

鸡矢藤多糖的分离纯化及体内抗菌活性

冉靛^{1*}, 张桂玲¹, 杨小生², 杨再昌³

- (1. 贵阳学院化学与材料工程学院, 贵阳 550005;
2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002;
3. 贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550003)

〔摘要〕 目的:对鸡矢藤多糖进行分离纯化,寻找具有体内抗菌活性的多糖组分。方法:采用柱色谱技术对鸡矢藤粗多糖(PSP)进行分离纯化,对纯化多糖组分采用凝胶柱和聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度鉴定,借助气相色谱法和红外光谱判断其部分结构信息,采用体内抗菌模型对所得多糖的活性进行研究。结果:从鸡矢藤中分离 2 个单一多糖组分 PSP2a 和 PSP2b。PSP2a 由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成,其摩尔比为 4.92:3.23:1.00:1.73:3.50, PSP2b 由阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖组成,其摩尔比为 1.00:0.73:1.80。PSP2a 和 PSP2b 中单糖主要以呋喃糖形式存在。体内抗菌模型表明,PSP,PSP2 和 PSP2a 对感染小鼠均有不同程度保护作用,其中以 PSP2a 的效果最好。结论:鸡矢藤多糖中具有体内抗菌活性的成分主要为 PSP2a。

〔关键词〕 鸡矢藤; 多糖; 分离; 抗菌
〔中图分类号〕 R284.1;R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)08-0059-05
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfix.2014080059

Separation and Purification of Antibacterial Polysaccharides from
Paederia scandens in vivo

RAN Liang^{1*}, ZHANG Gui-ling¹, YANG Xiao-sheng², YANG Zai-chang³

- (1. College of Chemistry and Materials Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China;
2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and
Chinese Academy of Science, Guiyang 550002, China;
3. College of Chemistry and Chemical engineering, Guizhou University, Guiyang 550003, China)

〔Abstract〕 **Objective:** The polysaccharide was separated and purified from *Paederia scandens* for antibacterial polysaccharide *in vivo*. **Method:** The crude polysaccharides were separated and purified by column chromatography, and then the homogeneous polysaccharides were identified by gel column chromatography and polyacrylamide disc gel electrophoresis. Their structure was analyzed by GC and IR. The activities of polysaccharides were studied by antibacterial model *in vivo*. **Result:** Two kinds of homogeneous polysaccharides, PSP2a and PSP2b, were obtained from *P. scandens*. PSP2a were consisted of glucose, galactose, mannose, xylose and arabinose in the molar ratio of 4.92:3.23:1.00:1.73:3.50. PSP2b were consisted of arabinose, galactose and glucose in the molar ratio of 1.00:0.73:1.80. PSP2a and PSP2b mainly contained furanose. The antibacterial model *in vivo* indicated that PSP, PSP2 and PSP2a could protect mice infected with the resistant strain of *P. scandens*, and protection of PSP2a was best. **Conclusion:** The antibacterial component among polysaccharides from *P. scandens* was mainly PSP2a.

〔Key words〕 *Paederia scandens*; polysaccharide; isolation; antibacterial activity

〔收稿日期〕 20130514(002)
〔基金项目〕 贵州省教育厅自然科学基金重点项目〔黔教合 KY 字(2012)059 号〕
〔通讯作者〕 * 冉靛, 硕士, 讲师, 从事天然产物分离纯化及其活性研究, Tel:0851-5231947, E-mail:ranliang23@aliyun.com

鸡矢藤为茜草科鸡矢藤属植物鸡矢藤的全草或根,广泛分布于长江流域及其以南各地。其药性味甘、微苦、性平,有祛风除湿、消食化积、解毒消肿、活血止痛之功效,主治风湿痹痛、痢疾、肝炎、湿疹等症^[1-2]。多糖具有降血糖、增强免疫功能,防治类风湿性关节炎等多种生物活性^[3-5],多种多糖具有抗感染活性^[6-7]。本实验室对鸡矢藤粗多糖的前期活性研究表明,该多糖成分对受细菌感染的小鼠具有一定的保护作用。本文对贵州产鸡矢藤的粗多糖开展了深入研究,旨在寻找出具有该活性的单一多糖成分,并对该单一活性多糖的结构进行初步研究。

