滇桂艾纳香水溶性多糖 BRP-B 的分离纯化及止血活性

廖敏富[a]　林翠梧[a]*　黄　丽[a]　许子竞[a]　覃飒飒[a]　李爱媛[b]
([a]广西大学化学化工学院　南宁 530004;[b]广西中医学院　南宁)

摘　要　用蒸馏水溶解滇桂艾纳香浸膏,从中提取多糖,通过膜分离、三氯乙酸法脱蛋白、二乙氨基乙基(DEAE)纤维素脱色、SephadexG10、SephadexG50 凝胶柱色谱纯化,获得滇桂艾纳香水溶性多糖(BRP-B)。由凝胶渗透色谱(HPGPC)确定 BRP-B 为相对分子质量分布均一的多糖,其数均分子量和质均分子量分别为 2654 和 2716 Da。以血浆复钙时间(PRT)为指标,研究 BRP-B 的凝血活性,结果显示 BRP-B 质量浓度为 6.25×10^{-2} g/L 时,凝血时间为 248.52 s,凝血时间抑制率达 22.42%。小白鼠离体子宫实验结果显示,BRP-B 质量浓度为 1.67×10^{-2}、1.97×10^{-2} 及 2.85×10^{-2} g/L 时能明显增加子宫平滑肌的收缩频率。

关键词　滇桂艾纳香,多糖,分离,纯化,止血活性
中图分类号:O629.1　　文献标识码:A　　文章编号:1000-0518(2011)01-0083-05
DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00124

滇桂艾纳香为菊科艾纳香属植物(*Blumea riparia*(*BI.*)*DC.*),具有养肝活血、收敛止血、活血不伤血、止血不留瘀等功效,可用于各种出血症;民间常以水煎汤剂服用,用于治疗妇女功能性子宫出血、产后出血等症有独特的疗效[1]。国内对该植物化学成分及药学的初步研究发现该植物含有原儿茶酸、绿原酸、豆甾醇、β-谷甾醇、槲皮素[2-3]、咖啡酸、小麦黄素、芹菜素、木犀草素等成分[4]。但有关滇桂艾纳香具体化学成分尤其是多糖的止血作用药理活性研究报道尚未见。考虑到民间常服用的滇桂艾纳香水煎汤剂其有效成分均是水溶性的,又鉴于小分子量的多糖具有表观黏度低、水溶性好、生物活性多样、易于透过机体组织屏障直达细胞内部发挥药效及利于结构与功能机制的研究等特点[5-7],本文报道了滇桂艾纳香中相对分子质量在 $10^3\sim10^4$ 范围内的水溶性多糖成分的分离、纯化、鉴定及其止血活性的初步研究。

1　实验部分

1.1　试剂和仪器

滇桂艾纳香水提浓缩浸膏(广西桂西制药厂);冷冻血浆,由南宁市中心血站提供健康人血浆,-25 ℃保存;云南白药、缩宫素、乐氏液及小白鼠离体子宫标本等由广西中医学院提供;二乙氨基乙基(DEAE)纤维素(上海试剂二厂),SephadexG10、SephadexG50 凝胶柱(法玛西亚公司),透析袋(上海绿鸟科技公司),pH = 7.1 的 PBS 缓冲液(NaCl:0.13 mmol/L,KCl:2.7 mmol/L,Na_2HPO_4:12 mmol/L,KH_2PO_4:1.5 mmol/L,棕色瓶保存);其它试剂均为国产分析纯。多功能陶瓷膜(合肥世杰膜工程有限责任公司),多功能有机膜(合肥世杰膜工程有限责任公司)。GPC 仪检测器为 Agilent 1100 型示差折光检测器,色谱柱为 TSK GEL G3000SW TOSOH 串联 TSK GEL G4000PW TOSOH,预柱:TSK GEL SW TOSOH AAS;Easy pure LF 超纯水仪,BL-420生物信息处理系统,HW-400S 型张力传感器。

1.2　滇桂艾纳香水溶性多糖(BRP-B)的分离纯化

参照文献[8]方法,将 5 kg 滇桂艾纳香水提浓缩浸膏,加 15 倍量的蒸馏水溶解过滤,将滤液依次过截留相对分子质量为 10^5 的陶瓷膜和截留相对分子质量分别为 10^4 和 10^3 的有机复合膜进行初步分离,

2010-03-03 收稿,2010-04-21 修回
国家自然科学基金(20662001,20962002)资助项目,2007 年国家大学生创新实验项目(071059314)
通讯联系人:林翠梧,教授; Tel:0771-3275878; E-mail:lincuiwu@163.com; 研究方向:中草药化学成分和天然产物的研究与开发

