

## 丹参多糖的组成分析

蔡亚平<sup>\*</sup>, 赵蕊, 朱丹

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

[摘要] 目的: 了解丹参多糖种类和相对分子质量的分布情况。方法: 通过高效凝胶渗透色谱技术, 分析了丹参多糖相对分子质量的分布情况。结果: 丹参多糖按照相对分子质量分布, 明显分成两部分。结论: 丹参多糖低相对分子质量部分是一个纯度很高的多糖, 具有一定的开发价值。

[关键词] 高效凝胶渗透色谱法; 重均分子质量; 丹参多糖; 乙醇分级法

[中图分类号] 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0088-04

## Research into Composition of *Salvia miltiorrhiza* Polysaccharides

CAI Ya-ping<sup>\*</sup>, ZHAO Rui, ZHU Dan

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land

Reclamation University, Daqing 163319, China)

[Abstract] **Objective:** To get a crude perception of the composition and the molecular weight of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides. **Method:** Using high perform HPGPC and alcohol fractionation, We got a better outline of the composition of the polysaccharides and respectively analized their molecular weights. **Result:** The test results proved that *S miltiorrhiza* polysaccharides breaks down to two parts with respect to their ranges of molecular weight. **Conclusion:** The part with low molecular weight exhibits the character of pure substance which is exploitable.

[Key words] HPGPC;  $M_w$ ; *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides(SMP); alcohol fractionation

丹参多糖 (*Salvia miltiorrhiza* polysaccharides, SMP) 具有明显的抗免疫性肝损伤<sup>[1]</sup>和抗大鼠实验性肾损伤<sup>[2]</sup>的作用, 但目前对它的研究存在以下问题: 研究对象多为粗多糖, 含较多杂质, 虽然证明其具有很强的药理活性, 但很难确定药效成分; 定量分析主要使用比色法, 不能如实反映多糖含量; 结构化学分析缺乏, 没有多糖标准品, 使其无法使用常规色谱技术进行定量分析。

高效凝胶渗透色谱技术 (HPGPC) 是最近 30 年来兴起并飞速发展的一门技术。采用分子排阻的原理, 它可以同时对小分子化合物和大分子化合物进行定性、定量研究, 克服了常规色谱技术的不足, 并

且可以根据色谱峰的保留时间, 测定出各物质的相对分子质量。本实验采用 HPGPC 辅助乙醇分级沉淀法, 准确地对具有药理活性的丹参粗多糖进行分离和相对分子质量分布考察, 确定这种具有生物活性的丹参多糖的种类, 为该多糖的进一步定性定量分析, 提供依据。

### 1 仪器与药品

丹参购于哈药集团世一堂中药饮片公司; 右旋糖酐标准物质 (中国计量科学研究院)。

WFJ 2100 型可见分光光度计; 高效凝胶色谱柱 (日本 TOSOH 公司), 高效凝胶色谱柱保护柱 (日本 TOSOH 公司); (agilent technology 1200) 高效液相色谱仪、示差折光检测器 (美国 Agilent 公司)。

### 2 方法与结果

**2.1 丹参多糖的提取** 称取干燥的丹参 100 g, 用 1 000 mL 蒸馏水浸泡 2 h, 加热至沸, 微沸 30 min, 过滤后, 再加入 500 mL 水煎煮 25 min, 过滤, 再将 2 次

[收稿日期] 20100902(001)

[基金项目] 黑龙江省中医管理局科研项目 (HZ2008-0388)

[通讯作者] \* 蔡亚平, 讲师, 硕士, 研究方向: 中药药剂学, E-mail: cypgogogo@126.com

滤液合并, 浓缩至每 1 mL 含有 0.2 g 丹参的量为止。加入无水乙醇使其浓度达到 80%, 并恒温 20 条件下放置 4 h, 离心沉淀, 将沉淀溶解于 500 mL 蒸馏水中, 再加入无水乙醇使其浓度达到 80%, 醇沉 4 h 后, 离心, 2 次水溶醇沉后的沉淀物, 即得<sup>[3]</sup>。