1 材料

1.1 药材 鸡矢藤购自贵阳药材市场,经贵阳医学院陈德媛教授鉴定为茜草科鸡矢藤属植物鸡矢藤 *Paederia scandens* (Lour.) Merr. 的藤状茎。

1.2 仪器与试剂 DEAE-纤维素(上海恒信化学试剂有限公司),Sephacrose CL-6B (Pharmacia),透析袋(北京经科宏达生物生物技术有限公司进口分装),甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、四甲基二乙胺、半乳糖醛酸(均为 Sigma),三羟甲基氨基甲烷、阿利新蓝 8GX(均为 Amresco),注射用硫酸链霉素(华北制药股份有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

感染菌株:铜绿假单胞菌耐药菌株(临床分离株,本实验室保存);实验动物 18~22 g 雄性昆明种小鼠(购自贵阳医学院实验动物中心)。合格证号 SCXK(黔)2002-0001。

HP8453 型紫外-可见分光光度仪,EYELA FDU-1100 型冷冻干燥机,DYY-2 稳压稳流电泳仪及圆盘电泳槽(北京六一仪器厂),BS-100A 型自动部分收集器、HL-2 型恒流泵(上海精科实业有限公司),ZK-82A 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂),GC-14C 型气相色谱仪(岛津),VECTOR22 型傅立叶变换红外光谱仪。

2 方法

2.1 鸡矢藤多糖的提取分离

2.1.1 鸡矢藤粗多糖的制备 干燥鸡矢藤粉碎后用 75% 乙醇回流脱脂,待残渣挥干溶剂后,加 8 倍蒸馏水,煮沸浸提 2 h,反复 2 次,合并滤液,减压浓缩至一定体积,加入重蒸工业乙醇,使乙醇含量达到 80% 以上,静置过夜,抽滤,依次用 95% 乙醇、丙酮洗涤沉淀,收集沉淀,于真空干燥箱中 60 ℃ 干燥得鸡矢藤醇沉物。用适量蒸馏水充分溶解鸡矢藤醇沉物,离心取上清液。按上清液三氯甲烷-正丁醇 25:5:1 进行 Sevag 脱蛋白^[8]处理,反复 6 次以上,取

上层水液。向水液中加入 95% 乙醇使溶液乙醇达 80% 以上,静置过夜,抽滤,依次用无水乙醇、丙酮洗涤沉淀,收集沉淀物,于 60 ℃ 下真空干燥,得鸡矢藤粗多糖(PSP)。

2.1.2 鸡矢藤多糖的分离纯化 取鸡矢藤粗多糖溶于适量蒸馏水,离心后取上清液上样,以 DEAE-纤维素柱色谱,依次用蒸馏水、1.0 mol·L⁻¹ 为上限的 NaCl 溶液、0.2 mol·L⁻¹ 为上限的 NaOH 溶液洗脱,用硫酸-苯酚法跟踪检测,收集多糖组分,浓缩洗脱液,依次对自来水、蒸馏水透析,冷冻干燥得相应多糖组分。

取 DEAE-纤维素柱的分级多糖组分溶于适量 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液中,于 3 000 r·min⁻¹ 下离心 5 min,取上清液上样,Sephacrose CL-6B 型凝胶柱(2.6 cm×100 cm)色谱,以 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱,流速 30 mL·h⁻¹,按 5 mL 每管收集,以硫酸-苯酚法跟踪检测多糖,并据吸光度对洗脱液体积绘制洗脱曲线,合并高峰部分,浓缩洗脱液,依次对自来水、蒸馏水透析,冷冻干燥。

