

人参糖肽分离及性质

南敏伦^{1,2}, 赵昱玮^{1,2*}, 司学玲³, 张敬国³, 吕娜², 赫玉芳^{1*}, 赵全成¹

(1. 吉林省中医药科学院, 长春 130012; 2. 吉林农业大学, 长春 130118;

3. 修正药业长春高新制药有限公司, 长春 130012)

[摘要] **目的:** 从人参根中分离纯化人参糖肽组分 P-II 并研究其理化性质。**方法:** 首先采用 50% 乙醇提取, 高浓度乙醇沉淀, 活性炭脱色得到人参糖肽, 经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱分离, 依次用 0.2, 0.5, 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱, 得到组分 II, 然后利用 Sephadex G-150 柱分离, 以 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱得到 P-II; 以葡萄糖、半乳糖醛酸和牛血清白蛋白为对照品测定中性糖、糖醛酸及肽的含量, 以醋酸纤维薄膜层析、Sephadex G-100 柱色谱、气相色谱分析仪、氨基酸分析仪对 P-II 性质进行研究。**结果:** P-II 含中性多糖 50.2%, 糖醛酸 38.5%, 肽 1.9%, P-II 为均一糖肽, 糖部分的单糖组成为 Rha, Ara, Glc 和 Gal, 其摩尔比为 0.45:1.15:1.00:2.36, 肽部分由 Asp, Fhr, Ser 等 16 种氨基酸组成。**结论:** 分离得到的 P-II 为均一糖肽, 而不是糖和肽的混合物, 为人参糖肽构效学研究奠定基础。

[关键词] 人参; 人参糖肽; 分离纯化; 理化性质

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0051-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030051

Isolation and Characterization of Glycopeptide from *Panax ginseng* NAN Min-lun^{1,2}, ZHAO Yu-wei^{1,2*}, SI Xue-ling³, ZHANG Jing-guo³, LYU Na², HE Yu-fang^{1*}, ZHAO Quan-cheng¹ (1. Jilin Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Changchun 130012, China; 2. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Xiuzheng Pharmaceutical Group Changchun High Tech Pharmaceutical Co. Ltd., Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To purify a glycopeptide named P-II from *Panax ginseng* and investigated its properties. **Method:** The glycopeptide was extracted by 50% ethanol, precipitated with high-concentration ethanol, after decolorized by active carbon obtained crude ginseng glycopeptide, then purified by DEAE-Sepharose CL-6B column, washed successively with 0.2, 0.5 and 1.0 mol·L⁻¹ NaCl aqueous solution. Then using Sephadex G-150 column eluted with an aqueous solution of 0.2 mol·L⁻¹ NaCl to give P-II. The contents of neutral carbohydrate, uronic acid and peptide were determined using glucose, galacturonic acid and bovine serum albumin as the standards. The characterization of P-II was analyzed by cellulose acetate membrane chromatography, Sephadex G-100 column chromatography, gas chromatography, and amino acid analysis. **Result:** P-II was a homogeneous glycopeptide. The contents of neutral carbohydrate, uronic acid, and peptide in P-II were 50.2%, 38.5%, and 1.9%, respectively. The molar ratio of Rha, Ara, Glc and Gal was 0.45:1.15:1.00:2.36. It was consisted 16 kinds of amino acids including Asp, Fhr, and Ser. **Conclusion:** P-II was a homogeneous glycopeptide, rather than a mixture of sugars and peptides, and laid the foundation for the study of structure-activity of ginseng glycopeptide.

[Key words] *Panax ginseng*; glycopeptide; isolation and purification; physical and chemical properties

人参是我国传统名贵的中药,素有“百草之王、神草”等美誉,具有大补元气、生津安神、强心固脱

[收稿日期] 20140226(005)

[基金项目] 吉林省科技发展计划重大科技支撑项目(20086042)

[第一作者] 南敏伦, 硕士, 副研究员, 从事植物化学研究与新药开发, Tel:0431-86058683, E-mail:nml2000@163.com

[通讯作者] * 赫玉芳, 博士, 研究员, 从事植物化学研究与新药开发, Tel:0431-86058683, E-mail:hyf_1992@163.com;

