

抗肿瘤活性茯苓多糖的提取、纯化与结构分析

黄 灿, 王玉明, 赵 骏*

天津中医药大学中药学院, 天津 300193

摘 要: 目的 对具有抗肿瘤活性的茯苓多糖进行提取、纯化以及结构分析。方法 采用水提醇沉法提取茯苓多糖, 三氯乙酸法除蛋白, 凝胶色谱柱纯化得到抗肿瘤活性茯苓多糖 ATPCP, 高效液相凝胶色谱法测其相对分子质量, 样品水解后经过 TLC 及 GC-MS 分析确定单糖组成, 通过 FT-IR、 ^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR 对其进行结构分析。结果 GPC 结果显示抗肿瘤活性茯苓多糖的重均相对分子质量为 16 850, 多分散性为 1.34, TLC 及 GC-MS 结果显示其含有岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖, 各单糖的物质的量比为 1:2.36:5.49:2.34。FT-IR 和 NMR 结果显示 ATPCP 含有 α -型和 β -型吡喃糖, 其主链为 1, 6-糖苷键, 并存在 1, 4-糖苷键支链。结论 茯苓中具有抗肿瘤活性的茯苓多糖是由 4 种确定的单糖组成并伴有支链的杂多糖。

关键词: 茯苓多糖; 抗肿瘤; 组分分析; 核磁共振; 红外光谱分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2146-04

Preparation, purification, and analysis of chemical composition of anti-tumor polysaccharide from *Poria cocos*

HUANG Can, WANG Yu-ming, ZHAO Jun

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Key words: polysaccharides of *Poria cocos* (Fr.) Wolf.; anti-tumor; component analysis; NMR; FT-IR

自从发现茯苓 *Poria cocos* (Fr.) Wolf. 多糖的抗肿瘤活性以来, 对其活性研究一直是多糖抗肿瘤活性研究的热点之一。研究发现多糖的形态结构, 相对分子质量以及化学成分组成均会影响多糖的抗肿瘤活性^[1]。Ke 等^[2]以热水为溶剂提取出茯苓多糖, 分析由核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 通过小鼠体内抗肿瘤实验证明其能够明显抑制肿瘤细胞的生长, 并能增加小鼠体内的 SOD、CAT 和 GPX 的活性。目前, 鲜有文献报道茯苓多糖相对分子质量对茯苓多糖抗肿瘤活性的影响。本实验为了探究茯苓多糖相对分子质量、结构与茯苓多糖抗肿瘤活性之间的关系, 分离得到不同相对分子质量段的茯苓多糖, 由体外细胞试验筛选出具有抗肿瘤活性的茯苓多糖进行结构分析, 确定了活性茯苓多糖的相对分子质量分布, 为抗肿瘤活性研究提供新的依据。

1 材料与仪器

RE—52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)、GZK—40 电热真空干燥箱 (天津市华北实验仪器有

限公司)、UV—2401PC 紫外可见分光仪 (日本岛津)、智能型傅里叶变换红外光谱仪 (Nicolet 公司)、Brucker—Plus 400 核磁共振波谱仪 (瑞士 Brucker 公司)、GC MS—QP2010SE 气相色谱质谱联用仪 (日本岛津)、Waters 高效液相色谱仪, Shodex SB-804 HQ (300 mm×8 mm, 10 μm) (北京京时代科技发展有限公司), 右旋糖苷 Dextran (Fluca) 依次为 (重均相对分子质量约值) 1 000、5 000、12 000、25 000、50 000、80 000、150 000、410 000、670 000 (北京拜尔迪生物有限公司), 葡萄糖、半乳糖、木糖、果糖、鼠李糖、树胶醛糖 (均为分析纯, 天津市博迪化工有限公司), 岩藻糖对照品 (10082526, 天津一方科技有限公司)。

5 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 (由天津中医药大学实验动物中心提供), Bel-7402 细胞株 (上海润成生物科技有限公司), 茯苓购自安徽省亳州市药材市场, 经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Fr.) Wolf. 的干燥菌核。

收稿日期: 2012-02-16

基金项目: 天津市重点项目“基于调控固有免疫的茯苓多糖抗肿瘤作用及机理研究”(10JCZDJC21300)

作者简介: 黄 灿 (1988—), 女, 硕士研究生, 安徽安庆人, 药物分析学硕士。Tel: 13821736523 E-mail: 5055386273@qq.com

