

板蓝根多糖的系统分离纯化与组成分析

国欣¹, 胡小龙¹, 王月荣^{1*}, 杨子峰², 王玉涛², 李征途², 胡坪^{1*}

1. 上海市功能性材料化学重点实验室, 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237
2. 广州医科大学附属第一医院 呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510230

摘要: **目的** 建立板蓝根多糖的系统分离纯化方法, 并对分离得到的均一多糖进行组成测定。**方法** 以抗病毒活性较好的 80%醇沉板蓝根粗多糖为研究对象, 对其进行 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱色谱、Sephacryl-200 葡聚糖凝胶柱色谱以及高效凝胶色谱系统分离纯化。分别采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 和邻苯二甲醛 (OPA) 衍生化 HPLC 法对分离得到的板蓝根均一多糖进行单糖组成和氨基酸组成测定。**结果** 利用系统分离纯化策略, 从 80%醇沉板蓝根粗多糖中分离得到 2 种均一板蓝根多糖 (IRPS1A 和 IRPS1B) 和 2 种均一板蓝根糖蛋白 (IRPS2A 和 IRPS3A)。其中, IRPS1A 与 IRPS1B 的单糖组成均为甘露糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖; IRPS2A 的单糖组成为半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖; IRPS3A 的单糖组成为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖。糖蛋白 IRPS2A 与 IRPS3A 均含有天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸, 共 14 种氨基酸残基。同时, IRPS2A 还含有酪氨酸残基。**结论** 该系统分离纯化的策略可应用于板蓝根均一多糖 (糖蛋白) 的获取, 为板蓝根多糖的结构分析及药理活性研究奠定基础。

关键词: 板蓝根多糖; 板蓝根糖蛋白; 系统分离纯化; 单糖组成; 氨基酸组成

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1508-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.010

System isolation and purification of *Isatidis Radix* polysaccharides and determination of their compositions

GUO Xin¹, HU Xiao-long¹, WANG Yue-rong¹, YANG Zi-feng², WANG Yu-tao², LI Zheng-tu², HU Ping¹

1. Shanghai Key Laboratory of Functional Materials Chemistry, School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
2. State Key Laboratory of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510230, China

Abstract: Objective To isolate and purify the polysaccharides (glycoproteins) from *Isatidis Radix* (Banlangen) systematically and to study the composition of them. **Methods** Crude polysaccharides precipitated by 80% ethanol from the water extract of *Isatidis Radix*, which has the anti-viral activity, were fractionated by DEAE-Sepharose Fast Flow, Sephacryl-200, and high gel chromatography system sequentially. The composition of monosaccharides and amino acids of polysaccharides (glycoproteins) was then determined by HPLC with pre-column derivatization using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) and *o*-phthalaldehyde (OPA), respectively. **Results** Two of homogeneous polysaccharides named IRPS1A and IRPS1B and two of homogeneous glycoproteins named IRPS2A and IRPS3A were obtained from *Isatidis Radix* by systematical separation and purification. The monosaccharide composition of IRPS1A and IRPS1B was of arabinose, mannose, galactose, and glucose. IRPS2A contained galacturonic acid, glucose, galactose, and arabinose. While IRPS3A contained mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose, and arabinose. The amino acid compositions of IRPS2A and IRPS3A were 14 kinds of amino acid residues including Asp, Glu, Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Cys, Val, Phe, Iso, Leu, and Lys. Besides all, IRPS2A also contained Tyr. **Conclusion** This strategy can be used for the isolation and purification of homogeneous polysaccharides/glycoproteins from *Isatidis Radix* which provides a possible support for the elucidation of the structure and the pharmacologic action of *Isatidis Radix* polysaccharides (glycoproteins).

Key words: *Isatidis Radix* polysaccharides; *Isatidis Radix* glycoproteins; system isolation and purification; monosaccharide composition; amino acid composition

收稿日期: 2015-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273481, U1201227, 81403167); 广州市属高校科研项目 (1201430183)

作者简介: 国欣 (1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为天然产物的分离与分析。Tel: (021)64252844 E-mail: fionastarguo@hotmail.com

*通信作者 胡坪 (1970—), 女, 教授, 博士, 从事天然产物分离与分析方向的研究。Tel: (021)64252844 E-mail: huping@ecust.edu.cn

王月荣 (1978—), 女, 讲师, 博士, 从事中药分析方向。Tel: (021)64252844 E-mail: wangyuerong@ecust.edu.cn