**2.2 标准曲线的建立** 精密称量右旋糖酐标准物质, 加入蒸馏水配制成右旋糖酐标准物质的标准溶

液, 使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤备用。采用 HPGPC 法, 流动相 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液, 柱温 50, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>。以右旋糖酐标准溶液标定色谱柱, 进样量 5 μL, 得到各相对分子质量右旋糖酐标准物质的保留时间, 将标准右旋糖酐  $M_w$  的对数 (X) 和保留时间 (Y) 进行回归, 得回归方程  $\lg X = -0.464 4 Y + 13.082$  ( $r = 0.998 9$ )<sup>[4]</sup>。见图 1。

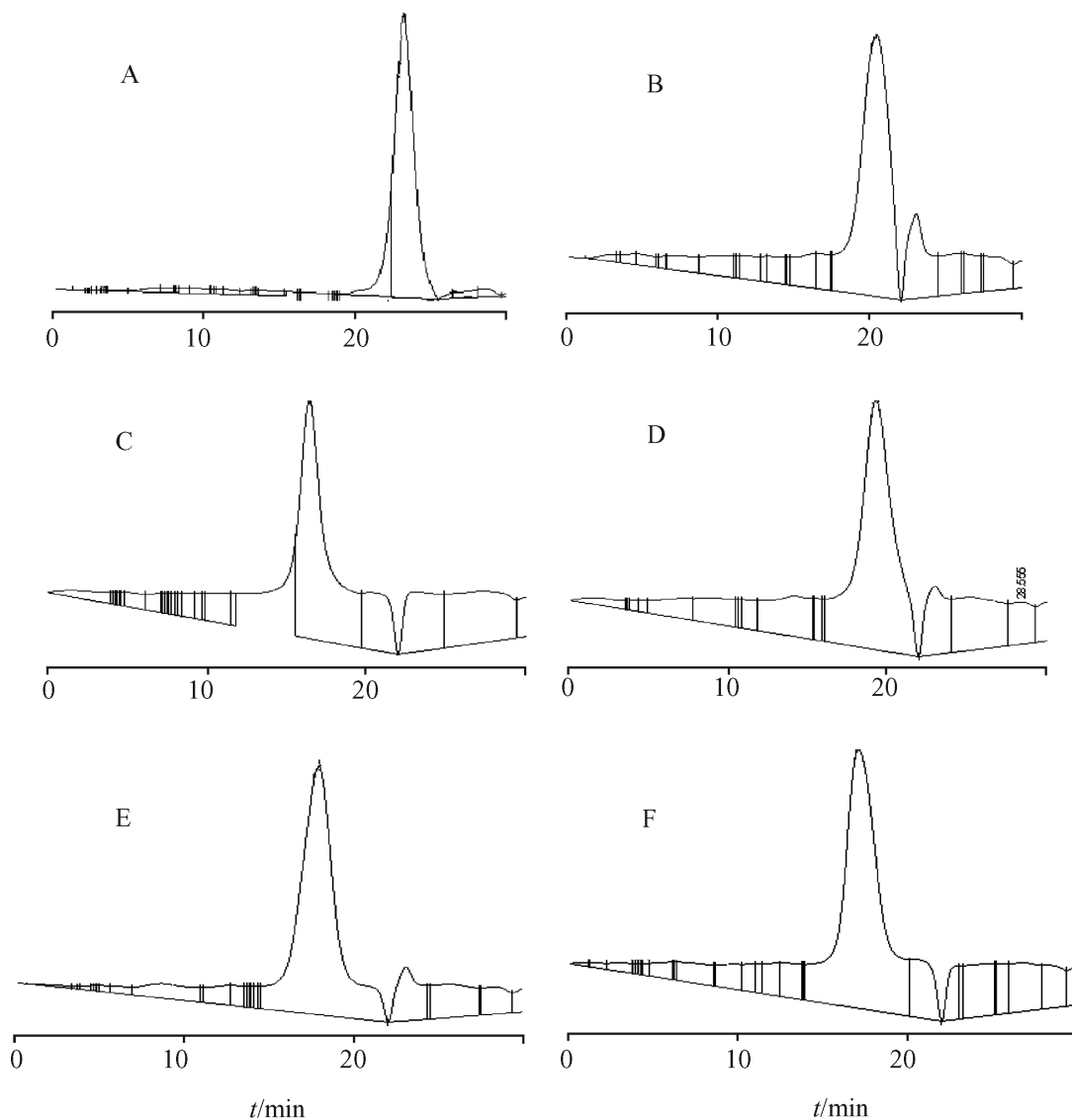


图 1 不同  $M_w$  的右旋糖酐的 HPGPC

A. 180; B.  $4.32 \times 10^3$ ; C.  $1 \times 10^4$ ; D.  $1.26 \times 10^4$ ; E.  $6.06 \times 10^4$ ; F.  $1.1 \times 10^5$ ; G.  $2.89 \times 10^5$ 。

