

· 化学与分析 ·

# 白花蛇舌草总多糖的分离纯化、 结构鉴定及初步免疫活性分析

马河<sup>1,2</sup>, 程艳琳<sup>2</sup>, 张金杰<sup>2</sup>, 曹广尚<sup>3</sup>, 杨培民<sup>3\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省药学科学院 化学药物重点实验室, 济南 250101;  
3. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

**[摘要]** 目的: 分离纯化白花蛇舌草总多糖, 研究其对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫增强活性。方法: 采用超滤技术分离纯化白花蛇舌草总多糖, 高效凝胶渗透色谱-示差检测器方法测定相对分子质量, 柱前衍生化 HPLC 分析其单糖组成; 采用环磷酰胺致免疫低下小鼠碳粒廓清试验研究其免疫活性。结果: 从白花蛇舌草中分离得到 1 个单一多糖组分 ODP-1, 其相对分子质量 20.88 kDa, 单糖组成为甘露糖-鼠李糖-半乳糖醛酸-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖, 摩尔比 0.005:0.033:0.575:1.000:0.144:0.143; 免疫活性试验结果表明, ODP-1 可升高环磷酰胺致免疫低下小鼠廓清指数、吞噬指数、胸腺指数和脾指数。结论: 白花蛇舌草多糖 ODP-1 为均一多糖, 具有免疫增强活性。

**[关键词]** 白花蛇舌草; 多糖; 切向流超滤; 相对分子质量; 碳粒廓清

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0037-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220037

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.0952.005.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-10 9:52

## Effect of Preliminary Immune Activity and Structural Identification of a Polysaccharide Extracted from *Oldenlandia diffusa*

MA He<sup>1,2</sup>, CHENG Yan-lin<sup>2</sup>, ZHANG Jin-jie<sup>2</sup>, CAO Guang-shang<sup>3</sup>, YANG Pei-min<sup>3\*</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355 China; 2. Key Laboratory for Chemical Drug Research, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Ji'nan 250101 China;  
3. The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011 China)

**[Abstract]** **Objective:** The polysaccharide was separated and purified from *Oldenlandia diffusa* and the immuno-enhancing activity was evaluated in immunosuppression mice by intraperitoneal administration. **Method:** The crude polysaccharides were separated and purified by tangential-flow ultrafiltration, then the relative molecular weight was measured by gel column chromatography. The structure was analyzed by pre-column derivatization HPLC. The activity of the homogeneous polysaccharide was investigated by carbon clearance on immunosuppression mice. **Result:** A new homogeneous polysaccharide named ODP-1 was obtained from *O. diffusa*. The relative molecular weight of ODP-1 was about 20.88 kDa. ODP-1 was composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose with the molar ratio of 0.005:0.033:0.575:1.000:0.144:0.143. Immune activity indicated that ODP-1 can improve the clearance index, phagocytic index, the index of thymus and spleen of

**[收稿日期]** 20140625(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81274052); 山东省自然科学基金项目(ZR2011HL043); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013YY052)

**[第一作者]** 马河, 博士, 主管中药师, 从事中药新药研究, Tel:0531-812132827, E-mail:maheff@163.com

**[通讯作者]** \* 杨培民, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂研究, Tel:0531-68617607, E-mail:jnypm7777@126.com

immunosuppression mice. **Conclusion:** ODP-1 from *O. diffusa* is a homogeneous polysaccharide with immunoenhancing activity.

[**Key words**] *Oldenlandia diffusa*; polysaccharide; tangential-flow ultrafiltration; relative molecular weight; carbon clearance

白花蛇舌草<sup>[1]</sup>临床应用广泛,主治恶性肿瘤、肠炎、胃肠炎、阑尾炎、扁桃体炎、肺炎、泌尿系统感染等症。白花蛇舌草含有蒽醌类、黄酮类、萜类、甾醇、多糖等化学成分;药理研究表明,白花蛇舌草总多糖具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化及抗衰老等作用<sup>[2]</sup>。目前对白花蛇舌草多糖的研究主要集中在提取方法、除蛋白工艺和单糖组成<sup>[3-6]</sup>等方面,对均一多糖组分的分离纯化、相对分子质量测定及活性研究却少见报道。本研究从白花蛇舌草多糖中分离纯化得到均一多糖组分 ODP-1,并研究了它的相对分子质量和单糖组成及免疫活性,为进一步深入研究白花蛇舌草多糖提供了依据。

