

# 关黄柏总多糖的分离纯化及其对小鼠脾细胞增殖的影响

薛娟<sup>1</sup>, 曾伟民<sup>2</sup>, 王长福<sup>1</sup>, 张宏伟<sup>1</sup>, 王秋红<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的:分离纯化关黄柏总多糖,研究纯化组分对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。方法:采用 DEAE Cellulose 52, DEAE-Sepharose F. F, Sephacryl S-400 等载体对关黄柏总多糖进行分离纯化,高效凝胶过滤色谱法鉴定纯度并测定分子量, PMP 柱前衍生化测定单糖组成;采用 MTT 法测定各多糖组分对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的作用。结果:关黄柏总多糖占药材的 4.3%,从关黄柏总多糖中分离纯化得到 3 种多糖组分 G1, G2, G3, 分别占总多糖的 6%, 9%, 10%, 经 HPLC 鉴定证明为均一多糖,均主要含阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和半乳糖醛酸,其摩尔比分别是 G1(1:1.06:1.04:1.14), G2(1:1.27:1.10:1.09), G3(1:1.23:0.99:1.55), 3 种均一多糖对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖有显著的抑制作用。结论:3 种均一关黄柏总多糖主要由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和半乳糖醛酸组成,具有一定显著的抑制细胞免疫的作用,为进一步研究提供了实验基础。

**[关键词]** 关黄柏; 多糖; 分离纯化; 脾细胞增殖

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0044-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140044

## Separation and Purification of Polysaccharides from *Phellodendri Amurensis* Cortex and Effect on Proliferation Function of Mice Spleen Lymphocyte

XUE Juan<sup>1</sup>, ZENG Wei-min<sup>2</sup>, WANG Chang-fu<sup>1</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>1</sup>, WANG Qiu-hong<sup>1\*</sup> (1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Heilongjiang University, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To separate and purificate homogeneous polysaccharides from *Phellodendri Amurensis* Cortex and study the effect on proliferation function of mice spleen lymphocyte transformation. **Method:** The DEAE Cellulose 52, DEAE-Sepharose F. F and Sephacryl S-400 columns were used to separate and purificate homogeneous polysaccharides and the monosaccharide composition and structure were preliminarily identified by periodate oxidation, smith degradation, methylation, IR, HPLC and GC-MS, and their effects on proliferation function of mice spleen lymphocyte transformation were determined by MTT. **Result:** The yield of crude polysaccharide was 4%. Three homogeneous polysaccharides were separated and purificated (G1-G3), the yields of purified polysaccharides were 6%, 9%, and 10%, respectively, which were identified as homogeneous polysaccharides by HPLC. They mainly contained arabinose, rhamnose, galactose and galacturonic acid, the mole ratios were 1:1.06:1.04:1.14 (G1), 1:1.27:1.10:1.09 (G2) and 1:1.23:0.99:1.55 (G3), and the homogeneous polysaccharides were able to inhibit the proliferation of lymphocytes induced by ConA. **Conclusion:** The homogeneous polysaccharides contained arabinose, rhamnose, galactose and galacturonic acid, and showed inhibit effect of cellular immunity, which established the experimental basis for the further study of the polysaccharides.

**[Key words]** *Phellodendri Amurensis* Cortex; polysaccharides; separation and purification; mice spleen lymphocyte transformation

**[收稿日期]** 20140915(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81473351)

**[第一作者]** 薛娟, 硕士, 助理实验师, 从事天然产物分离纯化与药物代谢动力学研究, Tel:15846621129, E-mail:15846621129@163.com

**[通讯作者]** \*王秋红, 博士, 教授, 从事中药及天然药物药效物质基础、中药性味理论研究, Tel:0451-87266856, E-mail: qhwang668@sina.com

关黄柏具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功效,用于湿热泻痢、黄疸尿赤、带下阴痒、热淋涩痛等<sup>[1]</sup>。关黄柏富含多糖类成分,一直以来人们仅关注了其中所含的生物碱、柠檬苦素等组分<sup>[2-3]</sup>,对关黄柏总多糖的研究多在提取工艺及含量测定等方面<sup>[4-6]</sup>,本研究拟对关黄柏总多糖进行分离纯化及化学研究,根据其可能通过免疫抑制机制发挥解热、抗炎等药效的作用,选择小鼠脾淋巴细胞增殖实验考察其对免疫作用的影响。