板蓝根 *Isatidis Radix* 是中国传统中草药, 始载于《神农本草经》, 味苦, 性寒, 具有清热解毒、凉血利咽之功效, 临床上常用于病毒性及细菌性感染疾病等^[1-2]。多糖是板蓝根入药部位(水提部位)的主要化学成分, Du 等^[3]对 95%醇沉板蓝根粗多糖进行分离纯化得到相对分子质量(M_w)为 57 000 的均一多糖 RIWP, 并首次报道了多糖 RIWP 对小鼠肺泡巨噬细胞的抗氧化和抗炎活性; 杨子峰等^[4-5]对板蓝根水提物 S-03 进行研究发现其可以体外抑制甲、乙型流感病毒的感染; 对 M_w 在 3 500~7 000 的粗多糖 G2 研究发现, 在病毒感染早期 G2 可能通过影响病毒颗粒来干扰流感病毒的附着, 从而防止流感病毒的感染; 日本学者 Yamada 认为板蓝根抗病毒成分之一为糖肽与蛋白质或多肽的复合物, 即糖蛋白或糖肽, 且分离出一种抗病毒的糖蛋白^[6]。板蓝根粗多糖是一种较为复杂的混合物, 由多种不同组成、不同 M_w 的均一多糖以及糖蛋白等构成, 因此, 对板蓝根粗多糖进行系统分离纯化, 对于筛选活性多糖(糖蛋白)成分, 阐明板蓝根多糖(糖蛋白)的抗病毒机制至关重要。

本实验在前期粗分离和活性追踪的基础上^[7], 以抗病毒活性较好的 80%醇沉板蓝根粗多糖为研究对象, 采用系统分离纯化法, 得到 2 种板蓝根均一多糖 IRPS1A 和 IRPS1B 及 2 种板蓝根均一糖蛋白 IRPS2A 和 IRPS3A, 并测定其单糖组成和氨基酸组成, 为板蓝根的抗病毒物质及机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 配备 Alltech 3300 ELSD 检测器, 上海埃纹斯科贸有限公司; RE-52C 旋转蒸发仪, 巩义市英峪予华仪器有限公司; FDI 冷冻干燥机, 北京博医康仪器有限公司; CH-8606 微量分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; BSZ-100 自动部分收集器, 上海青浦沪西仪器厂; EPED-E2-10TF 超纯水器, 南京易普易达科技发展有限公司; UV-2550 紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司。

1.2 药材与试剂

板蓝根由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供, 采自黑龙江大庆及安徽阜阳板蓝根 GAP 基地, 由中国科学院华南植物园叶华国研究员鉴定为十字花科菘蓝属植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的根; 硫酸、盐酸、苯酚、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二

钠, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司; DEAE-Sephacryl Fast Flow、Sephacryl-200, GE Healthcare; 乙腈, 色谱纯, Honeywell; 无水乙醇, 分析纯, 上海泰坦科技股份有限公司; 葡萄糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、半乳糖醛酸, 上海源聚生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$; 三氯甲烷, 分析纯, 上海化学试剂有限公司; 透析袋, 截留 M_w 3 500, 联合碳化; 标准葡聚糖的 M_w 1 000 (批号 31416)、5 000 (批号 31417)、12 000 (批号 31418)、25 000 (批号 31419)、50 000 (批号 31420)、150 000 (批号 31422), 瑞士 Fluka 公司; 邻苯二甲醛(OPA)、9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC), 质量分数 $\geq 99\%$, Sigma 公司; 17 种氨基酸混合标准溶液, 美国 Pierce 公司, 批号 61105, 其中 L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、L-组氨酸、甘氨酸、L-苏氨酸、L-精氨酸、L-丙氨酸、L-酪氨酸、L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸浓度为 2.5 $\mu\text{mol/mL}$; L-胱氨酸浓度为 1.25 $\mu\text{mol/mL}$; 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP), 阿拉丁试剂, 质量分数 $\geq 99.0\%$; 磷酸奥司他韦, 上海罗氏制药有限公司; 二甲基亚砜(DMSO), 美国 Sigma 公司; MEM 基础培养基(Minimum Essential Medium), 美国 Gibco 公司, 批号 20140217; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司, 批号 10099; 1 mg/mL 甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲酮处理过的胰酶(TPCK 胰酶), 广州捷倍斯生物科技有限公司, 批号 20140220; 噻唑蓝[MTT, 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2], Genebase 公司。

1.3 细胞株与病毒株

狗肾细胞(MDCK)引自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。甲型 H1N1 流感病毒 PR8 株(A/PR/8/34, H1N1)、甲型 H3N2 流感病毒 Aichi 株(A/Aichi/2/68, H3N2)均购自美国经典培养物收藏中心(ATCC); 新甲型 H1N1 流感病毒株(A/Guangzhou/GIRD07/09, H1N1, Genbank No. HM014332.1)为临床分离株。上述毒株流感病毒通过接种于 9 日龄的鸡胚尿囊腔中扩增, 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 d, 收获尿囊液。用 MDCK 细胞滴定病毒, 以细胞病变抑制法(CPE)^[8]判定这些毒株的半数感染量(TCID₅₀/100 μL), 作为病毒原始滴度。

2 方法与结果

2.1 粗多糖制备

准确称取板蓝根药材粉末 300 g, 加入 10 倍量去离子水, 回流提取 2 h, 冷却, 滤过, 重复上述提

取过程 2 次, 合并提取液, 减压浓缩至料液比约 1 : 2, 加入无水乙醇, 使乙醇的体积分数达 50%, 4 °C 下冷藏 24 h, 4 500 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥。重复上述醇沉过程, 使上清液中乙醇的体积分数依次达 60%、70%、80%、90%, 最终得到不同体积分数乙醇的醇沉粗多糖。分级醇沉板蓝根粗多糖的性状及产率见表 1。