## 1 材料

**1.1 药材** 白花蛇舌草经山东中医药大学附属医院药学部提供,药学院李峰教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* 的干燥全草。

**1.2 仪器与试剂** 10A 系列高效液相色谱仪 (SPD-10A 型紫外检测器,RI-201H 型示差折光检测器,日本岛津),AE240 型电子分析天平 (Mettler),UV2201 型紫外分光光度计 (日本岛津),Labscale 小型切向流超滤系统 (Millipore)。

葡聚糖对照品系列 DXT 500, DXT 3K, DXT 20K, DXT 47K, DXT 300K, DXT 530K 重均相对分子质量分别为 505, 3 650, 20 100, 47 250, 291 600, 534 000 (American polymer standards corp.), 甘露糖 (批号 140651-200602), 鼠李糖 (批号 111683-200401), 半乳糖醛酸 (批号 11646200301), 葡萄糖 (批号 110833-200904), 半乳糖 (批号 100226-200404), 阿拉伯糖 (批号 1506-200001) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。

人参多糖注射液 (商品名亿美奇,山西普德药业股份有限公司生产,批号 20120201),注射用环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号 12020525),0.9% 氯化钠注射液 (辰欣药业股份有限公司生产,批号 120828110),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) [批号 G1109042,阿拉丁试剂 (上海)有限公司],蛋白酶 K (Sigma 公司,批号 SLBD8373L),乙腈 (色谱纯,GRAC02-03712),其他试剂均为分析纯。

**1.3 动物** 昆明种小鼠 60 只,SPF 级,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK (京)2012-0001。

## 2 方法

### 2.1 白花蛇舌草多糖的提取分离

**2.1.1 提取** 白花蛇舌草粉碎后用 80% 乙醇回流脱脂,待药渣挥干溶剂后,加 10 倍量水提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,减压浓缩至相对密度约 1.015 (60 ℃),加入蛋白酶 K 10 mg,40 ℃ 搅拌 2 h 去除蛋白,滤过,滤液过 D101 型大孔吸附树脂柱,收集过柱流出药液;加入乙醇使含醇量达 90%,静置过夜,抽滤,沉淀用乙醇洗涤,于 60 ℃ 减压干燥,得白花蛇舌草粗多糖 (ODP)。

**2.1.2 分离纯化** 取白花蛇舌草粗多糖溶于适量纯化水,0.22 μm 滤膜滤过,滤液分别用截留相对分子质量为 30,5 kDa 膜包超滤,收集 5 ~ 30 kDa 相对分子质量段截留液,加入乙醇使含醇量达 90%,静置,抽滤,沉淀用乙醇洗涤,于 60 ℃ 减压干燥,得白花蛇舌草精制多糖 (ODP-1)。

### 2.2 白花蛇舌草多糖 (ODP-1) 的结构鉴定

**2.2.1 相对分子质量测定** 采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC)。选择 TSK-GEL G3000PWXL 色谱柱 (7.8 mm × 300 mm,10 μm),将 5.0 g·L<sup>-1</sup> 的样品及葡聚糖对照品依次进样,进样量 20 μL,流动相 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 硝酸钠水溶液,流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 40 ℃,检测器温度 35 ℃。

**2.2.2 单糖组成分析** 取白花蛇舌草多糖 10 mg,加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 三氟乙酸 (TFA) 2 mL,100 ℃ 水解 6 h,冷却至室温后,加甲醇 2 mL,蒸干,反复 3 次,去除 TFA,加水 2 mL 使溶解,得多糖水解液。按文献 [7] 方法分别制备多糖水解样品及各单糖对照品的 PMP 衍生物。色谱条件为 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 pH 6.9 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液-乙腈 (81:19),柱温 30 ℃,检测波长 245 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样体积 20 μL。