*通讯作者 赵 骏 E-mail: zhaojun_022@sina.com

2 抗肿瘤活性茯苓多糖 (APPC) 的提取

2.1 活性茯苓多糖的确定

取 70 °C 下烘干的茯苓 4 kg, 按料液比 1:12 加入蒸馏水, 回流提取 2 次, 每次 3 h, 合并 2 次滤液, 浓缩, 加入乙醇使其体积分数达到 80%, 4 °C 放置过夜, 滤过, 沉淀依次用无水乙醇、乙醚、丙酮洗涤, 低温烘干, 加入适量蒸馏水溶解, 除去少量不溶物, 加入 200 mL 的 10% 三氯乙酸, 搅拌 30 min, 4 °C 静置过夜, 滤过除去沉淀。上清液加入乙醇使醇浓度达到 20%, 4 °C 静置过夜, 离心, 沉淀分别用丙酮、乙醚、无水乙醇洗涤, 低温烘干, 即得 A 段茯苓多糖, 重复以上操作但上清液加入乙醇使其体积分数依次分别为 40%、60%、80%, 即得 B、C、D 段茯苓多糖。

2.2 APPC 的筛选

分离大鼠外周血白细胞, 将 A、B、C、D 以及总多糖作用于白细胞 2 h 后, 再将白细胞作用于肝癌 Bel-7402 细胞, 以玫瑰花环样结构的形成作为指标, 证明由 C 段作用的白细胞可提高白细胞在肝癌 Bel-7420 细胞周围形成玫瑰花环样结构的比例。由此筛选出 C 段 (命名为 APPC) 为抗肿瘤活性多糖^[3]。

2.3 均一相对分子质量茯苓活性多糖的确定

APPC 经过葡聚糖凝胶 Sephadex G-75, 以蒸馏水为流动相洗脱得均一相对分子质量茯苓活性多糖, 待结构分析。

3 结构分析

3.1 相对分子质量测定

3.1.1 色谱条件 LC—20AT 恒流泵, CTO—20A 柱温箱, RID—10A 检测器 (示差折光检测器), 色谱柱为 Shodex SB-804HQ (300 mm×8 mm, 10 μm), 柱温 30 °C, 检测池温度 30 °C, 流动相为三蒸水, 体积流量 0.8 mL/min。

3.1.2 利用排阻色谱-示差折光法对所得的活性多糖进行相对分子质量测定 对照品使用右旋糖苷 Dextran (Fluca) 的相对分子质量依次为 1 000、5 000、12 000、25 000、50 000、80 000、150 000、410 000、670 000, 用三蒸水溶解, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 以对照品的保留时间为横坐标, 相对分子质量的对数值为纵坐标做 GPC 的标准曲线。根据样品的保留时间, 计算出样品的相对分子质量。

3.2 TLC 分析单糖组成

3.2.1 样品水解液制备^[4] 称取 APPC 20 mg, 加入 2

mol/L 的硫酸 4 mL 于具塞试管中, 105 °C 水解 10 h, Ba(OH)₂ 中和, 离心, 取上清液, 浓缩至 1 mL, 备用。

3.2.2 对照品溶液制备 配置各单糖对照品质量浓度为 2 mg/mL, 备用。

3.2.3 显色剂制备 称取 0.93 g 苯胺和 1.66 g 邻苯二甲酸溶于 100 mL 水饱和正丁醇中, 备用。

3.2.4 展开系统 以展开剂 1 (正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-无水乙醇-水 7:16:12:10:9), 展开剂 2 (正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-乙酸-吡啶-水 7:20:12:7:6:5), 采用上行法 2 次展开, 展开距离相同, 晾干后均匀喷上显色剂, 置 105 °C 烘箱 20 min。由 R_f 值确定单糖组成。

3.3 GC-MS 分析单糖组成

3.3.1 色谱条件 柱温 100 °C, 进样口温度 280 °C, 分流比 30:1, 程序升温: 100 °C 保持 3 min, 14 °C/min 升温至 163 °C, 保持 9 min; 20 °C/min 升温至 210 °C, 保持 3 min; 25 °C/min 升温至 280 °C 保持 3 min。

3.3.2 对照品乙酰化处理 精密称取单糖对照品各 2 mg, 加入盐酸羟胺吡啶溶液 (20 mg/mL) 1 mL, 混匀后于 90 °C 水浴 30 min, 冷却至室温后加入 1 mL 乙酸酐, 混匀, 90 °C 水浴 30 min, 冷却, 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 1 μL 进样。

3.3.3 水解样品乙酰化处理 精密称取水解 ATPCP 10 mg, 加入盐酸羟胺吡啶溶液 (20 mg/mL) 0.5 mL, 混匀后于 90 °C 水浴 30 min, 冷却至室温后加入 0.5 mL 醋酸酐, 混匀, 90 °C 水浴 30 min, 冷却, 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 1 μL 进样。

