

平卧菊三七的多糖成分与结构表征研究

吴东¹ 田先知² 黄煜³ 蔡荞薇¹ 龚建平¹ 刘慧玲¹ 吴立洵¹

1 江西中医药大学 2 抚州市检验检测认证中心 3 南昌杏林生物科技有限公司

DOI:10.12238/fcmr.v6i4.11009

[摘要] 平卧菊三七 *Gynura procumbens* (Lour.) Merr 是菊科菊三七属的一年生草本植物,又名蔓三七,在东南亚及我国广东、江西、贵州等地有广泛种植。菊三七属植物长期以来被少数民族当作草药或食用蔬菜,如菊叶三七别名称土三七,为彝族、苗族和瑶族等少数民族常用,《中国彝族药学》记载其可治疗咽喉炎、扁桃体炎和肺结核等疾病;平卧菊三七也称续命草,《云南中草药》记载其可散淤、消肿和治疗痛风等疾病,除此之外,其还可以当做蔬菜食用,马来西亚等地区还将其做茶饮。国内外报道表明该属植物普遍含有丰富的黄酮、生物碱、萜类、甾醇、酚酸和脂肪酸等成分,具有降糖、降尿酸、镇痛、抗炎、止血和抗肿瘤等药理作用。当前,菊三七属植物的研究主要集中在平卧菊三七、白子菜和灵菊七等植物,且其都表明有良好的治疗糖尿病的效果。菊三七属植物大多数药食同源,具备很高的保健食品开发潜力,有极高的蔬菜和药用价值,本文综述了菊三七属植物的化学成分和药理作用研究现状,以期为进一步综合利用该属植物的价值提供参考依据。

[关键词] 平卧菊三七; 药食同源; 化学成分; 生物活性

中图分类号: S567.23+6 文献标识码: A

Study on the composition and structure characterization of polysaccharide from the chrysanthemum Notoginseng

Dong Wu¹ Xianzhi Tian² Yu Huang³ Qiaowei Cai¹ Jianping Gong¹ Huilin Liu¹ Lixun Wu¹

1 Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine

2 Fuzhou City Inspection, Testing and Certification Center

3 Nanchang Xinglin Biotechnology Co., LTD.

[Abstract] *Gynura procumbens* (Lour.) Merr is an annual herb of the genus Notoginseng in the Compositaceae family. It is widely cultivated in Southeast Asia and Guangdong, Jiangxi and Guizhou provinces of China. Chrysanthemum Notoginseng has long been used as an herb or edible vegetable by ethnic minorities. For example, chrysanthemum leaf Notoginseng, other name Tunoqi, is commonly used by ethnic minorities such as Yi, Miao and Yao. It is recorded in Chinese Yi Pharmacy that it can treat diseases such as pharyngitis, tonsillitis and tuberculosis. Flat chrysanthemum Notoginseng is also known as life herb, "Yunnan Chinese Herbal Medicine" records that it can dissipate stasis, reduce swelling and treat diseases such as gout, in addition, it can also be eaten as a vegetable, and Malaysia and other regions will also drink it as tea. Domestic and foreign reports indicate that the plant is generally rich in flavonoids, alkaloids, terpenoids, sterols, phenolacids and fatty acids, and has pharmacological effects such as lowering blood sugar, lowering uric acid, analgesic, anti-inflammatory, hemostatic and anti-tumor. At present, the research of chrysanthemum Notoginseng mainly focuses on the plants such as flat chrysanthemum Notoginseng, white cabbage and Lingchrysanthemum, and they all show that they have good therapeutic effect on diabetes. Most of the chrysanthemum Notoginseng plants have the same origin of medicine and food, and have high potential for development of health food, and have high vegetable and medicinal value. This paper reviewed the research status of chemical constituents and pharmacological effects of Chrysanthemum Notoginseng plants, in order to provide reference for further comprehensive utilization of the value of this plant.

