

山豆根多糖的制备、单糖组成及体外抗肿瘤作用

王淑娜, 杨丽雅, 余登香, 傅月朦, 邓中平

(上海中医药大学创新中药研究院, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 制备山豆根多糖(polysaccharide of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*, SRP)并分析其单糖组成,探索 SRP 的体外抗肿瘤作用。**方法:** 水提醇沉法制备 SRP,紫外-可见分光光度法测定 SRP 中多糖、黄酮、皂苷、酚类和蛋白质含量,高效液相色谱法测定生物碱含量,返滴定法测定有机酸含量。通过高效液相色谱仪,色谱柱采用 Waters X Bridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以乙腈:磷酸盐缓冲液(0.05 mol·L⁻¹, pH=6.8)=18:82 为流动相,等梯度洗脱,流速为 0.8 mL·min⁻¹,柱温为 30℃,检测波长为 245 nm,建立 SRP 的单糖组成分析方法,测定 SRP 中各单糖含量并计算摩尔比。采用 MTT 法检测 SRP 抑制肿瘤细胞增殖的活性。**结果:** 水提醇沉法制得 SRP,棕黄色粉末,得率为 3.95%,其中不含生物碱成分,多糖、黄酮、皂苷、有机酸和酚类含量分别为 66.08%,7.17%,3.45%,2.54%和 4.33%,蛋白质含量可忽略不计。SRP 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,各单糖的摩尔比为 1.25:0.31:0.28:0.50:40.47:1.00:10.46,SRP 的质量分数为 64.97%。SRP 对 Hepa1-6, HepG2, HT29 和 4T1 细胞均具有显著的增殖抑制作用且呈浓度依赖性,IC₅₀ 值分别为 770,1 910,1 870 和 1 880 μg·mL⁻¹。**结论:** 本研究制备的 SRP 中多糖含量大于 60%,已知成分含量大于 80%,其中不含生物碱。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolo, PMP)柱前衍生化-HPLC 法精密度、重复性和准确性良好,可用于分析 SRP 的单糖组成。SRP 是一类以葡萄糖和阿拉伯糖为主要成分的杂多糖。SRP 具有明显的细胞毒作用,提示 SRP 可通过抑制肿瘤细胞增殖发挥抗肿瘤作用。本研究为推进 SRP 成分的基础研究和促进 SRP 的抗肿瘤作用研究提供了参考。

[关键词] 山豆根多糖;单糖组成;Hepa1-6 细胞;HepG2 细胞;HT29 细胞;4T1 细胞;抗肿瘤

[中图分类号] R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)11-1155-08

Preparation, monosaccharide composition and *in vitro* antitumor effect of polysaccharide from *Sophora tonkinensis Radix et Rhizoma*

WANG Shu-na, YANG Li-ya, YU Deng-xiang, FU Yue-meng, DENG Zhong-ping

(Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To extract and separate polysaccharide from *Sophora tonkinensis Radix et Rhizoma* (SRP), determine the monosaccharide composition and content of SRP, and investigate the antitumor effects of SRP *in vitro*. **Methods:** SRP was prepared by water extraction and alcohol precipitation. The contents of polysaccharides, flavonoids, saponins, total phenols and proteins in SRP were determined by UV-Vis spectrophotometry, the contents of alkaloids were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), and the content of organic acid was measured by back titration method. The monosaccharide analysis method of SRP was established by HPLC. A

[作者简介] 王淑娜,女,硕士研究生,主要从事中药抗肿瘤作用研究。E-mail:wangshunalala@163.com。

[通讯作者] 邓中平,男,博士生导师,研究员,主要从事中药药理学与毒理学研究。E-mail:dengzpcn@163.com。

Waters X Bridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile: phosphate buffer (0.05 mol·L⁻¹, pH = 6.8) at the ration of 18:82 as mobile phase, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 245 nm. The contents of monosaccharides in SRP were determined and the mole ratio was calculated. MTT assay was used to detect the antitumor effects of SRP *in vitro*. **Results:** SRP, which is brown powder, was obtained by water extraction and alcohol precipitation with a yield of 3.95%. The contents of polysaccharides, flavonoids, saponins, organic acids and total phenols in SRP were 66.08%, 7.17%, 3.45%, 2.54% and 4.33%, respectively. No alkaloids and proteins were detected. SRP was composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose. The mole ratios were 1.25:0.31:0.28:0.50:40.47:1.00:10.46, and the percentage of polysaccharide was 64.97%. SRP had inhibitory effect on Hepal-6, HepG2, HT29 and 4T1 cells in a concentration-dependent manner with IC₅₀ of 770, 1 910, 1 870 and 1 880 μg·mL⁻¹, respectively. **Conclusion:** The SRP prepared in this study contained more than 60% polysaccharide and more than 80% known components, among which no alkaloids were detected. HPLC with pre-column derivatization of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolo has good precision, reproducibility and accuracy, and is suitable for the monosaccharide composition analysis of SRP polysaccharides. SRP is a kind of heteroglycan with glucose and arabinose as the main components. SRP has significant cytotoxic effect by inhibiting tumor cell proliferation, suggesting that it may play a anti-tumor role. This study provides a reference for advancing the basic research of the composition and antitumor effect of SRP.

