

张 涛,杨婉玲,曹 喻,等. 党参多糖的分离纯化及抗衰老作用研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):235-237.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.059

# 党参多糖的分离纯化及抗衰老作用研究

张 涛<sup>1,2</sup>, 杨婉玲<sup>2</sup>, 曹 喻<sup>1</sup>, 董泽令<sup>1</sup>, 闵 迅<sup>1,2</sup>

(1. 遵义医学院检验医学院, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医学院附属医院检验科, 贵州遵义 563003)

**摘要:**先采用二乙氨基乙基-纤维素(diethylaminoethyl cellulose, 简称 DEAE-纤维素)柱对党参多糖进行分离纯化;然后,分别采用高效离子色谱和高效排阻色谱分析分级产物的单糖组成和分子量;最后,采用 DPPH 自由基、超氧负离子的清除能力试验以及 D-半乳糖(D-Gal)诱导的小鼠衰老模型试验分析党参多糖的抗衰老活性。结果发现,党参多糖经 DEAE-纤维素柱分级后得到 CPNP-1 和 CPNP-2 2 个级分,均主要由鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖构成,分子量分别约为 51、23 ku。体外抗氧化和体内抗衰老活性研究结果表明,CPNP-2 具有较强清除 DPPH 自由基和超氧负离子的活性,半最大效应浓度 EC<sub>50</sub> 分别为 1.5、0.9 mg/mL,并且能够有效缓解衰老模型小鼠血清的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性下降情况。结果表明,本试验建立的分级方法适用于党参多糖中抗衰老活性成分的分离纯化,促进党参多糖类抗衰老药品的开发利用。

**关键词:**党参;多糖;分离纯化;抗衰老

**中图分类号:** R284

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2018)23-0235-03

多糖也称聚糖,是由多种单糖如葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸等,通过脱水连接在一起的生物大分子<sup>[1]</sup>。研究表明,多糖是中草药的有效成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种生物活性<sup>[2]</sup>,是构成植物细胞壁的主要成分,一般采取热水煮提法获得多糖,试验操作方便,对于多糖分子的结构破坏性较小,产率较高。

党参(*Codonopsis pilosula* Nannf.)是我国传统的中药材,且药食两用,具有抗氧化、补气补血、抗肿瘤、免疫调节等活性<sup>[3]</sup>。研究表明,党参的活性成分包括多糖、甾醇类等活性分子<sup>[4]</sup>。对党参主要成分多糖的研究自 20 世纪 80 年代就已开展,发现党参多糖具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等活性<sup>[5]</sup>,如经党参多糖处理后衰老模型小鼠的血清中丙二醛和脑中褐质含量下降明显,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性上升明显,推测党参多糖抗衰老与其清除自由基及脂质过氧化相关<sup>[6]</sup>。但是目前关于党参抗氧化活性方面的研究不全面,党参多糖中的主要抗氧化活性成分不完全明确,阻碍了党参多糖的结构及药理活性研究。本试验通过提取、分离纯化及体内外抗衰老活性试验,对党参多糖进行了较为系统的研究,能够促进党参多糖类抗衰老药品的开发利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

党参购于贵州仙龙药业有限公司;牛血清白蛋白级分 V 购于罗氏公司;间羟基联苯、氨基磺酸、1,1-二苯基-2-三

硝基苯肼(DPPH)购于 Sigma 公司;三氟乙酸购于国药集团;D-半乳糖(D-Gal)、乙醇、苯酚、浓硫酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、乙酸钠、氯化钠和维生素 C 等购于北京化工厂;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和过氧化氢酶(CAT)试剂盒购于上海索宝生物公司。昆明系小鼠购于第三军医大学。

### 1.2 仪器与设备

可见分光光度计(723 型)购于上海光谱仪器有限公司;电子天平(ME104)购于梅特勒-托利多公司;冷冻干燥器购于北京博医康实验仪器有限公司;电热恒温水浴锅购于北京泰泽瑞达科技有限公司;兰格蠕动泵(BT01-100)购于保定兰格恒流泵有限公司;自动部分收集器(BS-100A)购于上海沪西分析仪器厂有限公司。

