

桑白皮水提取多糖组分的分离纯化和结构特征

张晓曼 廖文锋 丛启飞 董群* 丁侃*

(中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

摘要 桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 是临床上常用的中药. 采用沸水提取获得桑白皮中的多糖, 用乙醇沉淀、阴离子交换柱层析、凝胶过滤层析等方法进行分离和纯化, 从水提粗多糖中得到均一多糖 CMA-a-1, CMA-a-5 和 CMA-b1-1. 应用糖组成分析、甲基化分析及 IR, NMR 等光谱学方法研究桑白皮多糖的结构及性质. 结果表明, CMA-a-1, CMA-a-5 均为淀粉类多糖, 前者结构类似于支链淀粉, 但 O-6 位上取代的支链中含有 1,6-连接葡萄糖, 平均链长为 23; 而后者更接近于直链淀粉, 平均链长为 30. CMA-b1-1 为以 1,2-连接的鼠李糖及 1,4-连接的半乳糖醛酸为主链的 RG-I 型果胶类多糖, 具有多种形式的由阿拉伯糖、半乳糖、木糖等构成的支链. CMA-b1-1 对 SMMC7721 肝癌细胞生长具有抑制作用, 对 L02 正常肝细胞生长则没有抑制作用. 本研究表明桑白皮水提多糖中主要是淀粉类和果胶类多糖.

关键词 桑白皮; 桑; 多糖; 化学结构; 抗肿瘤

Isolation and Structural Characterization of the Polysaccharides of Cortex Mori radices

Zhang, Xiaoman Liao, Wenfeng Cong, Qifei Dong, Qun* Ding, Kan*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

Abstract Cortex mori radices, the dried root cortex of *Morus alba* L., is a clinically widely used traditional Chinese medicine, with the effects of anti-tussive, preventing asthma, hypoglycemic, antitumor, antibacterial and antioxidative. Up to now, its polysaccharides and their contribution to biological activities remain largely unknown. In this study, the root cortex was extracted with boiling water, followed by ethanol precipitation, fractionation and purification by anion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column and gel permeation chromatography on Sephacryl S-300 column. Three polysaccharides, CMA-a-1, CMA-a-5 and CMA-b1-1, were isolated from boiling-water extract, and characterized to be homogeneous fractions by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). Their structural features were elucidated by sugar analyses, methylation analyses, IR, and NMR spectroscopic methods. Both CMA-a-1 and CMA-a-5 are found to be starch fractions. CMA-a-1, with an average molecular weight (MW) of 224 kDa, is an amylopectin-like polysaccharide with an average chain length (CL) of 23, containing 1,4-linked α -D-glucopyranosyl backbone, with 1, 6-linked glucose in the side chains attached to O-6 of backbone residues. CMA-a-5, with a MW of 15.5 kDa, is mainly an amylose fraction with an average chain length of 30. CMA-b1-1 was isolated from 0.2 mol·L⁻¹ NaCl-eluted fraction upon anion-exchange chromatography, and characterized as a RG-I type pectic polysaccharide, which contains a backbone composed of alternating 1,4-linked α -D-galacturonic acid and 1,2-linked α -L-rhamnose residues, with various branches attached to O-4 of rhamnose residues, comprising of T-, 1,3-, 1,5-, 1,3,5-linked Ara_f, T-, 1,6-, 1,3,6-linked Gal_p, 1, 4-linked Xyl_p, and 1, 4-linked Glc_p. MTT method showed that CMA-b1-1 could inhibit the proliferation of SMMC7721 liver cancer cells and showed no impairment to L02 normal liver cells. This study suggested that the boiling water extract of cortex mori radices contains mainly starch and pectic fraction as the major component polysaccharides, and that the RG-I polysaccharide *in vitro* can inhibit the liver cancer cell proliferation, but the starch fractions cannot.

Keywords cortex mori radices; *Morus alba* L.; polysaccharide; chemical structure; antitumor

1 前言

桑白皮(Cortex mori radices)为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 性寒味甘, 归肺经, 始载于《神农本草

经》, 是临床上常用的止咳平喘中药. 桑白皮以泻肺热、平喘为专长, 还能利尿消肿, 通调水道, 用于水肿实证、小便不利、面目浮肿或胀满喘急等症. 研究表明桑白皮提取物具有降压、降糖、利尿、镇咳平喘、抗病毒

* E-mail: qdong@mail.shcnc.ac.cn, kding@mail.shcnc.ac.cn

Received January 21, 2013; published March 15, 2013.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870551) and the Key New Drug Creation and Manufacturing Program (No. 2012ZX09301001-003).

项目受国家自然科学基金(No. 30870551)及新药创制重大专项(No. 2012ZX09301001-003)资助.

