苷(VII)和远志醇(VIII)。化合物I~VIII均为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

XT₄-100 显微熔点测定仪。质谱为 Agilent 1100 series LC/MSD Trap SL 质谱仪。核磁共振谱用 Inova-300, 500 型核磁共振仪测定。实验所用薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶(100~200 目, 200~300 目)均为青岛海洋化工厂产品。大孔树脂 D101 为天津海光化工有限公司产品, C₁₈ 反相硅胶为日本 YMC 公司产品, Sephadex LH-20(粒度 18~111 μm) 为瑞士 Pharmacia Biotech 公司产品。药材采自广西, 经龙光日工程师鉴定为远志科远志属植物华南远志 *P. glomerata* Lour 的全草, 标本保存在中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所。

2 提取分离

金不换全草 5 kg, 用 95% 乙醇回流提取 3 次(2 h/次), 浓缩得总浸膏 1 700 g, 通过硅胶柱色谱分离, 分为石油醚、氯仿、醋酸乙酯、醋酸乙酯-丙酮

收稿日期: 2006-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(20372087, 20432030)

作者简介: 李创军(1980-), 甘肃省甘谷人, 博士研究生, 研究方向为天然产物化学。 E-mail: lichuangjun@sina.com

* 通讯作者 张东明 Tel: (010)63165227 Fax: (010)63017757 E-mail: zhangdm@imm.ac.cn