[**Key words**] *Sophorae Tonkinensis* Radix et Rhizoma polysaccharide; monosaccharide composition; Hepal-6 cells; HepG2 cells; HT29 cells; 4T1 cells; antitumor

山豆根 (*Sophora tonkinensis* Radix et Rhizoma) 是豆科植物越南槐 (*Sophora tonkinensis* Gagnep) 的干燥根和根茎,在我国用药历史悠久,有清热解毒、消肿利咽之功效^[1],是临床上治疗急慢性咽炎、扁桃体炎和慢性肝炎等疾病的常用药。现代研究表明,山豆根具有抗肿瘤、调节免疫、抗病毒、抗氧化和保肝抗炎^[2-4]等药理作用。山豆根所含化学成分复杂,主要包括生物碱、多糖、黄酮、皂苷、有机酸、酚类及微量元素等^[5]。多糖作为山豆根的主要活性成分之一,具有抗肿瘤、调节免疫、抗氧化、抗病毒和抑菌抗炎等活性^[6-8]。山豆根有一定的毒性,其生物碱具有毒性和活性的双重性质,黄酮也是山豆根的潜在毒性成分之一^[9],而未见有山豆根多糖(SRP)类成分有毒的报道。由于多糖具有安全、无毒和活性明显等特点,在医药领域具有潜在的开发和应用价值。多糖是一类高分子化合物,其分子量较大和结构复杂的特点给其成分分析和含量测定带来较大的困难,有关 SRP 的制备工艺、质量研究及单糖组成成分的分析报道较少^[6,10-11]。单糖是构成多糖的最小分子单位,也是多糖结构表征的重要环节,因此单糖分析前对多糖样品进行前处理至关重要。

体外研究表明,SRP 能直接抑制人食管癌细胞

EC109 的生长^[12],并且能诱导早期的人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡^[13];体内实验表明,SRP 可以通过提高机体免疫能力,发挥抗肿瘤作用^[14]。本课题组前期研究表明 SRP 具有显著的抗乳腺癌和肺癌的活性,同时还具有增强免疫的作用^[15]。

本研究采用水提醇沉法对 SRP 进行提取纯化,利用紫外-可见分光光度法对多糖中相关成分进行定量分析以控制内在质量,并通过 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolo, PMP) 柱前衍生化 HPLC 法对 SRP 进行了单糖组成分析。采用 MTT 法从细胞水平考察了 SRP 对不同肿瘤细胞的增殖抑制作用,以期为进一步阐明 SRP 的成分基础及抗肿瘤作用提供实验依据。

材料与方法

1 药物与试剂

山豆根饮片购自四川新荷花饮片有限公司,产地:广西,批号:2101063,质量报告显示各项检测均符合《中华人民共和国药典》标准,苦参碱(C₁₅H₂₄N₂O)与氧化苦参碱(C₁₅H₂₄N₂O₂)的总量不少于 0.60%,并由上海中医药大学中药学院崔亚君教授鉴定确认为豆科植物越南槐的干燥根及根茎。

无水葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150603,纯度:98%);D-甘露糖(批号:C16J8H28561,纯度:98%)、D-半乳糖(批号:Z22J9H64187,纯度:98%)、D-阿拉伯糖(批号:Z29O7H23894,纯度:99%)、L-鼠李糖(批号:O12A10K95105,纯度:98%)、D-葡萄糖醛酸(批号:B25302,纯度:98%)、D-(+)-半乳糖醛酸(批号:S11020,纯度:97%)均购自上海源叶生物科技有限公司;DMEM高糖培养基(批号:SH30243.01)和RPMI 1640培养基(批号:8121104)均购自Gibco公司。

2 仪器

Agilent 8453型紫外-可见分光光度计(美国安捷伦科技有限公司);ME203型0.01 mg分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Multiskan FC酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);Agilent1260型高效液相色谱仪(VWD检测器,美国安捷伦科技有限公司);Thermo 3543型CO₂恒温培养箱(上海Thermo仪器有限公司);TDL-4-C低速离心机(上海安亭科学仪器厂);CKX41倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

3 细胞

肝癌细胞Hepal-6和HepG2、结肠癌细胞HT29、乳腺癌细胞4T1均购自中国科学院干细胞库。

4 SRP的提取纯化

取山豆根饮片1 kg,加3倍量95%乙醇回流脱脂2 h,药渣置于通风处常温晾干。脱脂后的药材加10倍量纯水浸泡30 min,武火煮沸,文火加热1 h,煎煮2次,合并滤液,加热浓缩至2 g药材·mL⁻¹,得山豆根水提液。向水提液中加入95%乙醇,慢加快搅,调整醇浓度达80%,4℃静置过夜,抽滤,收集醇沉淀物,50℃烘干,得到一次醇沉部位;将一次醇沉部位加纯水复溶,离心,上清液加95%乙醇调整醇浓度达80%,4℃静置过夜,抽滤,收集醇沉淀物,50℃烘干,得到二次醇沉部位;二次醇沉部位与一次醇沉部位处理方法相同,得到三次醇沉部位,即SRP。通过以下公式计算得率:

$$\text{得率}/\% = M_1/M_2 \times 100\% \quad (M_1: \text{多糖重量}/g, M_2: \text{饮片重量}/g)$$

