



研究报告

Research Report

一种水溶性党参多糖的分离纯化及结构分析

刘章泉¹ 姚晓东^{1,2} 肖世基¹ 陈晓兰¹ 吴倩男^{1,2} 余兰¹

¹ 遵义医学院药学院, 遵义, 563099; ² 遵义医学院院士工作站糖化学与糖生物学实验室, 遵义, 563099

✉ 通讯作者: yulanxu@126.com; 作者

植物药与药理学杂志, 2016年, 第5卷, 第4篇 doi: [10.5376/jpmpp.cn.2016.05.0004](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2016.05.0004)

收稿日期: 2016年06月03日

接受日期: 2016年06月15日

发表日期: 2016年06月25日

本文首次发表在《基因组学与生物应用学》2016年35卷第6期上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

刘章泉等, 2016, 一种水溶性党参多糖的分离纯化及结构分析, 植物药与药理学杂志(online) Vol.5 No.4 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2016.05.0004](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2016.05.0004))

引用格式(英文):

Liu et al., 2016, Purification and structural analysis of polysaccharide from a kind of water-soluble *Codonopsis pilosula*, Elongation and Acclimatization of *Chrysanthemum morifolium* Ramat, Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi (online) Vol.5 No.4 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2016.05.0004](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2016.05.0004))

摘要 采用水提醇沉法得到党参粗多糖(COP), 采用 Sevag 法除去蛋白成份, 接着通过 Sephacryl S-200 HR 及 Sephadex G-25 凝胶柱色谱分离得到均一多糖 COP-1。凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定其纯度和平均分子量。高效液相色谱法(HPLC)确定其单糖的组成。红外光谱及核磁推测 COP-1 结构。结果表明 COP-1 平均分子量约为 2.1×10^3 Da, 且均由 β -D-(2 \rightarrow 1)呋喃果糖组成。

关键词 HPGPC, 单糖组成, HPLC, 多糖, 党参

Purification and Structural Analysis of Polysaccharide from a Kind of Water-soluble *Codonopsis pilosula*

Liu Zhangquan¹ Yao Xiaodong^{1,2} Xiao Shiji¹ Chen Xiaolan¹ Wu Qiannan¹ Yu Lan¹

¹ of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi, 563009; ² Laboratory of Glycochemistry and Glycobiology, Academic Workstation of Zunyi Medical University, Zunyi, 563009

✉ Corresponding author, yulanxu@126.com; Authors

Abstract Crude *Codonopsis pilosula* polysaccharide was gained using water extraction-alcohol precipitation, and then Sevag method was used to remove protein. The main fraction of *Codonopsis pilosula* polysaccharide, namely COP-1, was isolated by Sephacryl S-200 HR and Sephadex G-25 column chromatography. High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC) was used to determinate the purity and molecular weight of COP-1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to analyze the monosaccharide composition of COP-1. Its structure was elucidated by FT-IR and NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC and HSQC). The molecular weight of COP-1 was about 2.1×10^3 Da, and the mainly constitution of it was β -D-(2 \rightarrow 1) fructose.

Keywords HPGPC, Monosaccharide composition, HPLC, Polysaccharide, *Codonopsis pilosula*

党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf 属植物全世界约有 40 种, 中国约有 39 种(冯佩佩等, 2012)。中药党参为桔梗科多年生草本植物党参、素花党参、川党参及其同属多种植物的根。党参为中国常用的传统补益药, 具有补中益气、润肺生津的功效, 用于气血两虚、气短心悸、食少心悸、食少便溏、哮喘咳嗽和内热消渴等(朱恩圆等, 2001)。传统使用中以山西上党地区出产的党参为上品, 具有补中益气, 健脾益肺之功效。现代研究表明党参含有多糖、皂苷、生物碱、黄酮、挥发油等多种天然药理活性(汪建红等, 2001)。现代药理学研究证实党参具有抗肿瘤, 抗放射, 增强免疫功能及抗氧化等多种生物活性, 其主要活性成分为党参多糖(Wang et al., 1996; Huheihel et al., 2002; Sun and Liu, 2008, 杨丰榕等, 2011; 杨维群等, 2015)。近几年, 国内外在党参多糖生物活性方面进行了深入的研究, 但是有关党参多糖的结构研究报道的较少。

在党参粗多糖抗疱疹病毒的筛选期间, 我们发现分子量在 3 000~10 000 kD 硫酸化的粗多糖是有效果的(王欢等, 2015)。为了更好的探讨它抗病毒的作用机制, 我们必须明确它的结构。本研究通过直接水解党参多糖 COP-1, 然后直接进高效液相分析, 与标准单糖对照, 从而解析单糖的组份及摩尔比; 同时, 结合 IR 数据, 借助于一维和二维的核磁技术确定 COP-1 的结构。

1 结果和分析

1.1 分离与纯化



通过水提醇沉得方法得到浅黄色的粗多糖, 然后用 Sevag 法除去蛋白质, 接着流动自来水透析 48 h, 然后浓缩透析液并冷冻干燥。为了得到纯度较高的多糖, 粗多糖(COP)先过 Sephacryl S-200HR 柱色谱。洗脱曲线表明 COP 呈现了一个大峰(COP-1) (图 1A), COP-1 的进一步纯化在 Sephadex G-25 柱色谱, 从洗脱曲线看, 也只有一个峰(图 1B)。

