

党参多糖单糖组成与其对 HepG2 细胞毒活性的相关分析

张培, 郑晓萍, 马玉玲, 白瑞斌, 胡芳弟*

兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 探究党参多糖的单糖组成与其对肝癌 HepG2 细胞毒活性之间的相关性。方法 26 批不同产地的党参样品, 采用水提醇沉法提取多糖, 苯酚硫酸法测多糖的量、气相色谱法和间羟基联苯法同时测定半乳糖醛酸的量、糖脲乙酸酯衍生法分析单糖种类及量、三甲基硅醚衍生法测果糖的量, MTT 法研究党参多糖对 HepG2 细胞的细胞毒活性, 采用聚类分析法对 26 批党参样品进行聚类分析, 以偏最小二乘法 (PLS) 探究样品中各单糖种类和量与其对 HepG2 细胞毒活性的相关性。结果 26 批党参多糖样品均显示一定的 HepG2 细胞毒活性, 且以甘肃文县的 8 号党参多糖的细胞毒活性最强 (其抑制率为 36.36%)。26 批党参多糖中各类单糖的量存在差异。聚类分析结果表明, 党参多糖的单糖种类及量不能作为党参分类的指标。党参多糖的单糖组成与 HepG2 细胞毒活性的相关性研究表明, 半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖与 HepG2 细胞毒活性呈正相关, 而甘露糖、木糖和葡萄糖与 HepG2 细胞毒活性呈负相关。结论 党参多糖对 HepG2 的细胞毒活性与其单糖的种类存在相关性, 含有半乳糖醛酸相对较高的党参多糖的细胞毒活性较强。

关键词: 党参; 多糖; 单糖组成; 细胞毒活性; 半乳糖醛酸; 鼠李糖; 阿拉伯糖; 半乳糖; 果糖; 甘露糖; 木糖; 葡萄糖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)15-2684-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.016

Monosaccharide compositions of *Codonopsis pilosula* polysaccharides and their correlation analysis on cytotoxic activities against HepG2 cells

ZHANG Pei, ZHENG Xiao-ping, MA Yu-ling, BAI Rui-bin, HU Fang-di

School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To study the correlation between monosaccharide compositions and their *in vitro* cytotoxic activities. **Methods** Twenty-six *Codonopsis pilosula* polysaccharides (CPPs) were extracted by water extraction and alcohol precipitation method from *C. pilosula* collected from 26 different habitats. Total carbohydrate contents of the polysaccharides were determined by the phenol-sulfuric acid colorimetric method. The methods of *m*-hydroxydiphenyl and GC were all applied to the determination of the galacturonic acid contents in polysaccharides, and the compositional analysis was performed using the aldonitrile acetate method while the fructose contents was analyzed by the trimethylsilyl ether method. *In vitro* cytotoxic activities against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells of the 26 batches of CPPs were evaluated by MTT. Then, hierarchical clustering analysis (HCA) was used to study the classification of 26 batches of *C. pilosula* and partial least squares (PLS) was used to investigate the correlation between the monosaccharide compositions and *in vitro* cytotoxic activities of the polysaccharides. **Results** The results showed that all the 26 batches of CPPs possessed the cytotoxic activities against HepG2 cells. The 8th CPPs sample, which was extracted from the *C. pilosula* collected in Wen county (Gansu province, China), had the highest growth inhibitory rate on HepG2 cells and the inhibitory rate was 36.36%. In addition, the monosaccharide contents of the 26 batches of CPPs were different from each other. The results of HCA showed that the *C. pilosula* could not be classified according to the monosaccharide compositions. The PLS results indicated that galacturonic acid, arabinose, rhamnose, galactose, and fructose were correlated positively with the cytotoxic activities, while mannose, xylose, and glucose were correlated negatively with the cytotoxic activities. **Conclusion** The *in vitro* cytotoxic activities of CPPs are highly correlative to their monosaccharide compositions, and the CPPs containing much galacturonic acid have the obviously cytotoxic activities.

Key words: *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.; polysaccharides; monosaccharide composition; cytotoxic activities; galacturonic acid; rhamnose; arabinose; galactose; fructose; mannose; xylose; glucose

收稿日期: 2016-03-23

基金项目: 兰州市科技计划项目 (2013-4-75, 2014-2-30); 甘肃中医药管理局科研项目 (GZK-2014-13, GZK-2015-19)

作者简介: 张培 (1991—), 女, 硕士在读, 主要从事多糖结构分析及活性研究。E-mail: pzhang3006@163.com

*通信作者 胡芳弟 (1971—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药成分分离分析及中药新药研究。

Tel: 13919780068 E-mail: hufd@lzu.edu.cn

党参多糖 (*Codonopsis pilosula* polysaccharides, CPPs) 具有抗肿瘤活性^[1-6], 而其抗肿瘤活性与许多因素有关, 如单糖组成、相对分子质量、溶解性、黏度及其空间结构。其中, 单糖组成分析是多糖分子特性研究的重要内容^[7]。目前关于党参多糖的提取分离及定量测定的文献报道较多^[8-9], 然而作为多糖的重要特性的单糖种类及其量与其抗肿瘤活性的相关性研究鲜有报道。基于此, 收集来自甘肃省党参主要产区如渭源县、陇西县、文县、宕昌县、临洮县以及山西省陵川县、湖北省恩施县等地的 26 批党参样品, 水提醇沉法提取其水溶性多糖, 苯酚硫酸法测定总多糖, 气相色谱 (GC) 法和间羟基联苯法测定多糖中半乳糖醛酸, 糖脲乙酸酯衍生法分析多糖中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖的量, 三甲基硅醚衍生法测定多糖中果糖的量, MTT 法检测党参多糖对肝癌 HepG2 细胞的细胞毒活性, 采用聚类分析法对 26 批党参多糖进行聚类分析, 以偏最小二乘法 (PLS) 分析不同党参多糖样品中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸及果糖的量与 HepG2 细胞毒活性间的相关性, 探究各单糖组成对 HepG2 细胞毒活性的影响, 可为党参多糖的构效关系研究提供理论支持, 并进一步对其抗肿瘤机制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂

中性单糖对照品葡萄糖 (Glu, 批号 110833-201205)、果糖 (Fru, 批号 111504-200001)、半乳

糖醛酸 (GalA, 批号 111646-200301)、鼠李糖 (Rha, 批号 111683-200401)、阿拉伯糖 (Ara, 批号 111506-200001)、半乳糖 (Gal, 批号 100226-201105)、甘露糖 (Man, 批号 140651-200602)、木糖 (Xyl, 批号 111508-200404)、葡萄糖醛酸 (GluA, 批号 140648-200602) 均购自中国食品药品检定研究院; 三氟乙酸 (郑州阿尔法化工有限公司), 盐酸羟胺 (天津化学试剂厂), 肌醇六乙酯 (上海洽姆仪器科技有限公司), 吡啶、乙酸酐 (北京化工厂); NaBH₄、732 型阳离子交换树脂 (国药集团化学试剂有限公司); Na₂B₄O₇ (天津市化学试剂三厂); DMEM 高糖培养基 [赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司]; 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司)。

分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; Shimadzu GC-2014 气相色谱仪 (Shimadzu, 日本); Agilent 7890 气相色谱仪-5977 质谱检测器 (Agilent, 美国); LabServ CO150 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国); Bio-Rad 680 酶标仪 (Bio-Rad, 日本); 凤凰牌倒置显微镜 (江西凤凰光学控股有限公司)。

1.2 药材来源

26 批党参药材 *Codonopsis Radix* (表 1) 分别采集自甘肃省渭源县、陇西县、文县、宕昌县、漳县、临洮县以及山西省陵川县、湖北省恩施县等地, 均经兰州大学药学院周印锁教授鉴定, 鉴定结果: 甘肃省文县各地党参均为纹党参, 是桔梗科植物素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 的干燥根; 甘肃省漳县、陇西县、

表 1 党参药材信息

Table 1 Information of *Codonopsis Radix*

| 编号 | 采集地 | 采集时间 | 编号 | 采集地 | 采集时间 |
|----|-------------------|------------|----|---------------|------------|
| 1 | 甘肃省渭源县新寨镇冯家村 | 2014-10-05 | 14 | 甘肃省宕昌县官亭镇王山村 | 2014-10-09 |
| 2 | 甘肃省渭源县新寨镇庙嘴村样品 1 | 2014-10-05 | 15 | 甘肃省宕昌县好梯乡彭家山村 | 2014-10-09 |
| 3 | 甘肃省渭源县新寨镇庙嘴村样品 2 | 2014-10-05 | 16 | 甘肃省漳县马泉乡陈家嘴村 | 2014-10-09 |
| 4 | 甘肃省陇西县高棱乡高堡子村 | 2014-10-06 | 17 | 甘肃省临洮县上营乡赵家占村 | 2014-10-27 |
| 5 | 甘肃省陇西县首阳镇李家营 | 2014-10-06 | 18 | 甘肃省临洮县岩乡村 | 2014-10-27 |
| 6 | 甘肃省宕昌县庞家乡许家村 | 2014-10-07 | 19 | 甘肃省渭源县庆坪乡樊家湾 | 2014-10-27 |
| 7 | 甘肃省宕昌县哈达镇上布村 | 2014-10-07 | 20 | 甘肃省渭源县北寨乡阳山村 | 2014-10-28 |
| 8 | 甘肃省文县 | 2014-10-08 | 21 | 甘肃省渭源县莲峰镇旋坡村 | 2014-10-28 |
| 9 | 甘肃省文县中寨镇大海村踏坪 | 2014-10-08 | 22 | 甘肃省渭源县锹峪乡裕丰村 | 2014-10-28 |
| 10 | 甘肃省文县中寨镇大海村偏沟样品 1 | 2014-10-08 | 23 | 甘肃省渭源县清源镇马家窑村 | 2013-10-20 |
| 11 | 甘肃省文县中寨镇大海村偏沟样品 2 | 2014-10-08 | 24 | 山西省陵川县六泉乡西海村 | 2014-11-22 |
| 12 | 甘肃省文县中寨镇哈西沟村 | 2014-10-08 | 25 | 山西省陵川县古效乡存效村 | 2014-11-22 |
| 13 | 甘肃省文县高楼山草坪村 | 2014-10-08 | 26 | 湖北省恩施县 | 2013-10-20 |

宕昌县、临洮县、渭源县党参均为白条党参，是桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根；山西省陵川县党参为潞党参，湖北省恩施县党参为板桥党参，均为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根，样品均为《中国药典》2015 年版收载品种。

2 方法与结果

2.1 党参多糖样品的制备

党参药材清洗烘干后，粉碎，称取党参药材粗粉适量，以 95%乙醇脱脂（回流 2 次，每次 1 h），弃去醇提液，药渣干燥后，分别以 12、10、8 倍量水煎煮，每次 40 min，合并水煎液并浓缩，加入 95%乙醇至终体积分数为 80%，静置过夜，弃去上清液，沉淀冷冻干燥，即得党参多糖，并按公式计算多糖得率，结果见表 2。

多糖得率 = 提取得到的党参多糖质量 / 党参药材质量

2.2 样品中多糖的测定

2.2.1 葡萄糖对照品溶液的配制 精密称取经 105 °C 干燥至恒定质量的无水葡萄糖对照品 1.04 mg，置 10 mL 量瓶中，蒸馏水溶解并定容，摇匀，得 0.104 mg/mL 葡萄糖对照品溶液，4 °C 保存备用。

2.2.2 标准曲线的制备 分别精密移取葡萄糖对照品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中，加蒸馏水补至 2.0 mL。加入 5%苯酚溶液（称取 5.07 g 重蒸苯酚用蒸馏水定容于 100 mL 棕色量瓶中）1 mL，摇匀，迅速加入浓硫酸 5 mL，摇匀，放置 10 min。于 100 °C 水浴中保温 30 min，取出，于冷水中冷却至室温，于 490 nm 处测吸光度 (A) 值。以 A 值为纵坐标 (Y)，葡萄糖对照品质量浓度为横坐标 (X)，绘制得到标准曲线为 $Y = 27.454X - 0.0172$ ($r = 0.9974$)。