5 SRP中相关成分含量测定

5.1 标准品溶液的配制

精密称取无水葡萄糖、芦丁、齐墩果酸、没食子酸、牛血清白蛋白标准品适量,分别配成浓度为1 mg·mL⁻¹的标准溶液。

5.2 标准曲线的绘制

精密移取葡萄糖标准品溶液0, 40, 60, 80, 100, 120 μL,加纯水稀释至1 mL,加1 mL 5%苯酚溶液,混匀,加8 mL浓硫酸,混匀后静置10 min,50℃水浴30 min,冰水浴冷却至室温,于490 nm处测吸光度。

精密移取芦丁标准品溶液0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL,加溶剂稀释至1 mL,依次加入0.5 mL 5% NaNO₂溶液、0.5 mL 10% Al(NO₃)₃溶液、5 mL 4% NaOH溶液,每加一次试剂混匀后静置6 min,最后静置15 min,于510 nm处测定吸光度。

精密移取齐墩果酸标准品溶液20, 40, 60, 80, 100 μL,70℃蒸干,再加入5%香草醛冰醋酸溶液3 mL,高氯酸6 mL,80℃水浴10 min,流水冷却5 min,于550 nm下测定吸光度。

精密移取没食子酸标准品溶液1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,先加1 mL磷钼钨酸试液,再加入纯水补齐体积至14 mL,用29%的碳酸钠溶液稀释至25 mL,放置30 min,于760 nm处测定吸光度。

精密移取牛血清白蛋白标准品溶液10, 20, 40, 80, 160 μL,加水至1 mL,再加入酸性染色液5 mL,立即混匀,立即在595 nm的波长处测定吸光度。

分别以各标准溶液的浓度(C)为横坐标,吸光度OD值为纵坐标,得到回归方程。

5.3 SRP供试品溶液的制备及成分含量测定

精密称取“4”项下SRP 10 mg于10 mL容量瓶中,加纯水超声溶解完全,定容至刻度,平行制备3份。同“5.2”项下方法测定SRP中的多糖、黄酮、皂苷、酚类和蛋白质含量。有机酸含量测定采用返滴定法^[16]。

6 HPLC法测定SRP中苦参碱和氧化苦参碱含量

6.1 标准品的配制

精密称取苦参碱17.41 mg、氧化苦参碱34.82 mg,用超纯水定容至10 mL,使用前用0.22 μm微孔滤膜过滤。

6.2 样品的制备

精密称取SRP 10.54 mg,加超纯水超声溶解,定容至10 mL,用0.22 μm微孔滤膜过滤即得。

6.3 色谱条件

采用Waters X Bridge C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流速0.5 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样体积10.00 μL,时间35 min,波长215 nm,洗脱模式为梯度洗脱(见表1)。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	0.2% 磷酸溶液/%	乙腈/%
0	95	5
5	95	5
6	91	9
6.5	88	12
11	85	15
21	66	34
23	55	45
26	53	47
27	23	77
35	2	98

7 PMP 柱前衍生化-HPLC 法分析单糖组成^[10]

7.1 色谱条件

采用 Waters X Bridge C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈:磷酸盐缓冲液(0.05 mol·L⁻¹, pH = 6.8) = 18:82, 等梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 时间 40 min, 检测波长 245 nm。

7.2 摩尔比计算

2 个单糖间的校正因子为 $F_{1/2} = (A_2/n_2)/(A_1/n_1)$, 则样品中 2 种单糖的比例 $R_{1/2} = F_{1/2} \times (A_1^*/A_2^*)$ 。其中 A_1, A_2 为混合单糖对照品溶液中单糖 1, 2 的峰面积; A_1^*, A_2^* 为 SRP 样品溶液中单糖 1, 2 的峰面积; n_1, n_2 分别为混合单糖对照品溶液中单糖 1, 2 的物质的量。按上述公式计算样品溶液中各单糖的物质的量之比。

7.3 对照品溶液的配制

精确称取甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Ara)标准品适量, 纯水溶解并定容至 10 mL, 得到单糖标准品溶液, 使用时按需要逐级稀释。

7.4 供试品溶液的配制

7.4.1 多糖的水解 精密称取 SRP 粉末适量于离心管中, 加 2 mol·L⁻¹ 的三氟乙酸 2 mL, 密封后于 100 °C 水解 6 h, 冷却至室温, 80 °C 水浴蒸干, 加甲醇 1 mL 溶解, 60 °C 水浴蒸干, 重复处理 3 次以除去残留的三氟乙酸, 残渣加纯水溶解, 并定容至 10 mL, 备用。