将相对分子质量在 10^3 ~ 10^4 的分离液减压浓缩至 500 mL。在冰浴冷却下,用质量分数为 5% 的三氯乙酸沉淀蛋白质,静置过夜后离心除沉淀。将清液浓缩至 200 mL,再用透析袋(截留分子量为 10^3 Da)流水透析 48 h,蒸馏水透析 24 h。将透析袋内溶液减压浓缩后,上 DEAE 纤维素柱脱色。收集含糖溶液,浓缩冷冻干燥得滇桂艾纳香水溶性粗多糖。将粗多糖用水溶解,以超纯水为洗脱液,上 SephadexG10、SephadexG-50 凝胶柱反复分离纯化,苯酚-硫酸法显色和紫外光谱检测,用自动部分接收器定量接收洗脱液,合并单峰部分溶液,减压浓缩后冷冻干燥,得 BRP-B 产物。

1.3 BRP-B 的光谱鉴别

参照文献[9]方法,将分离出的 BRP-B 多糖配成质量浓度为 2.0×10^{-4} g/mL 的水溶液,测定波长 200 ~ 600 nm 范围内的紫外可见吸收光谱。用 KBr 压片法纯化测定干燥 BRP-B 在 4000 ~ 400 cm^{-1} 区间的红外吸收谱,分别确定蛋白质杂质。

1.4 BRP-B 多糖平均分子量测定

参照文献[10]方法,将分离纯化的 BRP-B 配制成浓度为 2 g/L 的水溶液,过滤后进样 20 μL,上 HPGPC 柱,柱温 23 ℃,用流速 1.0 mL/min 超纯水洗脱,进行 HPGPC 分析,由标准校正曲线计算多糖的平均相对分子质量。

1.5 分离多糖 BRP-B 对小鼠离体子宫收缩作用的影响

参照文献[11]方法,体重约 25 g 的雌性小白鼠随机分为 11 组,每组 6 只,设 9 个不同浓度的 BRP-B 试剂组、1 个空白对照组及 1 个 0.01 U/mL 的缩宫素阳性对照组。实验前 2 d,按 0.1 mg/kg 体重给小鼠腹腔注射己烯雌酚,促使其进入动情期。脱颈椎处死后剖腹,取出子宫,置盛有乐氏液的培养皿内,剪除附在子宫上的结缔组织和脂肪组织。将子宫二角相连处剪开,取一角,剪取一半约 2 cm,一端用标本钩固定在(37 ±0.5) ℃恒温水浴槽底部,另一端用线结扎与张力传感器相连。以每秒 1 ~ 2 个气泡通入空气,待子宫稳定并描记正常收缩曲线后,进行离体子宫实验,观察并描记对子宫收缩频率影响的量效关系。平行实验 6 次,结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm S$)表示。

1.6 多糖 BRP-B 的血浆复钙实验

参照文献[12]方法,取内径为 10 mm 试管,分别依次加入 0.1 mL 血浆、0.1 mL 不同浓度的多糖溶液、0.1 mL 氯化钙溶液,混匀,立即计时。37 ℃保温 40 s 后,取出试管缓慢倾斜,观察溶液流动情况,如停止流动立即记时。平行实验 6 次,结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm S$)表示。建立药物浓度与血浆复钙时间(PRT)的药效关系。空白对照组为 PBS 缓冲液;阳性对照组为云南白药(0.05 g/L)。

2 结果与讨论

2.1 滇桂艾纳香水溶性多糖的光谱鉴别

提取的粗多糖经膜分离、脱蛋白、脱色、柱色谱分离纯化及冷冻干燥后得到白色絮状滇桂艾纳香多

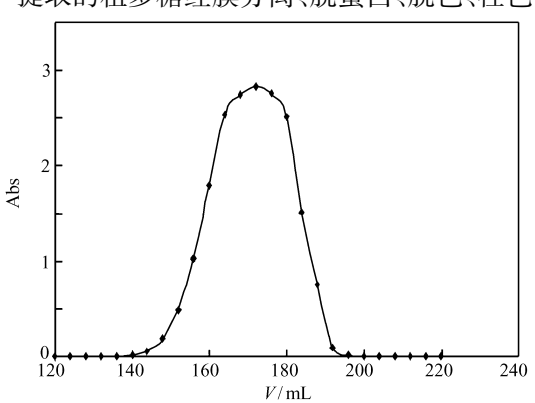


图 1 BRP-B 的葡聚糖凝胶 G50 柱洗脱曲线(483 nm)

Fig. 1 Elution curve of BRP-B on Sepadex G-50(483 nm)