[Key words] Panax notoginseng; medicine and food; chemical composition; biological activity

平卧菊三七 [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr], 又称蔓三七, 为菊科菊三七属的一年生草本植物^[1], 在泰国、印度尼西亚、越南、马来西亚等东南亚国家均有广泛种植^[2], 特别是在马来西亚当地, 它也被称为“Sambungnyawa”, 有着延长生命, 包治百病及长寿的意思^[3]。菊科菊三七属 (*Gynura*) 植物种类丰富, 全球有40余种, 主要分布于亚洲、非洲和澳大利亚, 其中有10余种分布于云南、贵州和广东沿海等南方地区, 包括菊叶三七、平卧菊三七和灵菊七等^[1]。菊三七属植物长期以来被少数民族当作草药或食用蔬菜, 如菊叶三七别名称土三七, 为彝族、苗族和瑶族等少数民族常用, 《中国彝药学》记载其可治疗咽喉炎、扁桃腺炎和肺结核等疾病^[3]; 平卧菊三七也称续命草, 《云南中草药》记载其可散淤、消肿和治疗痛风等疾病^[4], 除此之外, 其还可以当做蔬菜食用, 马来西亚等地区还将其做茶饮。

国内外报道表明该属植物普遍含有丰富的黄酮、生物碱、萜类、甾醇、酚酸和脂肪酸等成分, 具有降糖、降尿酸、镇痛、抗炎、止血和抗肿瘤等药理作用。当前, 菊三七属植物的研究主要集中在平卧菊三七、白子菜和灵菊七等植物, 且其都表明有良好的治疗糖尿病的效果。菊三七属植物大多数药食同源, 具备很高的保健食品开发潜力, 有极高的蔬菜和药用价值, 本文综述了菊三七属植物的化学成分和药理作用研究现状, 以期为进一步综合利用该属植物的价值提供参考依据。

1 化学成分

平卧菊三七的化学成分具有多种类型, 研究部位主要集中在茎和叶。已分离鉴定的化学成分包括黄酮类、酚酸类、生物碱类、萜烯类、苯丙素类、脂肪酸类、甾体及其苷类等。

已从11个不同种类的菊三七属植物中分离到200种化合物, 其中包括多糖类成分、黄酮类成分, 生物碱和其他含氮类成分, 萜类和甾醇类成分, 酚酸类成分, 脂肪族类成分及其他化合物。平卧菊三七植物多糖化学成分的系统性研究未有相关内容。因此对平卧菊三七多糖成分进行提取分离纯化和结构鉴定的相关的系统性研究, 平卧菊三七多糖自然资源得到开发和充分利用。

2 多糖提取与纯化

2.1 菊三七粗多糖的提取

称取一定量的菊三七药材放入煎药罐中, 加入20倍量的水煎煮3h(共两次), 合并煎液, 浓缩后用2倍95%乙醇醇沉12-24h(看沉淀性状)。之后, 离心10min(4000rpm/min), 取沉淀用适量纯净水复溶, 离心10min(4000rpm/min), 取上清液浓缩至适宜体积(最终要冻干, 所以浓缩至多糖不粘壁为宜), 待冷却后放入冰箱(-40℃)预冻2h, 最后冷冻干燥得菊三七粗多糖。

2.2 菊三七多糖的纯化

大孔树脂HP20装柱及再生: 取大孔树脂HP20装柱(34×10cm), 装至 $\frac{3}{4}$ 柱体积, 先用甲醇冲洗至树脂颜色变浅后, 再用无水乙醇冲洗至无颜色, 最后用纯化水冲洗至无醇味。^{[4][5]}粗多糖加蒸馏水搅拌溶解, 离心, 将上清液加入到大孔树脂HP-20中进行分离, 用水, 10%乙醇水, 20%乙醇水分别洗脱, 收集各流分, 根

据硫酸苯酚法显色和490nm检测结果合并相同流分, 再进行浓缩, 干燥得3个次级组分。

葡聚糖凝胶(SephadexG200)^[6]纯化称取脱色后的菊三七多糖适量, 加入40mL蒸馏水使其充分溶解,^[7]离心10min(4000rpm/min), 取上清液上样。用蒸馏水洗脱, 苯酚-硫酸法显色, 收集各部分馏分。浓缩后分别进行冷冻干燥, 得到不同分子量大小的均一多糖。

3 主要的结构解析

3.1 单糖组成成分

平卧菊三七样品酸水解: 取样品约5mg均一平卧菊三七多糖样品, 放入30mL带刻度带塞的磨口试管内, 加入约3mL, 2.0mol/L的三氟乙酸(TFA), 120℃油浴水解进行反应6小时, 在进行减压蒸干溶液, 再加入约3mL甲醇进行蒸干(重复3次, 以除净三氟乙酸), 全部处理。

