

一种车前子多糖的分离纯化及单糖组成分析

赵宏^{1,2}, 柴桂芳¹, 王秋红¹, 杨炳友¹, 管勇舟¹, 匡海学^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的: 分离纯化车前子多糖, 分析车前子均一多糖的单糖组成。方法: 采用阴阳弱离子串联树脂柱脱蛋白和初步分离, DEAE Cellulose DE-52 和 Sephacryl S-400 柱色谱分离纯化得车前子均一多糖(PP-B10), 利用紫外-可见吸收光谱、红外光谱和高效体积排阻色谱(HPSEC)分析 PP-B10 的结构特性和纯度, 柱前衍生-HPLC 法确定 PP-B10 的单糖组成。结果: PP-B10 纯度较高, 含有少量蛋白, 由甘露糖、核糖、半乳糖醛酸、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖 7 种单糖组成, 其物质的量比为 147.2:3.2:22.5:4.8:1.1:95.7:28.8 的酸性多糖。结论: PP-B10 是一种全新单糖组成的车前子均一多糖。

[关键词] 车前子; 多糖; 单糖组成; 柱前衍生

[中图分类号] R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0097-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190097

Isolation, Purification and Monosaccharide Analysis of a Polysaccharide from Plantaginis Semen

ZHAO Hong^{1,2}, CHAI Gui-fang¹, WANG Qiu-hong¹, YANG Bing-yon¹, GUAN Yong-zhou¹, KUANG Hai-xue^{1*}

(1. Pharmacy College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Pharmacy College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to isolate and purify the polysaccharide from Plantaginis Semen and to analyse the monosaccharide composition of the polysaccharide. **Method:** The crude polysaccharide from hot water extraction was subject to remove protein and preliminary isolated through Amberlite FPA90-Cl⁻ + Amberlite IRC-84, purified by DEAE-cellulose chromatography and Sephacryl S-400 chromatography, a polysaccharide fraction named *Plantago depressa* L. polysaccharide B10 (PP-B10) was obtained. The structural characterization and purity of PP-B10 were identified by Ultraviolet-visible Spectrophotometry and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The monosaccharide composition analyses of PP-B10 was conducted by PMP pre-column derivatization high performance liquid chromatography. **Result:** A acidic polysaccharide fraction in high purity named PP-B10 was obtained from Plantaginis Semen and it was mainly composed of mannose, ribose, galacturonic acid, galactose, xylose, arabinose and fucose. **Conclusion:** PP-B10 was a novel polysaccharide with new monosaccharide composition which was found in Plantaginis Semen.

[Key words] Plantaginis Semen; polysaccharides; monosaccharide composition; pre-column derivatization

车前子为车前科植物车前或平车前的干燥成熟种子, 又名车前实、猪耳朵穗子、虾蟆衣子、凤眼前仁, 其味甘, 性微寒, 归肝、肾、肺、小肠经。具清热利

尿, 渗湿通淋, 明目, 祛痰作用。现代药理研究证明, 车前子具有免疫调节^[1-3]、抗氧化^[4]、止咳祛痰^[5]、降血脂^[6]、降血糖^[7]等丰富的药理活性, 在临床使

[收稿日期] 20130918(018)

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973 计划)项目(2013CB531801)

[第一作者] 赵宏, 博士, 讲师, 从事中药活性成分的结构和活性研究, Tel:0454-8610838, E-mail:0316zh@163.com

[通讯作者] * 匡海学, 博士, 教授, 从事中药及复方药效物质基础的化学研究, Tel:0451-82193001, E-mail:hokuang@hotmail.com

用中,可用于治疗腹泻^[8]、高血压^[9]、咳嗽^[10]、小儿遗尿、痛风、青光眼、便秘等疾病,收效甚好。车前子的诸多成分中,以多糖的含量最为丰富,多年来,研究者就车前子多糖的结构^[11-13]及活性开展研究,从对补体作用^[14]、骨髓来源树突状细胞表型和吞噬功能的影响^[2]及巨噬细胞免疫调节作用^[15]等方面对车前子多糖进行免疫活性研究。本文在前期免疫活性车前子多糖筛选基础上,对免疫调节活性最强的热水提取车前子多糖进行分离纯化,得到相对分子质量均一的多糖 PP-B10,并利用红外光谱、紫外光谱考察 PP-B10 的光谱特征,高效体积排阻色谱法(HPSEC)判断 PP-B10 的纯度,PMP 柱前衍生-HPLC 法分析 PP-B10 的单糖组成,为进一步在分子水平上研究车前子多糖的免疫活性提供物质基础。