**2.3 相对分子质量的分布** 称取 0.5 g 干燥恒重的丹参多糖, 溶解于 2 mL 蒸馏水中, 制成丹参多糖的溶液, 将溶液置于离心机中, 4 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 1 h, 取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 蒸馏水稀释。使用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤备用。取丹参多糖的样品溶液进行 HPGPC 分析, 进样量 25 μL, 分析方法同 2.2, 如图 2。

丹参多糖的 HPGPC 图有 2 个色谱峰, 即峰 1 和

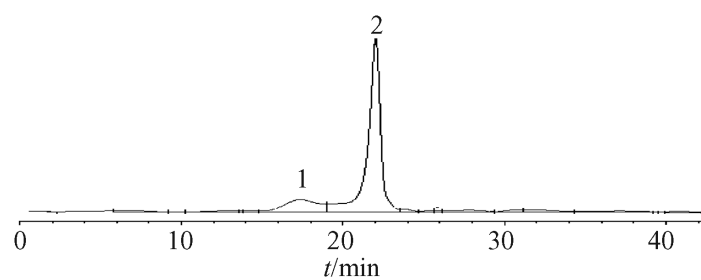


图 2 丹参多糖的 HPGPC

峰 2, 其保留时间分别为 17.354 min 和 22.018 min, 代入 2.2 的回归方程, 得到的  $M_w$  分别为 99 763 和 854, 两者相差十分悬殊。峰 2 图谱与单相对分子质量组分的谱峰极为类似, 证明这部分多糖具有单相对分子质量的特征。

**2.4 丹参多糖的组成分析** 采用恒温沉淀分级法, 将 2.3 g 丹参多糖溶于蒸馏水, 用 500 mL 量瓶定容, 待充分混匀后, 制成丹参多糖的溶液, 离心除去少量胶状沉淀后, 取 8 份 20 mL 的丹参多糖溶液, 分别置于 8 个锥形瓶中, 再分别加入无水乙醇, 使溶液中乙醇浓度达 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 在 20 恒温 3 h 后, 用 3 μm 微孔滤膜过滤, 将沉淀用水溶解后并定容, 分别用硫酸—酚法测定不同乙醇浓度下所沉淀的多糖量<sup>[6]</sup>。见图 3。