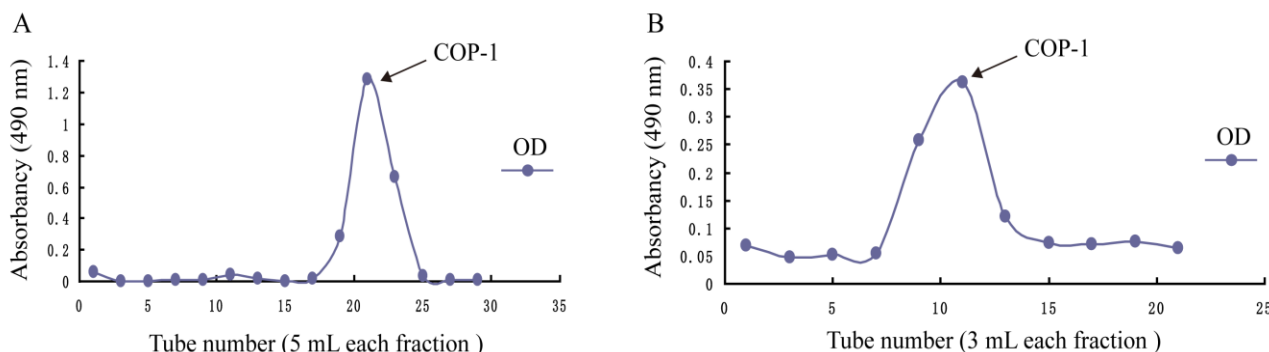


图 1 A: 粗多糖组分(COP) Sephacryl S-200HR 洗脱; B: 粗多糖组分(COP-1) Sephadex G-25 洗脱

Figure 1 A: Elution profiles of polysaccharide COP by Sephacryl S-200HR; B: Elution profiles of COP-1 by sephadex G-25

1.2 多糖均一性和分子量的测定

在 HPGPC 凝胶色谱中 COP-1 呈现出一个对称的单峰, 表明它是一个均一的多糖。根据分子量的标准曲线: $\log M = 2.544 + 0.6998X - 0.0473X^2$, 然后计算得出均一多糖(COP-1)重均分子量为: 2.1×10^3 Da。

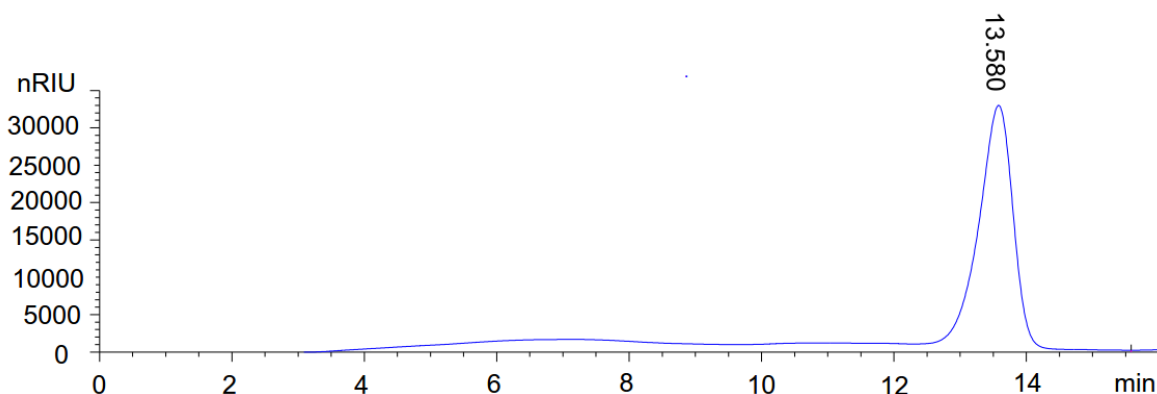


图 2 HPGPC 凝胶色谱中显示 COP-1 (COP-1 保留时间: 13.580 min)

Figure 2 HPGPC profile of polysaccharide COP-1 (retention time of COP-1: $t_R = 13.580$ min)

1.3 单糖组分分析

COP-1 单糖组成是通过直接水解多糖样品, 然后进高效液相色谱分析的。单糖和多糖水解的高效液相色谱图(图 3; 图 4)。多糖水解液的出峰时间对比单糖, 可以得知 COP-1 主要由果糖组成。

1.4 COP-1 红外分析

COP-1 多糖的红外光谱反映了它们的官能团和化学键(图 5)。吸收峰 $3200 \text{ cm}^{-1} \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 的响应是被-OH 的拉伸振动引起的。在 2939 cm^{-1} 的吸收是由于-CH 的拉伸振动, 同时 1637 cm^{-1} 的信号是由二氧化碳引起的。吸收在附近 934 cm^{-1} , 872 cm^{-1} 和 818 cm^{-1} 的信号表示存在呋喃环的构型, 也表明 COP-1 是呋喃型糖苷键(肖雄等, 2015); 此外, 对于 $1620 \text{ cm}^{-1} \sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ 没有吸收峰证明缺乏氨基。同时在 1077 cm^{-1} 和 1099 cm^{-1} 的峰均属性与 OH 的角振动的变化。我们从吸收在 872 cm^{-1} , 818 cm^{-1} 处推断出该多糖构型是 β -D-呋喃果糖(许峰等, 2014)。在 1740 cm^{-1} 没有吸收, 提示我们 COP-1 结构中没有糖醛酸。

1.5 COP-1 核磁分析

COP-1 的氢谱(图 6A, D₂O 作溶剂)显示有 7 个低场质子信号: δ H 4.23 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、4.07 (t, J = 8.3 Hz, 1H)、3.90 (d, J = 10.1 Hz, 1H)、3.83 (m, 2H)、3.72 (m, 2H); COP-1 的氢谱(图 6B, DMSO-d₆ 做溶剂)出现三个羟



基的信号: δH 5.18 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H)、4.75 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H)、4.62 (s, 1H)。在 COP-1 碳谱(图 6C)和 HSQC (图 6D)中出现了 6 个碳原子, 包括一个季碳信号(δC 103.1), 三个叔碳的信号(δC 80.9, 76.8, 74.1), 两个仲碳信号 (δC 62.0, 60.7), 通过对比文献(叶冠等, 2005)糖单元的结构被推断为呋喃型的果糖。呋喃果糖的异头碳信号(δC 103.1)表明糖环的构型是 β 构型。在 HMBC 图谱中(图 6E, DMSO- d_6 做溶剂)体现了-OH 和-C 的相关性(图 7): OH-3 和 C-2、C-3、C-4 有相关; OH-4 和 C-3、C-4、C-5 有相关; OH-6 和 C-5、C-6 有相关, 表明 OH-1 和 OH-2 的羟基参与糖苷键的形成。最终我们确定多糖 COP-1 的结构如下:

$[\rightarrow 1)-\beta\text{-D-fru-(2}\rightarrow 1)-]_n$

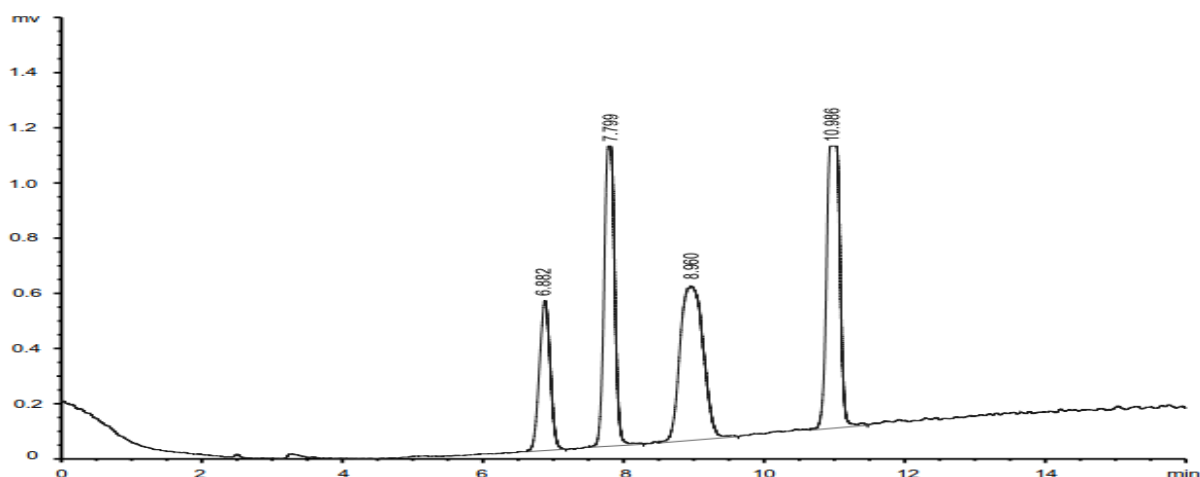


图 3 4 种单糖的液相

注: 四中单糖的保留时间: 木糖=7.099 min; 果糖=7.710 min; 甘露糖=8.620 min; 葡萄糖=10.549 min

Figure 3 Liquid of four kinds of standard monosaccharide

Note: Retention time of four kinds of monosaccharide: xylose $t_R=6.882$ min; fructose $t_R=7.799$ min; mannose $t_R=8.960$ min; glucose $t_R=10.986$ min)

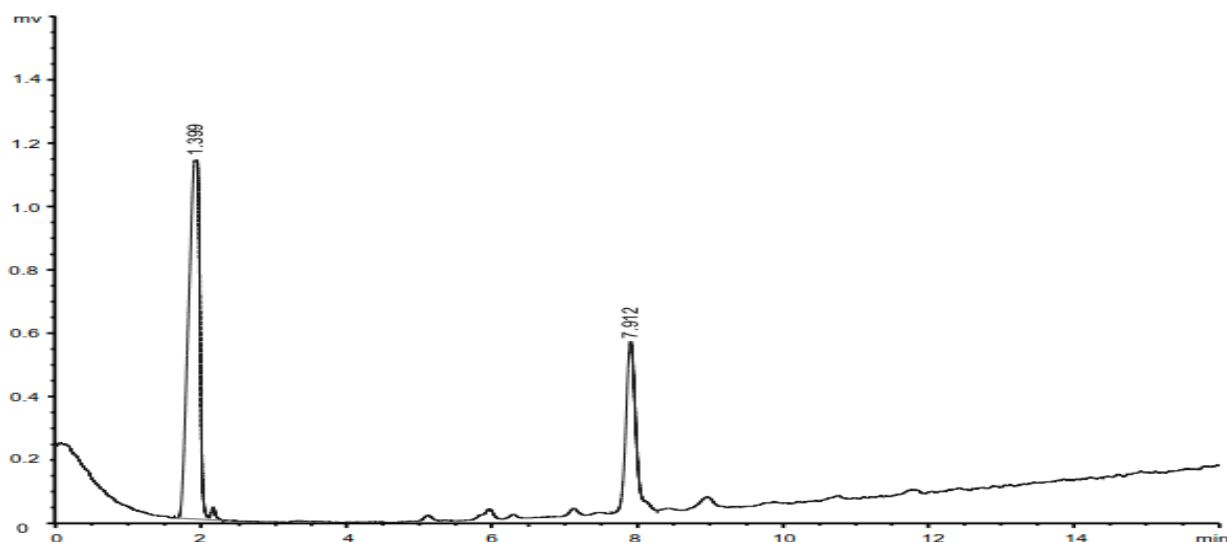


图 4 COP-1 单糖组分的高效液(果糖=7.912 min)

Figure 4 Hydrolyzing of COP-1 (fructose $t_R=7.912$ min)

2 讨论

从党参中分离出的水溶性果聚糖经 IR、 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMBC 和 HMQC 等核磁图谱, 推断 COP-1 的结构是: $\rightarrow 1)-\beta\text{-D-fru-(2}\rightarrow 1)$ 。另外, 我们分析该多糖的单糖组分时没有采取衍生化的方法, 而是将水解样品进高效分析。采用非衍生化的方法, 可以避免不同单糖之间的相互转化, 同时, 减少操作步骤以降低人为误差(这是一种精确的方式分析单糖组成, 原因是不经过衍生化就不会有样品的损失)。此外, 果糖在碱性条件下会发生结构的转变, 转变成葡萄糖和甘露糖(Fu and O'Neill, 1995), 假设某种多糖的单糖组成中含有果糖, 葡