7.4.2 PMP 衍生化 取单糖标准品溶液各 700 μL 置于同一离心管中, 多糖供试品水解液 1 mL 置于另

一离心管中, 分别加入 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液和 0.5 mol·L⁻¹ PMP 的甲醇溶液各 1 mL, 混匀后于 70 °C 水浴中反应 1 h。反应完成后加 0.3 mol·L⁻¹ 盐酸 1 mL 中和 NaOH, 加氯仿 2 mL, 涡旋混匀 30 s, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后弃去下层氯仿, 取上清液, 重复处理 3 次, 除去多余的 PMP, 弃去氯仿层后, 取水层过 0.22 μm 微孔滤膜, 备用。

7.5 方法学考察

7.5.1 线性关系与检测范围 取混合单糖对照品溶液 5 份, 稀释成不同浓度梯度, 衍生化后进样检测, 以浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标绘制各个单糖的标准曲线, 得到回归方程。

7.5.2 日内精密度 取单糖混合对照品溶液, 衍生化后每隔 1 h 进样 1 次, 共 6 次, 得甘露糖、鼠李糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的峰面积并计算 RSD。

7.5.3 日间精密度 取单糖混合对照品溶液, 衍生化后每隔 1 d 进样 1 次, 共 6 次, 得甘露糖、鼠李糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的峰面积并计算 RSD。

7.5.4 稳定性实验 精密称取 SRP 供试品, 水解、衍生化后分别在 0, 2, 4, 6, 16, 24 h 进样检测, 测得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积并计算含量和 RSD。

7.5.5 重复性实验 精密称取 5 份 SRP, 水解、衍生化后进样检测, 测得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积并计算含量和 RSD。

7.5.6 回收率实验 精密称取 5 份 SRP 粉末, 水解后加入一定量的单糖标准品溶液, 衍生化后进样检测, 计算 SRP 中各单糖组分的回收率和 RSD。

8 山豆根粗多糖对不同肿瘤细胞的体外作用

8.1 细胞的复苏与传代

Hepal-6, HepG2 和 HT29 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 4T1 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养。

细胞复苏: 从液氮中取出细胞, 于 37 °C 水浴锅中 2 min 内溶解, 转移至已加有 5 mL 培养基的 15 mL 离心管中, 轻轻吹打均匀, 1 000 r·min⁻¹, 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 5 mL 新的培养基, 吹打均匀, 计数。以 2×10^5 cells·mL⁻¹ 加入 25 cm³ 培养瓶

中,放入 CO₂ 恒温培养箱中培养。

细胞传代:当细胞铺满瓶底时,开始传代。弃去原培养基,加 5 mL PBS 缓冲液洗涤 2 次,加适量 0.25% 胰酶,37 °C 消化 2 min,加培养基终止消化。轻柔吹打使细胞悬浮,收集悬液至 15 mL 离心管中,1 000 r·min⁻¹,离心 5 min,弃上清,加 5 mL 培养基吹打均匀,计数。以 2 × 10⁵ cells·mL⁻¹ 加入培养瓶中,轻轻振荡,混匀,于显微镜下观察,放入 CO₂ 恒温培养箱中培养。

8.2 药物配制

SRP 储备液的配制:精密称取 SRP 适量,加培养基溶解,配成一定浓度的储备液,用 0.45 μm 滤器过滤,使用时逐级稀释至所需浓度。

8.3 MTT 法检测 SRP 不同浓度和时间对 Hepa1-6, HepG2, HT29 和 4T1 细胞增殖的影响

取对数生长期的 Hepa1-6 细胞经胰酶消化后接种至 96 孔板(100 μL 细胞悬液/孔,约 1 × 10⁴ 个细胞),待细胞贴壁后弃去原培养基,并用 PBS 缓冲液清洗 2 遍。在各孔中加入不同浓度的 SRP,每组设置 3 个复孔,分别于 24,36,48 h 时加入 10 μL 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液,继续培养 4 h。弃尽上清液,每孔加入 150 μL DMSO,37 °C 避光孵育 10 min。使用酶标

仪测定各孔细胞的吸光度 OD 值,波长为 490 nm,计算药物对 Hepa1-6 细胞的生长抑制率:抑制率/% = 1 - (OD_{sample} - OD_{blank}) / (OD_{control} - OD_{blank}) × 100%。采用 GraphPad Prism 7 软件绘制细胞增殖抑制曲线并计算 IC₅₀ 值。HepG2, 4T1 和 HT29 细胞检测步骤同上,每种细胞重复 3 次实验。

9 数据处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 7 软件进行统计处理。多组间比较采用单因素方差分析法(one way ANOVA)。P < 0.05 视为差异有统计学意义。

结 果

1 SRP 中相关成分的含量测定

通过水提醇沉法制备 3 批 SRP 样品,得率为 (3.95 ± 0.22)%。多糖、黄酮、皂苷、酚类、蛋白质标准品的回归方程分别为 $y = 182.87x + 13.126$ ($r^2 = 0.9993$), $y = 0.6949x + 0.0367$ ($r^2 = 0.9957$), $y = 98.754x + 5.7899$ ($r^2 = 0.9960$), $y = 0.0772x + 0.097$ ($r^2 = 0.9973$), $y = 141.94x + 2.9166$ ($r^2 = 0.9934$)。测得 SRP 中各成分含量见表 2,蛋白质含量为 0.09%,忽略不计。