2.2.3 样品溶液的制备及测定 分别精密称取干燥粗糖粉末 12.00 mg 加蒸馏水溶解并定容于 25 mL 量瓶中，配制成粗糖溶液。精密移取 0.2 mL 样品溶液，加水补至 2.0 mL。按“2.2.2”项下方法，自“加入 5%苯酚溶液 1 mL”起，进行余下操作，测定 A 值，按照标准曲线计算样品中的多糖质量分数。结果见表 2。由结果可知，26 批党参制得的多糖样品中多糖的质量分数均有不同，其中，26 号党参样品制得多糖的质量分数最低，为 25.12%；11 号党参样品制得多糖的质量分数最高，为 49.84%。

2.3 糖醛酸定量测定

本实验采用 GC 法^[10]及间羟基联苯法 2 种方法

表 2 26 批党参制得的多糖得率与质量分数

Table 2 Yield and content of CPPs from 26 batches of *C. pilosula*

| 编号 | 得率/% | 质量分数/% | 编号 | 得率/% | 质量分数/% |
|----|-------|--------|----|-------|--------|
| 1 | 17.12 | 43.56 | 14 | 11.31 | 44.02 |
| 2 | 16.18 | 45.20 | 15 | 13.36 | 44.46 |
| 3 | 13.92 | 47.60 | 16 | 18.02 | 46.09 |
| 4 | 11.13 | 41.32 | 17 | 19.29 | 42.49 |
| 5 | 10.37 | 45.71 | 18 | 25.82 | 37.16 |
| 6 | 24.67 | 45.97 | 19 | 15.67 | 49.36 |
| 7 | 16.10 | 44.12 | 20 | 11.04 | 33.31 |
| 8 | 15.42 | 46.09 | 21 | 14.09 | 28.53 |
| 9 | 11.90 | 36.36 | 22 | 13.48 | 32.04 |
| 10 | 11.92 | 47.20 | 23 | 23.45 | 39.30 |
| 11 | 10.67 | 49.84 | 24 | 10.53 | 31.54 |
| 12 | 15.87 | 38.70 | 25 | 18.27 | 37.63 |
| 13 | 19.73 | 45.17 | 26 | 16.95 | 25.12 |

对 26 批党参多糖中糖醛酸的量进行测定。

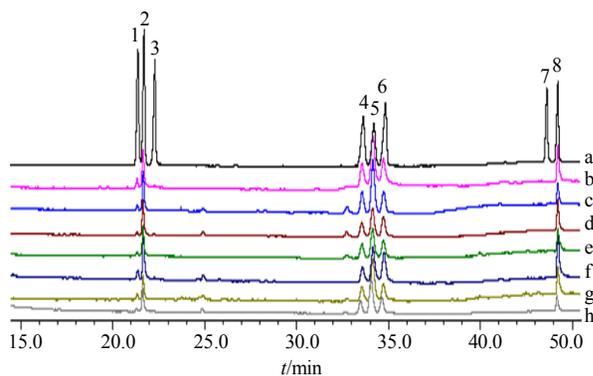
2.3.1 GC 法

(1)GC 条件：色谱柱 OV-101(50 m×0.25 mm)；进样体积 2 μL；程序升温：160 °C 保留 4 min，以 5 °C/min 升到 190 °C 保留 4 min，再以 3 °C/min 升到 210 °C 保留 15 min，以 10 °C/min 升到 260 °C 保留 5 min。

(2)混合单糖对照品溶液的制备：精密称取葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸对照品各 20.00 mg，蒸馏水定容于 10 mL 量瓶中，摇匀，配制成混合单糖对照品溶液，4 °C 保存备用。

(3)标准曲线的制备：依次分别精密移取混合单糖对照品溶液 2.0、1.5、1.0、0.75、0.50、0.20 mL 于 6 个 2 mL 量瓶中，蒸馏水定容，配成 2.0、1.5、1.0、0.75、0.50、0.20 mg/mL 的混合对照品溶液。分别从上述 6 个量瓶中，各精密移取 1 mL，转移至 6 个 10 mL 圆底烧瓶中，分别将其旋干。加入 78 μL 0.5 mol/L 碳酸钠，于 30 °C 保持 45 min 后，加入 4% NaBH₄ 溶液 0.5 mL，室温放置 1.5 h。滴加 25% 乙酸至不产生气泡为止以除去多余的 NaBH₄。溶液通过阳离子交换柱（732 型阳离子交换树脂），以 6 mL 蒸馏水洗脱。蒸干洗脱液（45 °C），加入甲醇 3 mL，重复多次以除去硼酸盐。85 °C 真空加热 2 h 将糖醛酸转变为内酯。残渣溶于 1 mL 吡啶中，加入 1 mL 正丙胺，盖严后 55 °C 加热 30 min。冷却至 45 °C 以下后再加热至 55 °C 氮气吹干。残渣分别加入 0.5 mL 吡啶和 0.5 mL 乙酸酐，95 °C 加热 1

h. 冷却后, 0.45 μm 滤膜滤过, 进行 GC 分析。混合单糖对照品衍生化后的色谱图见图 1, 各单糖均得到较好地分离, 建立半乳糖醛酸质量浓度 (X) 与各单糖衍生物峰面积 (Y) 的回归方程为 $Y=104\ 399 X-6\ 236$ ($r=0.996\ 1$)。



1-鼠李糖 2-阿拉伯糖 3-木糖 4-甘露糖 5-葡萄糖 6-半乳糖 7-葡萄糖醛酸 8-半乳糖醛酸 a-混合单糖对照品衍生物 b~h 分别为 1~7 号党参多糖酸水解后衍生物
1-rhamnose 2-arabinose 3-xylose 4-mannose 5-glucose 6-galactose 7-glucuronic acid 8-galacturonic acid a-stands for gas chromatograms of standard monosaccharides b-h stand for acid hydrolyzed derivatives of No.1—No.7 CPPs