### 1.3 党参多糖的制备

称取 500 g 党参,洗净后,先后分别于 100 ℃ 8 L 及 100 ℃ 6 L 蒸馏水中连续煮提 2 次,每次煮提 4 h。将提取液浓缩至约 700 mL,离心后收集上清并加入 4 倍体积的 95% 乙醇进行沉淀,离心收集多糖沉淀,利用 Sevag 法除蛋白后冻干,即得党参多糖(*Codonopsis pilosula* Nannf. polysaccharide, 简称 CPNP)。

### 1.4 党参多糖的分离纯化

称取 20 g 的党参多糖溶于 200 mL 蒸馏水中,上样于 DEAE-纤维素离子交换柱(8.0 cm × 20 cm, Cl<sup>-</sup> 型)。依次用蒸馏水(2 L)、0.1 mol/L NaCl(2 L)和 0.3 mol/L NaCl(2 L)进行洗脱,流速 12 mL/min,每 200 mL 洗脱液收集 1 次。采用苯酚-硫酸法检测洗脱液中的糖含量。根据糖含量的分布图,收集适当的洗脱液,经蒸馏水透析除盐后,冻干备用。

### 1.5 多糖的单糖组成分析

称取多糖约 2 mg 于水解小瓶中,加入 1.0 mL 2 mol/L 的三氟乙酸溶液(TFA),于 120 ℃ 水解 5 h;将水解产物转移至蒸发皿中,加入适量的无水乙醇,蒸干,除掉三氟乙酸;用超纯水复溶蒸干的水解产物,经 0.22 μm 滤膜过滤后,待离子色

收稿日期:2017-08-21

基金项目:遵义医学院 2016 年博士基金[编号:院字 2016(07 号)]。

作者简介:张 涛(1985—),男,贵州遵义人,博士,副教授,主要从事生物大分子结构与功能的研究。E-mail:zhangt760@hotmail.com。

通信作者:闵 迅,博士,教授,主要从事致病微生物的基础研究。

E-mail:minxun001@hotmail.com。

谱分析;采用 Thermo ICS-5000<sup>+</sup> 配备脉冲安培检测器,离子柱为 Carbo PAC PA20(3.0 mm × 150 mm)。根据 Liang 等建立的淋洗条件进行检测,流速 0.4 mL/min,柱温 28 ℃<sup>[7]</sup>。

### 1.6 党参多糖的分子量分布分析

称取多糖约 2 mg,溶于 0.2 mol/L NaCl 溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,待高效凝胶渗透色谱(high performance gel permeation chromatography,简称 HPGPC)分析。标准品聚糖系列,平均分子量分别为 12、50、150、270、410、670 ku。以上述标准聚糖的常用对数为纵坐标,相应的保留时间为横坐标作图,绘制标准曲线。根据标准曲线及多糖的保留时间计算出多糖的分子量。采用岛津 LC-20AT 系列高效液相色谱仪配备示差折光检测器,分子筛柱为 TSK-gel G4000PW<sub>XL</sub>(7.8 mm × 300 mm),流动相为 0.2 mol/L NaCl 水溶液,流速为 0.5 mL/min。

### 1.7 体外抗衰老试验

1.7.1 对 DPPH 的清除能力 将党参多糖的子级分溶于蒸馏水中,配成不同浓度的溶液(0~4.0 mg/mL)。取不同浓度的多糖溶液 4 mL 分别与 1 mL DPPH 溶液(0.1 mol/L)混合,避光孵育 20 min。空白对照为蒸馏水,阳性对照为维生素 C。DPPH 清除率 =  $(1 - D_{\text{多糖}}/D_{\text{蒸馏水}}) \times 100\%$ ,其中  $D_{\text{多糖}}$  和  $D_{\text{蒸馏水}}$  为溶液在 517 nm 处的吸光度<sup>[8]</sup>。