等作用,并从中分离得到黄酮类、木质素类、苯并呋喃类、生物碱类等活性成分^[1].有研究报道桑白皮中的多糖具有促进免疫细胞增殖的活性,但未进行结构鉴定^[2].目前,对桑白皮的研究主要集中于其中所含活性黄酮类化合物,而对桑白皮多糖的研究罕有涉及.多糖是许多中草药中的重要成分,在传统热水煎服用途径中,水煎液中必然含有大量的多糖类组分,这些多糖与药材的药理作用之间的关系仍不清楚.近年来的研究表明中草药中的多糖成分具有多方面的药理活性,而这些活性是与其中多糖的类型及结构密切相关的.中草药中的多糖组分因植物的种属、来源、采收时间、炮制方式、入药部位的不同会有显著的变化,如具有储存营养作用的块根块茎中通常含有较高含量的淀粉、而在花和叶中则含有较多的果胶类多糖.桑白皮属于根皮组织,其多糖类型和结构均未见相关的报道,故我们对桑白皮进行了沸水和稀碱提取,并对水提多糖进一步分离纯化,获得了结构不同的水提取均一多糖,并研究了这些多糖的化学结构特征和生物活性.

2 结果与讨论

2.1 分离与纯化

从 3 kg 桑白皮中通过沸水提取和 1 mol/L 氢氧化钠低温提取两种方法进行提取,分别得到了水提粗多糖 CMA 和碱提桑白皮粗多糖 CMB,得率分别为 9.4%和 0.7%,说明大多数多糖可被沸水提取,而碱溶性多糖的含量较低,故而下面主要对水提多糖进行深入研究.水提粗多糖先经 DEAE-纤维素柱进行阴离子交换层析,主要得到两个组分,即水洗脱的 CMA-a 和 0.2 mol/L NaCl 洗脱的 CMA-b1.用 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析进一步分离纯化,并以高效凝胶过滤法(HPGPC)检测各组分的均一度.从 CMA-a 得到均一多糖 CMA-a-1 和 CMA-a-5;从 CMA-b1 中分离得到均一多糖 CMA-b1-1.

2.2 理化性质及化学成分分析

对从桑白皮中所得到的水提粗多糖以及经分离纯化得到的各多糖组分进行糖组成分析,结果见表 1.粗多糖 CMA 含有复杂的糖基构成,但经阴离子交换层析分离后,水洗组分 CMA-a 与 0.2 mol/L NaCl 洗脱组分 CMA-b1 的糖基组成有明显的不同,表明它们为不同结构类型的多糖.经凝胶过滤层析得到的组分,如 CMA-b1-1 和 CMA-b1-2,彼此具有类似的糖基组成,表明它们应属于同一种结构类型,故而下面仅对 CMA-b1-1 的结构进一步分析.

2.3 CMA-a-1 的结构分析

HPGPC 分析表明 CMA-a-1 为均一多糖(辅助材料,图 S1A),根据以标准葡聚糖制备的标准曲线,测得其分子量为 224 kDa,比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +143$ (c 0.5, 0.5 mol/L NaOH)(因在水中难溶,故而以氢氧化钠溶液为

表 1 桑白皮水提多糖的产率及糖基组成

Table 1 Yields and glycosyl composition of the polysaccharides isolated from water-extract of cortex mori radices

Fraction	Yield/%	Glycosyl composition/%					
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
CMA	9.4 ^a	4.5	10.2	43.7	5.1	7.8	28.6
CMA-a	26.4 ^b	0.8	3.2	0.5	3.4	1.6	90.5
CMA-b1	18.0 ^b	13.6	29.4	7.0	5.8	23.7	23.1
CMA-a-1	0.93 ^c	—	—	—	—	—	100
CMA-a-5	4.0 ^c	—	—	—	—	—	100
CMA-b1-1	24.7 ^c	11.2	50.5	10.3	—	23.0	5.0
CMA-b1-2	22.4 ^c	11.5	42.7	10.6	—	28.8	6.4

^a Yields in relative to crude drug material; ^b Yields in relative to CMA; ^c Yields in relative to CMA-a, CMA-b1.

溶剂测定).该多糖对蛋白质特异的 Lowry 反应呈阴性,表明其不含肽或蛋白质.对 CMA-a-1 进行糖组成分析,经完全水解后,取少量水解产物进行 TLC 分析,结果表明 CMA-a-1 中不含有糖醛酸;气相色谱显示 CMA-a-1 中只含有葡萄糖.红外光谱(图 1)显示了典型的多糖类吸收特征,在 3386.4, 2929.3, 1371.1, 1020.2 cm^{-1} 的强吸收峰分别来自于羟基 O—H, C—H, 环外 C—O 及糖环内 C—O 的伸缩振动;在 1730 cm^{-1} 左右无糖醛酸吸收峰,与上述 TLC 分析不含糖醛酸的结果一致.在 858 cm^{-1} 处有一较弱的吸收峰,表明该多糖中的葡萄糖应为 α -异头构型^[3].CMA-a-1 对碘-碘化钾反应呈深紫色,即表明 CMA-a-1 的结构可能类似于支链淀粉^[4].