2.1.3 鸡矢藤多糖的纯度鉴定 ①Sephacrose CL-6B 凝胶柱色谱:取适量多糖组分溶于少量 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液中,上样,Sephacrose CL-6B 凝胶柱(1.6 cm×80 cm)色谱,以 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱,流速 30 mL·h⁻¹,收集 3 mL 每管,以硫酸-苯酚法跟踪检测多糖。

②聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳^[9]:5% 聚丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为 0.025 mol·L⁻¹ 硼砂-硼酸缓冲液(pH 9.0),每管 3 mA,电泳 8 h,上样量 50 μL(含糖量 50 μg),阿利新蓝染色。

2.2 鸡矢藤多糖的理化性质检测

2.2.1 总糖含量测定 以葡萄糖为对照品,采用硫酸-苯酚法^[10]测定。

2.2.2 糖醛酸含量测定 以半乳糖醛酸为对照品,采用硫酸-咔唑法^[11]测定。

2.3 鸡矢藤多糖结构的初步研究

2.3.1 单糖组成分析 取多糖样品 10 mg,加入 2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸 3 mL,充氮气后于 100 ℃ 下水解 6 h,氮吹浓缩水解液,按文献方法^[12]操作分别制备水解多糖样品以及标准单糖样品的糖醇乙酸酯衍生物,并以肌醇为内标物进行气相色谱分析。色谱操作条件:OV-275 石英毛细管柱(0.25 μm×0.32 mm×30 m),柱温以 10 ℃·min⁻¹,从 180 ℃ 升至 250 ℃,保持 5 min,检测器和进样器温度均为 250 ℃,氮气作载气,分流比 10:1,进样量 1 μL。

2.3.2 红外光谱分析 分别取 1 mg 左右的干燥多糖样品与 100 mg 干燥 KBr 混合研细后,压片,在 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 进行红外扫描。

2.4 鸡矢藤多糖抗菌活性的研究 铜绿假单胞菌是一种典型的院内条件致病菌,常常感染癌症病人、艾滋病患者等免疫力低下的病人,加之其本身具有的多重耐药性,使得该菌感染后的死亡率较高^[13]。本实验以昆明种小鼠为实验动物,采用感染前给药治疗的方式^[14],即感染前连续腹腔注射给药 2 d,然后以临床分离的铜绿假单胞菌耐药菌株对小鼠进行腹腔注射感染,接着连续腹腔注射给药 3 d,观察 1 周内小鼠的精神状况,并记录死亡情况,以死亡率来评价药物的疗效。

实验动物分组和给药:将小白鼠随机分为 5 组:阴性对照组、阳性对照组、药物 I 组、药物 II 组、药物 III 组,每组 10 只。阴性对照组给蒸馏水;阳性对照组按每日 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射链霉素;药物 I 组按每日 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射鸡矢藤粗多糖样品(PSP);药物 II 组按每日 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射鸡矢藤多糖分级组分样品(PSP2);药物 III 组按每日 $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射鸡矢藤单一多糖样品(PSP2a)。每组每只小鼠腹腔注射铜绿假单胞耐药菌 $2 \times 10^6\text{ CFU}$, 0.5 mL 。

3 结果与分析

3.1 鸡矢藤多糖的分离纯化 鸡矢藤粗多糖 PSP 的紫外扫描光谱显示其在 260, 280 nm 处无明显特征吸收峰,且 PSP 的双缩脲反应呈阴性,说明 PSP 中的蛋白质含量较少。

PSP 经 DEAE-纤维素色谱分离,依次用蒸馏水、 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为上限的 NaCl 溶液、 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为上限的 NaOH 溶液洗脱,分部收集洗脱液,并用硫酸-苯酚法检测不同洗脱液中糖含量,根据糖含量变化情况合并洗脱液,最终主要收集到 4 个组分,分别记作 PSP1, PSP2, PSP3, PSP4,其中以 PSP2 的量最大,故对其进一步分离纯化。PSP2 经 Sepharose CL-6B ($2.6\text{ cm} \times 100\text{ cm}$) 凝胶柱色谱分离,得到两个主要成分 PSP2a, PSP2b。