表 1 分级醇沉板蓝根粗多糖性状及产率

Table 1 Characteristic and productivity of crude polysaccharides precipitated by ethanol at different concentration

醇沉样	颜色	溶解性	产率/%
50%乙醇	灰白色粉末	难溶于水	18.0
60%乙醇	浅褐色粉末	溶于水, 少许浑浊	0.4
70%乙醇	褐色粉末	易溶于水	3.4
80%乙醇	土黄色粉末	易溶于水	2.6
90%乙醇	淡黄色粉末	易溶于水	1.8

2.2 80%乙醇醇沉板蓝根粗多糖抗病毒活性

2.2.1 药物毒性实验 (MTT 法) 按每孔约 2.5×10^4 MDCK 细胞接种到 96 孔板, 24 h 后待细胞长成单层后, 弃去培养液, 加入不同稀释度的药物 100 μ L/孔, 空白对照和正常细胞对照孔加入 100 μ L/孔 MEM, 37 °C、5% CO₂ 继续培养 36~48 h, 每孔加 MTT 液 (5 mg/mL) 20 μ L, 置 37 °C、5% CO₂ 温箱中继续孵育 4 h。吸弃培养上清液, 每孔加 100 μ L DMSO, 低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 (A) 值, 计算抑制率, 并用 Reed-Muench 法计算药物的半数有毒浓度 (TC₅₀), 抑制率 = (正常组平均 A 值 - 给药组平均 A 值) / (正常组平均 A 值 - 空白组平均 A 值)。结果显示 MTT 法体外检测板蓝根多糖的 TC₅₀ > 40 mg/mL。

2.2.2 板蓝根多糖体外抗流感病毒活性实验 在治疗作用模式下, 以细胞病变抑制法 (cytopathic effect reduction method) 研究板蓝根多糖对流感病毒的抑制作用。长满单层的 96 孔细胞培养板内的 MDCK 细胞吸附病毒 2 h, 同时设定阳性药物 (磷酸奥司他韦) 和细胞对照, 然后加入含不同质量浓度 (40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 2 mg/mL) 药物的培养液, 置 34 °C、5% CO₂ 环境下培养 48 h。

细胞出现病变程度按以下 6 级标准记录: “-” 为细胞生长正常, 无病变出现; “±” 为细胞病变少于整个单层细胞的 10%; “+” 为细胞病变约占整个单层细胞的 25%; “++” 为细胞病变约占整个

单层细胞的 50%; “+++” 为细胞病变约占整个单层细胞的 75%; “++++” 为细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以上。用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 (IC₅₀), 并以选择指数 (SI) 表示 (SI = TC₅₀/IC₅₀), SI > 2 表示低毒高效; SI = 1~2 表示高毒低效; SI < 1 表示无效。结果显示板蓝根多糖对多种亚型的甲型流感病毒有体外抑制作用, 见表 2。

表 2 板蓝根 80%醇沉粗多糖体外对多种甲型流感病毒药效作用

Table 2 Pharmacodynamics of crude polysaccharides precipitated by 80% ethanol on different influenza a virus *in vitro*

样品	考察指标	H1N1 (PR8)	H1N1 (2009pdm)	H3N2 (Aichi)
板蓝根	TC ₅₀ (mg·mL ⁻¹)	>40	>40	>40
多糖	IC ₅₀ (mg·mL ⁻¹)	20.48	8.47	4.35
	SI	>1.95	>4.72	>9.19
磷酸奥司	TC ₅₀ (mg·mL ⁻¹)	>0.312	>0.312	>0.312
他韦	IC ₅₀ (μ g·mL ⁻¹)	0.238	0.194	13.800
	SI	>1 000	>1 000	>100

