

藏药甘松多糖 S 的研究

蒋开年, 韩泳平*

西南民族大学 少数民族药物研究所, 四川 成都 610041

摘要: 目的 对甘松多糖 S (*Nardostachys chinensis* polysaccharide S, NCPS) 的组成进行研究。方法 采用水提醇沉法提取甘松多糖粗品, 并通过乙醇分级沉淀, Sevage 法除蛋白, 葡聚糖凝胶柱色谱纯化; UV 和 IR 等方法考察多糖性质, 凝胶渗透色谱-示差检测法测定多糖的纯度和相对分子质量范围及分布, HPLC 法鉴定单糖组成及其物质的量比值。结果 得到一种淡黄色粉末 NCPS。紫外光谱分析在 195 nm 波长处有明显吸收峰, 在 260、280 nm 等处无吸收峰, 表明被测物为多糖, 且不含核酸及蛋白质; 红外吸收光谱分析, 在 3 412.15、2 934.10、1 642.11、1 438.96、1 242.67、1 103.54、830.86、636.12 cm^{-1} 等处均有明显的多糖的特征吸收; 其重均相对分子质量为 7 082; NCPS 主要由阿拉伯糖、木糖、果糖和葡萄糖组成, 其物质的量的比值为 0.69:1.0:3.92:2.28。结论 NCPS 为一种杂多糖, 首次从甘松中分离得到。

关键词: 甘松多糖 S; 单糖组成; Sevage 法; 水提醇沉法; 葡聚糖凝胶柱色谱

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2248-03

Study on polysaccharide S from Tibetan traditional medicine *Nardostachys chinensis*

JIANG Kai-nian, HAN Yong-ping

Ethnic Pharmaceutical Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Key words: *Nardostachys chinensis* polysaccharide S (NCPS); monosaccharide constituent; Sevage method; water extraction and ethanol precipitation method; Sephadex gel column chromatography

甘松为败酱科植物甘松 *Nardostachys chinensis* Batal. 或匙叶甘松 *N. jatamansi* (D. Don) DC. 的干燥根及根茎, 主要分布于西藏、青海、四川、云南、甘肃等地。具有理气止痛、开郁醒脾之功效, 用于脘腹胀痛、食欲不振、呕吐; 外治牙痛、脚肿。甘松作为传统中药在临床上用于心律不齐、胃脘痛、胃及十二指肠溃疡、癫痫等多种疾病的治疗^[1]。此外, 近年来甘松属植物化学和药理学研究表明甘松提取的有效成分还具有镇静、对平滑肌的解痉、降血糖、抗心律失常、增强耐缺氧能力、抗心肌缺血、抑菌等作用^[2]。

天然多糖通常具有抗癌、抗炎、抗病毒、抗衰老和增强免疫等多种生物活性^[3-4], 其已经成为生命科学研究的热点^[5-6]。目前, 对甘松的研究多集中在其化学成分方面^[7-9]。本课题组在前期探讨甘松多糖 S (*Nardostachys chinensis* polysaccharide S, NCPS)

的抗氧化生物活性^[10]的基础上, 进一步利用红外光谱、紫外光谱、高效凝胶渗透色谱和高效液相色谱等方法, 对其理化性质和单糖组成进行研究。

1 仪器与材料

Waters 201 型凝胶色谱仪 (含 515 泵、2410 示差检测器, 美国 Waters 公司); Waters 600 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 透析袋 (DM-30 mm×5 m, 相对分子质量 3 500, 美国 Spectrum 公司), IR200 红外光谱仪 (美国 Thermo Electron), Unicam UV 500 紫外可见分光光度计 (美国 Thermo Electron 公司), Sephadex G-100 (瑞典 Pharmacia 公司), 果糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所); 其余试剂均为分析纯。

甘松药材购于成都市五块石药材市场, 由成都中医药大学卢先明教授鉴定为败酱科植物甘松 *Nardostachys chinensis* Batal. 的干燥根及根茎。

收稿日期: 2011-02-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371778); 西南民族大学青年重点资助项目 (05NQZ004)

作者简介: 蒋开年 (1984—), 男, 在读有机化学专业硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。

Tel: 15902898427 E-mail: jiangkainian@yahoo.com.cn

*通讯作者 韩泳平 Tel: 13550391197 E-mail: yphan65@tom.com

2 方法与结果

2.1 粗多糖的提取

甘松根状茎粉碎后,先后加入 10、8、8 倍量的蒸馏水,加热提取 3 次,每次 2 h,合并 3 次提取液,减压浓缩至合适体积,加入 3 倍量 95%乙醇沉淀,静置过夜,抽滤。依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,收集沉淀物。真空干燥得棕褐色粉末甘松多糖粗品(NCP)。