采用 Sepharose CL-6B 柱 ($1.6\text{ cm} \times 80\text{ cm}$) 对 PSP2a, PSP2b 进行纯度鉴定,两者在该凝胶柱上的洗脱峰均呈单一对称峰(图 1);同时两种多糖在聚丙烯酰胺凝胶电泳上均呈单一条带(图 2),说明这两种多糖均为具有一定纯度的多糖组分。

3.2 鸡矢藤多糖理化性质 据硫酸-苯酚法测定 PSP, PSP2a, PSP2b 中的总糖含量分别为 22.09%,

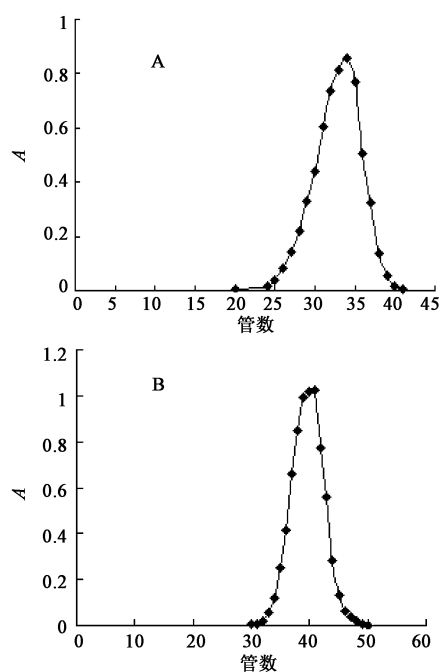


图 1 PSP2a(A), PSP2b(B) 的 Sepharose CL-6B 凝胶柱色谱鉴定洗脱曲线

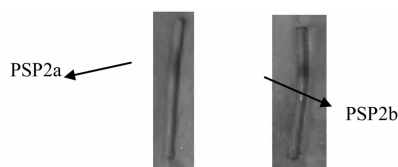
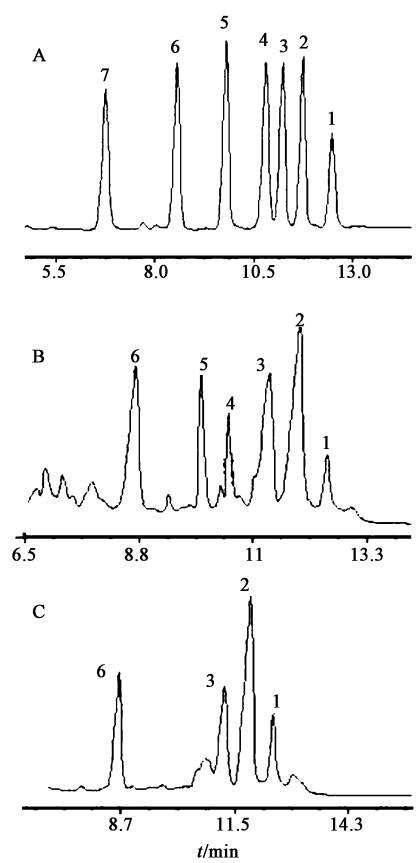


图 2 PSP2a, PSP2b 的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

9.12%, 85.33%; 据硫酸-咔唑法测定 PSP, PSP2a, PSP2b 中的糖醛酸含量分别为 20.01%, 3.62%, 7.38%。经冷冻干燥后, PSP2a 与 PSP2b 均为白色絮状粉末,均易溶于水,完全溶解后水溶液呈透明状,不溶于高浓度乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂;碘-碘化钾反应呈阴性,说明不含淀粉类多糖结构。