1 材料

2695 高效液相色谱仪(Waters 公司),ELSD-2000 蒸发光检测器(Alltech 公司),FTIR-8400S IR(日本岛津公司),UV-752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器厂),FDU-1200 型真空冷冻干燥机(日本东京理化株式会社),BS-100N 型自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂)。

离子交换纤维素 DEAE Cellulose 52(Whatman International Ltd.);阴、阳弱离子交换树脂 FPA90Cl⁻,IRC-84;丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-400(Amberlite Co.);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(北京化学试剂公司),甲醇重结晶2次;单糖对照品甘露糖(Man)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、核糖(Rib)、岩藻糖(Fuc)均为 Pharmacia 公司产品,质量分数均 > 99%;水为 Milli-Q 超纯水(Millipore 公司),三氟乙酸(TFA,德国 Merck 公司)。

车前子采自黑龙江省五常市,经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为车前科植物车前 *Plantago depressa* L. 的干燥种子,即小粒车前子。

2 方法

2.1 车前子多糖的提取 取干燥车前子 1.0 kg,用 95% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,除去部分小分子化合物和脂肪油,药渣阴干。药渣依次用冷水浸提 12 h,3 次,热水回流提取 2 h,3 次,2 份上清液分别进行如下处理:合并上清液,浓缩,加入 95% 乙醇使上清液乙醇体积分数达 80%,室温静置 24 h,反复醇沉 3 次,合并沉淀,冷冻干燥得车前子冷浸粗多糖(PLP-A)和热提粗多糖(PLP-B)。

2.2 车前子多糖的分离纯化 将 PLP-B10 经过 FPA90-Cl⁻(70 cm × 7.5 cm) + IRC-84(70 cm × 7.5 cm) 阴阳弱离子串联树脂柱脱色、脱蛋白和初步分离,得水,0.5,1.0 mol·L⁻¹ NaCl 洗脱组分。取水洗组分采用 DEAE Cellulose DE-52(70 cm × 4.5 cm) 离子交换柱色谱和 Sephacryl S-400(70 cm × 1.6 cm) 凝胶色谱柱进行分离纯化,依次以蒸馏水和梯度 NaCl 溶液为洗脱液,体积流量 0.5 mL·min⁻¹,流出液 5 mL/管,苯酚-硫酸法检测,以洗脱管数-吸光度值绘制洗脱曲线,合并相同峰位的流份,冷冻干燥,得到的组分称为车前子均一多糖(*P. depressa* polysaccharide B10, PP-B10)。

2.3 纯度检验 将 PP-B10 配成质量浓度为 2 g·L⁻¹ 的糖溶液,过 0.45 μm 滤膜,进行 HPSEC 检测。Waters 高效液相色谱系统(2996 泵,Alltech ELSD2000,Shodex sugar KS-805 + 保护柱 KS-G),流动相为超纯水,室温,流速 0.5 mL·min⁻¹。

2.4 红外光谱和紫外光谱分析 取 1~2 mg 多糖样品,用 KBr 压片进行常规 IR 分析。将 PP-B10 以蒸馏水配成质量浓度为 2.0 g·L⁻¹ 的溶液,离心,取上清液在 190~400 nm 利用紫外-可见分光光度计进行紫外全波长扫描,观察紫外光谱在 280,260 nm 处的吸收情况。

2.5 单糖组成分析

2.5.1 混合单糖对照品的制备 精密称取单糖对照品(Man, GlcUA, GalUA, Rha, Glc, Gal, Ara, Xyl, Rib, Fuc)各 10 mg,用双蒸水配成 1 mmol·L⁻¹ 的混合单糖对照品储备液;同时将每种单糖配制成 1 mmol·L⁻¹ 的标准单糖对照品储备液。

2.5.2 车前子多糖水解液的制备 称取 PP-B10 10 mg,加入 2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸(TFA)溶液 2.0 mL,充入 N₂ 封管后,于 120 °C 水解 160 min,减压蒸馏除去未反应的 TFA,加入双蒸水稀释到 2.0 mL,备用。

2.5.3 衍生化标记 精密移取标准单糖对照品、混合单糖对照品及车前子多糖水解液各 1.4 mL,分别置于 7.0 mL 离心管中,依次加入 700 μL PMP 甲醇溶液和 700 μL 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液,70 °C 水浴加热反应 30 min,取出,室温放置 10 min;加入 700 μL 0.3 mol·L⁻¹ HCl 溶液,中和,混匀后用等体积乙酸异戊酯和三氯甲烷分别萃取 2 次,取甲醇-水相过 0.45 μm 微孔膜过滤后,供 HPLC 进样分析。