表 2 SRP 中相关成分含量测定

$n = 3, \bar{x} \pm s$

参数	多糖	黄酮	皂苷	有机酸	总酚	总百分比
含量/%	66.08 ± 3.20	7.17 ± 0.48	3.45 ± 0.44	2.54 ± 0.63	4.33 ± 0.60	83.57 ± 2.59

2 HPLC 法测定多糖中苦参碱和氧化苦参碱含量

经过标准品和样品色谱峰比较(见图 1A 和图

1B),证明 SRP 中不含生物碱成分。

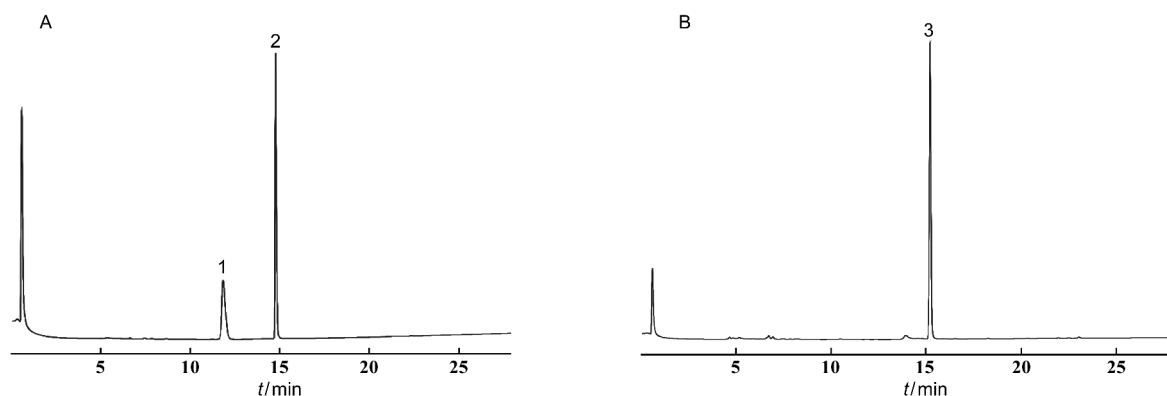


图 1 苦参碱和氧化苦参碱标准品(A)和多糖样品(B)色谱图

3 单糖组成分析

3.1 方法学考察

3.1.1 线性关系和检测范围 各个单糖标准溶液的回归方程及线性范围见表 3,可知在各自浓度范围内线性关系良好。

表 3 单糖标准曲线和线性范围

单糖种类	回归方程	相关系数 (<i>r</i>)	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
甘露糖	$A = 20.074C + 111.11$	0.999 9	11.66 ~ 373.14
鼠李糖	$A = 16.137C - 28.692$	1	23.67 ~ 757.43
葡糖醛酸	$A = 15.787C - 27.476$	0.999 5	11.21 ~ 358.71
半乳糖醛酸	$A = 30.798C - 17.2$	0.999 2	4.50 ~ 143.86
葡萄糖	$A = 18.062C + 13.212$	0.999 9	8.71 ~ 279.71
半乳糖	$A = 20.666C + 7.709 5$	1	12.49 ~ 399.71
阿拉伯糖	$A = 23.838C + 30.256$	0.999 8	12.85 ~ 411.29

3.1.2 日内精密度 混合标准溶液 1 d 内进样 6 次,得到各单糖的峰面积,计算 RSD 在 0.63% ~ 1.82% 之间,表明仪器日内精密度良好。

3.1.3 日间精密度 混合标准溶液每日进样 1 次,共 6 次,得到各单糖的峰面积,计算 RSD 在 0.95% ~

1.94% 之间,表明仪器日间精密度良好。

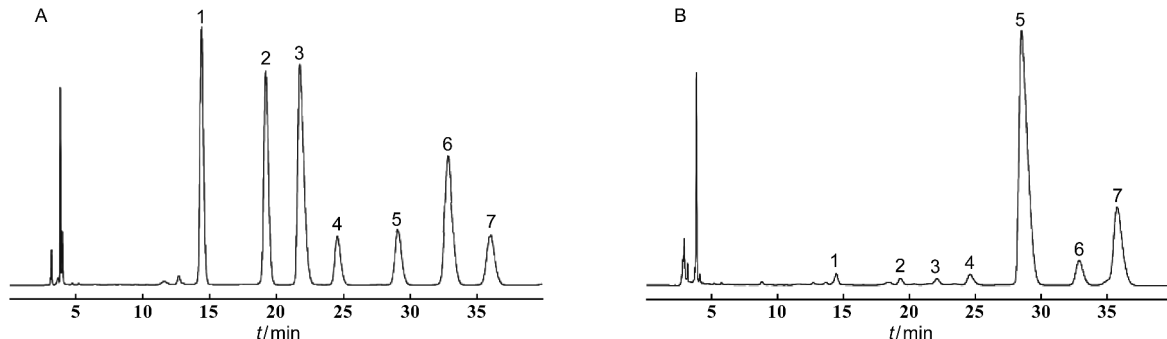
3.1.4 稳定性实验 精密称取 SRP 适量,经水解、衍生化后,在 0,2,4,6,16,24 h 时进样检测,测得各单糖的峰面积并计算含量和 RSD,RSD 在 0.45% ~ 1.78% 之间,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.1.5 重复性实验 精密称取 5 份 SRP,经水解、衍生化后进样检测,测得各单糖的峰面积并计算含量和 RSD,RSD 在 1.34% ~ 1.98% 之间,表明溶液重复性良好。