图 1 半乳糖醛酸定量测定 GC 图

Fig. 1 Quantitative determination of galacturonic acid by GC

(4) 样品的制备及测定: 精密称取党参多糖样品 10 mg 于特弗伦管中, 加入 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA) 2 mL, 120 °C 水解 3 h, 冷却后, 减压蒸干, 加入甲醇 1 mL, 蒸干, 重复 3 次, 完全除去 TFA。按“2.3.1(3)”项下方法操作, 自“加入 78 μL 0.5 mol/L 碳酸钠”起, 进行余下操作。结果如图 1 所示, 党参多糖样品中的各单糖均得到较好地分离, 且党参多糖中均含有半乳糖醛酸, 而不含有葡萄糖醛酸。将各样品中的半乳糖醛酸衍生物的峰面积代入回归方程, 计算各党参多糖的半乳糖醛酸的量, 结果见表 3。

2.3.2 间羟基联苯法 由“2.3.1”项下 GC 法测定糖醛酸种类及量的 GC 图可知, 党参多糖只含有半乳糖醛酸, 而不含有葡萄糖醛酸。因此, 选择半乳糖醛酸为对照品, 采用间羟基联苯法对上述 GC 法所测半乳糖醛酸的量进行验证。

(1) 半乳糖醛酸对照品溶液的制备: 称取干燥的半乳糖醛酸对照品 2.50 mg 置 5 mL 量瓶中, 用蒸馏水溶解并定容, 摇匀, 配成 0.50 mg/mL 半乳糖醛酸对照品溶液, 4 °C 保存备用。

(2) 标准曲线的制备: 取 8 支洁净试管, 依次

精密移取 0、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 mL 半乳糖醛酸对照品溶液, 补加蒸馏水至 1.0 mL。加入 5 mL $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ 溶液 (1.19 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 用浓硫酸定容于 250 mL 量瓶), 立即于漩涡混合器上混匀, 煮沸 5 min, 冰水浴冷却。加 100 μL 0.15% 间羟基联苯 (m -HDP) 溶液 (15 mg m -HDP 溶于 10 mL 0.5% NaOH 溶液), 混匀。30 min 后于 520 nm 处测定 A 值。以 A 值为纵坐标 (Y), 半乳糖醛酸对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制得到标准曲线为 $Y=19.473\ 6 X+0.004\ 8$ ($r=0.998\ 4$)。

(3) 样品溶液的制备及测定: 精密称取多糖 5.00 mg, 用蒸馏水定容于 25 mL 量瓶中。精密移取样品溶液 1.0 mL, 按“2.3.2 (2)”项下方法, 自“加入 5 mL $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ 溶液”起, 进行余下操作, 测定 A 值, 并计算样品中半乳糖醛酸的量。结果见表 3。

将“2.3.1”项 GC 法所测半乳糖醛酸的量及“2.3.2”项间羟基联苯法所测半乳糖醛酸的量进行比较, 由结果可知, 2 种方法所测结果差别不大, 从而验证了所测半乳糖醛酸的量的准确性。

2.4 党参多糖的单糖组成分析

糖脲乙酸酯衍生化法因具有衍生物制备简便、试剂易得及每种单糖能得到单一的色谱峰等优点而常被用于单糖的定性及定量分析, 但酮糖 (如果糖) 因缺乏还原端而难以衍生, 不适用于此法^[11-12]。当测定含有酮糖和醛糖的样品时, 可选用糖脲三甲基硅醚衍生化法, 酮糖和醛糖均能得到较好的分离。但此法的缺点是由于各种单糖异构体的存在, 造成色谱峰数目多于组分单糖的数目, 从而导致混合物的定性定量分析复杂化^[13]。基于此, 本实验采用糖脲乙酸酯衍生化法测定党参多糖中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖的量; 同时, 为了检验党参多糖是否含有果糖, 采用糖脲三甲基硅醚衍生化法并利用 GC-MS 对党参多糖中果糖的量进行测定。

2.4.1 单糖组成及定量测定

(1) GC 条件: 色谱柱 OV-101 (50 m × 0.25 mm); 进样体积 2 μL; 程序升温: 以 15 °C/min 从 175 °C 升到 190 °C, 保留 5 min; 再以 5 °C/min 升到 250 °C, 保留 1.5 min。

(2) 混合单糖对照品溶液的制备: 精密称取葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖各 100.00 mg, 用吡啶定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 得到混合单糖对照品溶液。

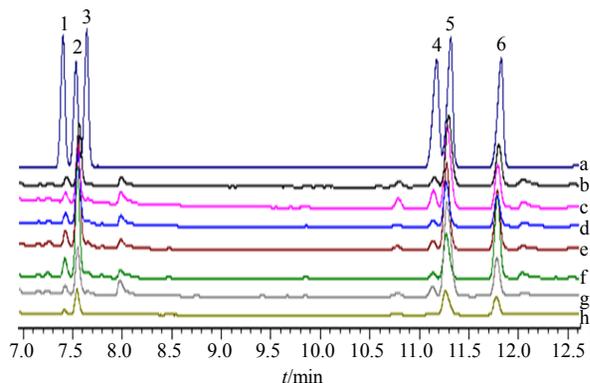
表 3 26 批党参多糖中各单糖质量分数 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Contents of each monosaccharide in 26 batches of CPPs ($\bar{x} \pm s$)