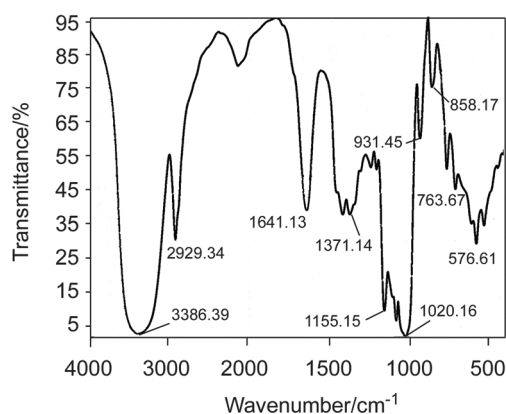


图 1 CMA-a-1 红外光谱

Figure 1 IR Spectrum of CMA-a-1

对 CMA-a-1 进行甲基化反应,经过四次甲基化反应后,经 IR 检测,位于 3400 cm^{-1} 处的 O—H 伸缩振动峰基本消失,说明多糖的甲基化基本完全.甲基化多糖经水解、还原、乙酰化,得到部分甲基化的糖醇乙酸酯,用 GC-MS 分析.结果表明葡萄糖残基存在四种连接方式(表 2),即非还原末端(T-),1,4-连接、1,6-连接和 1,4,6-连接,其物质的量之比约为 4.0 : 73.0 : 18.4 : 4.6,非还原末端糖基的含量与分支点糖残基含量基本一致,表明

甲基化反应是完全的. 根据上述结果, 可以初步推测多糖 CMA-a-1 的主链是由 1,4-连接的葡萄糖构成, 在 6 位有分支. 根据甲基化分析结果计算平均链长(CL)为 23. 1,6-连接葡萄糖的位置根据甲基化分析无法确定, 但 CMA-a-1 碘反应结果呈紫色, 故而推测其主链应由 1,4-连接的 α -D-葡萄糖构成, 有一定程度的分支, 1,6-连接的葡萄糖应位于支链中, 与主链上分支点葡萄糖残基的 O-6 相连, 因为如 1,6-连接的葡萄糖位于主链上, 由于 1,6-糖苷键的构象自由度大, 会影响主链与碘形成有色复合物的能力, 如含有 1,4-和 1,6-连接的 α -D-葡聚糖 pullulan 即与碘不发生颜色反应.

表 2 CMA-a-1 和 CMA-a-5 甲基化分析 GC-MS 结果

Table 2 GC-MS data for methylation analysis of CMA-a-1 and CMA-a-5

Methylated sugars	Linkage	Molar ratio/%		Mass fragment m/z
		CMA-a-1	CMA-a-5	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	T-Glcp	4.0	3.3	45, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,4-Glcp	73.0	93.5	85, 99, 101, 113, 117, 131, 161, 173, 233
2,3,4-Me ₃ -Glc	1,6-Glcp	18.4	—	71, 87, 100, 131, 161, 191
2,3-Me ₂ -Glc	1,4,6-Glcp	4.6	3.2	85, 101, 117, 127, 142, 159, 187, 201, 261

CMA-a-1 在重水中溶解度较低, 故而以氘代二甲亚砜(DMSO- d_6)为溶剂测定 NMR. 其 ^1H NMR 谱(辅助材料, 图 S2)中, 异头氢区域中 δ 5.43 和 5.53 分别是 1,4-连接和 1,6-连接的葡萄糖残基的异头氢信号, 其化学位移表明葡萄糖均为 α -异头构型. ^{13}C NMR 谱(图 2)中, 异头碳区域有两个信号 δ 100.42 和 98.54, 分别为 1,6-连接和 1,4-连接的 α -D-葡萄糖残基的 C-1 信号. δ 79.10 是 1,4-连接、1,4,6-连接葡萄糖残基的 C-4 信号, 在 DEPT 谱中 δ 66.33 的信号为倒峰, 表明它为 6 位发生取代的葡萄糖残基的 C-6 位信号, δ 61.18/60.85 为 C-6 位未取代的葡萄糖残基(末端及 1,4-连接的葡萄糖)的 C-6 信号, 参考相关文献其他信号归属如表 3 所示^[5-8].

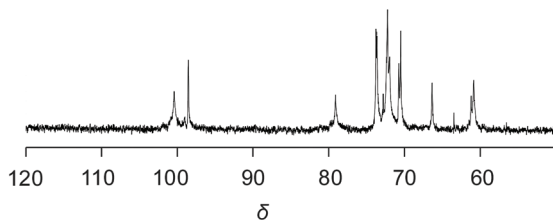


图 2 CMA-a-1 ^{13}C NMR 图谱

Figure 2 ^{13}C NMR spectrum of CMA-a-1

表 3 CMA-a-1 ^{13}C NMR 信号的归属

Table 3 ^{13}C NMR spectral assignment of CMA-a-1

Residue	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
T- α -D-Glc	100.42	72.22	73.76	70.74	71.96	61.18
1,4- α -D-Glc	100.42	72.22	73.62	79.10	71.96	60.85
1,4,6- α -D-Glc	98.54	72.22	73.62	79.10	71.96	66.34
1,6- α -D-Glc	98.54	72.22	73.75	70.48	72.80	66.34

结合糖组成分析的结果和甲基化的结果, 推测 CMA-a-1 的结构如图 3 所示.