3.1.6 回收率实验 精密称取 5 份 SRP,水解后加入一定量的单糖对照品溶液,衍生化后进样检测,各单糖组分的回收率在 99.20% ~ 101.23% 之间,RSD 在 1.13% ~ 2.50% 之间,表明该方法准确度良好。

3.2 样品分析

经 HPLC 测定后,对照品溶液和 SRP 供试品溶液的色谱图如图 2 所示,可知山豆根粗多糖主要由甘露糖、鼠李糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 7 种单糖组成。此色谱条件下单糖的分离度良好,出峰稳定(见图 2A)。SRP 样品水解后,测定各单糖的峰面积并计算含量和摩尔百分比,结果见图 2B 和表 4。



1:甘露糖;2:鼠李糖;3:葡糖醛酸;4:半乳糖醛酸;5:葡萄糖;6:半乳糖;7:阿拉伯糖

图 2 单糖混合标准溶液(A)和供试品溶液(B)色谱图

表 4 山豆根粗多糖中的单糖组成分析结果

$n = 3, \bar{x} \pm s$

参数	甘露糖	鼠李糖	葡糖醛酸	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖	总含量/%
质量分数/%	0.73 ± 0.01	0.68 ± 0.01	1.17 ± 0.02	0.79 ± 0.01	48.09 ± 0.53	3.09 ± 0.02	10.42 ± 0.33	64.97 ± 0.70
摩尔比/%	1.25 ± 0.09	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.50 ± 0.01	40.47 ± 1.02	1.00 ± 0.00	10.46 ± 0.14	—

4 SRP 对不同肿瘤细胞的体外作用

用不同浓度的 SRP 分别培养 24,36,48 h 后,SRP 对 Hepal-6,HepG2,HT29 和 4T1 细胞均具有生

长抑制作用且具有浓度依赖性,见表 5 ~ 8 及图 3A、图 3B 和图 3C。给药 24 h 后, IC_{50} 值分别为 770,1 910,1 870,1 880 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,见图 3D。

表 5 不同浓度 SRP 对 Hepa1-6 细胞增殖的影响

$n = 3, \bar{x} \pm s$

药物浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%		
	24 h	36 h	48 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
200	13.08 ± 2.56	21.55 ± 8.70 ^a	20.87 ± 10.42
400	24.28 ± 8.38 ^b	29.41 ± 10.22 ^b	26.98 ± 13.58 ^b
800	49.32 ± 12.47 ^b	51.52 ± 11.89 ^b	63.50 ± 10.52 ^b
1 600	81.33 ± 0.73 ^b	80.49 ± 1.18 ^b	88.08 ± 1.23 ^b
3 200	83.15 ± 5.23 ^b	84.62 ± 5.81 ^b	90.42 ± 0.47 ^b
6 400	82.84 ± 7.08 ^b	85.95 ± 8.41 ^b	92.09 ± 0.67 ^b

与对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

表 7 不同浓度 SRP 对 HT29 细胞增殖的影响

$n = 3, \bar{x} \pm s$

药物浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%		
	24 h	36 h	48 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
200	5.52 ± 0.19	10.61 ± 0.69	15.69 ± 7.96
400	6.72 ± 1.21	10.68 ± 6.71	18.76 ± 9.57 ^a
800	12.25 ± 3.23	22.40 ± 11.50	36.60 ± 3.37 ^b
1 600	33.51 ± 13.00 ^b	48.72 ± 29.69 ^b	57.35 ± 5.65 ^b
3 200	82.95 ± 4.93 ^b	81.92 ± 6.10 ^b	79.52 ± 3.41 ^b
6 400	87.96 ± 1.01 ^b	87.92 ± 2.26 ^b	91.32 ± 3.93 ^b

与对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

表 6 不同浓度 SRP 对 HepG2 细胞增殖的影响

$n = 3, \bar{x} \pm s$

药物浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%		
	24 h	36 h	48 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
200	0.00 ± 0.00	10.09 ± 2.81 ^a	2.95 ± 0.92
400	0.00 ± 0.00	12.12 ± 1.58 ^b	18.90 ± 2.00 ^b
800	6.92 ± 4.93	15.20 ± 1.36 ^b	35.84 ± 5.94 ^b
1 600	32.30 ± 5.39 ^b	48.37 ± 2.33 ^b	66.35 ± 3.39 ^b
3 200	57.72 ± 5.29 ^b	62.68 ± 5.09 ^b	82.18 ± 2.23 ^b
6 400	74.16 ± 5.17 ^b	83.04 ± 5.01 ^b	91.99 ± 2.04 ^b