葡萄糖、甘露糖(或者是其中的一种), 这样子的话会不利于单糖的组成分析。IR 和核磁(包含 2DNMR)技术相结合推测出 COP-1 结构。

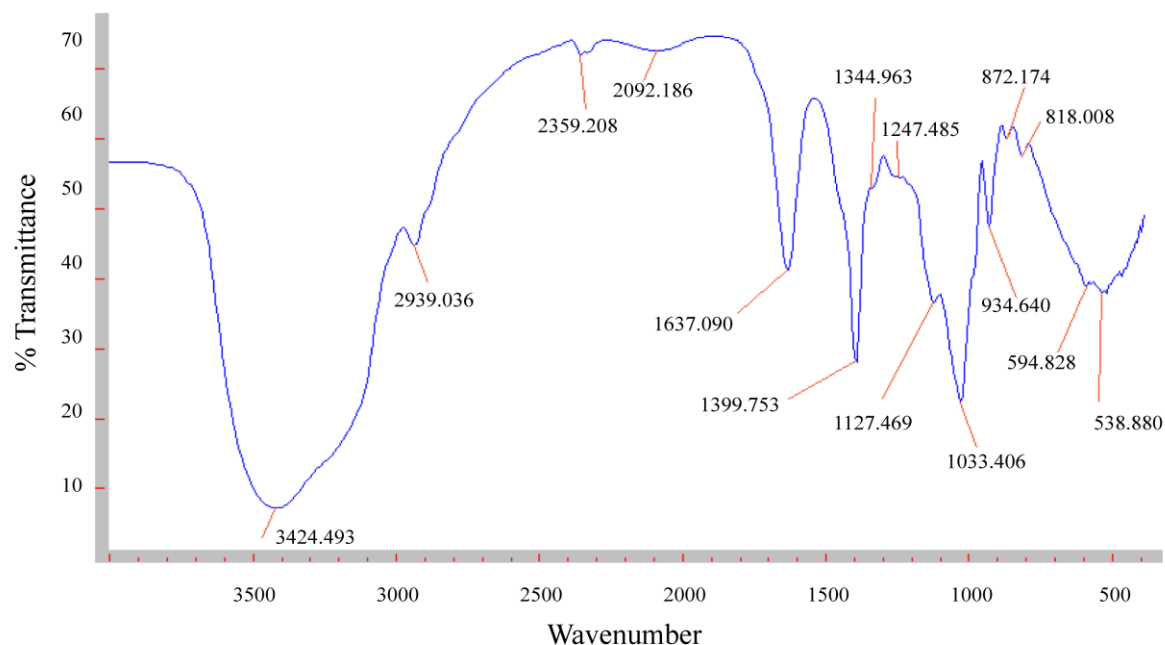


图 5 COP-1 红外吸收

Figure 5 FT-IR spectrum of COP-1

3 材料与方法

3.1 实验材料

洛龙党参购于遵义市道真县, 经遵义医学院杨建文教授鉴定为: *Codonopsis pilosul* (Franch.) Nannf. 甲醇、乙醇、三氟乙酸、葡萄糖、正丁醇等购自于成都市科伦化工试剂厂; 硝酸钠购于上海化学试剂总厂; 氯化钠, D-甘露糖, D-(+)-木糖, D-(-)果糖购自国药集团化学试剂有限公司(均为分析纯); 二甲亚砜、D₂O (色谱纯)、KBr (光谱纯)、普鲁兰多糖(分子量: 1 000 Da, 5 000 Da, 12 000 Da, 25 000 Da, 50 000 Da)等购自于 SIGMA-ALDRICH 公司。

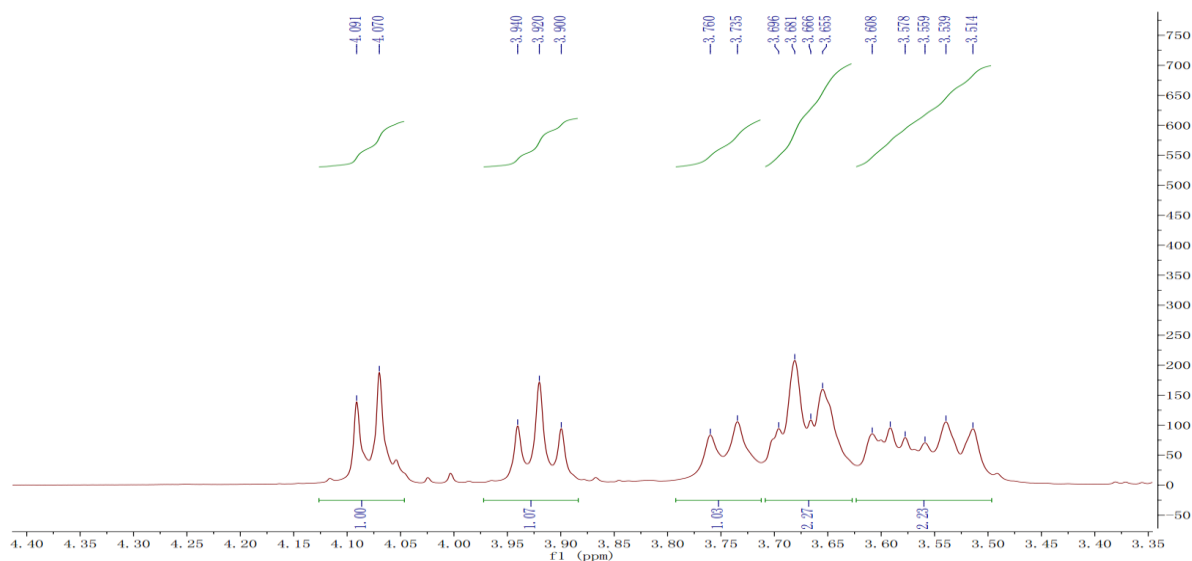


图 6A COP-1 氢谱谱图(D₂O 做溶剂)

Figure 6A ¹H NMR spectrum of the COP-1 (400 MHz, D₂O)