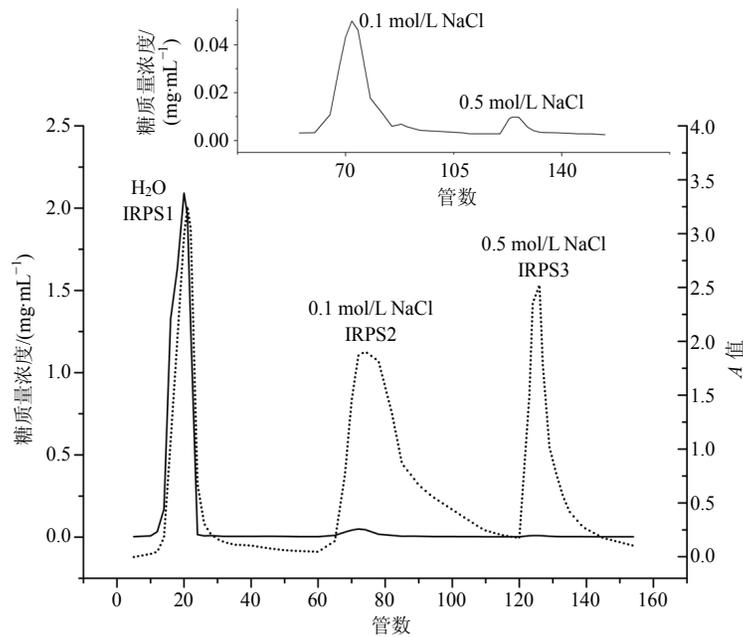
2.3 DEAE-Sephacryl Fast Flow 柱色谱分离

取 80%乙醇醇沉板蓝根粗多糖样品 1.0 g, 用纯水溶解后上 DEAE-Sephacryl Fast Flow 色谱柱, 依次以纯水及 0.1、0.5 mol/L NaCl 溶液进行洗脱, 自动部分收集器收集馏份, 7.5 mL/管。分别用苯酚-硫酸法^[9]与紫外分光光度法 ($\lambda = 280$ nm) 对每管洗脱液中的糖质量浓度和氨基酸质量浓度进行跟踪检测。苯酚-硫酸法测定的标准曲线为 $A = 15.2 C - 0.030 9$, 相关系数为 $r = 0.997$, 其中 A 为吸光度值, C 为葡萄糖质量浓度 (mg/mL)。以洗脱管数为横坐标, 糖质量浓度与 280 nm 处的 A 为纵坐标绘制洗脱曲线, 如图 1 所示。将图 1 中的水及 0.1、0.5 mol/L NaCl 洗脱部分分别合并, 减压浓缩至一定体积后, 转移至透析袋中透析 48 h, 样品减压浓缩, 冷冻干燥, 得 3 个粗多糖亚组分, 反复冻溶除去游离蛋白, 分别命名为 IRPS1、IRPS2、IRPS3, 得率 (得率 = 冻干粗多糖质量/上样质量) 分别为 5.4%、2.7%、2.0%。

2.4 葡聚糖凝胶柱色谱与 HPLC 纯化

取 IRPS1 50 mg, 水溶解后, 上 Sephacryl-200 聚丙烯胺葡聚糖凝胶柱。以水作为洗脱剂, 自动部分收集器收集洗脱馏份, 每管 3 mL, 采用苯酚-硫酸法和凝胶色谱-蒸发光散射检测器 (GPC-ELSD, 分析条件参见 “2.5.1”) 进行监测, 以糖质量浓度为纵坐标, 洗脱管数为横坐标, 绘制洗脱曲线见图 2。

由图 2 可以看出, 亚组分 IRPS1 经过 Sephacryl-



实线为多糖质量浓度曲线，虚线为 280 nm 紫外吸收曲线，上方为多糖质量浓度曲线的局部放大图
Solid line is sugar concentration curve. Dotted line is curve of UV absorption at 280 nm. Curves above picture is a partially enlarged view of sugar concentration curve

图 1 80%乙醇醇沉粗多糖的 DEAE-Sephacryl-200 洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of crude polysaccharides precipitated by 80% ethanol on DEAE-Sephacryl-200

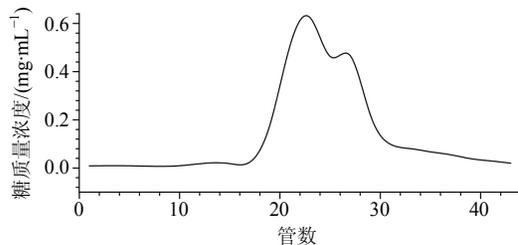


图 2 IRPS1 的 Sephacryl-200 洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of IRPS1A on Sephacryl-200

200 柱色谱分离纯化后，不同 M_w 的多糖之间仍无法达到完全分离。分别合并 18~25 管及 22~26 管溶液进行凝胶色谱测定，发现色谱峰不完全对称。为了得到质量分数更高的均一多糖，对 2 组合并液再用高效凝胶色谱法进行进一步纯化。以超纯水作为流动相，体积流量 0.6 mL/min，色谱柱为 TSK-G3000 PW_{XL} 柱，收集不同时间段的流出物，减压浓缩，冷冻干燥，得板蓝根均一多糖 IRPS1A 和 IRPS1B，

产率（产率=冻干均一多糖质量/上样质量）分别为 23.5%和 20.7%。其凝胶色谱图分别见图 3-A、B。

称取 IRPS2 或 IRPS3 50 mg，用 0.15 mol/L NaCl 溶液溶解后，上 Sephacryl-200 聚丙烯胺葡聚糖凝胶柱。以 0.15 mol/L NaCl 溶液作为洗脱剂，自动部分收集器收集洗脱馏份，每管约 3 mL，透析 48 h 除盐后，采用 GPC-ELSD 进行检测，合并 M_w 相同馏份，减压浓缩，冷冻干燥，即得板蓝根均一糖蛋白 IRPS2A 和 IRPS3A，产率（产率=冻干均一糖蛋白质量/上样质量）分别为 5.7%和 19.8%。其凝胶色谱图分别见图 3-C、D。

2.5 板蓝根多糖（糖蛋白）的 M_w 测定^[10]

