

淫羊藿多糖硫酸化修饰条件的优化

卢宇¹, 胡元亮^{1*}, 孙峻岭¹, 黄小燕¹, 王德云¹, 赵晓娜¹, 王效田²

(1. 南京农业大学 中兽医学研究室, 江苏 南京 210095; 2. 南京市浦口区兽医站, 江苏 南京 210095)

摘要: 目的 优化淫羊藿多糖硫酸化修饰的最佳条件。方法 采用氯磺酸-吡啶法。以硫酸基取代度和糖的质量分数为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对反应温度、试剂配比和反应时间进行优选。结果 反应温度对修饰的影响最大, 适宜的修饰条件为反应温度80℃, 氯磺酸与吡啶的体积比在1:8~1:10, 反应时间2~3 h。结论 采用优化的条件对淫羊藿多糖进行硫酸化修饰可以获得理想的硫酸化淫羊藿多糖。

关键词: 淫羊藿多糖; 硫酸化修饰; 氯磺酸-吡啶法; 试剂配比

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)03-0357-03

Optimization of sulfated modification conditions in epimedium polysaccharide

LU Yu¹, HU Yuan-liang¹, SUN Jun-ling¹, Huang Xiao-yan¹, WANG De-yun¹,
ZHAO Xiao-na¹, WANG Xiao-tian²

(1. Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Nanjing Pukou District Veterinary Workstation, Nanjing 210095, China)

Abstract: **Objective** To optimize the sulfated modification conditions of epimedium polysaccharide (EPS). **Methods** EPS was modified by chlorosulfonic acid-pyridine method. $L_9(3^4)$ Orthogonal test was used to optimize the reaction temperature, reagent formula, and reaction time with the degree of sulfate group and carbohydrate content as index. **Results** The most important affecting factor was reaction temperature. The optimized modification conditions were the reaction temperature of 80℃, the ratio of chlorosulfonic acid to pyridine of 1:8~1:10, and the reaction time of 2~3 h. **Conclusion** The better sulfated EPS could be obtained using optimized modification conditions.

Key words: epimedium polysaccharide (EPS); sulfated modification; chlorosulfonic acid-pyridine method; reagent formula

硫酸化多糖也称硫酸酯多糖或多糖硫酸酯,是指糖羟基上带有硫酸根的多糖,其生物活性明显不同于或显著强于天然多糖。许多天然多糖原来不具有生物活性或生物活性很弱,经硫酸化修饰后获得或增强了活性^[1],尤其是抗病毒、抗肿瘤、抗艾滋病、对免疫系统作用和抗凝等活性显著增强。淫羊藿多糖(epimedium polysaccharide, EPS)是淫羊藿的活性成分,具有增强免疫、抗病毒和调节内分泌系统等多种生物活性^[2,3]。本研究室采用氯磺酸-吡啶法对EPS进行修饰,测定了硫酸化EPS对鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)感染鸡胚成纤维细胞(CEF)的影响,结果表明修饰后的EPS抵抗IBDV感染CEF的活性显著增强^[4]。由于硫酸化修饰受多种因素的影响,筛选出最佳修饰条件至关重要,因此本实验考察了淫羊藿多糖硫酸化修饰条件的优化过程。

1 材料与仪器

淫羊藿购于南京大华中药房,由南京农业大学园艺学院中药学周立良副教授鉴定为箭叶淫羊藿。氯磺酸、吡啶、蒽酮(分析纯),上海凌峰试剂有限公司; ADS-7 大孔树脂,安徽省蚌埠天星树脂有限公司; DEAE SephadexTM A-25, Amersham Biosciences; 透析袋(截留相对分子质量1 000),上海绿鸟科技发展有限公司。

色谱柱、恒流泵和密度色谱混合仪,上海青浦沪西仪器厂; 99—2 恒温磁力加热搅拌器,江苏金坛新一佳仪器厂制造; 冷冻干燥机, Labconco; 722 光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂。