## 1 材料

2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),752型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FTIR-8400S型红外光谱仪(日本岛津有限公司),7890-5973C型气质联用仪(美国Agilent公司)。FPA90Cl<sup>-</sup>和FPC3500树脂(Amberlite),DEAE Cellulose-52(Whatman),Sephacryl S-400及葡聚糖T10, T40, T110, T500, T2000等对照品(Pharmacia Co.);ConA刀豆蛋白A,MTT噻唑蓝,DMSO等(Sigma公司);FBS胎牛血清,RPMI-1640培养基等(HyClone公司),1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP),其他试剂均为分析纯。

关黄柏药材采自黑龙江省尚志市亚布力林场,经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* 的树皮。

## 2 方法

**2.1 关黄柏多糖的提取与分离纯化** 新鲜黄檗树皮自然干燥,切丝,取700g用3倍量95%乙醇回流脱脂3次,每次3h,残渣通风干燥,加3倍体积水,回流提取3次,每次3h,滤液浓缩,加入乙醇醇沉,离心得沉淀,沉淀依次用无水乙醇,丙酮分别洗涤,洗涤后的沉淀用蒸馏水复溶,透析,透析液浓缩冻干,sevage法除蛋白,冻干,得关黄柏粗多糖30g。

关黄柏粗多糖30g配成3%~5%水溶液,经过FPA90(Cl<sup>-</sup>)和FPC3500(H<sup>+</sup>)离子交换树脂柱。分别以H<sub>2</sub>O,0.5,1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl作为洗脱液,得到Fr. A(9g)和Fr. B(12g)两个组分。

Fr. A(9g)经过DEAE-Sephacryl F. F凝胶柱,以H<sub>2</sub>O,0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl作为洗脱液分别获得G1',G2'两个洗脱组分。G1',G2'经过Sephacryl S-400凝胶色谱柱进一步纯化,分别得到G1(1.8g)和G2(2.7g)。

Fr. B(12g)以Cellulose DE-52离子交换色谱柱进行初步纯化。依次用H<sub>2</sub>O,0.2,1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl

进行梯度洗脱,得到0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl组分,记为G3'。G3'经过DEAE-Sephacryl F. F凝胶色谱柱再次进行色谱分离。以H<sub>2</sub>O,0.2,1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl进行梯度洗脱,以0.2 NaCl洗脱时主要呈一个主洗脱峰,得到组分G3(3.0g)。

洗脱液中的多糖用苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>检测,根据洗脱管数-吸光度绘制洗脱曲线,合并相同峰位的液体,用3500 Da的透析膜在蒸馏水中透析48h,浓缩,冻干得到各个洗脱组分。

**2.2 纯度鉴定及分子量测定** 将G1,G2,G3分别配制成2 g·L<sup>-1</sup>的溶液,用0.22 μm微孔滤膜过滤,进样高效液相色谱系统20 μL,Shodex sugar KS-805+保护柱KS-G高效凝胶过滤色谱柱,流动相超纯水,柱温30℃,流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>。相同条件下,用标准葡聚糖(T10,T40,T110,T500,T2000)的保留时间为横坐标,lgMw为纵坐标绘制标准曲线<sup>[8]</sup>。总糖含量用葡萄糖配制对照品溶液,用苯酚-硫酸比色法测定。将3种多糖配制成2 g·L<sup>-1</sup>的溶液,在200~400 nm波长下扫描,检查是否含有蛋白。