用凝胶过滤色谱法结合 ELSD 检测器测定多糖组分的 M_w 及其分布。

2.5.1 色谱分析条件 色谱柱为 TSK-G3000PW 柱；流动相为 4 mmol/L 甲酸铵水溶液；体积流量 0.6

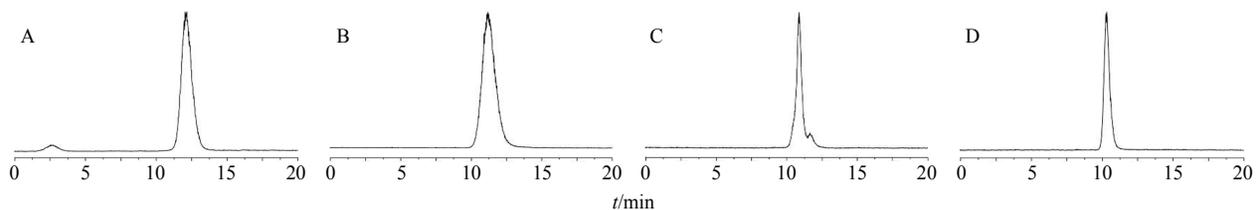


图 3 IRPS1A (A)、IRPS1B (B)、IRPS2A (C) 与 IRPS3A (D) 的 GPC-ELSD 色谱图

Fig. 3 GPC-ELSD chromatograms of IRPS1A (A), IRPS1B (B), IRPS2A (C), and IRPS3A (D)

mL/min; 进样量 10 μ L; ELSD 检测温度 50 $^{\circ}$ C; 气体体积流量 1.6 L/min。

2.5.2 对照品溶液的配制 分别精密称取 M_w 为 1 000、5 000、12 000、25 000、50 000、150 000 的葡聚糖, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 的对照品水溶液。

2.5.3 M_w 的测定 以标准葡聚糖的保留时间 (t) 为横坐标, M_w 对数值 $\lg M_w$ 为纵坐标, 绘制得到标准曲线的回归方程为 $\lg M_w = 10.038 - 0.496 4 t$, 相关系数 $r = 0.996$ 。将图 3 中 IRPS1A、IRPS1B、IRPS2A 与 IRPS3A 的 t 代入回归方程中, 计算得到 4 种均一多糖的 M_w 分别为 18 000、31 000、36 000 和 82 000。

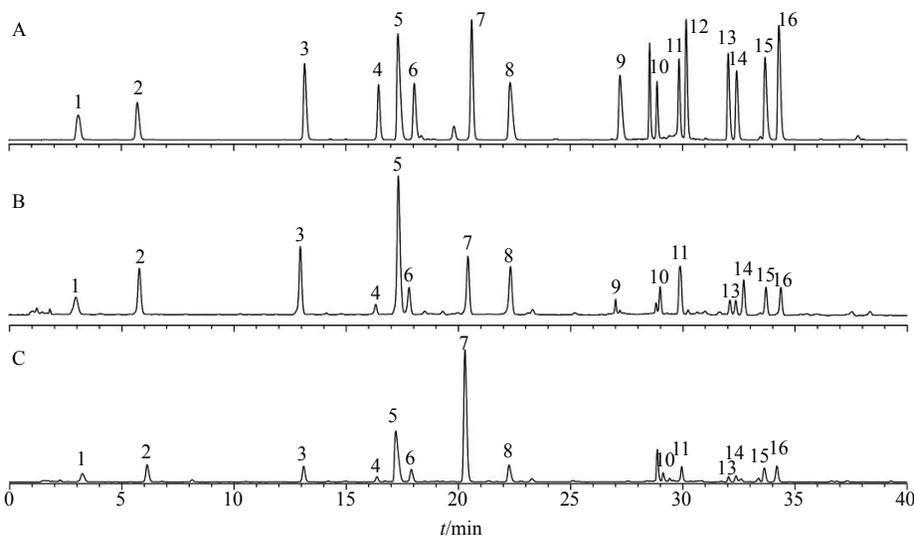
2.6 板蓝根糖蛋白的氨基酸组成测定

2.6.1 色谱分析条件与方法 色谱柱为 Zorbax Eclipse-AAA 柱 (150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m); 流动相 A 为 40 mmol/L Na_2HPO_4 , 用 NaOH 溶液调 pH 至 7.8, 流动相 B 为乙腈-甲醇-水 (45 : 45 : 10), 梯度洗脱: 0.0~1.9 min, 2.0% B; 1.9~25.0 min, 2.0%~23.7% B; 25.0~25.3 min, 23.7%~34.9% B; 25.3~45.6 min, 34.9%~57.0% B; 45.6~46.1 min, 57.0%~100% B; 46.1~49.8 min, 100% B; 49.8~51.7 min, 100%~2.0% B; 51.7~53.0 min, 2.0% B; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 检测波长 338、262 nm。OPA 溶液的配制方法: 10 mg OPA 溶于 1 mL 溶液 (0.16 mL 甲醇 + 0.14 mL 硼酸缓冲液 + 0.69 mL 纯水 + 0.01 mL 3-巯基丙酸)。硼酸缓冲液的配