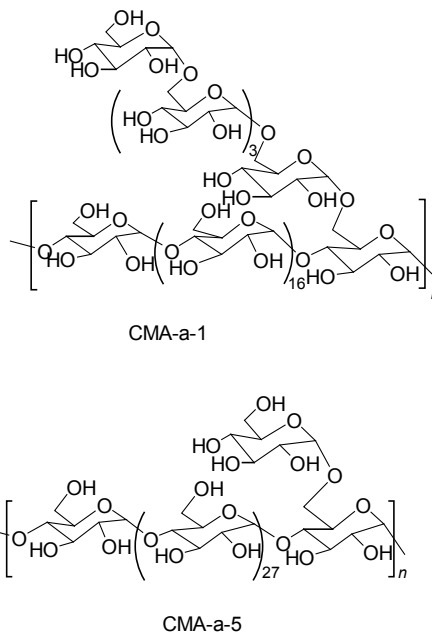


图 3 多糖 CMA-a-1 和 CMA-a-5 的化学结构

Figure 3 Proposed structures for CMA-a-1 and CMA-a-5

2.4 CMA-a-5 的结构分析

HPGPC 分析表明 CMA-a-5 为均一多糖(辅助材料, 图 S1B), 其分子量为 15.5 kDa, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +118.4$ (c 0.5, 0.5 mol/L NaOH), CMA-a-5 的分子量小于 CMA-a-1, 这与其在凝胶层析中的较大的洗脱体积一致. 紫外光谱显示 CMA-a-5 在 280 nm 处无明显吸收, 且对蛋白质特异的 Lowry 反应呈阴性, 表明该多糖不含肽或蛋白质. 对 CMA-a-5 进行糖组成分析, 水解物进行 TLC 分析, 无对应于糖醛酸的红色斑点, 说明 CMA-a-5 中不含糖醛酸. 其余水解产物制备成糖醇乙酸酯, 进行气相色谱分析, 结果显示其中仅含有葡萄糖.

CMA-a-5 的红外光谱显示了典型的多糖类吸收特征(图 4), 在 3403.7, 2929.3, 1371.1, 1022.1 cm^{-1} 处的强吸收峰分别来自于羟基 O—H, C—H, 环外 C—O 及糖环内 C—O 的伸缩振动. IR 谱中在 858 cm^{-1} 处有一较弱的吸收峰, 表明该多糖中的葡萄糖应具有 α -异头构型^[3]. CMA-a-5 对碘反应呈深蓝色, 表明 CMA-a-5 可能为直链淀粉类多糖^[9].

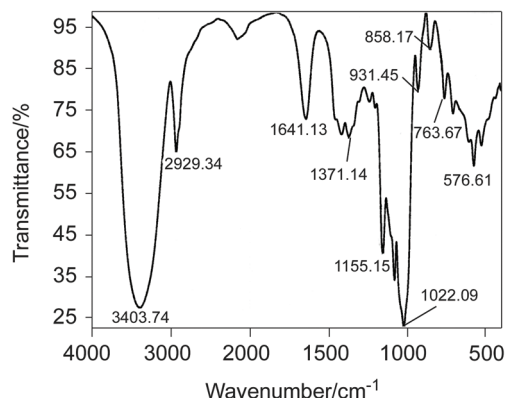


图4 CMA-a-5 的红外光谱
Figure 4 IR spectrum of CMA-a-5

对 CMA-a-5 进行甲基化分析, 结果表明其中的葡萄糖残基存在三种连接方式(表 3), 即末端连接、1,4-连接和 1,4,6-连接, 其物质的量之比约为 3.3 : 93.5 : 3.2. 根据上述数据, 结合碘反应的结果, 可以初步推断多糖 CMA-a-5 的主链由 1,4-连接的葡萄糖构成, 少量 T-及 1,4,6-连接的葡萄糖的存在表明该多糖存在少量的支链, 支链由单个葡萄糖基构成, 通过 1,6-糖苷键取代于主链分支点葡萄糖基的 6 位, 平均链长为 30.

因 CMA-a-5 在水中难溶, 故而将其溶于 DMSO-*d*₆ 中进行 NMR 分析, 其 ¹H NMR 谱(辅助材料, 图 S3)中, 异头氢区域中位于 δ 5.55, 5.44 的两个主要信号是葡萄糖残基的异头氢信号, 说明葡萄糖呈 α 构型. ¹³C NMR 谱(图 5)中, 两个异头碳信号位于 δ 101.16, 100.45, 分别可归属于 1,4,6-和 1,4-连接 α -D-葡萄糖残基的 C-1, 而位于 δ 79.72, 79.12 的两个信号则表明 C-4 位发生了取代, 故而分别归属于 1,4,6-和 1,4-连接葡萄糖的 C-4. 参考相关文献^[5-8], 对其他主要信号峰进行归属, δ 72.29, 73.62 和 71.95 分别为葡萄糖残基的 C-2, C-3, C-5 信号, δ 70.29 的信号来自于非还原末端未被取代的 C-4, δ 61.22, 60.85 分别为非还原末端和 1,4-连接葡萄糖残基的 C-6 位信号.

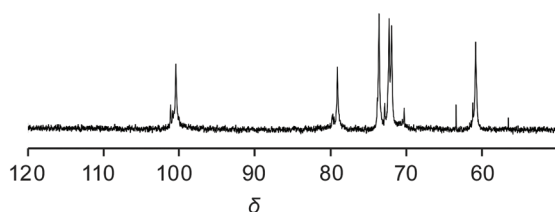


图5 CMA-a-5 的 ¹³C NMR 图谱
Figure 5 ¹³C NMR spectrum of CMA-a-5

综合以上结构, CMA-a-5 为一种(1→4)- α -D-葡聚糖, 含有少量分支, 平均每 30 个主链残基上有一个分支, 其结构可能如图 3 所示. 其较低的分支度使其能够形成较长的螺旋构象, 故而能与碘形成蓝色复合物.