| 编号 | 单糖质量分数/% | | | | | | | | |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|
| | Rha | Ara | Xyl | Man | Glu | Gal | GluA (GC) | GluA (UV) | Fru |
| 1 | 0.58±0.09 | 2.77±0.21 | 0.08±0.01 | 0.53±0.09 | 1.56±0.09 | 1.26±0.05 | 2.38±0.14 | 2.68±0.49 | 3.49±0.11 |
| 2 | 0.69±0.14 | 2.37±0.18 | 0.08±0.01 | 0.99±0.06 | 3.69±0.23 | 2.23±0.17 | 1.54±0.05 | 1.27±0.35 | 4.70±0.25 |
| 3 | 0.74±0.05 | 2.93±0.13 | 0.07±0.00 | 0.58±0.03 | 2.04±0.16 | 1.88±0.12 | 3.41±0.13 | 3.31±0.14 | 3.95±0.22 |
| 4 | 0.88±0.09 | 2.77±0.12 | 0.23±0.01 | 0.68±0.04 | 3.35±0.11 | 2.65±0.21 | 2.97±0.20 | 2.19±0.64 | 1.89±0.15 |
| 5 | 1.06±0.14 | 2.28±0.11 | 0.29±0.01 | 0.59±0.04 | 2.16±0.39 | 4.41±0.29 | 5.73±0.27 | 4.47±0.21 | 2.06±0.17 |
| 6 | 0.64±0.10 | 3.05±0.10 | 0.07±0.00 | 0.69±0.08 | 4.90±0.22 | 1.96±0.08 | 3.02±0.11 | 3.61±0.07 | 3.93±0.26 |
| 7 | 0.87±0.03 | 2.58±0.14 | 0.20±0.02 | 1.13±0.14 | 3.61±0.15 | 2.72±0.17 | 3.53±0.13 | 2.55±0.21 | 2.92±0.10 |
| 8 | 0.86±0.09 | 4.32±0.23 | 0.08±0.00 | 0.60±0.13 | 4.07±0.28 | 3.13±0.14 | 13.18±1.20 | 14.66±0.42 | 5.49±0.23 |
| 9 | 0.94±0.05 | 2.89±0.16 | 0.22±0.02 | 0.69±0.04 | 2.20±0.15 | 1.58±0.08 | 4.96±0.31 | 5.05±0.28 | 3.53±0.13 |
| 10 | 0.98±0.13 | 3.67±0.22 | 0.24±0.01 | 0.71±0.02 | 1.88±0.12 | 1.94±0.10 | 5.08±0.27 | 5.22±0.21 | 4.62±0.26 |
| 11 | 0.72±0.07 | 2.66±0.17 | 0.23±0.01 | 0.60±0.04 | 2.75±0.15 | 1.16±0.04 | 3.01±0.11 | 2.83±0.28 | 3.71±0.12 |
| 12 | 1.08±0.12 | 2.82±0.12 | 0.25±0.01 | 0.89±0.05 | 1.66±0.06 | 2.09±0.12 | 4.37±0.33 | 4.91±0.14 | 4.80±0.29 |
| 13 | 0.70±0.21 | 2.77±0.08 | 0.20±0.01 | 0.44±0.03 | 1.91±0.12 | 1.23±0.08 | 3.87±0.22 | 3.39±0.07 | 2.59±0.11 |
| 14 | 0.69±0.14 | 2.79±0.21 | 0.25±0.01 | 0.53±0.08 | 2.48±0.08 | 1.30±0.09 | 2.69±0.18 | 2.49±0.14 | 3.79±0.25 |
| 15 | 0.68±0.08 | 3.42±0.22 | 0.18±0.00 | 0.67±0.04 | 3.22±0.13 | 1.78±0.15 | 1.87±0.12 | 1.78±0.21 | 4.19±0.22 |
| 16 | 0.86±0.05 | 3.13±0.13 | 0.29±0.01 | 0.81±0.05 | 3.06±0.12 | 1.76±0.08 | 2.28±0.16 | 3.08±0.49 | 3.70±0.19 |
| 17 | 0.63±0.09 | 2.70±0.07 | 0.07±0.01 | 0.56±0.12 | 2.97±0.14 | 1.28±0.11 | 2.16±0.09 | 2.92±0.07 | 3.65±0.27 |
| 18 | 0.61±0.04 | 2.86±0.16 | 0.18±0.01 | 0.57±0.06 | 3.53±0.25 | 1.21±0.05 | 2.91±0.12 | 3.01±0.28 | 5.28±0.23 |
| 19 | 0.55±0.02 | 2.61±0.11 | 0.07±0.00 | 0.48±0.04 | 2.90±0.12 | 0.99±0.04 | 1.88±0.07 | 2.26±0.14 | 2.10±0.08 |
| 20 | 0.81±0.11 | 3.68±0.22 | 0.23±0.02 | 0.59±0.06 | 1.64±0.06 | 2.00±0.17 | 4.50±0.23 | 4.71±0.14 | 3.65±0.23 |
| 21 | 1.07±0.04 | 3.91±0.12 | 0.23±0.02 | 0.48±0.02 | 2.00±0.04 | 2.59±0.15 | 6.29±0.37 | 6.77±0.28 | 1.84±0.06 |
| 22 | 0.65±0.07 | 2.82±0.25 | 0.08±0.00 | 0.51±0.07 | 1.80±0.12 | 1.08±0.03 | 2.67±0.11 | 2.96±0.56 | 0.85±0.03 |
| 23 | 0.41±0.05 | 2.24±0.08 | 0.07±0.01 | 0.31±0.09 | 3.19±0.19 | 0.73±0.02 | 1.19±0.07 | 2.00±0.28 | 1.80±0.12 |
| 24 | 0.74±0.05 | 3.71±0.17 | 0.26±0.01 | 0.65±0.10 | 5.80±0.22 | 2.13±0.11 | 1.70±0.05 | 2.52±0.14 | 1.59±0.09 |
| 25 | 0.78±0.10 | 2.62±0.10 | 0.22±0.01 | 0.64±0.04 | 2.75±0.14 | 2.38±0.10 | 1.69±0.06 | 1.82±0.49 | 1.10±0.07 |
| 26 | 0.86±0.02 | 3.07±0.19 | 0.29±0.02 | 1.04±0.07 | 4.30±0.20 | 2.56±0.17 | 4.52±0.29 | 4.87±0.21 | 3.77±0.23 |

(3) 标准曲线的制备: 分别精密移取混合单糖对照品溶液 0.4、0.3、0.2、0.15、0.1、0.04 mL 于 6 个 2 mL 量瓶中, 分别加入 1.0 mL 内标肌醇六乙酰酯的吡啶溶液 (精密称取内标肌醇六乙酰酯 36.00 mg, 用吡啶定容于 5 mL 量瓶中), 用吡啶定容, 配成 2.0、1.5、1.0、0.75、0.50、0.20 mg/mL 的混合单糖对照品溶液。将上述对照品溶液分别精密移取 1 mL 转移至 6 个 10 mL 圆底烧瓶中, 分别加入 10 mg 盐酸羟胺后, 封口, 于 90 °C 反应 30 min, 冷却至室温。加入 0.5 mL 乙酸酐, 90 °C 反应 30 min, 减压蒸干, 溶于 1 mL 氯仿中, 即得混合单糖对照品的糖脎乙酸酯衍生物, 0.45 μm 滤膜滤过, 进行 GC 分