制方法: 首先配制 0.1 mol/L 硼酸溶液, 用 0.4 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 10.0。FMOC 溶液的配制: 10 mg FMOC 溶于 1 mL 乙腈。氨基酸的柱前在线衍生化在高效液相色谱仪自动进样器的定量环中进行。自动衍生程序: 抽取硼酸盐缓冲液 2.5 μ L; 抽取样品 1.0 μ L; 混合 5 次; 等待 0.2 min; 抽取 OPA 溶液 1.0 μ L; 混合 10 次; 抽取 FMOC 溶液 1.0 μ L, 抽取纯水 32 μ L, 等待 0.3 min, 进样。

2.6.2 供试品溶液的制备和氨基酸组成测定 参考文献方法^[11-13]对板蓝根糖蛋白 IRPS2A 与 IRPS3A 进行酸水解和氨基酸组成测定。水解时间为 17 h, 水解温度为 104 $^{\circ}$ C, 盐酸浓度为 10 mol/L。取 1 mL 水解液, 氮吹至干, 加入 100 μ L 纯水复溶, 按“2.6.1”项方法进行柱前衍生化 HPLC 分析。

16 种一级氨基酸标样和 IRPS2A、IRPS3A 的 OPA 衍生化产物色谱图见图 4, 样品中未检测出二级氨基酸脯氨酸。通过单点校正计算得 IRPS2A 的氨基酸组成 (各氨基酸的物质的量之比) 为天门冬氨酸-谷氨酸-丝氨酸-组氨酸-甘氨酸-苏氨酸-精氨酸-丙氨酸-酪氨酸-胱氨酸-缬氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-亮氨酸-赖氨酸 (5.1 : 7.2 : 5.6 : 1.4 : 7.7 : 3.1 : 3.5 : 4.8 : 1.0 : 1.8 : 4.6 : 1.1 : 3.2 : 2.0 : 1.6)。IRPS3A 的氨基酸组成为天门冬氨酸-谷氨酸-丝氨酸-组氨酸-甘氨酸-苏氨酸-精氨酸-丙氨酸-胱氨酸-缬氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-亮氨酸-赖氨酸 (5.2 :



1-L-天门冬氨酸 2-L-谷氨酸 3-L-丝氨酸 4-L-组氨酸 5-甘氨酸 6-L-苏氨酸 7-L-精氨酸 8-L-丙氨酸 9-L-酪氨酸 10-L-胱氨酸
11-L-缬氨酸 12-L-蛋氨酸 13-L-苯丙氨酸 14-L-异亮氨酸 15-L-亮氨酸 16-L-赖氨酸
1-L-aspartic acid 2-L-glutamic acid 3-L-serine 4-L-histidine 5-glycine 6-L-threonine 7-L-arginine 8-L-alanine 9-L-tyrosine
10-L-cysteine 11-L-valine 12-L-methionine 13-L-phenylalanine 14-L-isoleucine 15-L-leucine 16-L-lysine

图 4 16 种一级氨基酸标样 (A) 和 IRPS2A (B)、IRPS3A (C) 的 OPA 衍生化产物色谱图

Fig. 4 OPA derivatives chromatograms of 16 kinds of amino acids reference solution (A), IRPS2A (B), and IRPS3A (C)

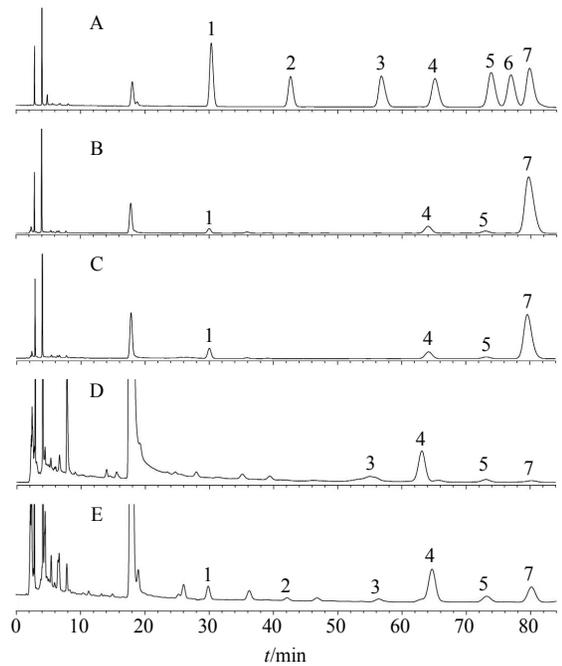
6.8 : 3.3 : 1.6 : 8.6 : 3.7 : 19.6 : 4.0 : 1.5 : 3.0 : 1.0 : 1.3 : 2.7 : 2.3)。

2.7 板蓝根多糖的单糖组成测定^[14-15]

2.7.1 色谱分析条件 色谱柱为 Inertsil® ODS-3 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.68) - 乙腈 (83 : 17), 等度洗脱; 柱温 30 °C; 检测波长 250 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 20 μL。