2.5 CMA-b1-1 的结构分析

HPGPC 分析表明 CMA-b1-1 为均一多糖(辅助材料, 图 S1C), 测得其分子量为 53.5 kDa, 比旋光度 $[\alpha]_D = -8.2$ (*c* 0.5, H₂O). CMA-b1-1 对 Lowry 反应呈阴性, 表明该多糖不含肽或蛋白质. 红外光谱(图 6)表明 CMA-b1-1 显示典型的多糖类吸收特征, 在 3426.9, 2931.3, 1419.4, 1024.0 cm⁻¹ 处的强吸收峰分别来自于羟基 O—H, C—H, 环外 C—O 及糖环内 C—O 的伸缩振动; 在 1735.6 cm⁻¹ 左右有较强的羰基吸收峰, 提示 CMA-b1-1 可能含有糖醛酸. 经间苯基苯酚比色法检测, 糖醛酸含量为 13.6%, 证实了上述结果. CMA-b1 是 DEAE-纤维素柱层析时 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱得到的组分, 这提示其中会带有可与二乙基氨乙基-(DEAE-)相互作用的酸性基团, 如糖醛酸中的羧基.

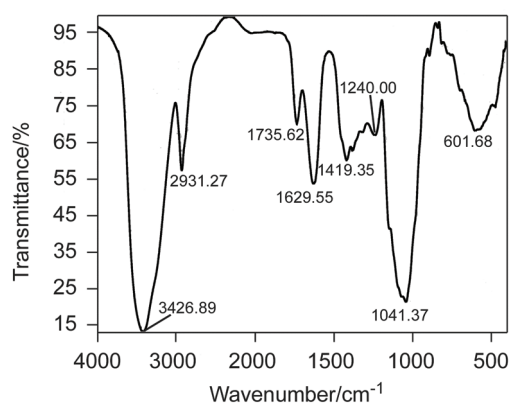


图6 CMA-b1-1 的红外光谱
Figure 6 IR spectrum of CMA-b1-1

对 CMA-b1-1 进行糖组成分析, 完全水解后进行 TLC 分析, 结果表明 CMA-b1-1 中含有糖醛酸, 与 IR 光谱的结果一致. 其余水解产物制备成糖醇乙酸酯, 进行气相色谱分析, 结果显示 CMA-b1-1 由阿拉伯糖、木糖、半乳糖和葡萄糖组成, $n(\text{Rha}) : n(\text{Ara}) : n(\text{Xyl}) : n(\text{Gal}) : n(\text{Glc}) = 12.0 : 54.0 : 11.0 : 24.6 : 5.4$. 用 Conrad 法还原 CMA-b1-1 中糖醛酸的羧基, 还原三次后的产物为 CMA-b1-1R, 红外光谱分析和比色法测定表明糖醛酸基本还原完全. 对 CMA-b1-1R 进行糖组成分析, 其中含有 Rha, Ara, Xyl, Gal 和 Glc, 物质的量之比依次为 8.6 : 31.3 : 11.0 : 41.5 : 7.6. 对比还原前后 CMA-b1-1 的糖组成, 还原后半乳糖的含量有了明显的上升, 说明 CMA-b1-1 中的糖醛酸主要为半乳糖醛酸, 阿拉伯糖含量则较之还原前有所降低, 这可能是由于它作为呋喃型戊糖更易水解的缘故. 综合糖醛酸还原前后的糖组成分析结果, CMA-b1-1 实际的糖基组成应为: $n(\text{Rha}) : n(\text{Ara}) : n(\text{Xyl}) : n(\text{Gal}) : n(\text{GalA}) : n(\text{Glc}) = 8.6 : 31.3 : 11.0 : 24.6 : 16.9 : 7.4$.

CMA-b1-1R 进行甲基化分析, 糖残基的连接方式详见表 4. 阿拉伯糖以非还原末端, 1,3-, 1,5-和 1,3,5-连接的形式存在, 其含量较之糖基组成分析的结果有所减

少,可能是它作为戊糖在反复甲基化反应中易被水解除去所致;半乳糖也存在多种连接方式(非还原末端, 1,4-, 1,6-, 1,4,6-, 1,3,6-连接),半乳糖醛酸以 1,4-连接形式存在;木糖、葡萄糖均为 1,4-连接;鼠李糖为 1,2,4-连接,表明其位于分支点上.糖基组成和上述各糖基的连接形式提示该多糖具有高分支的 RG-I 型果胶多糖的特点,即以 1,4-连接的 α -D-GalpA 和 1,2-连接的 α -L-Rha 构成主链,在鼠李糖的 4 位有分支点,分支具有多种类型,包括阿拉伯聚糖和阿拉伯半乳聚糖等^[10].