**2.3 红外光谱分析** 取多糖样品2 mg与干燥的KBr粉末100 mg混合压片,在红外光谱仪4000~400 cm<sup>-1</sup>扫描,记录红外光谱图<sup>[9]</sup>。

## 2.4 PMP柱前衍生高效液相色谱分析

**2.4.1 溶液的配制** 标准单糖对照品溶液的配制:取阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、半乳糖醛酸精确称定分别用去离子水配制成质量浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup>的溶液。

混合单糖对照品溶液的配制:取阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、半乳糖醛酸用去离子水配制成质量浓度为5 mmol·L<sup>-1</sup>的混合单糖对照品储备液。取该储备液1.0 mL和2 mmol·L<sup>-1</sup>的核糖内标溶液2 mL混合,定容到5 mL备用。

**2.4.2 多糖的酸水解及样品溶液配制** 称取精制多糖10 mg,置于10 mL玻璃瓶内,加入2 mmol·L<sup>-1</sup>三氟乙酸(TFA)溶液2 mL,加盖密封,于120℃水解2 h,得水解样品溶液,加入2 mmol·L<sup>-1</sup>的核糖内标溶液1 mL,加入甲醇用旋转蒸发仪减压蒸干,重复多次加入甲醇,直至TFA被完全蒸发除去后,用去离子水重新溶解多糖水解物定容到5 mL,备用。

**2.4.3 单糖对照品、混合单糖和多糖水解样品的PMP衍生** 取各单糖对照品溶液或混合单糖对照品溶液或多糖的水解样品溶液200 μL于5.0 mL离心管中,分别依次加入0.5 mol·L<sup>-1</sup> PMP甲醇溶液

100  $\mu\text{L}$ , 0.3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液 200  $\mu\text{L}$ , 混匀, 在 70  $^{\circ}\text{C}$  的水浴中反应 60 min, 冷却至室温后用 0.3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸 200  $\mu\text{L}$  中和。目标溶液用等体积的乙酸异戊酯萃取 2 次, 混匀, 离心 (5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 3 min), 弃上清; 用等体积的三氯甲烷萃取 1 次, 混匀, 离心 (5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 3 min), 取上清, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 备用<sup>[10]</sup>。

**2.4.4 色谱条件** DIKMA Diamonsil ODS 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-磷酸盐缓冲溶液 (7.4:82.6), 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 检测波长 245 nm, 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.5 Concanavalin A (ConA) 诱导的小鼠脾细胞增殖实验** 参照文献[11]方法制作脾淋巴细胞悬浮液并测定<sup>[12]</sup>。96 孔培养板, 每孔依次加入浓度为  $1 \times 10^8$  个/mL 的小鼠脾细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ , 除 RPMI-1640 空白对照和 ConA 组外, 每孔加入不同稀释度的多糖溶液 (RPMI-1640 培养液配制) 100  $\mu\text{L}$ , 再加入 ConA 使其终浓度为 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 每个稀释度设 4 个复孔。放置在 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 44 h。每孔加入 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 MTT 磷酸盐缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 再加入二甲基亚砜 100  $\mu\text{L}$ , 于微量振荡器上缓慢作用 10 min, 使结晶充分溶解。于酶标仪上 492 nm 处测吸光度。所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用  $t$  检验。

### 3 结果

**3.1 多糖的分离纯化** 黄檗树皮用 95% 乙醇回流除去小檗碱等季胺型生物碱、酚类和柠檬苦素类成分, 同时对内源性的酶灭活。乙醇提取后的残渣经传统的热提醇沉法获得以多糖为主要成分的醇沉物, 产率约为药材质量的 4.3%。经离子交换色谱和凝胶过滤色谱纯化后获得 G1, G2, G3 3 种分子量分布比较均一的多糖, 见图 1~3, 产率分别为总多糖质量的 6%, 9%, 10%。

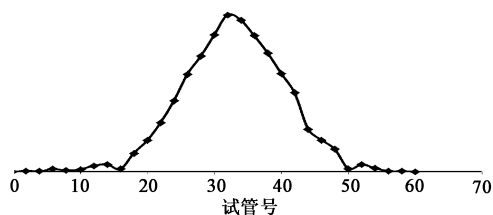


图1 G1 Sephacryl S-400 凝胶柱色谱曲线  
Fig.1 Elution profile of G1 on Sephacryl S-400 column