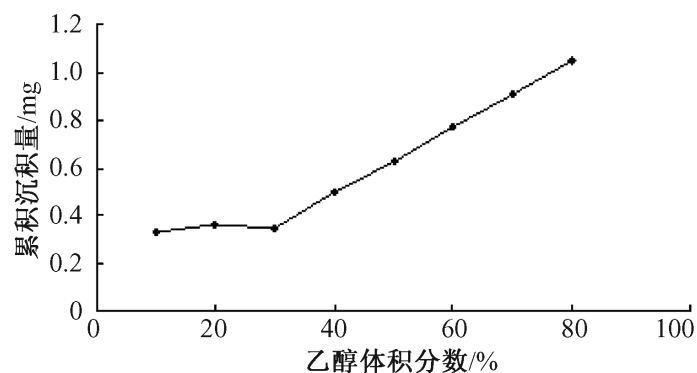


图 3 不同乙醇体积分数下所沉淀丹参多糖的变化曲线

### 3 讨论

从图 2 可以看出在 15 ~19 min, 是一个连续的很平坦宽峰, 即峰 1, 这部分多糖相对分子质量几乎是均匀连续分布, 其  $M_w$  在  $10^6 \sim 10^4$ , 这样高相对分子质量的多糖其水溶性很差; 在 22 min 左右处出现一个很尖锐的窄峰, 对应的相对分子质量为 854, 这个低相对分子质量的多糖, 水溶性很好, 实验也证明它遇水即溶, 同时在水溶液中有很高的稳定性。根据图 3 可以辅助性地判断出丹参多糖分成两部分。乙醇体积分数低于 30% 沉积的部分, 为高相对分子质量的丹参多糖, 这部分多糖具有较高的黏性, 水溶性很差, 上清液呈现浑浊的外观; 乙醇浓度高于 30% 的沉积部分, 为低相对分子质量的部分, 这部分多糖的黏性较小, 水溶性好, 其水溶液稳定, 上清液呈现澄清的外观。可通过调节乙醇的浓度, 很容易将两者分离。从图 2 可以看出; 高相对分子质量区与低相对分子质量区都有峰谷分割, 说明多糖的相对分子质量不是连续分布, 两区之间有一定的间隔, 用乙醇分级法也可以证明, 乙醇体积分数在 20% ~ 30% 几乎没有沉淀生成。

从图 2 上看两区相对分子质量分散情况是有很大的差别的, 高相对分子质量区的谱峰宽而平, 用不均匀指标  $HI (HI = \overline{M}_w / \overline{M}_n)$  判断, 其值在 1.8 ~2.5, 这两点都说明高相对分子质量区是一个高度分散区。低相对分子质量区的谱峰窄而尖, 与单相对分子质量多糖的谱峰很相似, 初步测得  $HI$  值在 0.99 ~1.04 ( $M_n$  用冰点下降法测得), 这是一个接近 1 的数据, 这两点都说明它是一个接近单相对分子质量的多

糖<sup>[7]</sup>。通过乙醇分级法建立的图 3 也可以得出相类似的结论。

### 4 结论

从丹参多糖的 HPGPC 图可以看出, 它的相对分子质量分布明显分成 2 个区; 即高相对分子质量区和低相对分子质量区, 前者相对分子质量分散性大; 后者相对分子质量分散性小, 并集中显示出单相对分子质量的特征。两者很容易用乙醇分级法分离。根据作者查阅的资料, 这 2 种多糖的混合物, 具有明显的抗肝损伤和肾损伤的功能<sup>[1-2]</sup>, 但很难确定是哪一种多糖真正发挥了疗效。丹参多糖的高相对分子质量的部分, 分子结构复杂, 提取纯化困难, 很难确定空间化学结构式, 使得这部分多糖无法利用常规方法测定含量; 而丹参多糖的低相对分子质量部分, 结构简单, 纯度高, 便于纯化和化学结构确定, 却在以往的研究中被忽略。这种多糖在丹参粗多糖中的含量很大, 如果被当做杂质去除, 可能是一种浪费。

### [参考文献]

- [1] JCR Pharmaceuticals Co. LTD. Polyglucuronic acid as remitting agent for nephritic syndrome and hepatopathy symptoms: Europe, 94305146. 6[P]. 1994-07-14.
- [2] Yu H S, Liu Q, Liu Z P, et al. Protection of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza*, a Chinese medicinal herb, against immunological liver injury in mice[J]. Int J Biol Macromol, 2008, 43: 170.
- [3] 韩学忠. 五味子多糖提取纯化、分级及应用[J]. 中医学报, 2005, 33(6): 35.
- [4] 林兴, 蒋伟哲, 焦杨, 等. 玉郎伞多糖的分离纯化和组成性质研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 901.
- [5] 王培培, 于广利, 杨波, 等. 选育羊栖菜与野生羊栖菜中褐藻胶与褐藻糖胶组成分析[J]. 中国海洋药物杂质, 2009, 28(3): 39.
- [6] 蔡亚平, 韩学忠. 五味子多糖分级注射剂的分级含量和性质测定研究[J]. 中成药, 2010, 32(7): 136.
- [7] 王艺. 中药研究理论与方法[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 84.