CMA-b1-1 的 ^1H NMR 谱(辅助材料,图 S4)中,异头氢区域中出现多个异头信号,参考文献数据^[10],其中 δ 5.23~5.08 的强信号应归属于含量最高的不同连接 α -L-阿拉伯呋喃糖的 H-1, δ 5.04 归属于 α -D-半乳糖醛酸,而 δ 4.63 的宽峰来自于不同连接的 β -D-半乳糖残基的信号($J_{\text{H1,H2}}=8$ Hz), δ 4.53 处弱信号可能是 β -D-木糖残基的信号峰, δ 3.3~4.3 附近的信号重叠严重,无法进行明确归属.其 ^{13}C NMR 谱(图 7)中,异头碳区域有多个信号,参考文献数据^[11,12],其中 δ 110~108, 104~105, 102.88 和 100.23 分别为 α -L-阿拉伯呋喃糖、 β -D-半乳糖、 β -D-木糖和 α -D-半乳糖醛酸残基的 C-1 信号, δ 99.21 和 98.94 的信号分别来自 α -D-葡萄糖和 α -L-鼠李糖的 C-1. δ 174.37 为半乳糖醛酸的 C-6 信号, δ 17.99/17.75 为鼠李糖的 C-6 信号,出现两个信号是由于取代的支链不同造成的.在 δ 85.27 和 77.79 的较强信号分别来自于被取代的阿拉伯糖 C-3 和半乳糖醛酸 C-4,而 DEPT 谱中在 δ 68.10, 67.59 的两个倒峰可分别归属于发生取代的阿拉伯糖 C-5 及半乳糖 C-6.

综合糖组成分析、NMR 和甲基化分析的结果,可以初步推测 CMA-b1-1 为果胶类多糖中的 I 型鼠李半乳糖醛酸聚糖(RG-I),该类多糖的特点在于,主链由 1,2-连接 α -L-Rhap 和 1,4-连接 α -D-GalpA 组成,其中鼠李糖的 4 位上取代有各种支链,而支链中的部分阿拉伯糖和半

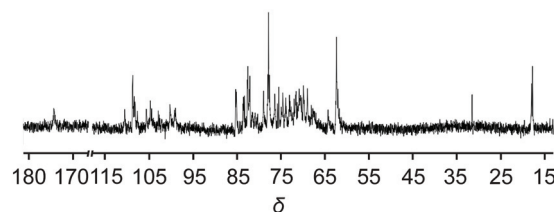


图 7 CMA-b1-1 的 ^{13}C NMR 图谱

Figure 7 ^{13}C NMR spectrum of CMA-b1-1

乳糖发生进一步的分支.CMA-b1-1 在糖基组成、连接形式和糖基的异头构型等方面均符合 RG-I 多糖的特点.甲基化分析表明 CMA-b1-1 的支链组成复杂,由 T-, 1,3-, 1,5-, 1,3,5-连接 Araf, T-, 1,6-, 1,3,6-连接 Galp, 1,4-连接 Xylp, 1,4-连接 Glcp 组成,其详细的结构有待进一步研究.

CMA-b1-1 在 0.5, 1.0 mg/ml 浓度下,对肝癌 SMMC7721 细胞增殖显示一定的抑制作用,抑制率为 29.2%和 32.6%,对 LO2 正常肝细胞没有抑制作用,表明它对肿瘤细胞有选择性抑制作用.CMA-a-1 和 CMA-a-5 则对正常肝细胞和肝癌细胞均没有活性.

3 结论

采用 DEAE-纤维素柱阴离子交换层析分离和 Saphecryl S-300 凝胶柱层析分离纯化手段,从桑白皮水提粗多糖中分离得到 3 种均一多糖 CMA-a-1, CMA-a-5 和 CMA-b1-1,对它们进行了较深入的结构解析.CMA-a-1 是以 1,4-连接的葡萄糖为主链的葡聚糖,其中部分糖基的 O-6 位被 1,6-连接葡萄糖构成的支链取代;CMA-a-5 是以 1,4-连接的葡萄糖为主链的葡聚糖,少部分主链糖基 O-6 位被单个葡萄糖取代.CMA-a-1 的平均链长为 23,而 CMA-a-5 的平均链长为 30,这可以

表 4 CMA-b1-1R 甲基化分析 GC-MS 结果

Table 4 GC-MS data for methylation analysis of CMA-b1-1R

Methylated sugar	RT/min	Linkage	Molar ratio/%	Mass fragment m/z
2,3,5-Me ₃ -Araf	17.69	T-Araf	7.7	71, 87, 101, 117, 129, 145, 161
2,5-Me ₂ -Araf	21.94	1,3-Araf	5.9	58, 85, 87, 99, 117, 129, 159, 201, 233
2,3-Me ₂ -Xyl	23.41	1,4-Xylp	10.5	87, 89, 101, 117, 129, 161, 189
2,3-Me ₂ -Ara	23.70	1,5-Araf	7.8	87, 101, 117, 129, 161, 189
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	26.85	T-Galp	7.1	45, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
2-Me-Ara	27.74	1,3,5-Araf	4.1	58, 87, 99, 117, 127, 159, 201, 261
3-Me-Rhap	28.59	1,2,4-Rhap	9.1	87, 101, 117, 129, 143, 159, 203
2,3,6-Me ₃ -Glc	31.49	1,4-Glcp	13.7	87, 99, 101, 113, 117, 129, 161, 173, 233
2,3,6-Me ₃ -Gal	31.98	1,4-GalpA	20.8	85, 87, 101, 113, 129, 142, 173, 233
2,3,4-Me ₃ -Gal	35.7	1,6-Galp	6.2	87, 99, 101, 117, 129, 161, 173, 189, 233
2,3-Me ₂ -Gal	40.53	1,4,6-Galp	3.1	87, 99, 101, 117, 127, 149, 201, 261
2,4-Me ₂ -Gal	43.53	1,3,6-Galp	4.1	87, 101, 117, 129, 159, 173, 189, 201, 233