3.4 红外波谱分析以及核磁共振波谱分析

3.4.1 红外光谱分析 采用 KBr 压片法在 400~4 000 cm⁻¹ 测定。

3.4.2 核磁共振分析 Bruker AV600 型超导核磁共振谱仪, 温度 300 K, 溶剂为 D₂O, DMSO 定标。

4 结果

4.1 APPC 的相对分子质量分布

图 1 显示 APPC 的 M_p (峰尖相对分子质量) 为 13 917, 多分散性为 1.34。切片积分计算出 ATPCP 的 M_w (重均相对分子质量) 为 16 580, M_n (数均相对分子质量) 为 12 620。

4.2 薄层色谱分析

通过计算各单糖的 R_f 值, 与单糖对照品对照, 结果显示抗肿瘤活性 APPC 可能含有甘露糖、葡萄糖、果糖、岩藻糖、半乳糖。

4.3 GC-MS 分析单糖组成

由图 2 分析可知 ATPCP 含有岩藻糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。根据峰面积可计算各单糖之间的物质的量之比为 1 : 2.36 : 5.49 : 2.34。

4.4 红外光谱分析

红外图谱显示^[1], 3 418 cm^{-1} 处强且宽的吸收峰是 O-H 与 C-H 的伸缩振动, 为糖类物质的特征吸收, 并且存在明显的分子间氢键; 2 928 cm^{-1} 是饱和 C-H

的伸缩振动, 1 658 cm^{-1} 处吸收峰是由 O-H 的弯曲振动引起, 1 416 cm^{-1} 和 1 368 cm^{-1} 是次甲基的变形振动吸收峰, 1 247 cm^{-1} 是吡喃糖环 C-O-C 伸缩振动吸收峰, 1 400 cm^{-1} 和 1 200 cm^{-1} 是糖类的 C-H 变角振动, 1 141 cm^{-1} 是吡喃糖环的 C-O 吸收峰, 1 080 cm^{-1} 和 1 027 cm^{-1} 是 -OH 的变角振动吸收峰, 876 cm^{-1} 为 β 型糖苷键的吸收峰, 773 cm^{-1} 为吡喃糖环的 C-O-C 的对称振动峰。561 cm^{-1} 和 517 cm^{-1} 是 C-CO 的变形振动吸收峰。

4.5 核磁共振波谱分析

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) δ : 102.4, 101.5, 98.1, 77.6, 73.5, 71.6, 70.5, 70.2, 69.7, 68.4, 67.3, 66.9, 61.3, 15.8。 ^1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.05, 4.99, 4.96, 4.94, 4.70, 4.10, 4.01, 3.96, 3.93, 3.85, 3.82, 3.72, 3.60, 3.57, 1.16, 1.11。多糖的氢谱信号大多数在 δ 3.5~5.5, δ 5.05, 4.99, 4.96, 4.94 为异头碳质子信号, 显示可能含有 4 种单糖, δ 1.11 处是岩藻糖的 6 位质子信号。 ^{13}C -NMR 谱显示^[5-6], δ 102.4, 101.5, 98.1 为端基异头碳信号。 δ 70.0~75.0 为未取代的 C-2, C-3, C-4 共振峰, δ 77.6 是被取代的 C-4 糖苷键的共振峰, δ 70.2 为发生取代的 C-6 的共振峰, δ 61.3 说明存在游离的 C-6, δ 15.8 处含有吸收峰说明有 6-位脱氧糖的甲基存在, 这与气质联用检测出的岩藻糖相符, 由峰高比可知多糖的主链是由 1-6 连接的糖苷键为主, 并有 1-4 连接的糖苷键的支链。

5 讨论

文献报道有多种展开系统, 且均是单次展开。但实验中多次尝试, 发现单次展开分离效果不佳, 后采用 2 种展开剂 2 次展开达到满意的分离效果。另外, 本实验尝试过多种单糖显色剂, 最终选择显色效果最好的苯胺-邻苯二甲酸显色剂。

GC-MS 分析中衍生化方法的不同对检测结果影响很大, 本实验比较了硅烷化以及糖腈乙酰酯衍生化的方法, 采用糖腈乙酰酯衍生化的方法出峰效果较好。

本实验在经典的水提醇沉的多糖提取方法的基础上进一步改进, 获得 4 种不同相对分子质量段的茯苓多糖, 确定了茯苓多糖的相对分子质量对抗肿瘤活性的影响, 为开发茯苓多糖药物提供依据。茯苓多糖 ATPCP 的结构研究有利于进一步探索其结构与抗肿瘤活性的关系, 以便寻找更为有效的药物多糖。