2.5.4 HPLC 分析 采用 Waters 2695 高效液相仪进行分析,Diamonsil C₁₈ HPLC 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 30 °C,流动相为 0.1 mol·L⁻¹

磷酸盐缓冲液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.7)-乙腈 84:16(0~50 min), 87:13 (50.1~100 min), 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 紫外吸收波长为 245 nm。

2.5.5 标准曲线的绘制及回归方程的确定 精密移取上述衍生化标记的混合单糖对照溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别加入 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0 mL 甲醇制成梯度对照溶液, 进行 HPLC 检测, 以质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 制作标准曲线, 得到各单糖的回归方程, 与样品 HPLC 图谱比对后, 确定 PP-B10 中单糖种类及比例。

3 结果

3.1 均一多糖的分离纯化 车前子粗多糖经 DEAE Cellulose DE-52 柱层析分离得到 5 个主峰, 即 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱组分, 其中 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱组分有 2 个峰。将 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱组分继续用 Sephacryl S-400 凝胶柱纯化, 得到 PP-B10。经 2.3 项下纯度检验, PP-B10 呈现均一对称单峰, 证明其为相对分子质量均一多糖且纯度可达 95% 以上。

3.2 红外光谱和紫外光谱分析 PP-B10 水溶液经紫外扫描后, 发现在 260 nm 处无吸收, 但是在 280 nm 处有较弱吸收。说明该多糖中没有核酸但是含有少量蛋白。

IR 光谱显示 PP-B10 具有多糖类的一般特征。3 338.8 cm^{-1} 处有强而宽的吸收峰, 是 O-H 伸缩振动峰; 2 925.8 cm^{-1} 是 C-H 键的伸缩振动峰, 1 043.43 cm^{-1} 是 C-O 伸缩振动引起的; 890.77 cm^{-1} 处有吸收, 说明该多糖有 β -吡喃糖苷键。PP-B10 的 IR 见图 1。

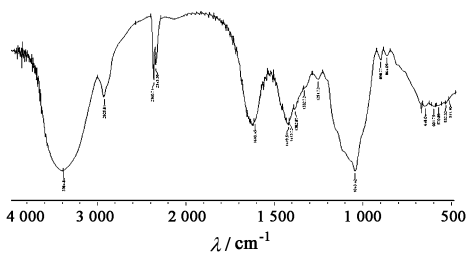
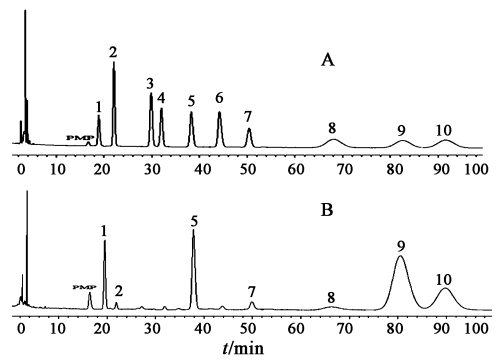


图 1 PP-B10 的 IR 色谱

3.3 单糖组成分析 PP-B10 经衍生化后通过 HPLC 测定其单糖组成, 分析可知 PP-B10 主要由甘露糖、核糖、半乳糖醛酸、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖组成, 物质的量比为 147.2:3.2:22.5:4.8:1.1:95.7:28.8。HPLC 结果见图 2。

4 结论

PP-B10 是纯度较高的酸性多糖, 含有少量蛋



A. 混合标准单糖 PMP 衍生物; B. PP-B10 水解单糖 PMP 衍生物

图 2 单糖组成分析 HPLC

白, 不含有核酸, 其中主要含有甘露糖、核糖、半乳糖醛酸、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖 7 种单糖; PMP 柱前衍生-HPLC 法对车前子多糖的单糖组成分析精确有效。在本研究基础上, 可以进行 PP-B10 的免疫机制研究, 进而开发多糖类免疫调节剂; 另一方面, 可以进行抗氧化和抗炎等活性研究, 为合理开发和利用车前子这一传统中药奠定前期研究基础。

[参考文献]