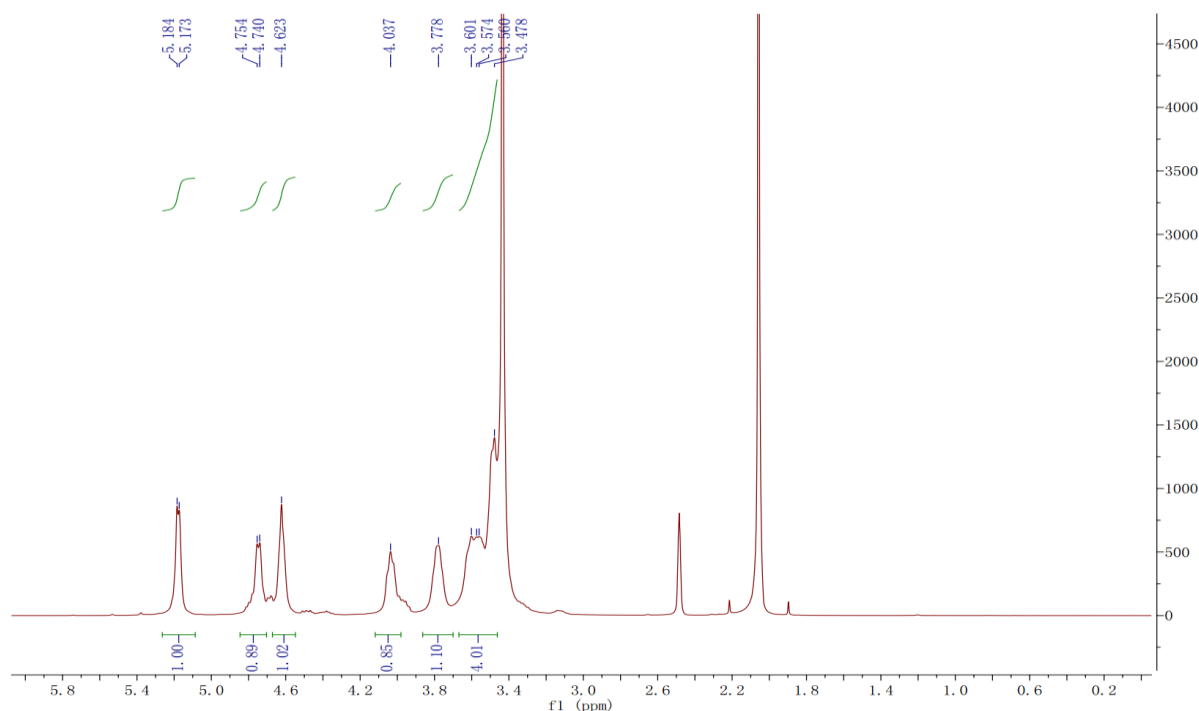


图 6B COP-1 氢谱谱图(DMSO 做溶剂)

Figure 6B ^1H NMR spectrum of the COP-1 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

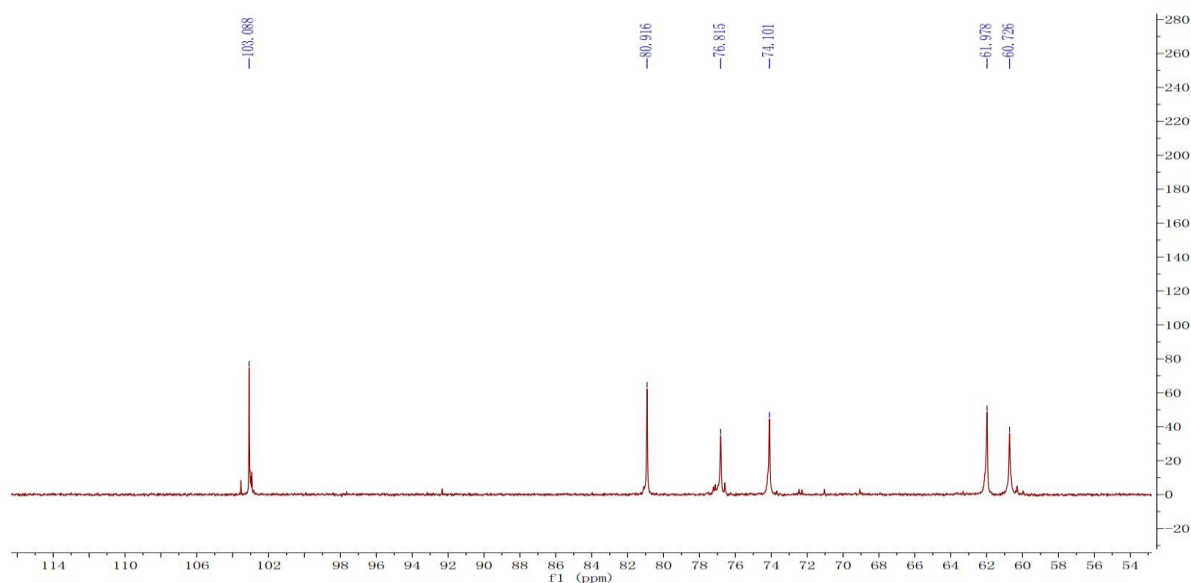


图 6C COP-1 碳谱谱图(D_2O 做溶剂)

Figure 6C ^{13}C NMR spectrum of the COP-1 (D_2O as the solvent)

3.2 粗多糖的分离纯化

100 g 粗多糖溶于 100 mL 去离子水, 1580 ($\times g$)离心 10 min 除去不溶物。加入无水乙醇使多糖溶液中乙醇终浓度为 35%, 然后将其存储在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下两周。两周后在烧杯的底部, 出现了白色沉淀, 冷冻干燥得到白色粉末。称取 1 g 白色粉末溶解在 30 mL 去离子水, 然后用 10 mL Sevag 试剂(正丁醇:氯仿=1:4)溶液中重复加入三次去除蛋白质组分。取制得白色粉末粗多糖 0.5 g 溶解在 10 mL 去离子水中, 上 Sephacryl S-200HR (2.6 \times 140 cm, Whatman)柱, 0.2 mol/L NaCl 等度洗脱, 恒流泵流速: 0.6 ml/min, 然后用硫酸苯酚法跟踪检测, 收集主峰溶液, 透析, 浓缩。进一步的纯化通过 Sephadex G-25 (2.6 \times 50 cm, Whatman)柱, 用去离子水洗脱以 0.3 mL/min 的流速洗脱。收集主峰, 透析, 并冻干, 命名为 COP-1。