1.7.2 对超氧负离子( $O_2^{\cdot-}$ )的清除能力 将党参多糖的子级分溶于蒸馏水中,配成不同浓度的溶液(0~4.0 mg/mL)。取不同浓度的多糖溶液 1 mL,分别加入 1 mL 氯化硝基四氮唑(300 μmol/L)、1 mL 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(936 μmol/L)、1 mL 吩嗪硫酸二甲酯(120 μmol/L)混合,室温孵育 5 min。 $O_2^{\cdot-}$ 清除率 =  $(1 - D_{\text{多糖}}/D_{\text{蒸馏水}}) \times 100\%$ ,其中  $D_{\text{多糖}}$  和  $D_{\text{蒸馏水}}$  为溶液在 560 nm 处的吸光度<sup>[9]</sup>。

### 1.8 衰老模型小鼠试验

选择体质量 20~25 g 雄性小鼠 30 只,随机分为蒸馏水空白组、衰老模型对照组、党参多糖组,每组 10 只。3 组于皮下注射 D-半乳糖(生理盐水配成 5%)构建衰老模型小鼠<sup>[10]</sup>,连续 40 d。党参多糖灌胃剂量为 400 mg/kg,另 2 组灌胃同体积蒸馏水。连续灌胃 30 d,末次灌胃 2 h 后,小鼠眼眶取血,测定血 SOD 和 CAT 的活性,结果计算按试剂盒说明进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 党参多糖的分离纯化

利用 DEAE-纤维素柱对党参多糖进行分离纯化,分别用 0、0.1、0.3 mol/L 的 NaCl 溶液对党参多糖进行梯度洗脱,结果发现得到党参多糖子级分多糖-1(*Codonopsis pilosua* Nannf. sub-polysaccharide-1,简称 CPNP-1)和党参多糖子级分多糖-2(*Codonopsis pilosua* Nannf. sub-polysaccharide-2,简称 CPNP-2)2 个级分的产率分别为 30.6% 和 19.8%,二者均富含糖醛酸(图 1)。

### 2.2 党参多糖级分 CPNP-1 和 CPNP-2 的单糖组成

采用高效离子色谱法检测党参多糖各级分的单糖组成,结果发现,党参多糖的子级分 CPNP-1 主要含有 19.8% 半乳糖醛酸(galacturonic acid,简称 GalA)、23.9% 半乳糖(galactose,简称 Gal)、22.1% 阿拉伯糖(arabinos,简称 Ara)和 26.7 葡萄糖(glucose,简称 Glc),还含有 4.6% 鼠李糖

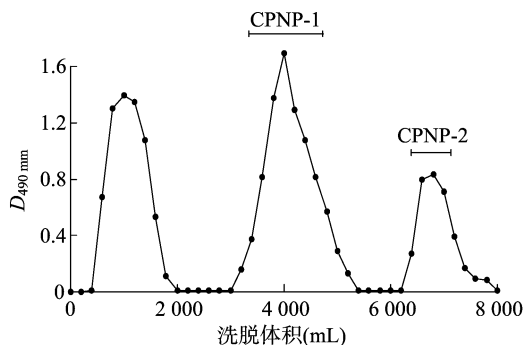


图1 党参多糖在 DEAE-纤维素柱上的洗脱分布曲线

(rhamnose,简称 Rha)和 2.9% 葡萄糖醛酸(glucuronic acid,简称 GlcA)。CPNP-2 主要含有 GalA(32.2%)、Rha(17.9%)、Gal(17.2%)和 Ara(28.3%),以及少量的 Glc(2.1%)和 GlcA(2.3%);二者 Rha/GalA 的比例分别为 0.23 和 0.56,均在 I 型-鼠李半乳糖醛酸聚糖(rhamngalacturonan I,简称 RG-I)型果胶的定义范围之内(0.05~1.0)<sup>[11]</sup>(图 2)。推测 CPNP-1 和 CPNP-2 都属于 RG-I 型果胶,并且可能带有 I/II 型-阿拉伯半乳糖(arabinogalactan I/II,简称 I/II-AG)侧链。