**3.2 纯度鉴定与相对分子质量测定** 3 种纯化多糖经苯酚硫酸法测定, 质量分数均  $> 90\%$ , 280 nm 处没有紫外吸收, 基本不含蛋白。经高效凝胶过滤

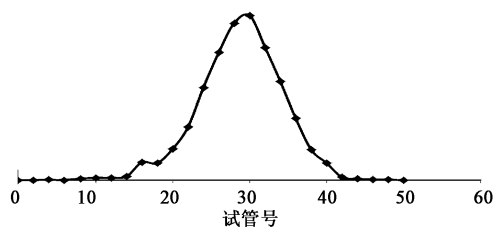


图2 G2 Sephacryl S-400 凝胶柱色谱曲线  
Fig.2 Elution profile of G-2 on Sephacryl S-400 column

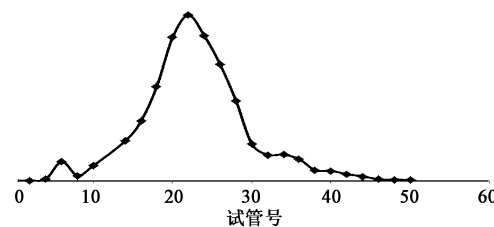


图3 G3 DEAE-Sepharose F.F 凝胶柱洗脱曲线  
Fig.3 Elution profile of G-3 on DEAE-Sepharose F.F column

液相色谱鉴定纯度, 色谱峰形基本上是单一而尖锐, 说明每种多糖中相对分子量分布比较均一。根据平行条件下测定的标准曲线方程  $Y = -0.744 4X + 14.497 (R^2 = 0.992 8)$ , 结果 3 种多糖相对分子量均在 200 万以上。

**3.3 红外光谱分析** 黄柏多糖的峰形分布基本一致。多糖分子间或分子内的氢键, O-H 的伸缩振动在 3 500 ~ 3 300  $\text{cm}^{-1}$  有一个宽峰; 次甲基-CH-的伸缩振动在 3 000 ~ 2 800  $\text{cm}^{-1}$  出现一个小峰, 是糖类的特征峰; 1 400 ~ 1 200  $\text{cm}^{-1}$  的一组峰则是 C-H 的变角振动。3 种多糖均具有这 3 组峰, 则证明为多糖化合物。在 1 749 ~ 1 725, 1 220 ~ 1 240  $\text{cm}^{-1}$  处的两组特征峰分别代表 C=O, C-O 伸缩振动, 表明含有酯酰基结构; 在 892  $\text{cm}^{-1}$  处的特征峰表明组成该多糖的单糖为  $\beta$  吡喃型, G3 组分的红外光谱图见图 4。

**3.4 单糖组成分析** 多糖中单糖组成的摩尔比计算采用内标加校正因子法计算。黄柏多糖 G1, G2, G3 均主要含阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 其摩尔比分别是 G1 (1:1.06:1.04:1.14), G2 (1:1.27:1.10:1.09), G3 (1:1.23:0.99:1.55), 另含微量的葡萄糖, G1 中葡萄糖含量稍高于其他 3 种糖。混合单糖对照品及样品的 HPLC 色谱见图 5。

**3.5 ConA 诱导的小鼠脾细胞增殖实验** ConA 组与空白组比较吸光度, A 明显升高, 有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 说明 ConA 能引起小鼠脾淋巴细胞体外增殖。与 ConA 组比较, G1, G2, G3 各剂量组均能引