- [1] Huang D F, Xie M Y, Yin J Y, et al. Immunomodulatory activity of the seeds of *Plantago asiatica* L. [J]. J Ethnopharm, 2009, 124(3): 493.
- [2] Huang D F, Tang Y F, Nie S P, et al. Effect of phenylethanoid glycosides and polysaccharides from the seed of *Plantago asiatica* L. on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells [J]. Europ J Pharm, 2009, 620(1/3): 105.
- [3] Anne Berit Samuelsen, Ingrid Lunda, Jali M Djahromia, et al. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 38(2): 133.
- [4] Hu J L, Nie S P, Xie M Y. High pressure homogenization increases antioxidant capacity and short-chain fatty acid yield of polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. [J]. Food Chem, 2013, 138(4): 2338.
- [5] 舒晓宏, 郭桂林, 崔秀云, 等. 车前子甙镇咳、祛痰作用的实验研究 [J]. 大连医科大学学报, 2001, 23(4): 254.
- [6] 张杰, 李兴琴, 王素敏, 等. 车前子对高脂血症大鼠血脂水平及抗氧化作用的影响 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(3): 299.

鼠曲草乙酸乙酯部位化学成分 II

黄豆豆¹, 李君丽^{1,2}, 姚风艳^{1,2}, 黄光辉^{1,2}, 薛丹¹, 孙连娜^{1*}

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福州 350108)

[摘要] 目的: 研究鼠曲草乙酸乙酯部位化学成分。方法: 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 等分离纯化手段相结合对鼠曲草进行分离纯化。通过理化性质和波谱数据(¹H-NMR, ¹³C-NMR)进行结构鉴定。结果: 从鼠曲草中分离鉴定了13个化合物, 分别鉴定为咖啡酸乙酯(1), 原儿茶酸乙酯(2), 对羟基肉桂酸(3), 4-羟基苯乙酮(4), 原儿茶酸(5), 3-(4'-formylphenoxy)-4-methoxybenzaldehyde(6), desmethylyangonine-4'-glucopyranoside(7), 4'-hydroxydehydrokawain(8), 绿原酸(9), 1,4,5-三咖啡酰奎宁酸(10), 1,5-二咖啡酰奎宁酸(11), 1,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯(12), 1,3-二咖啡酰奎宁酸(13)。结论: 化合物1, 2, 4~7, 10 为首次从鼠曲草属植物中分离得到, 化合物3, 8 为首次从菊科植物中分离得到。

[关键词] 鼠曲草; 化学成分; 鼠曲草属; 结构鉴定

[中图分类号] R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0100-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190100

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0927.012.html>

[网络出版时间] 2014-08-19 9:27

Chemical Constituents of Ethyl Acetate Extract Part of *Gnaphalium affine* II

HUANG Dou-dou¹, LI Jun-li^{1,2}, YAO Feng-yan^{1,2}, HUANG Guang-hui^{1,2}, XUE Dan¹, SUN Lian-na^{1*}

(1. School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** This article aimed to study chemical constituents of *Gnaphalium affine*. **Method:**

[收稿日期] 20130923(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373954);上海市科委资助课题项目(13ZR1448800)

[第一作者] 黄豆豆, 硕士, Tel:15221957803, E-mail:hdd890920@163.com

[通讯作者] * 孙连娜, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药及天然药物的品质评价及新药研发, Tel:021-81871308, E-mail:ssnmr@163.com

[7] 曾金祥, 魏娟, 毕莹, 等. 车前子醇提物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 173.

[8] 杨福盛. 止泻妙药车前子[N]. 中国中医药报, 2005-6-27(6).

[9] 杨忠良, 温木生, 张子臻, 等. 专题笔谈关于车前子的功能[J]. 中医杂志, 1998, 39(10): 581.

[10] 钟百民, 朱晨, 王克勤, 等. 专题笔谈关于车前子的功能[J]. 中医杂志, 1998, 39(11): 645.

[11] Anne Berit Sajmuelsen. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. [J]. J Ethnopharm, 2000, 71(9): 1.

[12] Tomoda Masashi, Uno Masayo. Smith degradation products of Plantasan [J]. Chem Pharm Bull, 1972, 20

(4): 778.

[13] Tomoda Masashi, Tannaka Machiko. Three disaccharides obtained from plantasan by Partial acid hydrolysis [J]. Chem Pharm Bull, 1973, 21(5): 989.

[14] Samuelsen A B, Lund I, Djahmi J M, et al. Structural features and anticomplementary activity of some heteroxylan Polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 38(6): 133.

[15] 陈一晴, 聂少平, 黄丹菲, 等. 大粒车前子多糖对 RAW264·7 细胞一氧化氮生成的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 1119.

[责任编辑 邹晓翠]