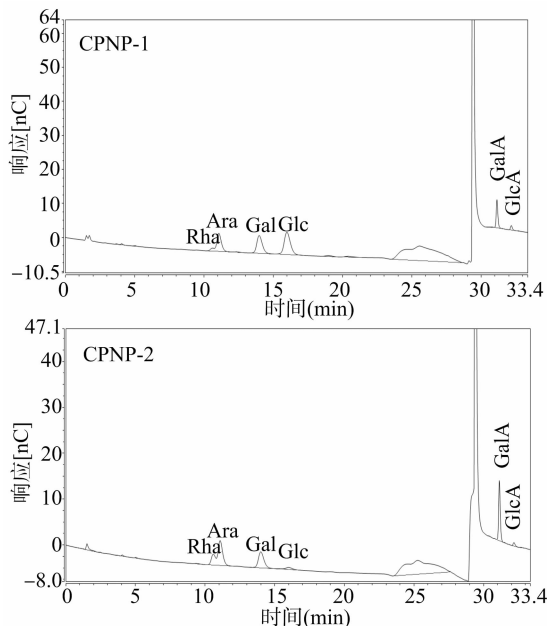


图2 党参多糖各级分的单糖组成

### 2.3 党参多糖级分 CPNP-1 和 CPNP-2 的分子量

利用高效凝胶排阻色谱联合 TSK-gel G4000PW<sub>XL</sub> 分子筛对 DEAE-纤维素柱分级得到的 CPNP-1 和 CPNP-2 分子量进行分析。结果发现,CPNP-1 和 CPNP-2 的分子量分别约为 51.23 ku,且均一性良好,CPNP-2 呈现对称且较窄的峰型(图 3)。

### 2.4 党参多糖体外抗衰老活性

对党参多糖子级分 CPNP-1 和 CPNP-2 的 DPPH 清除能力进行分析,结果发现,CPNP-1 和 CPNP-2 都具有良好的 DPPH 自由基和超氧负阴离子的清除能力,且活性随着 2 种多糖浓度的增加而增强,呈现一定的浓度依赖性。在多糖浓度为 0~4 mg/mL 的范围内,CPNP-1 的 DPPH 自由基和

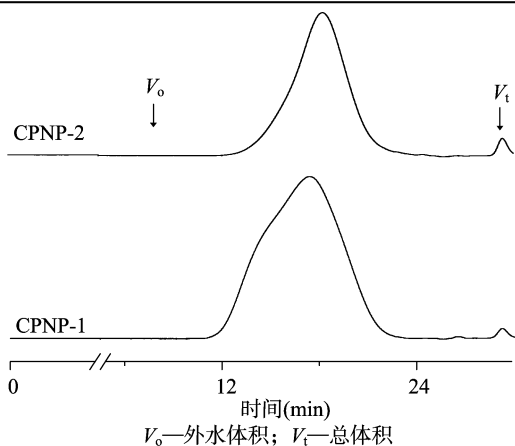


图3 利用 HPGPC 检测 CPNP-1 和 CPNP-2 的分子量分布

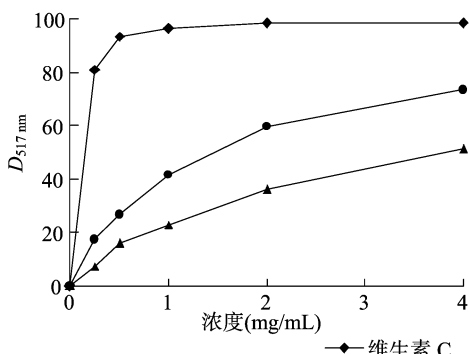


图4 CPNP-1 和 CPNP-2 体外抗衰老作用

表 1 衰老模型小鼠各组血清中 SOD 和 CAT 活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别       | SOD 活性 (nU/mL)     | CAT 活性 (U/mL)          |
|----------|--------------------|------------------------|
| 蒸馏水空白组   | 2 735 $\pm$ 219 ** | 3. 118 $\pm$ 0. 236 ** |
| 衰老模型对照组  | 1 092 $\pm$ 208    | 1. 676 $\pm$ 0. 303    |
| CPNP-2 组 | 2 627 $\pm$ 194 ** | 2. 903 $\pm$ 0. 217 ** |