3.3 鸡矢藤多糖结构 标准单糖与 PSP2a, PSP2b 的气相色谱见图 3。与标准单糖的保留时间进行比对,判断出样品的单糖组成,并按内标法^[15]计算出 PSP2a, PSP2b 相应的单糖摩尔比, PSP2a 由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成,其摩尔比为 4.92:3.23:1.00:1.73:3.50, PSP2b 由阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖组成,其摩尔比为 1.00:0.73:1.80。

PSP2a, PSP2b 的红外光谱图表明 PSP2a, PSP2b 在 $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 均具有多糖类物质的一般特性。两种多糖在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 左右的吸收峰是糖类分子间或分子内氢键的伸缩振动峰, $2\,930\text{ cm}^{-1}$ 附近的弱吸收峰是 C-H 的伸缩振动峰,以上两组峰是糖类的



1. 内标肌醇;2. 葡萄糖;3. 半乳糖;4. 甘露糖;
5. 木糖;6. 阿拉伯糖;7. 鼠李糖
图 3 标准单糖(A)、PSP2a 水解物(B)、
PSP2b 水解物(C)的气相色谱

特征峰。PSP2a 与 PSP2b 在 $1\,100\sim1\,010\text{ cm}^{-1}$ 均有两个吸收峰,说明两者中的单糖主要以呋喃糖形式存在,它们分别在 $859,853\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰均为羟基呋喃环的吸收峰。

3.4 鸡矢藤多糖体内抗菌活性 给小鼠注入细菌后,各组小鼠精神萎靡,食欲下降。感染 10~12 h 后,阴性对照组和 PSP 组开始出现小鼠死亡;12~20 h 为小鼠死亡高峰期,除阳性对照组外,各组小鼠均出现死亡,其中以阴性对照组和 PSP 组的死亡数量最多;28 h 后,阴性对照组小鼠全部死亡。感染后 7 d,各组的存活情况见图 4。在所选感染前给药模型下,3 种多糖对感染小鼠都具有一定的保护作用,且小鼠的存活率随着多糖纯度的提高而增大,因此鸡矢藤多糖的抗感染保护活性得以确证;虽然 PSP2a 组比 PSP2 组的存活率仅多 10%,但是 PSP2a 组的用药剂量仅为 PSP2 组的一半,这说明 PSP2a 活性较强;而 PSP2a 是从鸡矢藤粗多糖 PSP 中的分得的主要单一多糖成分,据此可以推断 PSP2a 是鸡矢藤粗多糖起抗感染保护作用的主要成分。

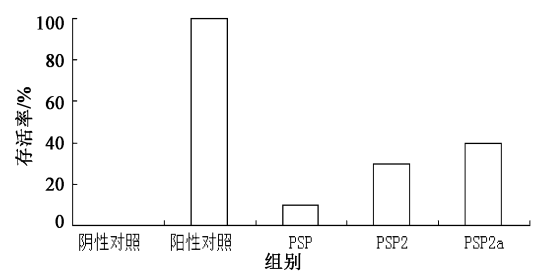


图 4 感染 7 d 后各组小鼠存活率

4 结论

鸡矢藤粗多糖经 DEAE-纤维素色谱分离共得 4 个主要成分 PSP1, PSP2, PSP3, PSP4, 其中 PSP2 的含量最高, PSP2 经 Sepharose CL-6B 凝胶柱进一步分离纯化得到纯度较高的两个主要成分 PSP2a 与 PSP2b,经凝胶柱和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,两者均为单一多糖组分。

PSP2a 为白色絮状粉末,易溶于水,完全溶解后水溶液呈透明状,不溶于高浓度乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂;碘-碘化钾反应呈阴性,总糖含量为 69.12%,糖醛酸含量为 3.62%;中性单糖组成为葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖,其摩尔比为:4.92:3.23:1.00:1.73:3.50,其单糖构型主要以呋喃环为主。PSP2b 为白色絮状粉末,易溶于水,完全溶解后水溶液呈透明状,不溶于高浓度乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂;碘-碘化钾反应呈阴性,总糖含量为 85.33%,糖醛酸含量为 7.38%;中性单糖组成阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖,其摩尔比为 1.00:0.73:1.80,其单糖构型主要以呋喃环为主。