与对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

表 8 不同浓度 SRP 对 4T1 细胞增殖的影响

$n = 3, \bar{x} \pm s$

药物浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%		
	24 h	36 h	48 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
200	0.00 ± 0.00	7.78 ± 3.85	12.88 ± 4.04
400	0.00 ± 0.00	1.58 ± 0.76	22.98 ± 4.65 ^a
800	0.00 ± 0.00	27.31 ± 3.68 ^a	46.05 ± 9.51 ^a
1 600	35.50 ± 2.67 ^a	46.50 ± 3.08 ^a	70.05 ± 4.22 ^a
3 200	55.61 ± 6.52 ^a	64.79 ± 2.22 ^a	86.51 ± 4.43 ^a
6 400	77.66 ± 4.17 ^a	83.32 ± 4.09 ^a	91.43 ± 3.73 ^a

与对照组相比, a: $P < 0.01$

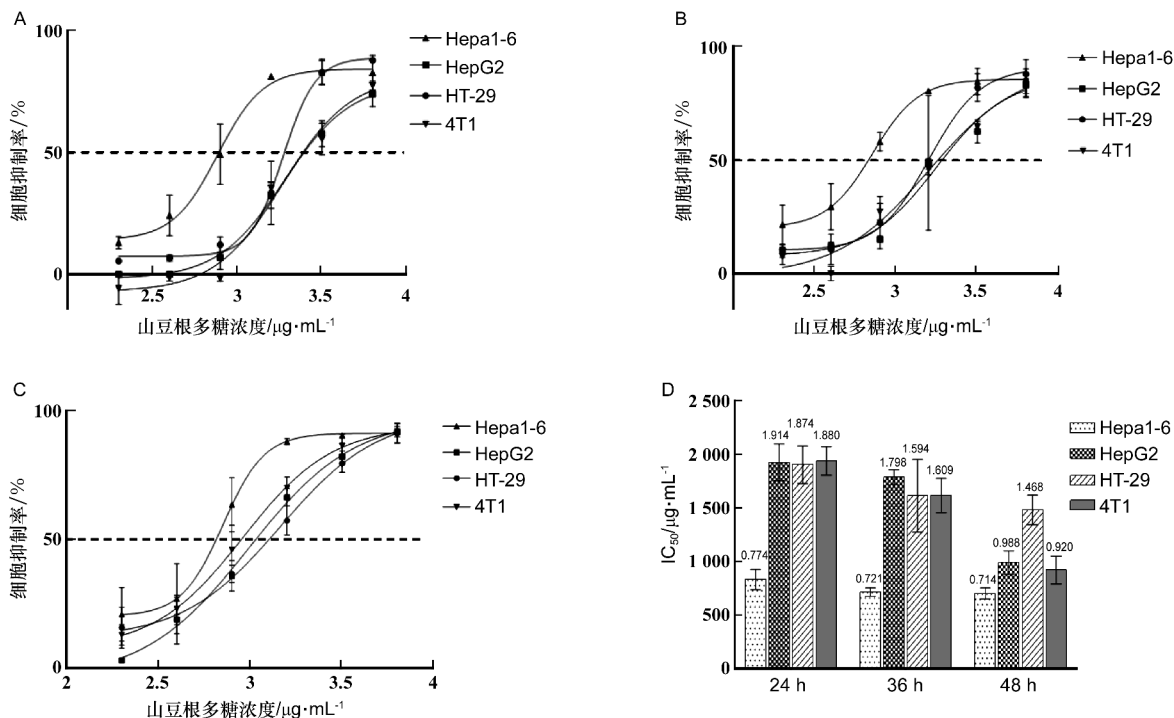


图 3 不同浓度 SRP 作用 24,36,48 h 后对不同肿瘤细胞的增殖抑制及 IC_{50} 值



讨 论

水提醇沉法是中药多糖最常用的提取方法,其遵循“相似相溶”的原理,利用中药中各成分的溶解度不同达到分离和精制的目的。煎煮法提取范围较宽,可提取药材中的大部分成分,通过煎煮法得到SRP的同时,部分黄酮、生物碱、皂苷等脂溶性物质也随之而出,通过后续3次醇沉以期达到理想的除杂效果。本研究先用乙醇回流脱脂除杂^[17],除去部分脂溶性杂质,再用水煎煮法使药渣中的大部分多糖溶出,然后加入乙醇至一定浓度,利用多糖易溶于水的性质使之沉淀析出,与脂溶性杂质分离,得到SRP。通过UV-Vis和HPLC法分析SRP中各成分含量,其中不含生物碱和蛋白质,其他成分含量稳定,多糖含量满足有效部位的含量要求,可对其进行单糖组成分析。