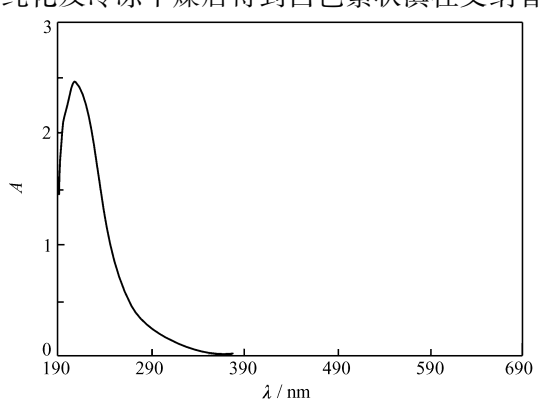


图 2 多糖 BRP-B 经脱蛋白后的紫外图谱

Fig. 2 UV spectrum of BRP-B after eliminating protein

糖 BRP-B 固体。对其柱层析洗脱流分用苯酚-硫酸法显色,测定 483 nm 处的吸光度,绘制洗脱曲线如图 1所示,为单一对称峰,表明所得 BRP-B 为单纯多糖组分。因分离纯化的 BRP-B 紫外可见吸收光谱(图 2)无 280 nm 处蛋白质的特征吸收,亦无 600 nm 处有色物质的特征吸收,可确定多糖基本不含多肽、蛋白质和色素等杂质。

纯化干燥后 BRP-B 的红外谱中,出现 3360 cm^{-1}处—OH 的伸缩振动强吸收峰,2889 ~ 2940 cm^{-1}处 C—H键伸缩振动吸收峰,1400 ~ 1200 cm^{-1}处 C—H 键的变角振动吸收峰,1639 cm^{-1}处羰基 C═O 的伸缩振动吸收,1031 cm^{-1}处 C—O 键的变角振动吸收峰,933 cm^{-1}处呋喃糖环对称伸缩振动吸收峰,874 cm^{-1}处呋喃糖分子中次甲基 CH_2—的横向振动吸收峰,824 cm^{-1}处呋喃糖分子中 C—H 键的变角振动吸收峰[10]。据此可判断获得产物是糖类化合物,且为呋喃多糖。

2.2　BRP-B 的分子量及其分布

图 3 为 BRP-B 的 HPGPC 谱图。图中单一对称峰表明,滇桂艾纳香水溶性多糖 BRP-B 是分子量均一的多糖,其数均分子量和质均分子量分别为 2654 和 2716。

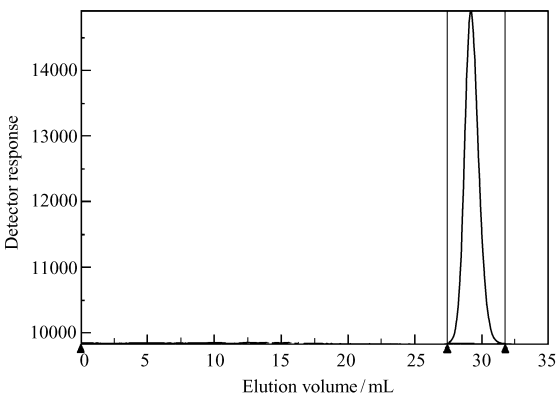


图 3　BRP-B 的高效凝胶渗透色谱(HPGPC)图

Fig. 3　HPGPC of BRP-B

2.3　分离多糖 BRP-B 对小鼠离体子宫收缩的影响

在 BL-420 型生物机能实验系统上,以子宫收缩的频率为评价指标,观察不同剂量的 BRP-B 糖溶液对小白鼠子宫平滑肌收缩频率的影响,结果列于表 1。表 1 数据表明,在 BRP-B 浓度为 $1.67 \times 10^{-2} \sim 2.85 \times 10^{-2}$ g/L 范围内时,能明显提高小白鼠离体子宫的收缩频率。

表 1　BRP-B 对子宫收缩频率的影响($\bar{x} \pm S, n = 6$)

Table 1　The influence on frequencies of uterine contraction by BRP-B($\bar{x} \pm S, n = 6$)

Groups	ρ(BRP-B)/(g·L^{-1})	Frequency/(times · min^{-1})	Groups	ρ(BRP-B)/(g·L^{-1})	Frequency/(times · min^{-1})
1	0.35×10^{-2}	2.08 ± 0.51	7	2.56×10^{-2}	3.60 ± 2.41
2	0.69×10^{-2}	2.33 ± 1.40	8	2.85×10^{-2}	3.78 ± 1.86 *
3	1.03×10^{-2}	1.55 ± 0.52	9	3.13×10^{-2}	2.85 ± 2.03
4	1.35×10^{-2}	2.71 ± 1.27	Blank	0	1.18 ± 1.19
5	1.67×10^{-2}	3.58 ± 1.83 *	Oxytocin	0.01 U/mL	4.52 ± 1.96 **
6	1.97×10^{-2}	3.79 ± 2.36 *			