还原与乙酰化: 将水解后的样品, 溶于3mL的去离子水中, 加入40mg的硼氢化钠, 在室温下还原2h(不时地摇匀), 之后逐滴加入20%的乙酸, 以分解过量的NaBH₄, 直到无气泡产生, 将溶液减压蒸干, 再加入约3mL的甲醇再减压(重复3次, 以除尽乙酸)蒸干。然后加入3mL乙酸酐-吡啶(1:1), 100度下反应1h, 取出减压蒸干, 加入氯仿进行萃取, 之后取上清液直接进气相进行分析。

MS条件: 电子能量70eV, 离子源200℃, 接口温度250℃, 溶剂切除2.5min。

GC条件: 柱温: 140℃, 进样口温度: 280℃; 总流速: 37.8; 柱流速: 1.65。

程序升温条件: 初始140℃→2℃/min到180℃→1℃/min到185℃(保持3min)→1℃/min到188℃(保持5min)→1℃/min到192℃(保持2min)→2℃/min到200℃→5℃/min到250℃(保持4min)。

3.2 平卧菊三七总糖含量的测定

标准溶液的配制: 称取各平卧菊三七单糖对照品5.0mg, 根据之前平卧菊三七单糖组成进行, 各均一平卧菊三七多糖, 定容至10.0mL容量瓶中。

标准曲线的建立: 吸取1mL各标准液于第一个试管中, 对倍稀释成0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1mg/mL的标准溶液。取各浓度标准液0.5mL, 加入5%的苯酚溶液0.5mL, 再加入2.5mL的浓硫酸, 震荡5min, 室温放置15min, 吸光度在490nm下测定, 以0.5mL的去离子水作空白对照。回归曲线以浓度与吸光度值作图。

样品溶液的测定: 精密称定平卧菊三七多糖样品2.0mg, 置于10mL容量瓶中, 配制成0.2mg/mL的溶液, 吸取样品液0.5mL于试管中, 按以上步骤测定吸光度值, 均一平卧菊三七多糖按各自回归方程, 计算总糖含量。

均一多糖甲基化反应

SM液的制备, 甲基化反应

甲基化反应是提供糖基被取代位置信息的主要手段, 小心称取带油的氢氧化钠(NaH)2g, 置于100mL二口烧瓶中, 加入无水石油醚20mL, 震荡片刻, 静置沉降, 倾去石油醚, 此过程重复3次, 得

到无油NaH。然后通氮气(N₂)吹干NaH直至粉末状(灰白色)。放入搅拌子, N₂保护, 将反应瓶置于磁力搅拌器上, 缓慢地注入无水DMSO(20mL), 油浴(50℃)反应6h。最后将反应混悬液(甲基亚磺酞甲基钠)装于50mL离心管中, 充满N₂保存备用。

打开塞子, 通N₂将反应液中剩余的碘甲烷吹尽, 对自来水透析(1-2d)或者用超滤膜过滤, 冷冻干燥, 既得甲基化样品, 经IR分析, 若在3500cm⁻¹基本无吸收, 说明甲基化完全, 若没有, 再甲基化一次, 直到甲基化完全为止。

甲基化平卧菊三七多糖衍生物的制备: 将已完全甲基化的样品, 用约3mL甲酸溶解, 密封。100℃下水浴进行解聚反应(约6小时)减压蒸干甲酸, 再加入约3mL甲醇, 蒸干(此过程重复3次以充分除去甲酸), 均是用三氟乙酸完全水解后, 再乙酰化。GC-MS条件也与单糖组成分析一致。

4 分析

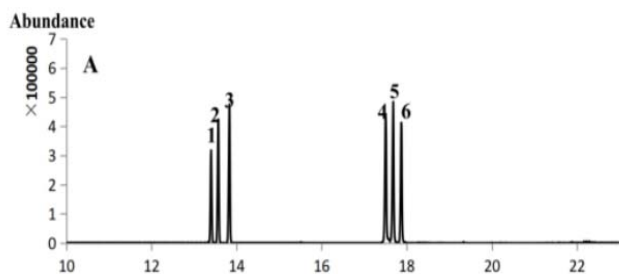


图1单糖标准品气相色谱峰: (1: 鼠李糖; 2: 阿拉伯糖; 3: 木糖; 4: 甘露糖; 5: 葡萄糖; 6: 半乳糖)