**2.2.3 红外光谱分析** 取干燥的 ODP-1 约 1 mg 与干燥溴化钾 (KBr) 100 mg 混合研细后,压片,在 400 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup> 进行红外光谱扫描。

2.3 初步免疫活性研究

2.3.1 动物分组和给药 将小鼠随机分为6组,正常组、模型组、阳性组、ODP-1低、中、高剂量组,每组10只,雌雄各半。模型组和正常组给生理盐水;ODP-1溶液低、中、高剂量组按2.25,4.5,9.0 mg·kg<sup>-1</sup>肌内注射;阳性组按4.5 mg·kg<sup>-1</sup>肌内注射亿美奇。给药体积均为0.01 mL·g<sup>-1</sup>,每天1次,连续给药10 d。在给药第6天,除正常组外,其余各组腹腔注射50 mg·kg<sup>-1</sup>环磷酸腺苷,连续4 d,每天1次。

禁食不禁水12 h,末次给药1 h后,鼠尾静脉注入25%的印度墨汁(0.01 mL·g<sup>-1</sup>),2,10 min后分别从眼球取血20 μL,并将其加到4 mL 0.1% NaCO<sub>3</sub>溶液中,680 nm波长测定吸光度,计算廓清指数K和吞噬指数α,记录小鼠体重,取肝、脾、胸腺称重,以小鼠脾重/体重(mg·g<sup>-1</sup>)和胸腺重/体重(mg·g<sup>-1</sup>)作为脾脏和胸腺指数<sup>[8-9]</sup>。

2.3.2 观察指标 廓清指数  $K = (\log A_2 - \log A_{10}) / (t_{10} - t_2) = \log(A_2/A_{10}) / 8$  (A<sub>2</sub>, A<sub>10</sub>分别为10,2 min时吸光度)。吞噬指数  $\alpha = \text{体重} / \text{肝脾重} \times K^{1/3}$

2.3.3 统计方法 使用SPSS 13.0软件统计分析。采用单因素方差分析LSD检验进行组间比较,P < 0.05认为有统计学意义。

3 结果

3.1 相对分子质量及纯度鉴定 ODP-1的凝胶渗透色谱图(图1)为单一对称峰,说明ODP-1为均一多糖。以葡聚糖dextran系列为对照品,用GPC软件作标准曲线,采用三次曲线,得回归方程  $Y = -0.064 2X^3 + 2.767 7X^2 - 40.411X + 210.31$  (r = 0.999 7);计算得白花蛇舌草多糖的重均相对分子质量为20.88 kDa。分散系数为1.26 < 2,表明分散度较小。白花蛇舌草多糖与考马斯亮蓝G<sub>250</sub>溶液反应呈阴性,表明其不含蛋白及核酸。

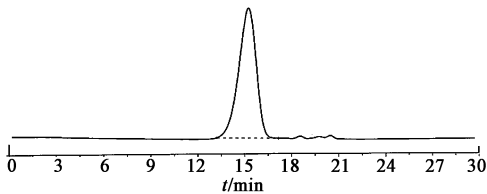
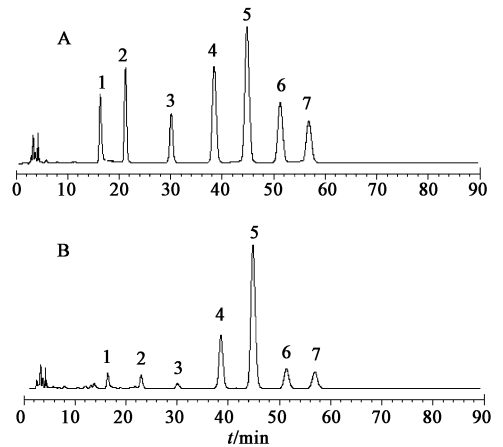


图1 白花蛇舌草多糖 ODP-1 的 HPGPC

3.2 单糖组成 6种单糖对照品能完全分离,以单糖对照品峰面积为纵坐标,浓度为横坐标作标准曲线(表1);ODP-1由6种单糖组成,分别为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖,其摩尔比为0.005:0.033:0.575:1.000:0.144:0.143。见图2。