析, 结果如图 2 所示。每种单糖的糖脎乙酸酯衍生物在 GC 分析时都为单峰。以各标准单糖质量浓度与内标质量浓度比值为横坐标 (X), 单糖衍生物峰面积/内标衍生物峰面积的比值为纵坐标 (Y), 做回归方程, 各单糖糖脎乙酸酯衍生物的回归方程如表 4 所示。

(4) 样品的制备及测定: 分别称取党参多糖 10 mg 于特弗伦管中, 加入 2 mol/L TFA 2 mL, 120 °C 水解 3 h。冷却后, 减压蒸干。加入甲醇 1 mL, 蒸干, 重复 3 次, 完全除去 TFA。再加入 10 mg 盐酸羟胺, 加入 0.5 mL 内标肌醇六乙酰酯的吡啶溶液, 封口。按“2.4.1”项下方法操作, 自“于 90 °C 反应 30 min”起, 进行余下操作, 得到样品的糖脎乙



1-鼠李糖 2-阿拉伯糖 3-木糖 4-甘露糖 5-葡萄糖 6-半乳糖
 a-混合对照品的糖脎乙酸酯衍生物 b~h 分别为 1~7 号党参多糖样品酸水解后的糖脎乙酸酯衍生物
 1-rhamnose 2-arabinose 3-xylose 4-mannose 5-glucose 6-galactose
 a-stands for gas chromatograms of aldonitrile acetate precolumn-derivatization of monosaccharides b-h stand for aldonitrile acetate precolumn-derivatives after acid hydrolyzation of No.1—No.7 CPPs

图 2 糖脎乙酸酯衍生物 GC 图

Fig. 2 GC of aldonitrile acetate precolumn-derivative

表 4 6 种单糖糖脎乙酸酯衍生物的回归方程

Table 4 Regression equation of aldonitrile acetate precolumnderivatives of six monosaccharides

| 单糖种类 | 标准曲线 | r |
|------|--------------------|--------|
| 鼠李糖 | $Y=1.7746X-0.0215$ | 0.9992 |
| 阿拉伯糖 | $Y=1.9704X-0.0996$ | 0.9946 |
| 木糖 | $Y=1.6573X-0.0035$ | 0.9995 |
| 甘露糖 | $Y=1.8983X-0.0172$ | 0.9997 |
| 葡萄糖 | $Y=1.5961X+0.0136$ | 0.9974 |
| 半乳糖 | $Y=1.6260X-0.0121$ | 0.9996 |

酸酯衍生物, 0.45 μm 滤膜滤过, 进行 GC 分析, 结果如图 2 所示。根据保留时间, 可确定各党参多糖主要由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和少量鼠李糖、甘露糖及痕量木糖组成; 将各单糖衍生物的峰面积/内标衍生物的峰面积的比值代入各回归方程, 则可知各单糖的质量分数, 如表 3 所示, 党参多糖各单糖的量均有所不同。

2.4.2 果糖定量测定

(1) 色谱条件: 色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱 (60 m×0.32 mm); 进样体积 1 μL; 进样口、传输线和离子源温度均为 250 °C, 柱温箱采用程序升温, 起始温度 140 °C, 2 °C/min 升温至 198 °C, 保温 4 min; 4 °C/min 升温至 214 °C, 1 °C/min 升温至 217 °C, 保温 4 min; 5 °C/min 升温至 250 °C, 保温 18 min, 载气体积流量 1 mL/min, 质谱扫描范围

m/z 40~650。

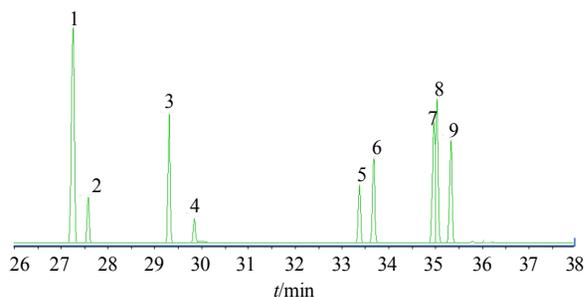
(2) 混合单糖对照品溶液的制备: 精密称取单糖对照品 (葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、果糖) 各 20.00 mg, 蒸馏水定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 配制成混合单糖对照品溶液, 4 °C 保存备用。

(3) 标准曲线的制备: 依次分别精密移取混合单糖对照品溶液 2.0、1.2、1.0、0.8、0.4、0.2 mL 于 6 个 5 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 摇匀。依次从上述 6 个量瓶精密移取 2.5 mL 溶液转移至 10 mL 圆底烧瓶中, 加热混悬均匀, 60 °C 减压蒸干。加入 0.5 mL 2.5% 盐酸羟胺的吡啶溶液, 封口后, 于 70 °C 烘箱中加热反应 30 min, 然后加入 0.9 mL 六甲基二硅胺烷和 0.1 mL 三氟乙酸, 于 100 °C 烘箱中加热反应 60 min, 即得标准单糖的三甲基硅醚衍生物, 进行 GC-MS 分析, 结果如图 3 所示。各单糖均得到较好的分离, 建立果糖质量浓度 (X) 与果糖衍生物峰面积 (Y) 的回归方程, 线性方程为 $Y=3 \times 10^6 X + 312585$ ($r=0.9993$)。

(4) 样品的制备及测定: 称取样品 10.00 mg 于特弗伦管中, 加 5 mL 2 mol/L TFA 溶液, 120 °C 水解 2 h, 水解液转入 10 mL 圆底烧瓶中减压蒸干, 残余物按“2.4.2 (3)”项下方法操作, 自“加入 0.5 mL 2.5% 盐酸羟胺的吡啶溶液”起, 制备水解后样品的三甲基硅醚衍生物。将生成物转入 25 mL 量瓶, 用氯仿定容, 并取 1 mL 稀释至 10 mL, 进行 GC-MS 分析, 混合单糖对照品的 GC-MS 图见图 3, 4 号党参多糖水解后衍生物 GC 图见图 4。将各样品中的果糖衍生物峰面积代入方程, 计算各党参多糖中果糖的量, 如表 3 所示。