* 赵昱玮, 硕士, 从事植物化学研究与新药开发, Tel:0431-86058683, E-mail:yuwei5208@163.com

等多种生物活性^[1]。人参皂苷及人参多糖是主要的活性物质,人参多糖由人参淀粉和人参果胶两部分组成。人参多糖具有调节免疫力、抗肿瘤、降血糖及调控血细胞生成的作用。目前为止,人参多糖的研究主要是从不同部位提取的人参总多糖进行简单的组成糖分析及药理活性研究,形成成药的较少。从人参根中提取的人参多糖主要由半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖残基组成,还有少量鼠李糖残基;人参茎叶提取的人参茎叶总多糖是由半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖等组成;从人参果多糖提取的酸性杂多糖主要由阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、葡萄糖及半乳糖组成^[2]。吉林省中医药科学院研究的人参糖肽注射液,主要利用人参提取人参糖肽^[3],经过制剂研究,得到人参糖肽注射液,具有抑制体外糖基化,是一种新型降血糖药物^[4],已上市多年,疗效确切;但是对人参糖肽性质及组成没有更深入的研究,本研究论文按照国家对注射剂活性物质需要明确的要求,对人参中提取的人参糖肽进行系统化研究,同时对其性质及组成进行研究,为人参糖肽构效学研究及确定人参糖肽注射液中具体活性物质奠定基础。

1 仪器与试剂

UV-1601 型紫外分光光度计(日本岛津),HR26M 型落地式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司),BSZ-100A 型自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂),GC-6890 型气相色谱(美国安捷伦公司),AB204-N 型天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),1100 系列液相色谱仪(美国 Agilent)。DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-150, Con-A-Sepharose 4B, Sephadex G-100 均购自瑞典 Pharmacia 公司,半乳糖醛酸、葡萄糖、牛血清白蛋白、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖均购自 Sigma 公司。

人参购买于长春市吉琛药店,由吉林省中医药科学院赵全成教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 测试条件的选择 中性糖、总糖醛酸、肽等分别采用 Phenol-H₂SO₄^[5-6], m-Hydroxydiphenyl^[6-7] 和 Lowry^[8] 法,以葡萄糖、半乳糖醛酸和牛血清白蛋白为对照品进行测定。

组成糖分析及氨基酸组成分析按照文献记载的仪器方法进行测定^[9-10]。

2.2 人参糖肽提取 取人参粗粉 1 kg,用 6 倍量 50% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并 3 次滤

液,回收乙醇至 800 mL,在搅拌条件下加 95% 乙醇 4 000 mL,静置,滤取沉淀,得粗人参糖肽沉淀,将粗糖肽用 1 L 水溶解,置 0~3 ℃ 冰箱中放置 24 h,过滤,除去不溶物,滤液中加活性炭,搅拌,静置,滤取澄明液,浓缩,冷冻干燥,得白色或微黄色人参糖肽精品。

2.3 人参糖肽 DEAE-Sepharose CL-6B 柱分离 取人参糖肽 3 g,用 100 mL 去离子水溶解,在 DEAE-Sepharose CL-6B 柱上分离(3.6 cm × 30 cm),先用去离子水洗脱,再用 0.2, 0.5, 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱。用部分收集器收集流分,得到 4 个组分,然后对 4 个组分进行透析,浓缩,冷冻干燥,分别得到组分 I (0.12 g), II (2.29 g), III (0.30 g), IV (0.09 g)。见图 1。

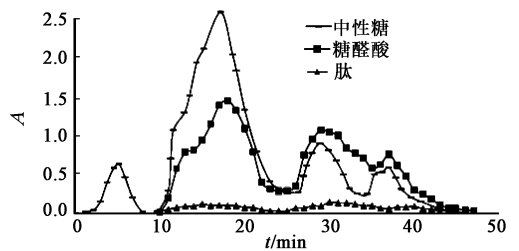


图 1 人参糖肽 DEAE-Sepharose CL-6B 柱分离洗脱
Fig. 1 Chart of Separation and Elution of glycopeptide from *Panax ginseng* by DEAE-Sepharose CL-6B

2.4 组分 II 的 Sephadex G-150 分离和纯化 取 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱部分 0.5 g,用 30 mL 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液溶解,通过 Sephadex G-150(2.6 cm × 100 cm) 柱分离,0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱,定时收集,每管 8 mL,所得各组分进行糖醛酸、肽和中性糖测定,根据洗脱图分别合并组分,然后分别透析,浓缩,冷冻干燥,得白色粉末 P-I (0.04 g), P-II (0.44 g) 和 P-III (0.01 g)。见图 2。

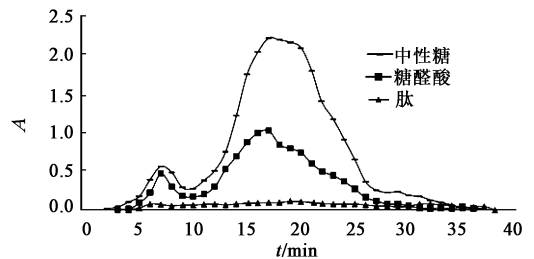


图 2 组分 II 的 Sephadex G-150 分离和纯化
Fig. 2 Isolation and purification of component II by Sephadex G-150