解释它们对碘反应不同的结果,因为平均链长短的 CMA-a-1 更接近于支链淀粉,所以与碘反应呈现紫色. CMA-b1-1 是以 1,2-连接的 α -L-鼠李糖和 1,4-连接的 α -D-半乳糖醛酸为主链的 RG-I 型果胶类多糖,分支程度高、结构复杂,支链由 T-, 1,3-, 1,5-, 1,3,5-连接 Araf, T-, 1,6-, 1,3,6-连接 Galp 1,4-连接 Xylp, 1,4-连接 Glcp 组成,分支点在鼠李糖的 O-4 位及部分半乳糖的 O-6 位上. 这一结果表明桑白皮水提多糖主要为不同分支度的淀粉类多糖和高分支 RG-I 型果胶类多糖. 体外抗肿瘤实验表明, CMA-b1-1 对肝癌细胞具有抑制作用,对正常细胞的损害较低.

4 实验部分

4.1 材料、试剂与仪器

桑白皮药材于 2010 年购于上海青浦中药饮片有限公司,为干燥的中药饮片,原植物产于江苏省. 试剂与仪器见支持信息.

4.2 实验方法

4.2.1 多糖的分离与纯化

粗多糖的提取: 3.0 kg 桑白皮药材用 95%工业乙醇室温下浸泡以除去脂溶性小分子. 残渣置于通风处晾干,然后用 30 L 水 100 °C 提取,每次 5 h,用苯酚-硫酸法检测提取液中的糖含量,至糖反应不明显为止. 提取液经过滤后合并,加热浓缩至小体积,对流动水透析,透析内液离心除去不溶物,上清液中加入三倍体积 95%工业乙醇,离心得沉淀,经无水乙醇和丙酮洗涤后真空干燥,得水提粗多糖 CMA (188 g, 得率 9.4%).

阴离子交换层析: 水提粗多糖 CMA (64 g)分多次上样 DEAE-纤维素阴离子交换柱(50 cm $\times$ 5 cm),依次以去离子水、0.2, 0.4 和 0.8 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,苯酚-硫酸法检测,分别收集洗脱液,得到水洗和 0.2 mol/L NaCl 洗脱两个组分(0.4 mol/L 和 0.8 mol/L 洗脱部分糖反应不明显,未收集). 洗脱液对去离子水透析,透析内液减压浓缩并冷冻干燥,水洗和 0.2 mol/L NaCl 洗脱所得产物分别命名为 CMA-a (16.9 g)及 CMA-b1 (11.5 g).

凝胶过滤层析: CMA-a (6.3 g)分多次用 EZ-中压凝胶分离系统在 Sephacryl S-300 柱上进行分离纯化,以 0.2 mol/L NaCl 溶液作为平衡和洗脱液,用示差法和苯酚-硫酸法检测糖含量,分部收集,分别经浓缩、透析、冻干后,得到 CMA-a-1 (58 mg), CMA-a-2 (2.14 g)和 CMA-a-3 (629 mg), CMA-a-4 (150 mg), CMA-a-5 (255 mg)和 CMA-a-6 (45 mg).

CMA-b1 (2.0 g)同上用 Sephacryl S-300 柱(2.6 cm $\times$ 90 cm)进行分离纯化,用苯酚-硫酸法检测糖含量,得到 CMA-b1-1 (494 mg), CMA-b1-2 (449 mg)和 CMA-b1-3 (560 mg).

4.2.2 多糖纯度鉴定及分子量测定

多糖纯度及分子量用高效凝胶过滤法(HPGPC)进行测定^[13]. 先用分子量已知的标准 pullulan 糖(分子量分别为 805, 393, 210, 113, 48.8, 21.7, 11.3, 6.0, 0.667, 0.18 kDa)制作标准曲线,然后根据样品的洗脱时间与标准曲线对照,计算得到多糖的分子量. 多糖分别用流动相配制成 1%的溶液, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液,每次进样 20 μ L, 以分子量的对数值对保留时间作标准曲线,标准曲线的绘制、处理及分子量计算由 GPC 软件自动完成.

4.2.3 多糖结构分析

多糖化学成分含量的测定: 总糖和糖醛酸含量分别用苯酚-硫酸法和间苯基苯酚法测定,以葡萄糖和葡萄糖醛酸作为标准^[14,15], 蛋白质含量以牛血清白蛋白为标准用 Lowry 法测定^[16].

糖组成分析^[17]: 取 2 mg 多糖样品,加入 4 mL 2 mol/L TFA 溶液,封管后于 110 °C 下进行酸水解反应 2 h. 溶液于减压蒸发至干,加甲醇蒸干,除去剩余的 TFA. 水解样品溶解于水中,加入 25 mg NaBH₄, 室温下反应 4 h,然后用 25%乙酸调 pH 至 4~5,加甲醇反复减压蒸干. 加 2 mL 乙酸酐,密闭后,100 °C 下反应 1 h,加甲苯反复减压蒸发,直至完全干燥. 用 8 mL 氯仿萃取,用等体积去离子水洗涤 4 次,氯仿层用无水硫酸钠干燥,然后浓缩至小体积后进行 GC 分析.