注: \*\* 表示与模型组比较差异极显著 ( $P < 0. 01$ )。

与人体的衰老以及多种疾病(肿瘤、心脑血管等)密切相关<sup>[12]</sup>。与其他外源性抗氧化剂相比,多糖具有毒性低、来源广等特点。但是,多糖抗氧化的机制较为复杂,如多糖分子可以直接作用于活性氧自由基,结合脂质发生过氧化时产生的活性氧,减缓过氧化的进程;多糖可直接结合  $O_2\cdot^-$  并将其进行清除<sup>[13]</sup>。通过单一试验难以准确地分析多糖抗衰老活性的强弱,因此,本研究联合体内和体外试验分析了党参多糖经 DEAE-纤维素柱分离纯化后得到子级分的抗衰老活性,包括 DPPH 自由基、超氧负离子 ( $O_2\cdot^-$ ) 清除试验和 D-Gal 诱导的衰老模型小鼠试验,结果表明,党参多糖子级分 CPNP-2 具有良好的抗衰老作用。

#### 参考文献:

[1]董群,方积年. 多糖在医药领域中的应用[J]. 中国药学杂志, 2001,36(10):2-5.  
[2]王涛,赵谋明. 多糖的研究进展[J]. 现代食品科技,2007,23(1):103-106,95.  
[3]焦红军. 党参的药理作用及其临床应用[J]. 临床医学,2005,25(4):92-93.  
[4]朱恩圆,贺庆,王峥涛,等. 党参化学成分研究[J]. 中国药科

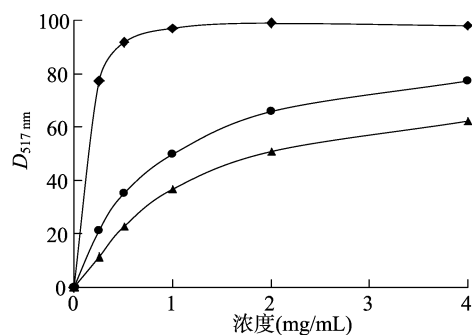
超氧负阴离子 50% 有效的清除浓度分别 3. 6、2. 1 mg/mL; CPNP-2 的自由基和超氧负阴离子 50% 有效的清除浓度分别为 1. 3、0. 9 mg/mL。CPNP-2 的 DPPH 自由基和超氧负阴离子的清除能力均强于 CPNP-1(图 4)。

#### 2.5 衰老模型小鼠试验

通过建立衰老模型小鼠,检测血清中 SOD 和 CAT 的活性,进而分析党参多糖子级分 CPNP-2 的活性,结果如表 1 所示。与衰老模型对照组相比,CPNP-2 组血清中 SOD 和 CAT 活性显著升高 ( $P < 0. 01$ ),且与蒸馏水空白对照组差异不明显,表明党参多糖子级分 CPNP-2 可以缓解衰老模型小鼠血清的 SOD 和 CAT 活性下降。

#### 3 结论与讨论

活性氧是一系列由氧产生的化学活性分子,研究表明其



大学学报,2001,32(2):94-95.

[5]陈克克,王喆之. 党参多糖的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2007,7(4):635-637.  
[6]付成国,文连奎,董然. 轮叶党参化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材,2007,30(4):497-499.  
[7]Liang L,Zhang P,Cai Y Q,et al. High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection for simultaneous determination of monosaccharides and uronic acids [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2006,34(10):1371-1374.  
[8]Shimada K,Fujikawa K,Yahara K,et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cycloextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1992,40(6):945-948.  
[9]Liu F,Ooi V E,Chang S T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts[J]. Life Sciences,1997,60(10):763-771.  
[10]苗明三,方晓艳. 制何首乌多糖对衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J]. 中药药理与临床,2002,18(5):23-24.  
[11]Zhang X,Yu L,Bi H T,et al. Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. Carbohydrate Polymers,2009,77(3):544-552.  
[12]Nordberg J,Arner E S. Reactive oxygen species,antioxidants,and the mammalian thioredoxin system [J]. Free Radical Biology & Medicine,2001,31(11):1287-1312.  
[13]Duan J Y,Kasper D L. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species [J]. Glycobiology,2011,21(4):401-409.