2.5 党参多糖对肝癌 HepG2 的细胞毒活性研究

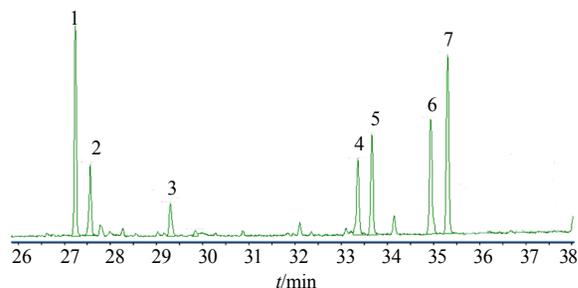
取对数生长期的肝癌 HepG2 细胞 (由兰州大学医学院提供) 接种于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL (约含 5×10^3 个细胞)。细胞贴壁后, 加入 100 μL 各批用培养基配制的党参多糖 (按照“2.1”项方法制备) 溶液 (经 0.22 μm 滤膜滤过), 使其终质量浓度为 200 μg/mL^[3,14], 阳性药组给予相同体积的甲氨蝶呤 (MTX) 溶液, 并使其终质量浓度为 8 μg/mL^[3], 另设调零孔 (只加 200 μL 培养基)、对照孔 (只加 100 μL 细胞悬液和 100 μL 培养基), 每组均设 4 个平行孔。37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 于 CO₂ 培养箱中继续培养 4 h 后, 沿着培养液上部小心吸取上清液后, 每孔加入 150



1-木糖/阿拉伯糖 2-阿拉伯糖 3、4-鼠李糖 5、6-果糖 7-半乳糖
8-甘露糖 9-葡萄糖
1-xylose/arabinose 2-arabinose 3, 4-rhamnose 5, 6-fructose
7-galactose 8-mannose 9-glucose

图 3 混合单糖对照品的三甲基硅醚衍生物 GC 图

Fig. 3 GC of trimethylsilylated oxime of mixed mono saccharide reference substances



1-木糖/阿拉伯糖 2-阿拉伯糖 3-鼠李糖 4、5-果糖 6-半乳糖
7-葡萄糖
1-xylose/arabinose 2-arabinose 3-rhamnose 4, 5-fructose
6-galactose 7-glucose

图 4 党参多糖酸水解后的三甲基硅醚衍生物 GC 图

Fig. 4 GC of trimethylsilylated oxime after acid hydrolyzation of CPPs

μL DMSO, 小心振荡 10 min, 利用酶标仪于 570 nm 处测 A 值, 并计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}})$$

结果如图 5 所示, 在相同的给药浓度下, 各党参多糖的细胞毒活性均有所不同。其中, 细胞毒活性最强者为 8 号党参多糖样品, 其抑制率为 36.36%, 稍低于甲氨蝶呤阳性药组 (抑制率为 47.01%); 细胞毒活性最低者为 25 号党参多糖样品, 其抑制率为 11.40%。

2.6 聚类分析

利用 SPSS 16.0 软件, 以党参多糖的单糖质量分数为指标, 对 26 批不同党参进行聚类分析, 结果如图 6 所示。本实验中, 1~7 号及 14~23 号为白条党参, 应分成一类; 8~13 号为素花党参, 应分成一类; 24~25 号为潞党参, 应分成一类; 26 号为板桥党参, 应分成一类。结合聚类分析结果可知, 党参多糖的单糖种类及质量分数不能作为党参分类的指标。

2.7 党参多糖的单糖组成与其对 HepG2 细胞毒活性的相关分析

由表 3 及图 5 可知, 党参多糖主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸及果糖组成, 但不同产地的党参多糖, 其单糖的量及对 HepG2 细胞毒活性均有所不同。为明确单糖种类及量与 HepG2 细胞毒活性间是否有关联, 利用 Simca-p 11.5 软件采用 PLS 分析法对党参多糖的单糖种类及量与其对 HepG2 细胞毒活性进行相关性分析, 探讨两者的关系。