2.5 P-II 的理化性质

2.5.1 溶解性 白色粉末,易溶于水,不溶于乙醇

等有机溶剂。

2.5.2 各主要成分的含量 分别测定, P-II 含中性多糖(以葡萄糖计)50.2%, 糖醛酸(以半乳糖醛酸计)38.5%, 肽(以牛血清白蛋白计)1.9%。

2.5.3 乙酸纤维薄膜色谱 将 P-II 1 mg 用去离子水 1 mL 溶解, 点于乙酸纤维薄膜中间, 点样量为 10 μ L, 以 0.08 mol·L⁻¹ 吡啶-0.04 mol·L⁻¹ 乙酸为缓冲液(pH 为 5.4), 电压 420 V, 时间 30 min, 取出风干后用 3% 乙酸的甲苯胺兰显色 5 min, 再用 1% 乙酸水溶液小心浸洗 2 次, PGP-II 显单一蓝色斑点。

2.5.4 Con-A-Sepharose 4B 亲和色谱 P-II 150 mg 溶解于含 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaCl 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液中(pH 为 7.2), 在预先用同样缓冲液平衡好的 Con-A-Sepharose 4B(2.5 cm × 5 cm) 柱上色谱, 用同样缓冲液洗脱, 部分收集器收集, 每管 1 mL, 洗脱至用酚硫酸法测定无糖反应后, 改用 0.1 mol·L⁻¹ 硼酸钠缓冲液洗脱(pH 为 6.0), 同样方法收集各流分。分别测定各流分的糖、肽, 结果显示, 糖的峰与肽的峰重合。实验洗脱图见图 3。

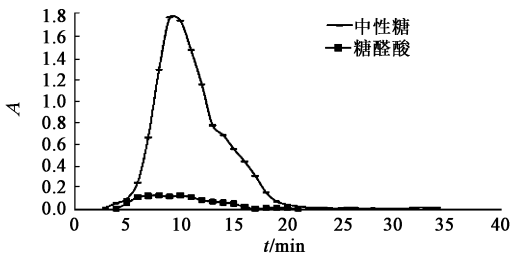


图3 P-II 的 Con-A-Sepharose 4B 色谱洗脱
Fig.3 Chromatographic elution of P-II by Con-A-Sepharose 4B

2.5.5 Sephadex G-100 柱色谱 将 P-II 溶解在 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液中, 在 Sephadex G-100(2.6 cm × 100 cm) 柱, 用 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱, 部分收集器收集各组分, 测定各组分测定中性糖和肽, 结果显示, 为单一对称峰。见图 4。

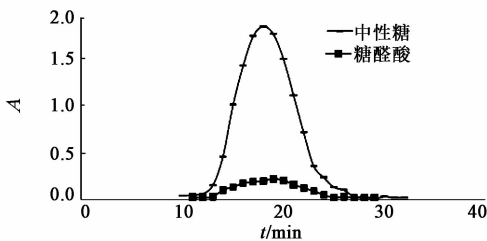
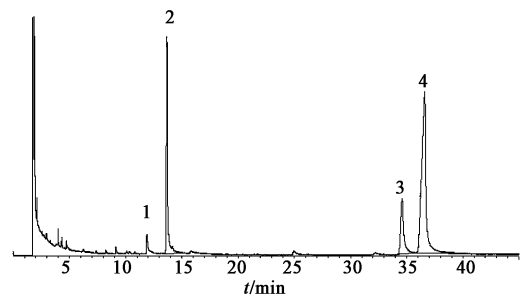


图4 P-II 的 Sephadex G-100 柱层析洗脱
Fig.4 Chromatographic elution of P-II by Sephadex G-100

2.5.6 组成糖分析 精密称取 P-II 20 mg, 置于具塞试管, 加 2 mol·L⁻¹ 的三氟乙酸 1 mL, 密塞, 置 121

℃ 鼓风干燥箱中水解 1.5 h, 热风吹干。残渣加甲醇 1 mL, 热风吹干, 反复进行 3 次。残渣加 1 mol·L⁻¹ 的氨水 0.5 mL, 硼氢化钠 20 mg, 室温反应 1.5 h, 加冰乙酸两滴终止反应。残渣加 10% 乙酸甲醇溶液 1 mL, 吹干, 反复 3 次。置五氧化二磷干燥器过夜, 加吡啶 0.5 mL, 乙酸酐 1 mL 密封, 置 121 ℃ 鼓风干燥箱中 3 h, 吹干, 残渣加甲醇 1 mL 吹干, 反复 3 次。残渣加去离子水 3 mL 使溶解, 加三氯甲烷 3 mL 萃取, 三氯甲烷层吹干, 残渣加丙酮 0.5 mL 溶解, 进行 GC 分析^[7]。见图 5。结果显示, P-II 单糖组成为 Rha, Ara, Glc 和 Gal, 其摩尔比为 0.45 : 1.15 : 1.00 : 2.36。