2.2 NCP 的分离纯化

NCP 经 Sevage 法脱蛋白, H_2O_2 法脱色后上 Sephadex G-100 柱色谱分离,以 0.1 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,体积流量为 30 mL/h,每管收集 5 mL,苯酚硫酸法检测糖分布,见图 1。合并高峰部分,经透析、浓缩、醇沉、真空干燥得 NCPS。NCPS 为淡黄色粉末,溶于水,不溶于二甲基亚砜、乙醇等有机溶剂。

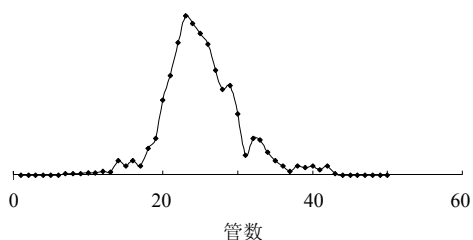


图1 NCP 的 Sephadex G-100 柱色谱洗脱图
Fig. 1 Elution chromatogram of NCP on Sephadex G-100 column

2.3 红外、紫外光谱分析及理化鉴定

2.3.1 红外光谱 取 2~3 mg 的 NCPS 样品,以 KBr 压片,测其红外光谱吸收。其红外光谱图显示出了明显的多糖特征吸收峰,在 3 412.15、2 934.10、1 642.11、1 438.96、1 242.67、1 103.54、830.86、636.12 cm^{-1} 等处均有多糖的特征吸收,3 412.15 cm^{-1} 处吸收峰主要是由多糖的配糖体羟基(缔合)伸缩振动引起的;2 934.10 cm^{-1} 处的吸收峰与碳氢键的伸缩振动相对应;1 103.54 cm^{-1} 处出峰则是碳氧键伸缩振动的特征;830.86 cm^{-1} 处出峰提示糖链构型为吡喃型。

2.3.2 紫外光谱 以 1 mg/mL NCPS 溶液在波长 190~400 nm 内扫描。在紫外光谱图中,195 nm 处显示多糖的特征吸收^[11],在 260、280 nm 处无蛋白、核酸吸收峰,表明多糖中无蛋白、多肽及核酸的存在。

2.3.3 理化鉴定 以硫酸-咔唑反应、双缩脲反应、碘-碘化钾反应、 $FeCl_3$ 试液反应、斐林试剂检测

NCPS,反应均显阴性,表明 NCPS 不含多酚类、蛋白、还原糖等成分,与红外光谱、紫外光谱试验结果一致。

2.4 NCPS 的纯度检查及相对分子质量测定

2.4.1 常压凝胶柱色谱法 取 2 mg NCPS 溶于少量蒸馏水中,上 Sephadex G-100 柱色谱,以 0.1 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,体积流量为 45 mL/h,每管收集 1.5 mL,苯酚硫酸法检测糖分布,结果为单一狭窄对称峰,见图 2。

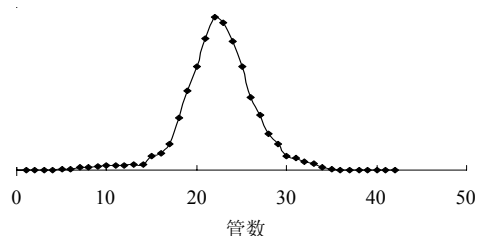


图2 NCPS 的 Sephadex G-100 柱色谱洗脱图
Fig. 2 Elution chromatogram of NCPS on Sephadex G-100 column

2.4.2 高效凝胶渗透色谱法 取 NCPS 样品溶于 0.2 mol/L NaCl 溶液中,配成 3 mg/mL 的溶液,在 Waters ultrahydrogel linear 色谱柱(300 mm×7.8 mm)上进样分析,进样量为 10 μ L,洗脱液为 0.2 mol/L NaCl,体积流量为 0.8 mL/min,运行 18 min,以 Waters 2410 示差检测器测定质量浓度,记录图谱。以标准 Dextran 标准相对分子质量系列求出相关标准相对分子质量校正曲线方程为 $\lg M_w = 26.4 - 4.77t + 0.390t^2 - 0.013t^3$ ($r = 0.9854$), M_w 为瞬间相对分子质量, t 为保留时间, r 为相关系数。