体内抗菌模型表明,PSP,PSP2 和 PSP2a 对感染小鼠均有不同程度保护作用,且小鼠的存活率随着多糖纯度的提高而增大,以 PSP2a 活性较强,据此推断 PSP2a 是鸡矢藤粗多糖中起抗感染保护作用的主要成分。由于采用提前给药再注射细菌感染的模型,提示该多糖的体内抗菌活性可能基于对实验动物免疫活性的增强,这有待于在后续的药理实验中加以研究证实。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 6 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:460.
[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:435.
[3] 蔡忠华,宋美桂,赖政宏,等. 牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠模型的降血糖作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(23):238.

GC-MS-AMDIS 结合保留指数分析花椒、 竹叶花椒挥发油的组成成分

樊丹青,陈鸿平,刘荣,李旻,刘友平*

(成都中医药大学药学院,中药资源系统研究与开发利用省部
共建国家重点实验室培育基地,成都 611137)

〔摘要〕 目的:研究不同产地的花椒和竹叶花椒挥发油组成成分及相对含量。方法:采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)和自动质谱退卷积定性系统(AMDIS)结合 Kováts 保留指数(Retention index, RI)对其化学成分进行检测分析。结果:8 批样品共鉴定出 86 个化合物,其中 2 批四川产花椒含量最高的化合物为芳樟醇,其含量分别为 36.25%,30.91%;2 批陕西产花椒含量最高的化合物为柠檬烯,其含量分别为 15.63%,17.23%;4 批竹叶花椒含量最高的化合物均为芳樟醇,其含量在 71.74%~75.03%。结论:花椒挥发油和竹叶花椒挥发油的组成结构之间差异显著;四川产花椒和陕西产花椒可能分属两个不同的化学型。

〔关键词〕 花椒;竹叶花椒;挥发油;气相色谱-质谱法;自动质谱退卷积定性系统;保留指数

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)08-0063-06

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.20140800063

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000041.html>

〔网络出版时间〕 2014-02-07 15:26

〔收稿日期〕 20130818(005)

〔基金项目〕 2015 版《中华人民共和国药典》增修订项目

〔第一作者〕 樊丹青,在读硕士,从事中药化学成分与质量标准化研究,Tel:13540638680,E-mail:fandanqinggod@126.com

〔通讯作者〕 *刘友平,研究员,博士生导师,从事中药质量标准化及药效物质基础研究,Tel:028-61800158,E-mail:lyp@cdutcm.edu.cn

[4] 罗珍,黄萍,郭重仪,等.猴头菇多糖增强免疫功能的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):182.

[5] 陈燕,李世刚.中药多糖防治类风湿性关节炎的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):202.

[6] 刘小燕.多糖抗感染作用的研究进展[J].热带病与寄生虫学,2006,4(2):117.

[7] 余丹凤,孔繁智,朱婉萍,等.黄芪多糖抗呼吸道绿脓杆菌感染的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(2):76.

[8] 刘莉,李泳怡,潘育方,等.荔枝核多糖脱蛋白工艺考察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(23):52.

[9] 吴梧桐,余品华,夏尔宁,等.银耳孢子多糖 TF-ATF-BTF-C 的分离、纯化及组成单糖的鉴定[J].生物化学与生物物理学报,1984,16(4):393.

[10] 张璐,翁立冬,刘莉,等.苯酚-硫酸法测定乌梅多糖含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):107.

[11] 郭欣,高向东,杨晓兵.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.

[12] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].2版.杭州:浙江大学出版社,1999:40.

[13] Li X Z, Livermore D M, Nikaido H. Role of efflux pumps in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994,38:1732.

[14] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2000:1664.

[15] 朱明华,胡坪.仪器分析[M].4版.北京:高等教育出版社,2008:53.

〔责任编辑 邹晓翠〕