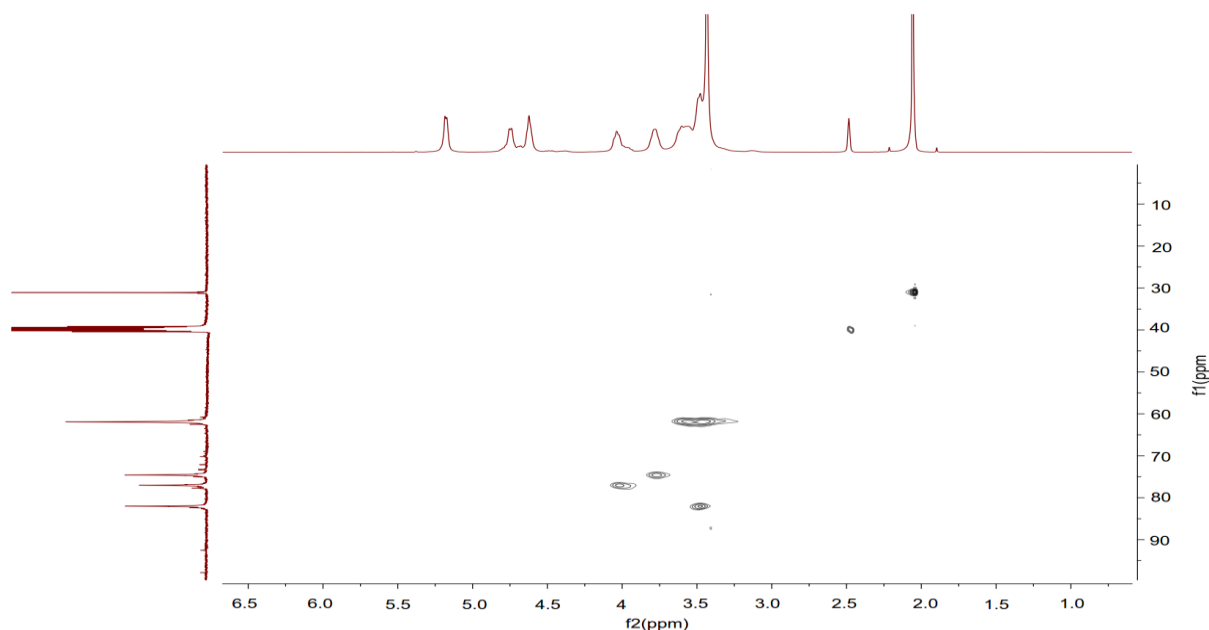


图 6D COP-1 HSQC 谱图(DMSO 做溶剂)
Figure 6D HSQC spectra of COP-1 (400 MHz, DMSO- d_6)

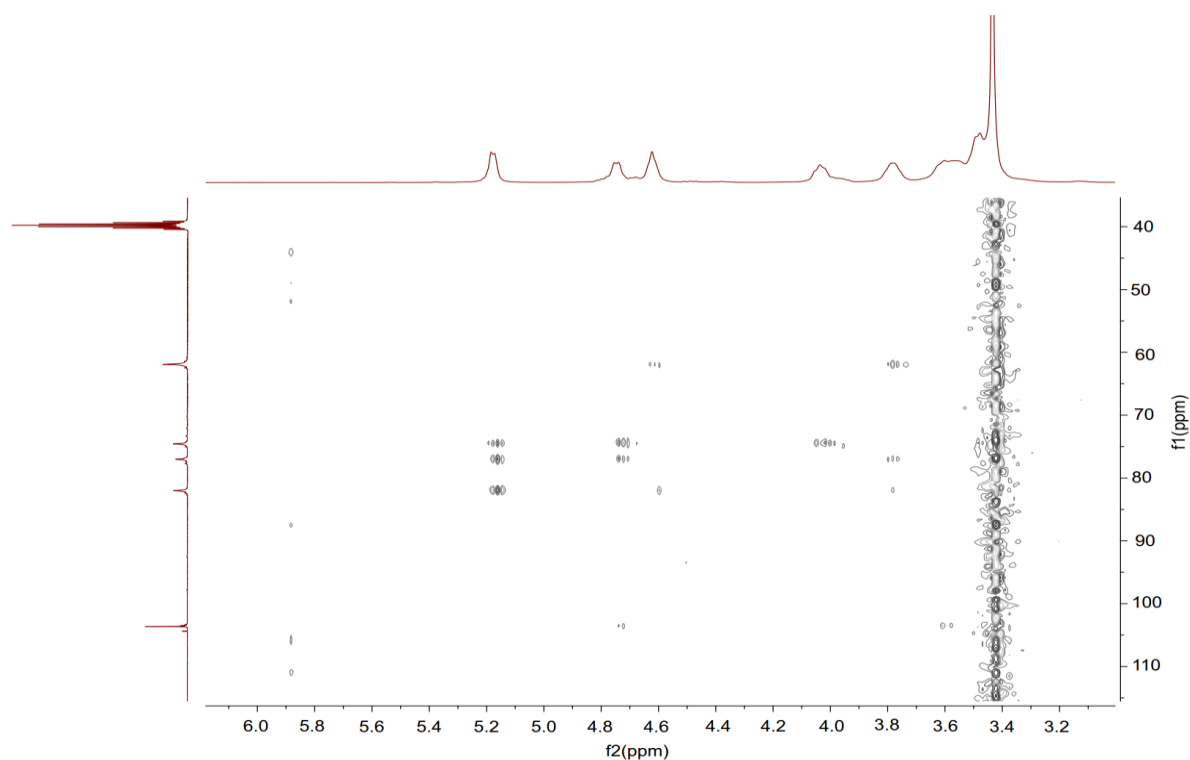


图 6E COP-1 是 HMBC 谱图(DMSO 做溶剂)
Figure 6E HMBC spectra of COP-1(400 MHz, DMSO- d_6)