目前PMP柱前衍生化-HPLC法是糖类物质最常用的分析方法,具有灵敏度高、分离效果好等优点,可用于检测中性、酸性和碱性单糖^[18]。SRP的HPLC色谱图显示有7个峰,按照出峰顺序依次为甘露糖、鼠李糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖。其中葡萄糖的含量最高,占单糖总含量的3/4左右,其次是阿拉伯糖,表明SRP是一类以葡萄糖和阿拉伯糖为主要成分的杂多糖。经HPLC含量测定发现7种单糖的总含量占SRP的质量百分含量为64.97%,这与硫酸苯酚法检测的多糖含量结果较为接近,2种检测方法相互验证,表明准确度较好,具有可行性和可重复性。本研究结果与吴学昊等^[10]对SRP中单糖组成分析的研究结果略有差别,吴学昊等^[10]研究表明SRP由甘露糖、鼠李糖、葡糖醛酸、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,摩尔比为5.27:4.04:4.25:2.45:60.00:6.69:17.30。而本研究中制备的SRP中并未发现氨基半乳糖,而是出现了半乳糖醛酸。中药材的质量受多种因素影响,如产地、气候、水分、采收时期、加工方法等,由于使用的分析方法相同,故推测产生此差别是因为药材产地不同,吴学昊等^[10]使用的山豆根饮片产于广东省,而本研究的山豆根饮片产地是广西地区。

SRP能直接抑制人食管癌细胞EC109,并且可以抑制小鼠黑色素瘤细胞B16-BL6的增殖、黏附、侵袭和转移^[12,19-20],提示SRP具有直接细胞毒作用。本研究采用MTT法考察SRP对4种肿瘤细胞

的抑制作用,结果发现在一定浓度范围内,SRP具有明显的增殖抑制作用且具有时效关系,其中对肝癌细胞Hepal-6的增殖抑制作用最强,值得进一步深入研究。

综上所述,本研究提取纯化化了质量稳定的SRP,明确了其中的单糖成分含量及比例,体外初步研究了SRP的抗肿瘤细胞增殖作用,为SRP的基础成分研究提供了参考,但其体内抗肿瘤作用及机制仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020年版. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:28-29.
- [2] 陈影,陈两绵,全燕,等. 山豆根药理毒理研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(13):2439-2442.
- [3] 孙文学,宁炼,唐黎明. 山豆根保肝作用与肝毒性研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(10):50-54.
- [4] 航艾,孙杰,盛云华,等. 基于药代动力学的山豆根抗炎作用机制研究[J]. 中国药理学通报,2020,36(5):645-649.
- [5] 余登香,王淑娜,傅月朦,等. 山豆根中生物碱类成分的毒性及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(6):262-271.
- [6] CAI LL, ZOU SS, LIANG DP, et al. Structural characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *sophorae tonkinensis Radix*[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 184: 354-365.
- [7] 曹迷霞,陈奇,杨剑,等. 山豆根多糖对猪圆环病毒Ⅱ型感染免疫细胞增殖活性及炎症相关因子的影响[J]. 南方农业学报,2021,52(2):439-447.
- [8] 陈奇,文露婷,李曼,等. 山豆根多糖对人工感染罗非鱼链球菌病的预防效果[J]. 饲料研究,2021,44(15):68-72.
- [9] 袁文琳,黄峥蕊,肖思佳,等. 山豆根黄酮类成分对斑马鱼的急性毒性研究[J]. 中草药,2021,52(10):2978-2986.
- [10] 吴学昊,黄远祥,谢秀娟,等. PMP衍生化-高效液相色谱法测定山豆根中多糖的单糖组分[J]. 今日药学,2016,26(5):304-307.
- [11] NING X, LIU Y, JIA MD, et al. Pectic polysaccharides from *Radix Sophorae Tonkinensis* exhibit significant antioxidant effects[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 262: 117925.
- [12] 赵培荣,田爱琴,马湘玲,等. 山豆根对人食管癌细胞株(Eca-109)杀伤、抑制及脱氢酶类的影响[J]. 河南肿瘤学杂志,1998,11(2):87-89.
- [13] 肖正明,宋景贵,徐朝晖,等. 山豆根水提物对体外培养人肝癌细胞增殖及代谢的影响[J]. 山东中医药大学学报,2000,24(1):62-64.
- [14] 路海滨,高洋,禹珊珊,等. 山豆根多糖对Lewis肺癌小鼠抑制作用及免疫功能影响的实验研究[J]. 中药材,2018,41(6):1459-1462.
- [15] 邓中平,金冰亮,杨以阜,等. 一种山豆根多糖有效部位在制备抗肿瘤药物中的用途:CN107126457B[P]. 2017-09-05.
- [16] 郑东华,石松利,苏琨. 蒙古扁桃药材中有机酸含量的测定[J]. 时珍国医国药,2013,24(3):515-516.
- [17] 方苏,闫兴富,周立彪. 脱脂和脱蛋白处理对虫草多糖测定的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):144-146.
- [18] 刘玉红,张岱州,任文静,等. GC和HPLC分析北豆根多糖的单糖组成的方法比较[J]. 化学研究与应用,2020,32(8):1514-1518.
- [19] 李俊兰,张东兴,刘诗. 山豆根对小鼠黑色素瘤细胞B16-BL6生长、增殖的影响[J]. 光明中医,2017,32(9):1256-1259.
- [20] 李曦,高健美,龚其海. 山豆根药理作用及毒性研究进展[J]. 世界中医药,2022,17(5):743-747,752.

编辑:毕晓帆/接受日期:2022-07-13