以党参多糖的单糖组成为独立变量 (X), 以党参多糖对 HepG2 肿瘤细胞的抑制率作为因变量

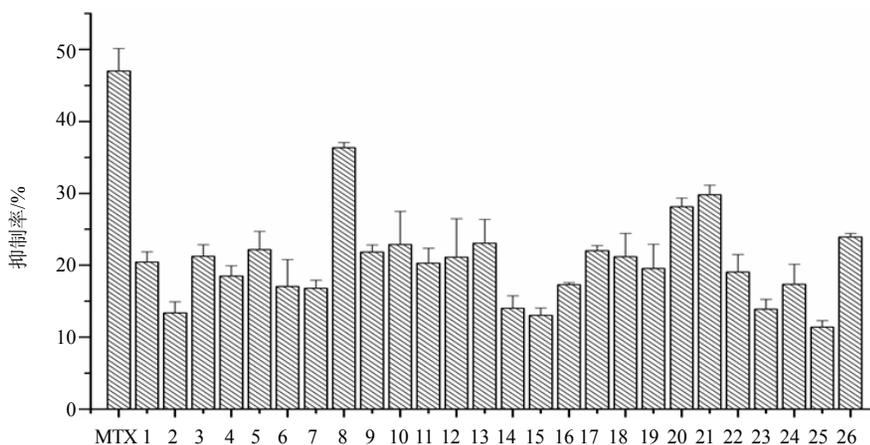


图 5 26 批党参多糖细胞毒活性

Fig. 5 Cytotoxic activities of 26 batches of CPPs

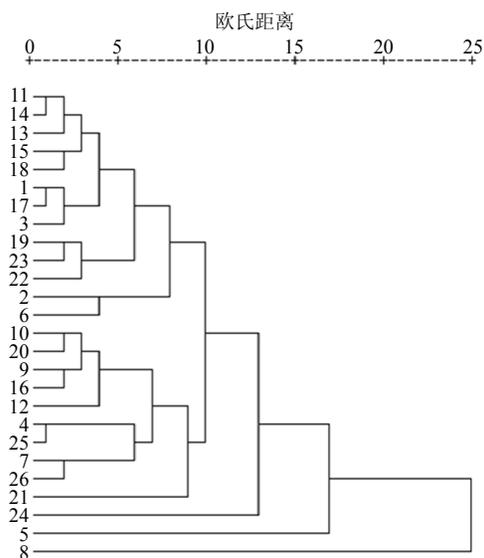


图 6 26 批党参聚类分析结果

Fig. 6 Cluster analysis of 26 batches of *C. pilosula*

(*Y*), 采用 PLS 进行相关分析, 得到各单糖的回归系数。其中系数绝对值反映单糖种类及量对 HepG2 细胞毒活性贡献的大小, 回归系数绝对值越大, 说明相关性越大; 回归系数的符号反映单糖与 HepG2 细胞毒活性相关性 (正相关或负相关)。拟合出党参多糖的单糖种类及量与 HepG2 细胞毒活性之间的回归方程为 $Y=0.124 X_{Rha}+0.325 X_{Ara}-0.098 X_{Xyl}-0.192 X_{Man}-0.140 X_{Glu}+0.050 X_{Gal}+0.482 X_{GalA}+0.120 X_{Fru}$ 。由此方程可知, 各单糖对 HepG2 细胞毒活性的贡献大小为半乳糖醛酸>阿拉伯糖>甘露糖>葡萄糖>鼠李糖>果糖>木糖>半乳糖。其中, 半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖与多糖样品对 HepG2 细胞毒活性呈正相关, 木糖、甘露糖及葡萄糖与 HepG2 细胞毒活性呈负相关。

3 讨论

Yang 等^[3]通过党参多糖的分离纯化获得了均一性的党参果胶多糖, 而果胶多糖是一种杂多糖^[15], 按照其结构分类, 果胶多糖主要包含 3 大类: 半乳糖醛酸聚糖 (HG)、鼠李半乳糖醛酸聚糖-I (RG-I) 及鼠李半乳糖醛酸聚糖-II (RG-II)^[16]。Zhang 等^[17]报道果胶多糖的抗肿瘤活性与 Gal 及 RG-1 的量有关, 其量越多, 多糖抗肿瘤活性越强; Gao 等^[18]发现人参果胶多糖的抗肿瘤活性并非只与 GalA 的量有关, Gal 及 Ara 也可抑制肿瘤细胞的增殖。Fan 等^[19]证实人参果胶多糖抑制肿瘤细胞的生长与 GalA 的量 HG 及 RG-I 的量呈正相关。

26 批党参多糖的单糖种类基本相同, 但量差异很大, 各多糖对 HepG2 细胞的细胞毒活性差异较大。分析测定的 8 种单糖中, 半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖与 HepG2 细胞毒活性呈正相关, 而甘露糖、木糖和葡萄糖与 HepG2 细胞毒活性呈负相关, 而 GalA 对多糖的细胞毒活性贡献最大, 此结果与上述文献所报道的结果相一致。8~13 号党参多糖样品 (主产区为文县) 与其他样品相比半乳糖醛酸的量相对较高, 细胞毒活性也相对较强。值得一提的是, 尽管 26 批不同产地的党参多糖的单糖量差异较大, 但并不能据此实现甘肃 2 种主要的党参品种——白条党参和素花党参的分类鉴别。

参考文献

- [1] Xu C, Liu Y, Yuan G X, *et al.* The contribution of side chains to antitumor activity of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(4): 891-894.
- [2] 杨 瑾, 刘杰书, 袁德培. 板桥党参多糖体内抗肿瘤活性实验研究 [J]. *中国处方药*, 2014, 12(3): 25-26.
- [3] Yang C X, Gou Y Q, Chen J Y, *et al.* Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula* [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(1): 886-895.
- [4] Xin T, Zhang F B, Jiang Q Y, *et al.* The inhibitory effect of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* on tumor growth and metastasis *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51(5): 788-793.
- [5] 冯浩丽, 高建平. 党参多糖体内抗肿瘤活性研究及急性毒性实验 [J]. *山西中医*, 2012, 28(8): 49-50.
- [6] 杨丰榕, 李卓敏, 高建平. 党参多糖分离鉴定及体外抗肿瘤活性的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(12): 2876-2878.
- [7] 倪力军, 王媛媛, 何婉瑛, 等. 8 种多糖的单糖组成、活性及其相关性分析 [J]. *天津大学学报: 自然科学与工程技术版*, 2014, 47(4): 326-330.
- [8] He J Y, Ma N, Zhu S, *et al.* The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): A review of phytochemistry, bioactivity and quality control [J]. *J Nat Med*, 2015, 69(1): 1-21.
- [9] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 80(3): 949-953.
- [10] Jacob L. Simultaneous gas-liquid chromatographic

- determination of aldoses and alduronic acids [J]. *J Chromatogr A*, 1987, 408(1): 245-253.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [12] 付海宁, 赵 峡, 于广利, 等. 盐藻多糖单糖组成分析的四色色谱方法比较 [J]. 中国海洋药物杂志, 2008, 27(4): 30-34.
- [13] 宋叶涵, 李冬梅, 杨静峰, 等. 三种色谱法分析鲍鱼生殖腺多糖的单糖组成 [J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 44-47.
- [14] Chen W X, Gou Y Q, Li W, *et al.* Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in A549 cell by a pectin polysaccharide isolated from *Codonopsis pilosula* and its selenized derivative [J]. *J Carbohydr Chem*, 2015, 34(8): 475-489.
- [15] 孙元琳, 汤 坚. 果胶类多糖的研究进展 [J]. 食品与机械, 2004, 20(6): 60-63.
- [16] 蔡为荣, 孙元琳, 汤 坚. 果胶多糖结构与降血脂研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31(5): 307-311.
- [17] Zhang W B, Xu P, Zhang H. Pectin in cancer therapy: A review [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2015, 44(2): 258-271.
- [18] Gao X G, Zhi Y, Sun L, *et al.* The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(47): 33953-33965.
- [19] Fan Y Y, Cheng H R, Li S S, *et al.* Relationship of the inhibition of cell migration with the structure of ginseng pectic polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 81(2): 340-347.