3.3 多糖 COP-1 均一性和分子量确定

1 mg 纯化的 COP-1 溶解在 1 mL 去离子水中, 8 827 ($\times g$)离心 5 min, 收集上清液, 待上 HPLC 分析。HPGPC 的具体测试条件如下: Agilent 高效液相系统(1 260 HPLC Pump, In line Degasser, 1 260 Infinity Refractive Index Detector, Waters Ultrahydrogel 250 (7.8 \times 300 mm)色谱柱, 流动相: 0.2 mol/L 硝酸钠, 流速: 0.6 mL/min, 进样体积: 20 μ L, 柱温: 30 $^{\circ}$ C(姚晓东等, 2015)。

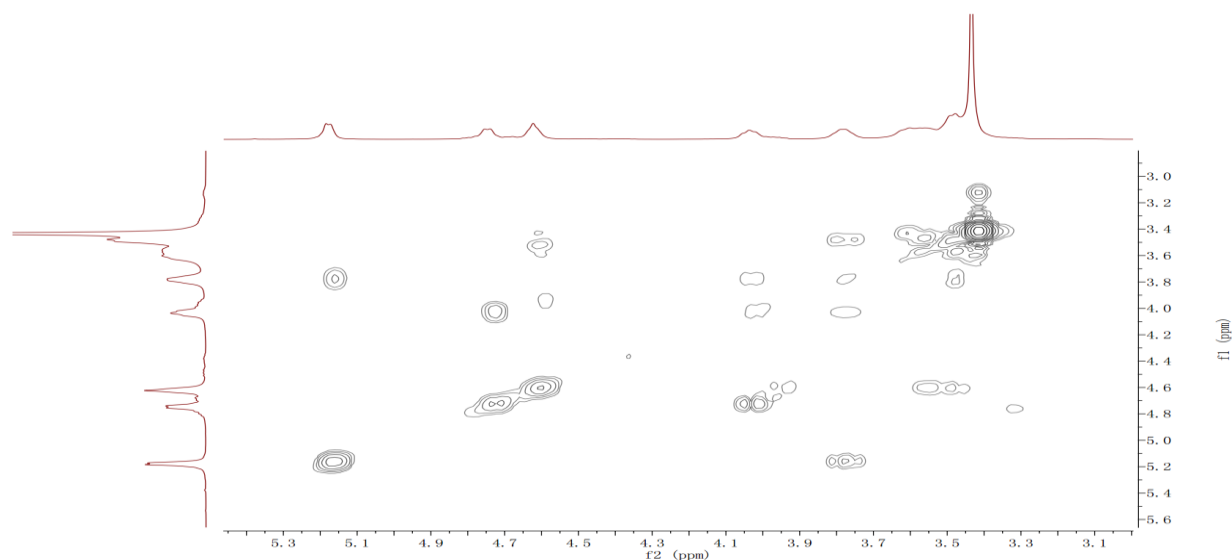


图 6F COP-1 是 ^1H - ^1H COSY 谱图(DMSO 做溶剂)

Figure 6F ^1H - ^1H COSY spectra of COP-1 (400 MHz, DMSO- d_6)

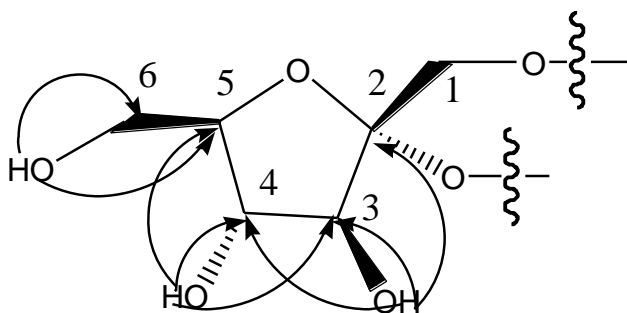


图 7 果糖单元主要的 HMBC 相关

Figure 7 Key HMBC correlations of fructose unit

3.4 多糖 COP-1 组分分析-HPLC 法

取约 1 mg COP-1 置于安瓿瓶中, 加入 1.5 mL 的 2 mol/L 的三氟乙酸, 然后封管在 100℃ 的条件下水解 3 h (Hu et al., 2015)。接着用旋转蒸发器旋干水解液, 加入 1 mL 的甲醇接着旋蒸除去多余的三氟乙酸。然后用 1 mL 去离子水复溶, 8 827 ($\times g$)离心 5 min, 并收集上清液。色谱分析条件如下: Agilent 高效液相系统(1 260 HPLC Pump, In line Degasser, Evaporative Light-scattering Detector, Xbridge BEH Amide (4.6 \times 250 mm)色谱柱, 流动相: A- 80%乙腈水溶液含 0.2%三乙胺;B-30%乙腈水溶液含 0.2%三乙胺, ELSD 检测器漂移管的温度: 30℃, 雾化温度: 30℃, 梯度洗脱程序: A 100%~40%~100%, 0~21.00~33.00 min, 进样体积: 20 μL , 柱温: 35℃。

3.5 红外分析

将适量的多糖 COP-1 和 KBr 置于 105℃ 条件下干燥 6 h, 为了除去这两种物质中的水分, 以便更好地分析多糖的结果。在研钵中加入 2 mg 的多糖样品和 400 mg 已经烘干的 KBr 充分研磨。然后进行压片扫描分析, 扫描波长范围在 500~4 000 cm^{-1} 。