1. Rha; 2. Ara; 3. Glc; 4. Gal
图5 P-II 的水解后单糖醇乙酸醋 GC
Fig.5 GC chart of Monosaccharide alcohol acetic acid vinegar hydrolyzed by P-II

2.5.7 肽组成分析 取 P-II 2 mg 溶解于 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液中, 密封, 置 110 ℃ 条件下水解 20 h, 抽干, 进行氨基酸分析^[8], 实验结果显示, P-II 肽部分由 16 种氨基酸组成, 其质量分数(%) 为天冬氨酸(Asp)(0.058)、苏氨酸(Fhr)(0.008)、谷氨酸(Ser)(0.036)、甘氨酸(Glu)(0.078)、丙氨酸(Ala)(0.029)、半胱氨酸(Cys)(0.027)、缬氨酸(Val)(0.048)、蛋氨酸(Met)(0.018)、异亮氨酸(Ile)(0.021)、亮氨酸(Leu)(0.027)、苯丙氨酸(Phe)(0.042)、赖氨酸(Lys)(0.023)、组氨酸(His)(0.012)、精氨酸(Arg)(0.018)及脯氨酸(Pro)(0.082)。

3 讨论

人参糖肽进行 DEAE-Sepharose CL-6B 柱色谱分离后, 依次用去离子水洗脱, 0.2, 0.5, 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱, 经过药效学试验证明, 其活性部位为 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱部分; 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液洗脱部分经 Sephadex G-150(2.6 cm × 100 cm) 柱分离, 得到 P-I, P-II 和 P-III 三部分, 其活性组分为 P-II, 同时, P-II 收率达

到 87.8%,为进一步确定人参糖肽的活性物质确定了依据。

P-Ⅱ 含中性糖、糖醛酸、肽,经乙酸纤维素薄膜电泳分析为单一斑点;经 Con-A-Sepharose 4B 亲和色谱得单一峰,改变洗脱剂未能再洗脱下其他物质,并证明了糖与肽同时被洗脱;经 Sephadex G-100 凝胶柱色谱证明糖与肽均为单一对称峰。以上结果说明 P-Ⅱ 为均一糖肽,且糖与肽部分在上述实验中不能分离,可以认为 P-Ⅱ 为糖肽,而不是糖与肽的混合物。

P-Ⅱ 经三氟乙酸水解,水解的单糖经硼氢化钠还原,并制成相应的乙酸酯进行气相色谱分析,结果显示,P-Ⅱ 由 Rha, Ara, Glc 和 Gal 等单糖组成,其摩尔比为(0.45:1.15:1.00:2.36)。P-Ⅱ 经盐酸水解后进行氨基酸分析,实验结果显示,P-Ⅱ 肽部分由天冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸等 16 中氨基酸组成。

本研究从人参根中分离纯化得到 P-Ⅱ,并且其结构目前尚无报道,作者对其组成糖及氨基酸的组成进行了研究,但未对其具体的结构进行研究,作者将在后续的工作中对其具体结构作进一步研究。

[参考文献]

[1] 王丽杰,王春艳,张冬燕,等. 人参治疗糖尿病及作用机制研究进展 [J]. 中国热带医学, 2013, 13(7):

906-909.

- [2] 张彬,林瑞超,冯芳. 人参多糖研究概况 [J]. 中国药事, 2004, 18(9):46-49.
- [3] 王诗雯,苗春生,李才. 人参糖肽对糖基化抑制作用的体外研究 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(5):557-559.
- [4] 葛焕琦,蔡寒青,王涛,等. 人参糖肽注射液治疗 2 型糖尿病 30 例 [J]. 吉林大学学报:医学版, 2003, 29(2):206-207.
- [5] 杨大鹏,李青,刘思杰,等. 人参中人参多糖检测方法研究 [J]. 人参研究, 2011(3):5-7.
- [6] 郭欣,高向东,杨晓兵,等. 酸性多糖中的葡萄糖醛酸与中性糖的含量测定 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(2):100-101.
- [7] 陈巧巧,万琴,王振中,等. 人参多糖中糖醛酸含量测定方法的建立 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):121-124.
- [8] 曲德斌,王媛媛. 人参糖肽注射液肽含量测定研究 [J]. 中国执业药师, 2013, 10(12):21-22.
- [9] 王颖,高其品,李桂荣,等. 人参糖肽 PG-g 的分离纯化与结构分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(6):1053-1056.
- [10] 张彬,林瑞超,鲁静,等. 人参糖蛋白的分离纯化及其性质研究 [J]. 药物分析杂志, 2010, 26(2):172-176.

[责任编辑 顾雪竹]