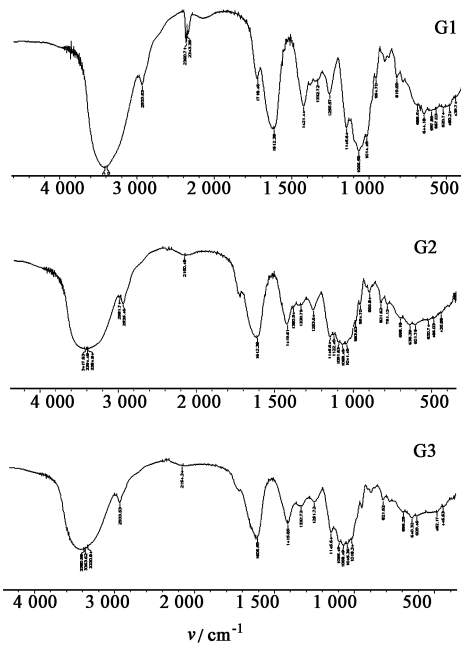


图 4 3 种多糖组分红外光谱

Fig. 4 IR absorption curve of the three kinds purified polysaccharide

起 A 下降,呈一定的剂量关系,并且 3 种多糖组分的抑制效果比较  $G1 < G2 < G3$ ,表明关黄柏 3 种均多糖对 ConA 引起的小鼠脾淋巴细胞体外增殖有显著的抑制作用。见表 1。

表 1 关黄柏多糖对小鼠脾细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

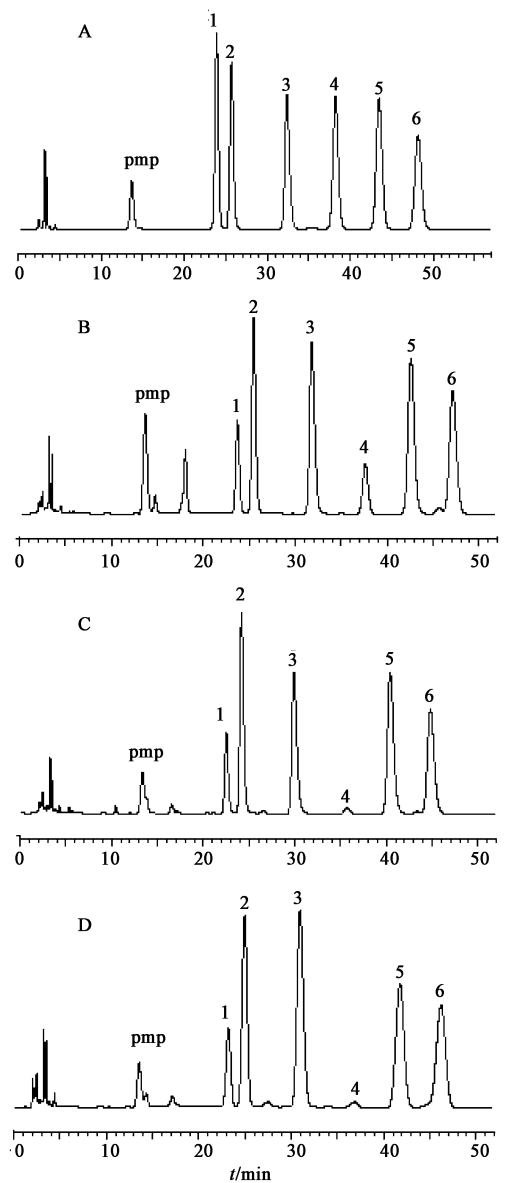
Table 1 Effect of polysaccharide on the splenocyte proliferation of mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白	-	$0.443 \pm 0.021$
ConA	-	$0.543 \pm 0.034^{1)}$
G1	25	$0.506 \pm 0.027$
	100	$0.464 \pm 0.022^{2)}$
	200	$0.380 \pm 0.029^{3)}$
G2	25	$0.512 \pm 0.019$
	100	$0.456 \pm 0.016^{2)}$
	200	$0.367 \pm 0.028^{3)}$
G3	25	$0.544 \pm 0.031$
	100	$0.443 \pm 0.025^{2)}$
	200	$0.346 \pm 0.022^{3)}$

注: <sup>1)</sup>与空白组比较  $P < 0.01$ ; <sup>2)</sup>与模型组比较  $P < 0.05$ ; <sup>3)</sup>与模型组比较  $P < 0.01$ 。