Remark: compare with blank group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4　多糖 BRP-B 的血浆复钙作用

多糖 BRP-B 有效浓度在 $1.56 \times 10^{-2} \sim 1.25 \times 10^{-1}$ g/L 范围对血浆的凝集作用数据见表 2。当其浓度为 6.25×10^{-2} g/L 时,促凝作用最强,其凝血时间(PRT)缩短率与阳性对照的缩短率相近。

表 2　多糖 BRP-B 对 PRT 的影响(时间:$\bar{x} \pm S, n = 6$)

Table 2　The influence on plasma recalcification time(PRT) of BRP-B($\bar{x} \pm S, n = 6$)

Groups	ρ(BRP-B)/(g·L^{-1})	PRT of Blank/s	PRT of Drug/s	Shortening rate/%
1	1.00	562.02 ± 59.03	580.32 ± 65.13	−3.26
2	0.50	562.02 ± 59.03	544.14 ± 62.69	3.17
3	0.25	314.34 ± 31.38	276.66 ± 29.48	11.99
4	1.25×10^{-1}	314.34 ± 31.38	259.38 ± 20.90	17.48 **
5	6.25×10^{-2}	320.34 ± 31.97	248.52 ± 19.65	22.42 ***
6	3.13×10^{-2}	320.34 ± 31.97	258.30 ± 21.37	19.37 **

续表 2

Groups	ρ(BRP-B)/(g·L^{-1})	PRT of Blank/s	PRT of Drug/s	Shortening rate/%
7	1.56×10^{-2}	405.36 ± 32.35	345.48 ± 25.23	14.76**
8	7.81×10^{-3}	405.36 ± 32.35	355.38 ± 26.76	12.33
9	3.91×10^{-3}	443.82 ± 31.27	391.80 ± 26.33	11.72
Yunnan Baiyao	0.05	355.37 ± 41.15	269.02 ± 35.27	24.30**

** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

3 结 论

桂西特产草药滇桂艾纳水浸膏的提取多糖 BRP-B 的血浆复钙和离体小鼠子宫收缩实验分别显示促凝血和促子宫收缩作用。提示 BRP-B 一方面可直接或间接地促使子宫平滑肌细胞钙离子的浓度增加,激发子宫平滑肌的运动性能力而使收缩频率增大,从而促使血管闭合而止血[13];另一方面,很可能对凝血酶具有活化作用,通过增加凝血酶的活性,激活血小板,促进血栓形成,实现止血作用[14]。

参 考 文 献

[1] LING Rong. Flora Repubulicae Popularis Sinicae[M]. Beijing:Science Press,1979:13-14(in Chinese).
林镕. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1979:13-14.

[2] CAO Jiaqing,DANG Quan,FU Hongwei. Isolation and Identification of Chemical Constituents from *Blumea ripa ria DC.*[J]. *J Shenyang Pharmaceut Univ*,2007,**24**(10):615-618(in Chinese).
曹家庆,党权,付红伟. 滇桂艾纳香化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2007,**24**(10):615-618.

[3] LEI Ting,LIN Cuiwu,CHEN Haiyan,*et al*. Determination of Chlorogenic Acid in *Blumea riparia*(*Bl.*) *DC.* by HPLC[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*,2008,**19**(9):2073-2074(in Chinese).
雷婷,林翠梧,陈海燕,等. 反相高效液相色谱法测定滇桂艾纳香中绿原酸的含量[J]. 时珍国医国药,2008,**19**(9):2073-2074.

[4] ZHENG Dan,ZHANG Xiaoqi,WANG Ying. Chemical Constituents of the Aerial Parts of *Blumea riparia*[J]. *Chinese J Nat Med*,2007,**5**(6):421-424(in Chinese).
郑丹,张晓琦,王英. 滇桂艾纳香地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物,2007,**5**(6):421-424.

[5] Sun L Q,Wang C H,Shi Q J,*et al*. Preparation of Different Molecular Weight Polysaccharides from Porphyridium Cruentum and Their Antioxidant Activities[J]. *Int J Biol Macromol*,2009,**45**:42-47.