2.7.2 对照品溶液的制备 利用 PMP 柱前衍生化法对板蓝根多糖的单糖组成进行测定。取 1 mL 单糖混合对照品溶液 (葡萄糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸、鼠李糖), 加入 1 mL 0.6 mol/L NaOH 溶液, 置于 10 mL 的具塞试管中混合均匀; 加入 1 mL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液, 混匀后, 置于 70 °C 烘箱中加热反应 60 min, 取出, 室温放置 10 min; 再加入 1 mL 0.3 mol/L 盐酸溶液中和。加 3 mL 三氯甲烷, 振摇, 静置, 弃去三氯甲烷相, 萃取 3 次。水相用 0.45 μm 微孔膜滤过后进行 HPLC 分析。配制不同质量浓度的混标溶液, 以质量浓度 (C , mg/mL) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果各单糖的标准曲线分别为甘露糖 $A=29\ 353\ C-9.57$, $r=0.999\ 4$; 鼠李糖 $A=25\ 107\ C+11.02$, $r=0.999\ 2$; 半乳糖醛酸 $A=30\ 842\ C-346.57$, $r=0.996\ 3$; 葡萄糖 $A=24\ 914\ C-98.65$, $r=0.999\ 1$; 半乳糖 $A=31\ 183\ C-58.89$, $r=0.999\ 3$; 木糖 $A=31\ 075\ C-62.47$, $r=0.999\ 5$; 阿拉伯糖 $A=35\ 545\ C-84.34$, $r=0.999\ 6$ 。

2.7.3 供试品溶液的制备和单糖组成测定 分别称取适量的 IRPS1A、IRPS1B、IRPS2A 与 IRPS3A 于 5 mL 安瓿中, 加入 1 mL 水溶解, 再加入 2 mL 2 mol/L 的硫酸溶液, 封管, 110 °C 烘箱中水解 8 h, 冷却至室温, 加入 8 mol/L NaOH 溶液, 调节 pH 值约为 7。取 1 mL 水解液于 10 mL 试管中, 按“2.7.2”项方法进行衍生化和测定。单糖混合对照品溶液与水解产物 IRPS1A、IRPS1B、IRPS2A、IRPS3A 的 PMP 衍生色谱图见图 5。经计算, IRPS1A 单糖组成主要为甘露糖-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖 (2.9 : 4.8 : 1.0 : 23.4); IRPS1B 单糖组成为甘露糖-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖 (1.0 : 3.8 : 3.0 : 24.5); IRPS2A 单糖组成为半乳糖醛酸-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖 (12.6 : 27.1 : 1.9 : 1.0); IRPS3A 单糖组成为甘露糖-鼠李糖-半乳糖醛酸-葡萄糖-半乳糖-阿拉伯糖 (2.2 : 1.0 : 1.6 : 13.5 : 2.3 : 4.7)。



1-甘露糖 2-鼠李糖 3-半乳糖醛酸 4-葡萄糖 5-半乳糖
6-木糖 7-阿拉伯糖
1-mannose 2-rhamnose 3-galacturonic acid 4-glucose
5-galactose 6-xylose 7-arabinose

图 5 单糖混合对照品 (A) 与 IRPS1A (B)、IRPS1B (C)、IRPS2A (D)、IRPS3A (E) 水解产物的 PMP 衍生色谱图
Fig. 5 PMP derivative HPLC of mixed reference substances of monosaccharide (A), IRPS1A (B), IRPS1B (C), IRPS2A (D), and IRPS3A (E)

3 讨论

板蓝根的抗病毒作用在临床上已被证实^[16-17], 多糖作为板蓝根入药部位的主要化学物质, 其抗病毒的活性及作用机制亦受到广泛关注。然而, 板蓝根多糖是组成复杂的混合物, 其分离纯化一直是抗病毒活性及机制研究的瓶颈问题。本实验采用系统分离的研究思路, 首先将板蓝根药材水提物进行分级醇沉, 选择具有较强抗病毒活性的 80%乙醇醇沉粗多糖作为分离对象, 以降低后续分离纯化的难度。再通过快速离子交换柱色谱, 将不带电荷或者带有极少数电荷的多糖成分与带有大量电荷的糖蛋白成分进行初步分离, 得到 3 个亚组分 IRPA1、IRPS2 与 IRPS3。最后, 利用快速凝胶色谱柱对各亚组分进行进一步的分离纯化。对于 M_w 接近、但均一性不够的混合部位, 则采用分辨率更高的高效凝胶色谱法进一步纯化, 最终得到 4 种均一多糖 (糖蛋白) IRPS1A、IRPS1B、IRPS2A、IRPS3A。该系统分离纯化的研究策略也可运用于其他复杂中药多糖的高效制备。

在板蓝根多糖的分离纯化过程中,分离过程的监控十分重要。本实验选用苯酚-硫酸法、紫外分光光度法和高效凝胶色谱法等多种方法进行过程跟踪,可以同时兼顾糖量较高的多糖组分和氨基酸量较高的糖蛋白组分,还可以依据 M_w 的差异进行馏份的切割和合并,从而有效避免单一监测方法的缺陷,提高系统分离的效率和目标产物的均一性。