3.6 核磁分析

核磁是一种很有效的工具用来分析多糖的复杂结构, 可以提供精确的信息, 包括单糖组成、连接方式、糖环的构型等。室温下取 100 mg COP-1 分别用了 99.9% DMSO 和 99.96% D₂O 溶解, 如不能完全溶解, 则需要加热使其全部溶解。运用 Agilent Technologies 400/54 Annual Refill 扫描分析。

作者贡献

刘章泉负责试验操作及文章撰写; 姚晓东负责文章校对, 实验辅助; 肖世基负责文献实验技术指导 and 核磁图谱的解析; 陈晓兰、吴倩男负责文献查阅; 余兰负责实验路线设计和文章修改。



致谢

本研究由遵义医学院博士启动资金协助项目(ZMKD2013-006)和贵州省自然科学基金(QKH-LH[2014]7563)共同资助。

参考文献

- Feng P.P., Li Z.X., and Yuan Z., 2012, Review on the phytochemical and pharmacological study of *Codonopsis pilosula*, *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao (Journal of Shenyang Pharmaceutical University)*, 29(4): 307-310 (冯佩佩, 李忠祥, 原忠, 2012, 党参属药用植物化学成分和药理研究进展, *沈阳药科大学学报*, 29(4): 307-310)
- Fu D.T., and O'neill R.A., 1995, Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 227(2): 377-384
- Huheihel M., Ishanu V., Tal J., and Arad S., 2002, Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 50(2-3): 189-200
- Sun Y.X., and Liu J.C., 2008, Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity, *Int. J. Biol. Macrol.*, 43(3): 279-282
- Wang H., Zhang N.Y., Li H.Y., and Yu L., 2015, Effect of sulfated modification on *Codonopsis pilosula* polysaccharide against HSV-1, *Zhongguo Keji Lunwen (China Science Paper)*, 10(6): 705-709 (王欢, 张能英, 李海英, 余兰, 2015, 硫酸化修饰对党参多糖体外抗 I 型单纯疱疹病毒的影响, *中国科技论文*, 10(6): 705-709)
- Wang J.H., Yuan H., and Li X.H., 2012, Antioxidant and antifatigue activities of flavonoid from *Codonopsis clematidea* (Schrenk), *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa (Natural Product Research and Development)*, 24(8): 1035-1039 (汪建红, 原慧, 李雪红, 2001, 新疆野生党参总黄酮体内抗氧化及抗疲劳作用研究, *天然产物研究与开发*, 24(8): 1035-1039)
- Wang Z.T., Ng T.B., Yeung H.W., and Xu G.B., 1996, Immunity effect of a polysaccharide-enriched preparation of *Codonopsis pilosula* roots, *Gen. Pharmacol.*, 27(8): 1347-1350
- Xiao X., Peng M., Tang J.B., and Yang J., 2015, Optimization on sulfated technology of *Campanumoea javanica* polysaccharide by orthogonal design, *Huaxi Yaoxue Zazhi (West China Journal of Pharmaceutical Sciences)*, 30(5): 556-558 (肖雄, 彭梅, 唐健波, 杨娟, 2015, 正交实验优选土党参多糖的硫酸化工艺, *华西药理学杂志*, 30(5): 556-558)
- Xu F., Wu L.F., Lin S., Wang H.Y., Teng Y., Liu Z.Q., and Zheng Y.G., 2014, The content determination and structural characterization of polysaccharides from the mycelium of *Ophiocordyceps sinensis*, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 33(6): 1294-1302 (许峰, 吴林芳, 林善, 王红燕, 腾毅, 柳志强, 郑裕国, 2014, 发酵冬虫夏草菌丝体中草多糖含量的检测及结构鉴定, *基因组学与应用生物学*, 33(6): 1294-1302)
- Yang F.R., Li Z.M., and Gao J.P., 2011, Separation and structural characterization and anti-tumor effect *in vitro* of polysaccharides from *Radix codonopsis*, *Shizhen Guoyi Guoyao (Lishizhen Medicine and Materia Medica Research)*, 22(12): 2876-2878 (杨丰榕, 李卓敏, 高建平, 2011, 党参多糖分离鉴定及体外抗肿瘤活性的研究, *时珍国医国药*, 22(12): 2876-2878)
- Yang W.Q., Wen Y.M., Lin W.D., Xie Y.H., and Chen C.M., 2015, Effect of polysaccharides from *Coelomaetra antiquata* on human carcinoma of esophagus cells transplanted in nude mice, *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa (Natural Product Research and Development)*, 27(8): 1402-1406 (杨维群, 温扬敏, 林文东, 谢永华, 陈长明, 2015, 西施舌多糖对人食管鳞癌裸鼠移植瘤作用的研究, *天然产物研究与开发*, 27(8): 1402-1406)
- Yao X.D., Liu Z.Q., Wang W., and Zhou X.M., 2015, Molecular weight distribution and monosaccharide composition analysis for water-soluble polysaccharide from *Dendrobium nobile* Lindl, *Zunyi Yixueyuan Xuebao (Acta Academiae Medicinae Zunyi)*, 38(3): 239-243 (姚晓东, 刘章泉, 汪巍, 周旭美, 金钊石斛水溶性多糖分子量分布及单糖组份分析, *遵义医学院学报*, 38(3): 239-243)
- Ye G., Li C., Huang C.G., Li Z.X., Wang X.L., and Chen Y.Z., 2005, Chemical structure of fructosan from *Codonopsis pilosula*, *Zhongguo Zhongyao Zazhi (China Journal of Chinese Materia Medica)*, 30(17): 1338-1339 (叶冠, 李晨, 黄成钢, 李志孝, 王新亮, 陈耀祖, 党参果聚糖的化学结构, *中国中药杂志*, 30(17): 1338-1339)
- Zhu E.Y., He Q., Wang Z.T., Xu L.S., and Xu G.J., 2001, Chemical study on the root of *Codonopsis pilosula*, *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao (Journal of China Pharmaceutical University)*, 32(2): 94-95 (朱恩圆, 贺庆, 王峥涛, 徐璐珊, 徐国钧, 2001, 党参化学成分研究, *中国药科大学学报*, 32(2): 94-95)