表1 单糖标准曲线

单糖	线性方程	相关系数	线性范围 /g·L <sup>-1</sup>
甘露糖	$Y = 1.5 \times 10^8 X - 43 924$	0.999 0	0.003 2 ~ 0.032 1
鼠李糖	$Y = 1.3 \times 10^8 X - 66 157$	0.997 8	0.002 8 ~ 0.027 5
半乳糖醛酸	$Y = 7.5 \times 10^7 X + 1.9 \times 10^5$	0.993 0	0.009 8 ~ 0.097 7
葡萄糖	$Y = 1.5 \times 10^8 X - 4.6 \times 10^5$	0.997 9	0.009 3 ~ 0.093 3
半乳糖	$Y = 1.6 \times 10^8 X - 2.5 \times 10^5$	0.997 0	0.004 3 ~ 0.042 9
阿拉伯糖	$Y = 1.9 \times 10^8 X - 2.2 \times 10^5$	0.995 4	0.002 9 ~ 0.028 9



A. 混合单糖对照品; B. ODP-1 单糖组成  
1. PMP; 2. 甘露糖; 3. 鼠李糖; 4. 半乳糖醛酸;  
5. 葡萄糖; 6. 半乳糖; 7. 阿拉伯糖

图2 柱前 PMP 衍生化单糖组成 HPLC 分析

3.3 红外光谱分析 3 415 cm<sup>-1</sup>为羟基伸缩振动,2 932 cm<sup>-1</sup>为 C-H 伸缩弯曲振动,1 622 cm<sup>-1</sup>为 C=O 伸缩振动,1 409 cm<sup>-1</sup>为 C-H 变形振动,多糖独特的吸收带 1 200 ~ 1 000 cm<sup>-1</sup>如 1 150,1 079,1 025 cm<sup>-1</sup>为糖环上 C-OH 与 C-O-C 振动吸收光谱,表明有吡喃糖单元结构片段。由红外图谱可知 ODP-1 具有明显的糖类化合物红外吸收<sup>[10]</sup>(图3)。

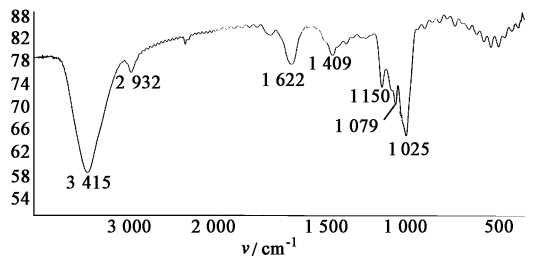


图3 ODP-1 红外光谱

3.4 ODP-1 的初步免疫活性 与模型组比较,ODP-1各剂量组与阳性组,均可升高环磷酸腺苷致免疫低下小鼠廓清指数、吞噬指数、胸腺指数和脾指数;其中 ODP-1 中、高剂量组与阳性组可显著升高

环磷酰胺致免疫低下小鼠廓清指数 ( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$ ) 和吞噬指数 ( $P < 0.01$ ); ODP-1 高剂量组可显著升高小鼠胸腺指数和脾指数 ( $P <$

0.01)。ODP-1 中剂量组与阳性组比较,无显著性差异,表明 ODP-1 可显著增强免疫低下小鼠免疫力,见表 2。

表 2 ODP-1 对环磷酰胺致免疫低下小鼠吞噬廓清能力影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	廓清指数	吞噬指数	胸腺指数/mg·g <sup>-1</sup>	脾指数/mg·g <sup>-1</sup>
正常	-	0.020 ± 0.007 <sup>2)</sup>	9.45 ± 1.43 <sup>2)</sup>	2.95 ± 0.84 <sup>2)</sup>	4.55 ± 0.76 <sup>2)</sup>
模型	-	0.009 ± 0.004	6.36 ± 1.58	0.65 ± 0.17	2.78 ± 0.49
阳性	4.5	0.015 ± 0.003 <sup>1)</sup>	8.41 ± 0.80 <sup>2)</sup>	1.04 ± 0.44	3.50 ± 0.65
ODP-1	2.25	0.013 ± 0.007	7.38 ± 2.05	0.93 ± 0.20	3.90 ± 0.95
	4.5	0.021 ± 0.008 <sup>1)</sup>	8.99 ± 1.07 <sup>2)</sup>	0.99 ± 0.32	4.00 ± 1.03
	9.0	0.021 ± 0.006 <sup>2)</sup>	9.26 ± 1.46 <sup>2)</sup>	1.04 ± 0.15 <sup>2)</sup>	5.10 ± 1.11 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