[责任编辑 邹晓翠]

## 多叶棘豆清除自由基活性研究

折改梅, 孙芳芳, 吕海宁, 刘斌\*

(北京中医药大学中药学院中药化学系, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究多叶棘豆的清除自由基活性。方法: 分别以常用抗氧化剂 L-抗坏血酸和生育酚为对照, 采用清除 DPPH 和 ABTS 自由基的方法对多叶棘豆乙醇提取物不同极性部位, 以及 AB-8 大孔吸附树脂柱不同乙醇浓度洗脱部位进行清除自由基能力的评价。结果: 多叶棘豆提取物 AB-8 大孔吸附树脂柱的 50% 乙醇洗脱部位对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基均有较强的清除能力, 其清除 DPPH 自由基能力强于同浓度的 L-抗坏血酸。结论: AB-8 大孔吸附树脂柱层析技术对多叶棘豆的清除自由基活性物质有分离富集作用, 以 50% 乙醇洗脱部位活性最为突出。

[关键词] 多叶棘豆; 清除自由基活性; 抗氧化

[中图分类号] 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0091-04

## Radical Scavenging Activity of *Oxtropis myriophylla*

SHE Gai-mei, SUN Fang-fang, LV Hai-ning, LIU Bin\*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract] Objective:** To study DPPH and ABTS radical scavenging activities of *Oxtropis myriophylla*.

**Method:** The anti-oxidant activity of *O. myriophylla* was measured by DPPH assay and ABTS assay. Furthermore, the AB-8 macroporous absorbent resin column chromatography with gradient elution (aqueous solution, 50% and 90% ethanol solution) were used. **Result:** 50% ethanol extract from *O. myriophylla* in the capability of scavenging DPPH and ABTS free radicals was much stronger than any other fractions, which is a trifle stronger than ascorbic acid. In addition, the active ingredient was screened effectively by the column chromatography method.

**Conclusion:** 50% ethanol extract from *O. myriophylla* in the capability of scavenging DPPH and ABTS free radicals was much stronger than any other fractions, which is a trifle stronger than ascorbic acid. In addition, the active ingredient was screened effectively by the column chromatography method. **Conclusion:** The 50% ethanol extracts exhibited strong scavenging capacity of free radical.

**[Key words]** *Oxtropis myriophylla*; scavenging capacity of free radical; anti-oxidant

现代医学表明许多疾病的发生、发展都与人体所产生的过氧化物有关, 而这些过氧化物的形成, 是由于人体内部在代谢过程中产生的过氧自由基所造成的。人体自身虽然有完整的抗氧化体系进行自我

保护, 但当体内自由基产生过多或机体清除自由基能力下降时, 就会造成机体在分子水平、细胞水平及组织水平的不同程度损伤。摄入具有清除自由基能力的食物和药物(抗氧化剂)可以减缓自由基对机体的侵害, 预防各种炎症、变态性疾病、衰老等病变的发生<sup>[1-2]</sup>。由于人工合成抗氧化剂有累积致癌的报道, 研究者将目光转移到天然抗氧化剂的研究与开发。

多叶棘豆为豆科植物多叶棘豆 *Oxtropis myriophylla* 的干燥全草, 又名狐尾藻棘豆, 主产于内蒙古, 为蒙医常用药, 收载于《内蒙古药材标准》, 具

[收稿日期] 20100730(004)

[作者简介] 折改梅, 博士, 讲师, 研究方向: 中药和中药相关产品的物质基础和产品质量控制方法, Tel: 010-84738629, E-mail: shegaiimei@126.com

[通讯作者] \* 刘斌, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药(复方)有效成分(组分), Tel: 010-84738628, E-mail: liubinyn67@163.com