#### 4 结论与讨论

本试验研究了关黄柏多糖的分离纯化并对纯化组分进行了化学组成和初步的生物活性研究,结果



A. 对照品; B. 样品 G1; C. 样品 G2; D. 样品 G3; 1. 核糖; 2. 鼠李糖; 3. 半乳糖醛酸; 4. 葡萄糖; 5. 半乳糖; 6. 阿拉伯糖

图 5 单糖组成 HPLC 分析

Fig. 5 HPLC analysis of PMP derivatives of purified polysaccharide

从关黄柏总多糖中分离纯化得到 3 种均一多糖 G1, G2, G3, 分别占总多糖的 6%, 9%, 10%, 3 种多糖的产率之和只占总多糖的 25%, 在分离纯化期间有 75% 的损失率, 原因可能是关黄柏药用部位为皮类, 多糖在其中起着保护的作用, 导致关黄柏多糖的相对分子质量较大 ( $> 200$  万 Da), 水溶解性很差, 需要温水加热才能部分溶解, 进而导致了多糖在每一步溶解中都有大量的损失, 提高关黄柏多糖的溶解性问题需要进一步研究解决; 3 种多糖主要含阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 其摩尔比分别

是 G1 (1:1.06:1.04:1.14), G2 (1:1.27:1.10:1.09), G3 (1:1.23:0.99:1.55), 另含微量的葡萄糖, 3 种均一多糖对 ConA 诱导的小鼠脾细胞体外增殖具有显著的抑制作用, 提示关黄柏多糖可通过细胞免疫抑制而发挥免疫抑制功能。ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的增殖能力常被作为检测机体细胞免疫功能的指标之一, 研究表明影响多糖活性的因素有许多, 如单糖组成、相对分子质量、糖基连接方式、糖链的构型等, 比较得知, G3 多糖显示出较强的活性, 且其半乳糖醛酸含量相对较多, 揭示半乳糖醛酸含量与活性之间也存在密切的关系。关黄柏作为药材应用已有悠久的历史, 生物碱类等成分一直被认为是关黄柏的药效物质基础, 对其成分和活性的研究也多集中于生物碱等成分上。上述实验结果表明关黄柏含大量的具有显著生物活性的多糖类成分, 这一发现进一步深化了对常用中药关黄柏药效物质基础和功效的认识, 为合理开发利用关黄柏药材提供依据。

[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.  
[2] 张倩, 蔡丽芬, 钟国跃, 等. RP-HPLC 法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2061-2064.  
[3] 张冠英, 董瑞娟, 廉莲. 川黄柏, 关黄柏的化学成分及

药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(10): 812-821.  
[4] 甄铎, 罗傲雪, 罗傲霜. 优选黄柏多糖超声波辅助提取工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 12747-12748.  
[5] 张伟杰, 王鹏, 林茜, 等. 3 种中药多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 19-22.  
[6] 李卫彬, 阳文辉, 黄锁义. DNS 法测定黄柏中总糖的量[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 30(1): 13-14.  
[7] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553.  
[8] 魏远安, 方积年. 高效凝胶渗透色谱测定多糖纯度及分子量[J]. 药学报, 1989, 24(7): 532-536.  
[9] 周宝珍, 肖娅萍, 牛俊峰, 等. 绞股蓝多糖的分离纯化及红外光谱、气相色谱分析[J]. 中国中医药杂志, 2012, 27(1): 97-100.  
[10] 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): 43-46.  
[11] 长城, 赵海霞, 姜美杰, 等. 竹节参多糖对环磷酰胺致免疫低下小鼠的恢复作用研究[J]. 中药材, 2011, 34(1): 91-94.  
[12] Hakki A, Hallquist N, Friedman H, et al. Differential impact of nicotine on cellular proliferation and cytokine production by LPS-stimulated murine splenocytes[J]. Int J Immunopharmac, 2000, 22(6): 403-410.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估, 《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种, 其中中国出版的英文期刊 194 种, 中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记); 扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库, 曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。