[6] Liu W,Wang H Y,Pang X B,*et al*. Characterization and Antioxidant Activity of Two Low-molecular-weight Polysaccharides Purified from the Fruiting Bodies of Ganoderma Lucidum[J]. *Int J Biol Macromol*,2010,**46**:451-457

[7] ZHANG Fanhua,YAN Lang,ZHANG Shuming,*et al*. Structure Elucidation of Low Molecular Weight Pumpkin Polysaccharides LWPP-Ia[J]. *Food Sci*,2009,**30**(1):25-27(in Chinese).
张凡华,严浪,张树明,等. 低分子量南瓜多糖 LWPP-Ia 的结构研究[J]. 食品科学,2009,**30**(1):25-27.

[8] TIAN Limei,WANG Man. Studies on Extraction, Isolation and Composition of Lycium Barbarum Plysaccharides[J]. *China J Chinese Mater Med*,2006,**3**(19):1603-1608(in Chinese).
田丽梅,王曼. 枸杞多糖的提取分离和其组成研究[J]. 中国中药杂志,2006,**3**(19):1603-1608.

[9] LI Xialan,WEI Guodong,WANG Zhaojing,*et al*. Purification and Physico-chemical Characteristics of Polysaccharide from Leaf Mustard Isolated with Dilute Alkali[J]. *Chinese J Appl Chem*,2006,**23**(11):1304-1306(in Chinese).
李夏兰,魏国栋,王昭晶,等. 碱提芥菜多糖 ALP-2 的分离纯化及理化性质分析[J]. 应用化学,2006,**23**(11):1304-1306.

[10] ZHANG Weijie. The Technology of Biochemical Study of Glycoconjugates[M]. Hangzhou:Zhejiang University Press,1999:112-117,193-198(in Chinese).
张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999:112-117,193-198..

[11] YU Yan,WU Ning,WANG Xiuxia. Influence of Shenghuazhixueying on autonomic movement of Isolated Uterine from Rats[J]. *Chinese J Tradit Med Sci Technol*,2003,**10**(2):93-93(in Chinese).
于燕,吴宁,王秀霞. 生化止血饮对大鼠离体子宫自发运动影响的实验研究[J]. 中国中医药科技,2003,**10**(2):93-93.

[12] JIANG Weixin, ZHAO Xi. The Anti-coagulant Effect of Polysaccharides from Long Dan[J]. *Heilongjiang Med J*, 2008, **21**(5):31-32(in Chinese).
江蔚新,赵玺. 龙胆多糖的抗凝血作用的研究[J]. 黑龙江医药,2008,**21**(5):31-32.

[13] LIU Guoyun, CHI Xiaoli, MA Yuan, *et al*. Effect of DSS-A-N-30, An Active Ingredient of Danggui Shaoyao San, on Contractility of Rat Uterine Smooth Muscle *In Vitro*[J]. *Chinese J Pharmacol Toxicol*, 2007, **21**(5):427-433(in Chinese).
刘国云,迟晓丽,马渊,等. 当归芍药散活性部位 DSS-A-N-30 对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2007,**21**(5):427-433.

[14] SHI Xubo, HU Dayi. Coagulation Mechanism and New Concepts of Anticoagulant Therapy[J]. *Clin Focus*, 2008, **23**(22):1597-1599(in Chinees).
史旭波,胡大一. 凝血机制与抗凝治疗新观念[J]. 临床汇萃,2008,**23**(22):1597-1599.

Isolation, Purification and Hemostatic Activity of Water-soluble Polysaccharide in *Blumea Riparia*(*BI.*) *DC.*

LIAO Minfu[a], LIN Cuiwu[a*], HUANG Li[a], XU Zijing[a], QIN Sasa[a], LI Aiyuan[b]
([a]*School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning* 530004;
[b]*GuangXi Traditional Chinese Medical University, Nanning*)

Abstract Water-soluble polysaccharide B(BRP-B) in *Blumea riparia*(*BI.*) *DC.* was extracted and purified by using membrane separation, discoloration on diethylaminoethyl(DEAE)-cellulose, and sephadex column chromatography of G10 and G50. Results from high-performance gel permeation chromatography(HPGPC) showed that the obtained BRP-B has a narrow-distributed molecular mass, with the number average molecular mass and mass average molecular mass as 2654 and 2716, respectively. The drug activity test based on plasma recalcification as the index showed that BRP-B with the optimal concentration of 6.25×10^{-2} g/L had the strongest procoagulant activity, the coagulation time was 248.52 s, and the inhibition rate of coagulation time was 22.42%. In particularly, BRP-B with concentration of 1.67×10^{-2}, 1.97×10^{-2} and 2.85×10^{-2} g/L could significantly enhance the frequency of uterus muscle.

Keywords *Blumea riparia*(*BI.*)*DC.*, polysaccharide, separation, purification, hemostatic activity