超滤已用于多糖、中药制剂及中药注射剂等有效成分的提取分离及热源去除<sup>[11]</sup>。本文采用大孔吸附树脂脱色、蛋白酶水解除蛋白及超滤技术联合应用分离得到均一多糖组分 ODP-1,其相对分子质量为 20.88 kDa,单糖组成为甘露糖-鼠李糖-半乳糖醛酸-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖。

用水作流动相,测得相对分子质量偏大,可能由于在水相中,糖链过度伸展,多糖分子尺寸变大,加入一定浓度的盐离子可以抑制糖链上可电离单糖,使聚离子多糖恢复为普通多糖的性质。本文参考文献<sup>[12]</sup>选用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 硝酸钠溶液作为流动相。

柱前衍生化高效液相色谱法进行多糖组成分析,具有分离效率高、分析时间短、产物无立体异构、分析成本低等特点<sup>[14]</sup>。本试验选 PMP 为衍生化试剂。采用三氟乙酸(TFA)水解<sup>[7]</sup>,加入 PMP 衍生化,进行 HPLC 分析,取得良好分离效果。

人參多糖注射液功能主治为增强机体免疫功能,用于减轻肿瘤放化疗引起的副作用,临床上用于增强化疗病人的免疫功能,因此选作阳性对照药。结果显示,ODP-1 可显著增强环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫力,与阳性组比较,无显著性差异,且随着剂量增加,活性显著提高;说明 ODP-1 具有增强非特异免疫功能的作用,更全面的免疫活性研究有待后续的药理深入研究。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;附录 23.

[2] 覃骊兰,邓家刚. 中药白花蛇舌草化学成分及有效成分药理活性研究进展[J]. 内蒙古中医药,2008,8(4):42.

[3] 蒋剑平,许海顺,卢烨琳,等. 响应面分析法优化白花蛇舌草水溶性多糖的提取工艺[J]. 浙江中医药大学

学报,2012,36(2):187.

[4] 宝炉丹,徐国防,马郑,等. 柱前衍生化 HPLC 分析白花蛇舌草多糖中单糖组成[J]. 中成药,2008,30(3):406.

[5] 刘志刚,颜仁梁,罗佳波. 白花蛇舌草多糖除蛋白工艺研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(10):2283.

[6] 钱韵旭,刘裴,李莉,等. 白花蛇舌草多糖的分离纯化及 PMP 柱前衍生高效液相分析[J]. 云南中医学院学报,2010,33(3):43.

[7] Dai J, Wu Y, Chen S W, et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. Carbohydr Polym, 2010,82:629.

[8] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前指导原则汇编[S]. 1993:128.

[9] 孙向红,王辉明,刘洪玲. 海康灵合剂对免疫抑制小鼠免疫功能的影响研究[J]. 中国药房,2008,19(24):1858.

[10] Lv L S, Cheng Y H, Zheng T S, et al. Purification antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. Carbohydr Polym, 2014,99:765.

[11] 王子尧,陈彦,孙文秀,等. 超滤法分离丹皮多糖的研究[J]. 膜科学与技术,2009,29(4):98.

[12] 赵峡,杨海,宋乐天,等. 不同色谱柱和 GPC 软件对灰树花倍他葡聚糖相对分子质量测定的影响[J]. 药物分析杂志,2007,27(8):1143.

[13] 王岩. 桂附地黄方多糖质量控制与评价方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009:18.

[14] Kuang H X, Xia Y G, Liang J, et al. Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMs by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis [J]. Carbohydr Polym, 2011, (84):1258.

[责任编辑 顾雪竹]