参考文献

[1] Wang Y F, Zhang M, Ruan D, *et al.* Chemical

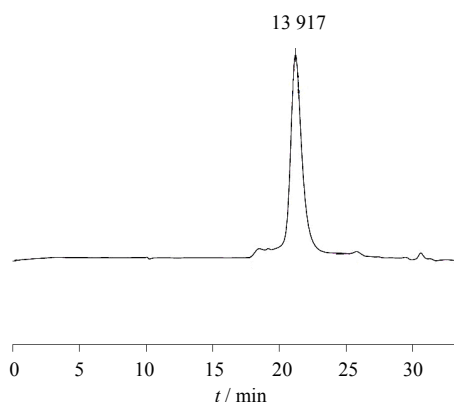


图 1 抗肿瘤茯苓多糖凝胶色谱图

Fig. 1 Molecular weight distribution of APPC

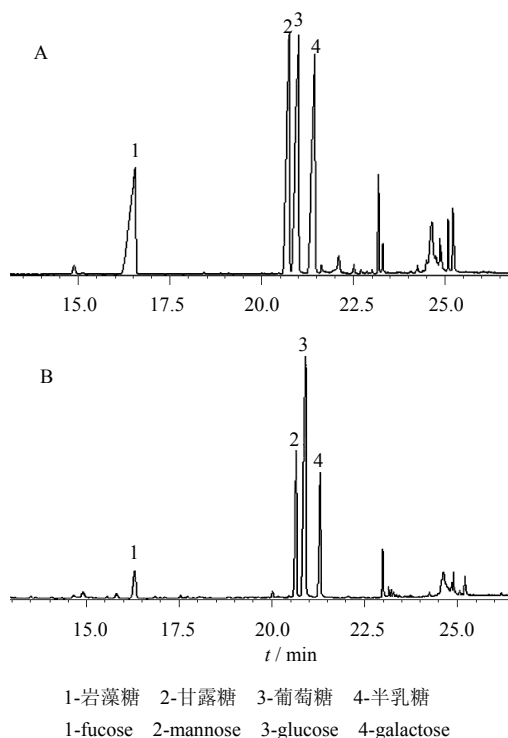


图 2 单糖对照品 (A) 与 APPC (B) 的 GC-MS 图

Fig. 2 GC-MS chromatograms of monosaccharide reference substances (A) and APPC (B)

- components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos* [J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(2): 327-334.
- [2] Ke R D, Lin S F, Chen Y. Analysis of chemical composition of polysaccharides from *Poria cocos* Wolf and its anti-tumor activity by NMR spectroscopy [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 80(1): 31-34.
- [3] Cui Z, Willingham M C, Hicks A M, *et al*. Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice [J]. *PNAS*, 2003, 100(11): 6682-6687.
- [4] 葛淑敏, 于源华, 张艳飞. 紫蘑菇多糖组分分析及结构初步鉴定 [J]. 现代预防医学, 2009, 36(21): 4145-4146.
- [5] 乔善义, 王立岩, 赵毅民, 等. 山药多糖的提取分离与结构测定 [J]. 中国天然药物, 2003, 1(3): 155-156.
- [6] Lu M K, Cheng J J, Lin C Y, *et al*. Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory effect of a water-soluble 1, 6-branched 1, 3- α -D-galactan from cultured mycelia of *Poria cocos* [J]. *Food Chem*, 2010, 118(2): 349-356.

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药学科学技术性期刊, 双月刊, 国内外公开发刊。桑国卫院士为名誉主编, 刘昌孝院士任编委会主任委员, 汤立达研究员为主编。

办刊宗旨: 报道药物评价工作实践, 推动药物评价方法研究, 开展药物评价标准或技术探讨, 促进药物评价与研究水平的提高, 为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目: 针对药物及其制剂的评价规范以及药学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容, 设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题7个栏目。

读者对象: 药品管理、新药研发、药物临床应用、药学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO 组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白, 将为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台, 通过交流药物评价工作的实践经验, 发展和完善评价的方法学, 探讨评价相关的国际标准或指南, 提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿, 广大读者踊跃订阅! 本刊自办发行, 订阅请直接与编辑部联系! 本刊热忱与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统, 欢迎广大读者、作者、编委使用!

《药物评价研究》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道308号(300193)

网址: www.中草药杂志社.中国

电话/传真: 022-23006822

www.tiprpress.com

E-mail: der@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

帐号: 441140100100081504

户名: 天津中草药杂志社