NCPS 相对分子质量分布见图 3,其重均相对分子质量约为 7 082。检出峰为单一对称峰,表明 NCPS 是纯度较高的多糖级分。

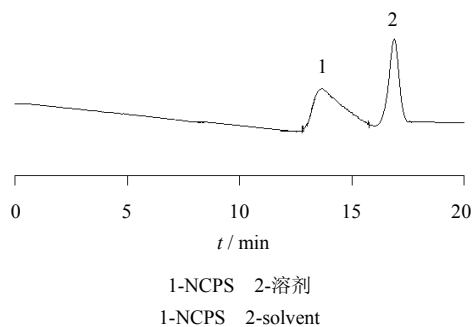


图3 NCPS 的高效凝胶渗透色谱洗脱图
Fig. 3 High performance gel permeation chromatogram of NCPS

2.5 单糖组成分析

准确称取阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖配制单糖混合对照品溶液。精密称取多糖样品 20 mg, 加 2 mol/L 硫酸 5 mL, 110 °C 下水解 6 h, 取出, 冷却后用固体 BaCO₃ 粉末完全中和, 4 000 r/min 离心, 留取上清液。采用 HPLC 法分析其单糖组分。分析柱为 Luna 氨基色谱柱, 流动相为乙腈-

水 (80:20), 体积流量为 1 mL/min, 进样量为 20 μ L, 柱温为 30 °C; 采用 2487 检测器检测, 色谱图见图 4。由单糖对照品的保留时间进一步确认单糖的种类, 根据各组分的峰面积确定各单糖的比例。结果表明, 甘松多糖由木糖、阿拉伯糖、果糖和葡萄糖 4 种单糖组成, 其物质的量比值为 0.69:1.0:3.92:2.28。

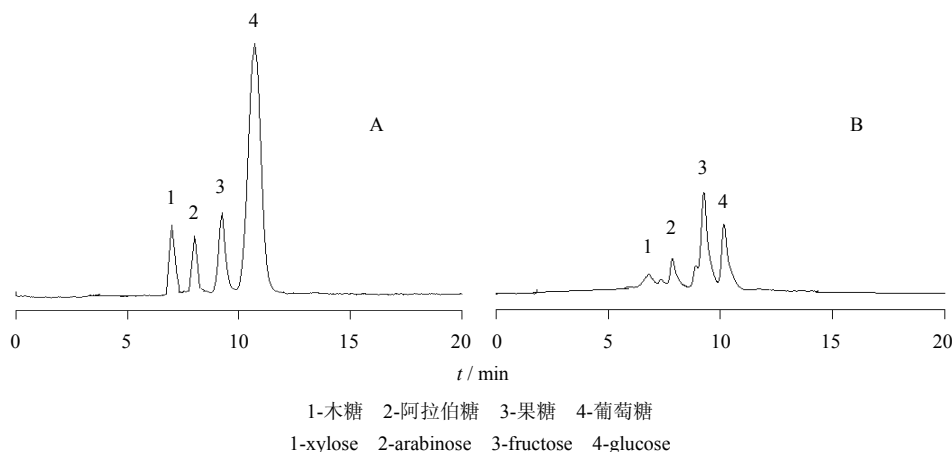


图4 混合单糖对照品(A)和NCPS水解样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of mixed monosaccharide reference substances (A) and hydrolysate of NCPS (B)

3 讨论

通过实验, 得到了一个纯度较高的甘松多糖 NCPS。并且通过红外、紫外光谱等仪器及化学方法分析了甘松多糖的性质, 实验证明甘松多糖中不含多酚类、蛋白、核酸、还原糖等成分。甘松多糖由木糖、阿拉伯糖、果糖和葡萄糖组成, 其物质的量比值为 0.69:1.0:3.92:2.28。本实验为甘松多糖的进一步研究提供了基础。

参考文献

- [1] 黄伯舜. 甘松的临床应用心得 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 377.
- [2] 张文衡, 陈虎彪. 甘松属植物化学和药理学研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(3): 11-14.
- [3] 邓小云, 丁登辉, 戴美红, 等. 植物多糖药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2006, 12(9): 86-88.
- [4] 朱成杰, 赵 昆, 王桂芳, 等. 天然多糖在体外抗甲型流感病毒作用的普遍性 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(12): 919-923.
- [5] 何碧烟, 欧光南, 李旭敏, 等. 红毛菜多糖组成及结构的初步研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(11): 210-214.
- [6] 何晋浙, 邵 平, 倪惠东, 等. 灵芝多糖结构及其组成研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(1): 123-127.
- [7] 张 毅, 徐丽珍, 杨世林. 甘松化学成分的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 181-183.
- [8] 张 毅, 林 佳, 徐丽珍, 等. 甘松化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2007, 38(6): 823-825.
- [9] 韩泳平, 向永臣, 肖 丹, 等. 甘松挥发性化学成分的研究 [J]. 成都中医药大学学报, 1999, 22(3): 43-44.
- [10] 张苏阳, 蒋开年, 王 煜, 等. 甘松多糖的体外抗氧化性研究 [J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(2): 145-146.
- [11] 宋学伟, 任 磊, 韩泳平, 等. 大花红景天多糖 RCPS 分离纯化及单糖组成分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 642-644.