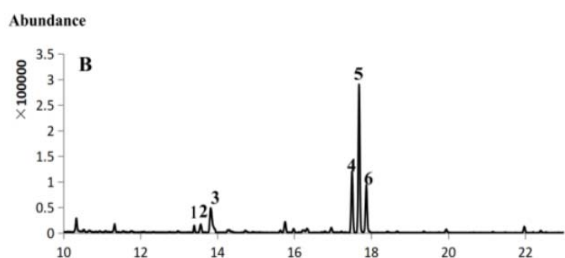


图2 多糖样品GPPS-b气相色谱峰: (1: 鼠李糖; 2: 阿拉伯糖; 3: 木糖; 4: 甘露糖; 5: 葡萄糖; 6: 半乳糖)

4.1平卧菊三七单糖组成分析采用气相色谱测定平卧菊三七多糖的单糖组成

将各单糖标准品乙酰化处理, 通过气相色谱仪得到各单糖的气相分析色谱图, 确定各平卧菊三七单糖保留时间, 如图1所示。然后将GPPS-b进行还原乙酰化处理, 取平卧菊三七多糖10mg, 加入3mL配置好的2mol/L的三氟乙酸, 在110℃下水解4h, 后用甲醇洗涤, 除去三氟乙酸的残留。将水解后的样品还原成糖醇, 在还原过程中加硼氢化钠后视情况可适量补加氨水, 然后旋干。蒸干后, 按照处理标准品的方式, 加入1:1乙酸酐(500 μL)和吡啶(500 μL)溶液于90℃反应30min。冷却后, 加水和氯仿萃取3次, 残渣用氯仿溶解, 0.22 μm有机相滤膜过滤, 取过滤清液, 待GC分析。气相色谱条件: SH-Rtx-5硅毛毛细管柱(30m×0.25mm×0.25

μm), 载气为N₂, 进样量为1 μL, 温度条件为: 初始温度为100℃保持0min, 以5℃/min从180℃升到250℃, 后以10℃/min从250℃升到320℃, 保持5min。通过气相色谱仪得到GPPS-b的气相色谱图, 如图2所示, 通过保留时间比对确定单糖组成, 测得GPPS-b主要由葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、半乳糖(Gal)阿拉伯糖(Ara)、鼠李糖(Rha)组成。

4.2甲基化分析

平卧菊三七单糖单元间的连接类型由甲基化分析确定, PLP-1经完全甲基化后, 水解、还原、乙酰化, 得到部分甲基化糖醇乙酐酯(PMAA)衍生物, 然后进行GC-MS测定, 根据CCRC光谱数据库中的标准数据和文献。样品的水解与乙酰化相同故不再赘述。利用GC-MS对总离子图进行分子离子峰碎片分析, 归属各连接不同类型糖苷组成。如表1所示, 多糖结构是以吡喃糖环Glc为主骨架构成, 其主要结构由Araf-(1→, →4)-Rhap-(1→, →4)-Xylf-(1→, Manp-(1→, Galp-(1→, →4)-Glc-(1→, →6)-Glc-(1→, →3)-Galp-(1→, →6)-Manp-(1→, →4, 6)-Glc-(1→组成。

表1 相对保留时间及糖苷键类型

序号	保留时间 (min)	甲基化阿尔迪醇乙酐酯	连接方式	碎片离子 (m/z)
1	12.72	2,3,5-tri-O-methyl-1,4-di-O-ac	Araf-(1→	87,101,117,129,189,233
2	13.08	2,3-tri-O-methyl-1,4,5-di-O-ac	→4)-Rhap-(1	87,89,99,115,129,131, 189
3	15.36	2,3-di-O-methyl-1,4,5-tri-O-ac	→4)-Xylf-(1	87,101,117,129,173,189,233
4	16.88	2,3,4,6-tetra-O-methyl-1,5-O-a	Manp-(1→	87,101,117,129,161,189,205
5	17.28	2,3,4,6-tetra-O-methyl-1,5-O-a	Galp-(1→	87,101,117,129,145,161,189,
6	17.66	2,3,6-tri-O-methyl-1,4,5-	→4)-Glc-(1	87,101,117,129,161,173,189,
7	18.15	2,3,4-tri-O-methyl-1,5,6-	→6)-Glc-(1	87,101,117,129,161,173,233
8	19.26	2,4,6-tri-O-methyl-1,3,5-	→3)-Galp-(1	87,101,117,129,145,161,189,
9	19.55	2,3,4-tri-O-methyl-1,5,6-	→6)-	87,101,117,129,161,173,189,
10	20.06	2,3-di-O-methyl-1,4,5,6-tetra-O	→4,	87,101,117,129,189,233