本实验是在前期研究的基础上^[10],选择最优条件对板蓝根多糖进行水解,而后利用柱前衍生化的方法对多糖中的氨基酸残基进行分析。结果表明,IRPS2A 含有以甘氨酸为主的 15 种氨基酸,IRPS3A 中包含以精氨酸为主的 14 种氨基酸,且质量分数较高,故 IRPS2A 和 IRPS3A 为板蓝根均一糖蛋白。2 种糖蛋白中均未检测出二级氨基酸,所含有的一级氨基酸种类丰富且大致相同。研究过程中还对 IRPS1A、IRPS1B 的氨基酸残基进行了测定,结果表明 IRPS1A、IRPS1B 的氨基酸残基总量极低,可能由少量杂质引入,因此 IRPS1A、IRPS1B 为板蓝根均一多糖。

板蓝根多糖的组成分析已有少量文献报道,马莉等^[18]从 60%乙醇醇沉板蓝根粗多糖中分离得到 4 种均由单一木糖组成、 M_w 不同的均一多糖。张体祥等^[19]分离得到 1 种 M_w 为 2.24×10^5 ,由鼠李糖、果糖、葡萄糖、半乳糖组成的板蓝根均一多糖。陈浩然等^[20]从 70%乙醇醇沉板蓝根粗多糖分离得到一种 M_w 为 11 700 的均一板蓝根多糖 A,其单糖组成为阿拉伯糖和半乳糖。本实验主要研究 80%乙醇醇沉板蓝根粗多糖,分离得到的 4 种均一多糖(糖蛋白) M_w 为 $1.8 \times 10^4 \sim 8.2 \times 10^4$,IRPS1A 与 IRPS1B 主要由阿拉伯糖残基构成,同时还含有少量的甘露糖、葡萄糖和半乳糖,糖组成与文献报道^[20]相近。板蓝根糖蛋白 IRPS2A、IRPS3A 中,单糖组成以葡萄糖为主,还含有少量半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖等。

参考文献

[1] 周威. 现代分离分析技术在板蓝根成分分析中的应用研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2012.
 [2] 胡晓燕, 刘明华, 孙琴, 等. 板蓝根抑菌活性部位的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1615-1620.
 [3] Du Z, Liu H, Zhang Z, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Radix Isatidis* polysaccharide in murine alveolar macrophages [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 329-335.
 [4] Yang Z F, Wang Y T, Zhao S, et al. *In vitro* inhibition of influenza virus infection by a crude extract from *Isatis*

indigotica root resulting in the prevention of viral attachment [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3): 793-799.

- [5] 杨子峰, 王玉涛, 秦笙, 等. 板蓝根水提物 S-03 体外抑制甲、乙型流感病毒感染的实验研究 [J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 218-223.
 [6] Yamada H. Antiviral compositions containing new glycoprotein from *Isatis tinctoria*: 日本, JP, 11-60599 [P]. 1999-03-02.
 [7] Yang Z F, Hu P, Zhong S, et al. Extraction and separation of polysaccharides from *Radix isatidis* and their effects towards hemagglutinin protein of influenza virus [J]. *Asian J Chem*, 2015, 27(5): 1615-1620.
 [8] Reed L J, Muenc H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *Am J Epidemiol*, 1938, 27(3): 493-497.
 [9] 范传颖, 陶正明, 吴志刚. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定铁皮石斛中多糖含量的比较 [J]. 浙江农业科学, 2013, 1(7): 799-801.
 [10] 胡坪, 乔晚芳, 沈俊文, 等. 麦冬多糖单糖组成的分析方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 50-56.
 [11] 胡坪, 陈焯, 杨子峰, 等. 板蓝根糖肽的组成测定 [J]. 中成药, 2015, 37(2): 336-342.
 [12] Roch M C, Harmony M D. Determination of amino acids at subfemtomole levels by high performance liquid chromatography with laserinduced fluorescence detection [J]. *Anal Chem*, 1987, 59(3): 411.
 [13] Li H, Lee J R, Nguyen D Q A, et al. Quantitative analysis of valiolamine through pre-column derivatization with phenyl isocyanate using high performance liquid chromatography with UV detection: Selection of reagent, identification of derivative and optimization of derivatization conditions [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 957-963.
 [14] 范刚, 唐策, 李艳, 等. 柱前衍生 HPLC 分析黄连多糖的单糖组成 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 74-78.
 [15] Bai W, Fang X, Zhao W, et al. Determination of oligosaccharides and monosaccharides in Hakka rice wine by precolumn derivation high-performance liquid chromatography [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(4): 645-651.
 [16] 马毅敏, 李娜, 刘承伟, 等. 板蓝根不同提取部位抗炎镇痛活性比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2517-2521.
 [17] 何立巍, 董伟, 杨婧妍, 等. 板蓝根抗病毒有效部位的化学成分及其活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 2960-2964.
 [18] 马莉, 唐健元, 李祖伦, 等. 板蓝根多糖分离纯化及其性质研究 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1143-1146.
 [19] 张体祥, 李艳福, 刘婕, 等. 板蓝根多糖分离纯化及其单糖组成研究 [J]. 河南工程学院学报, 2009, 21(3): 13-17.
 [20] 陈浩然, 李祥, 何立巍, 等. 板蓝根多糖 A 的分离纯化及结构研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(21): 1642-1644.