2 方法与结果

2.1 EPS的制备: 取箭叶淫羊藿2.0 kg,加8倍水煎煮2次,合并滤液浓缩至2 000 mL,缓慢加入95%

* 收稿日期: 2007-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571360); 江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(2006)

作者简介: 卢宇(1978—),男,江苏睢宁人,博士研究生,主要从事兽医中药学与中药药理学研究。E-mail: 2005207022@njau.edu.cn

* 通讯作者 胡元亮 Tel: (025) 84395203 E-mail: ylu@njau.edu.cn

乙醇至含醇量达70%，搅匀，静置24 h，取沉淀，挥去乙醇，加蒸馏水溶解，重复醇沉1次。取沉淀冷冻干燥，得粗淫羊藿多糖42.77 g。然后用三氯乙酸法除去蛋白，过ADS-7大孔树脂柱、DEAE SephadexTM A-25色谱柱(0.05~1.0 mol/mL NaCl溶液洗脱)，自来水流水透析48 h，蒸馏水透析24 h，冷冻干燥，即得纯化的EPS^[5]。

2.2 修饰条件设计：由于反应温度、试剂配比、反应时间对多糖硫酸酯化的影响较大^[6]，在预试验的基础上，以修饰试剂的反应温度、氯磺酸与吡啶的体积比和反应时间为因素，按3因素3水平的正交试验 $L_9(3^4)$ 设计9种修饰条件。

2.3 酯化试剂的制备：将带有搅拌(磁力搅拌)和冷凝装置的三颈烧瓶置冰盐水中，加入25 mL无水吡啶，快速搅拌，充分冷却后，按表1设定的氯磺酸与吡啶的体积比，边搅拌边逐滴加氯磺酸，于40 min内加完。反应结束后，撤去冰盐水和磁力搅拌装置。共制备9份酯化试剂。

2.4 修饰反应的操作：分别精确称取纯化的EPS 500.0 mg，加入酯化试剂中，按表1设定的水浴温度和反应时间搅拌反应，反应结束后冷却至室温，反应液加入预冷的100 mL冰水中，用15%氢氧化钠溶液中和至pH 7.0，边摇边缓慢加入3倍体积的无水乙醇，静置24 h，离心，取沉淀装入透析袋自来水流水透析48 h、蒸馏水透析24 h，冷冻干燥，得9种硫酸化淫羊藿多糖(sulfated EPS, sEPS)。

2.5 蒽酮-硫酸法测定糖的质量分数^[7]

2.5.1 标准曲线的绘制：精确称取经105℃恒重的D-葡萄糖25.0 mg，定容于100 mL量瓶，在6支带塞试管中分别加入葡萄糖对照品溶液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，然后加蒸馏水至2.0 mL，加0.2%蒽酮浓硫酸1.0 mL，迅速垂直液面加入浓硫酸4.0 mL，混匀后在沸水浴中加热6 min，冷却后用分光光度仪在610 nm处测定吸光度(以0管吸光度值为校正值)，重复3次。以D-葡萄糖对照品溶液质量浓度对吸光度值绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 0.0306X + 0.0023$ ， $r^2 = 0.996$ 。

2.5.2 样品测定：将待测样品经105℃恒重，精密称取2~5 mg置于10 mL量瓶中，加去离子水溶解并稀释至1.0 mg/mL。吸取0.4 mL于带塞试管中($n = 4$)，按2.5.1法测定各样品吸光度，求平均数后代入回归方程，计算多糖的质量分数。

2.6 氯化钡-明胶法测定硫酸基取代度^[7]

2.6.1 标准曲线绘制：在5支试管中分别加入100

μg/mL硫酸钾对照品溶液0、0.1、0.2、0.3、0.4 mL，加去离子水至0.4 mL，再加入0.35 mL三氯乙酸溶液和0.25 mL氯化钡明胶溶液，混合。静置15~20 min，在360 nm波长下测定浊度。同法用0.25 mL明胶溶液替代氯化钡明胶溶液测定360 nm处的吸光度值。重复3次。用有氯化钡存在的平均吸光度值减去此溶液无氯化钡存在的平均吸光度值为最终吸光度值。以 SO_4^{2-} 质量浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 37.156X - 0.0811$ ， $r^2 = 0.995$ 。