本研究对GPPS-b的结构进行了初步表征, 得到GPPS-b的部分结构信息, 得到相对分子质量、单糖组成及相应摩尔质量比, 通过红外得到一些官能团信息, 通过甲基化分析GC-MS得到不同糖苷组成的连接方式。

5 结语

平卧菊三七作为一种传统的药食两用植物, 具有多种药用价值, 在东南亚有广泛的栽培和悠久的食用历史。近年来我国引进并栽培后, 人们对其开发及利用也逐渐兴起。

菊三七属植物化学成分种类多, 药理活性广泛, 在我国拥有广泛的药用及食用基础, 因其广阔的开发前景, 已有诸多企业对其进行人工种植。菊叶三七时常被当做三七使用, 肝毒性是限制其发展的主要原因, 吡咯里西啶生物碱对菊三七属植物的用药安全和食用安全构成威胁, 迫切需要进一步深入研究, 阐明其毒性机制, 寻找有效的解毒策略。除此之外, 该属植物的质量标志物并不明确也是限制其发展的重要原因, 其含有的多糖、酚酸和黄酮类成分普遍较高, 但成分结构较为简单, 需进一步深入研究菊三七属植物功效和活性物质之间的关联, 以便确定质量标志物, 制定其质量标准。深度开发平卧菊三七资源并提升其价值有重要意义。

[项目基金]

江西省中医药管理局科研计划(2021B606)。

[参考文献]

[1]杜清,许晓辉,林鹏程,等.植物多糖的研究进展及开发前景[J].转化医学电子杂志,2017,4(4):78-82.

[2]赵西哲,李想,顾兴贵.平卧菊三七扦插繁殖切口形状对植株根系影响的初步研究[J].吉林林业科技,2021,50(02):1-2.

[3]Siriamornpun Sirithon, Kaewseejan Niwat, Chumroenphat Theeraphan, Inchuen Sudathip. Characterization of polysaccharides from *Gynura procumbens* with relation to their antioxidant and anti-glycation potentials[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 32 (prepublish): SZYB20216113

[4]Guo Sa, Ouyang Hui, Du Wendi, Li Junmao, Liu Mi, Yang Shilin, He Mingzhen, Feng Yulin. Exploring the protective effect of *Gynura procumbens* against type 2 diabetes mellitus by network pharmacology and validation in C57BL/KsJ db/db mice.[J]. Food & function, 2021, 12(4):.

[5]Kim Woosuk, Jung Hyo Young, Yoo Dae Young, Kwon Hyun

Jung, Hahn Kyu Ri, Kim Dae Won, Yoon Yeo Sung, Choi Soo Young, Hwang In Koo. *Gynura procumbens* Root Extract Ameliorates Ischemia-Induced Neuronal Damage in the Hippocampal CA1 Region by Reducing Neuroinflammation.[J]. Nutrients, 2021, 13(1):.

[6]Nain Zulkar, Mansur Fariha Jasin, Syed Shifath Bin, Islam Md Ariful, Azakami Hiroyuki, Islam Md Rezuana, Karim Mohammad Minnatul. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and other virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by polyphenols of *Gynura procumbens* leaves.[J]. Journal of biomolecular structure & dynamics, 2021.

[7]陈炜炜,高婷婷,廖梦凡,等.平卧菊三七的形态特征和影响因素[J].湖北农机化,2020,(12):31-32.

[8]郭斌.基于网络药理学的平卧菊三七治疗Ⅱ型糖尿病的机制研究[D].江西中医药大学,2020.

作者简介:

吴东(1987-),男,汉族,江西南昌人,本科,工程师,从事食品与功能食品研究与开发。