糖残基连接方式分析: 取多糖样品 6 mg,按 Needs 改进的 Ciucanu 法进行甲基化^[18]. 减压蒸发除去过量的碘甲烷后,溶液对去离子水透析,内液减压浓缩至小体积,冷冻干燥. 根据 IR 光谱确定甲基化是否完全. 完全甲基化的多糖样品先以 90%甲酸 100 °C 解聚 6 h,减压蒸干;再溶于 2 mol/L TFA 溶液中,在 100 °C 反应 4 h,减压蒸干,反复加甲醇减压蒸发除去 TFA. 水解物按糖组成分析的方法进行还原、乙酰化,得到部分甲基化的糖醇乙酸酯衍生物,进行 GC-MS 分析.

糖醛酸的还原: 多糖中糖醛酸的还原用 Conrad 法进行^[19]: 多糖样品 20 mg 溶于 20 mL 去离子水,加入 CMC 200 mg,磁力搅拌下滴加 0.01 mol/L HCl 使 pH 保持为 4.75,维持 3 h. 滴加 2 mol/L 硼氢化钠溶液(20 mL),用 4 mol/L HCl 溶液来调节 pH 为 7.0,持续搅拌. 硼氢化钠溶液加完后,在室温下继续反应 2 h,对去离子水透析(2 L $\times$ 3),内液减压浓缩至 10 mL,冷冻干燥.

IR 及 NMR: 取 1~2 mg 多糖样品,用 KBr 压片进行常规 IR 分析;对甲基化多糖样品,则采用石蜡油制膜后进行 IR 光谱测定(Nujol 法). 取多糖样品 30 mg 溶于 0.5 mL D₂O 中,冷冻干燥后再溶于 0.5 mL D₂O 中(进行重氢交换),加至核磁管(Φ =3 mm),于室温下在核磁共振仪上进行 ¹H NMR, ¹³C NMR, HSQC 和 HMBC 等光谱的测定. 加少量丙酮(1 μ L)作为碳谱化学位移测定的内标(甲基碳原子位移 δ 31.5). 氢谱以 HOD 峰作为定标的

标准(δ 4.75).

References

- [1] Zheng, Z. G.; Wang, R. S.; Tang, D.; He, B.; Gu, F.; Duan, T.; Zhu, Q. *Nat. Prod. Res. Dev.* **2011**, *23*, 399. (郑兆广, 王汝上, 汤丹, 何宝, 顾斐, 段婷婷, 朱荃, 天然产物研究与开发, **2011**, *23*, 399.)
- [2] Kim, H. M.; Han, S. B.; Lee, K. H.; Lee, C. W.; Kim, C. Y.; Lee, E. J.; Huh, H. *Pharm. Res.* **2000**, *23*, 240.
- [3] Jiang, T. In *Biochemical Techniques in Carbohydrate Complexes*, Ed.: Zhang, W. J., Zhejiang University Press, Hangzhou, **1999**, p. 196. (蒋挺大, 糖复合物生化研究技术, 张惟杰主编, 浙江大学出版社, **1999**, p. 196.)
- [4] Gomand, S. V.; Verwimp, T.; Goesart, H.; Delcour, J. A. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2727.
- [5] Ishurd, O.; Zgheel, F.; Elghazoun, M. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 848.
- [6] Huang, Z. P.; Zhang, L. N. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1136.
- [7] Cui, H. X.; Liu, Q.; Tao, Y. Z.; Zhang, H.; Zhang, L.; Ding, K.. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 771.
- [8] Matheson, N. K.; Caldwell, R. A. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *40*, 191.
- [9] Mukerjee, R.; Robyt, J. F. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 449.
- [10] Dong, Q.; Liu, X.; Yao, J.; Dong, X. T.; Ma, C.; Xu, Y. X.; Fang, J.; Ding, K. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1430.
- [11] Habibi, Y.; Heyraud, A.; Mahrouz, M.; Vignon, M. R. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1119.
- [12] Inngjerdingen, K. T.; Kiyohara, H.; Matsumoto, T.; Peterson, D.; Michaelsen, T. E.; Diallo, D.; Inngjerdingen, M.; Yamada, H.; Paulsen, B. S. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1046.
- [13] Wei, Y. A.; Fang, J. N. *Acta Pharm. Sin.* **1989**, *24*, 532. (魏远安, 方积年, 药学报, **1989**, *24*, 532.)
- [14] Dubios, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350.
- [15] Blumencrantz, N.; Asboe, H. G. *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 484.
- [16] Bensadon, A.; Weinstein, D. *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 241.
- [17] Albersheim, P.; Nevins, D.; English, P. D. *Carbohydr. Res.* **1967**, *5*, 340.
- [18] Needs, P. W.; Selvendran, R. R. *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 1.
- [19] Taylor, R. L.; Conrad, H. E. *Biochemistry* **1972**, *11*, 1283.

(Zhao, C.)