2.6.2 样品测定：称取样品(1~3 mg)放入盛有1.0 mol/mL HCl的试管中，密封，于100℃水解6 h，冷却后开启试管，内容物于40℃减压旋转蒸干，残渣用1.0 mL蒸馏水溶解。同2.6.1项下方法测定有、无氯化钡吸光度的差值($n = 4$)，然后根据回归方程和公式[取代度 $DS = 162 \times (SO_4^{2-} \%) / 100 - (96 / 98 \times SO_4^{2-} \%)$]计算样品的硫酸基取代度。

2.7 试验结果分析：见表1。以DS为指标，反应温度的影响最大，其次是反应时间，试剂配比的影响作用最小，最佳组合为 $A_2B_3C_3$ ；以糖质量分数为指标，也是反应温度的影响最大，试剂配比次之，反应时间影响最小，最佳组合为 $A_2B_2C_1$ 。两个指标中A因素即温度的效应是可靠的。进一步进行方差分析，各因素影响硫酸基取代度和糖质量分数的差异不显著($P > 0.05$)。根据本结果和从实际生产考虑，反应温度为80℃，氯磺酸与吡啶的体积比应在1:8~1:10，时间2~3 h为宜。

2.8 验证试验：进一步重复80℃时3种条件，并将反应原料(酯化试剂和淫羊藿多糖)数量增加1倍，其他条件不变进行硫酸化反应，得到的相应多糖硫酸酯的糖质量分数和DS，分别为48.526%、0.773%，70.148%、0.699%，30.632%、0.841%。与原来无显著性差异，重复性好。笔者对9种硫酸化淫羊藿多糖的体外抗病毒活性比较也证明，在80℃下，氯磺酸与吡啶的体积比为1:8，反应3 h获得的sEPS5的活性最好^[4]。

3 讨论

多糖硫酸酯化的方法很多，一般吡喃型多糖采用Wolfson法，常用的方法有浓硫酸法、三氧化硫-吡啶法和氯磺酸-吡啶法^[8]。淫羊藿多糖为吡喃型多糖，采用氯磺酸-吡啶法修饰具有反应条件相对简单、硫酸基取代率高、产物回收方便和收率较高等优点^[9]，为大多数研究者采用。一般认为，升高温度可以提高产物的硫酸基取代度。但本实验发现，当温度

表1 L₉(3⁴) 正交试验结果
Table 1 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	多 糖	A 反应温度/	B 氯磺酸与吡啶的体积比	C 反应时间/h	D(误差)	DS/ %	糖质量分数/ %
1	sEPS ₁	60	1 6	1	1	0.097	31.843
2	sEPS ₂	60	1 8	2	2	0.484	62.474
3	sEPS ₃	60	1 10	3	3	1.120	50.949
4	sEPS ₄	80	1 6	3	2	0.772	49.938
5	sEPS ₅	80	1 8	1	3	0.696	72.380
6	sEPS ₆	80	1 10	2	1	0.834	28.049
7	sEPS ₇	95	1 6	2	3	0.351	21.027
8	sEPS ₈	95	1 8	3	1	0.074	27.699
9	sEPS ₉	95	1 10	1	2	0.089	36.190
DS	K ₁	0.567	0.407	0.294	0.335		
	K ₂	0.767	0.418	0.556	0.448		
	K ₃	0.171	0.681	0.655	0.722		
	R	0.596	0.274	0.361	0.387		
糖质量分数	K ₁	48.222	34.269	46.804	29.197		
	K ₂	50.122	54.184	37.183	49.534		
	K ₃	28.305	38.396	42.729	47.967		
	R	21.817	19.915	9.621	20.337		

升高到95℃时,硫酸基的取代度和糖质量分数明显降低,可能是淫羊藿多糖的结构被破坏,因此反应温度宜控制在80℃。也有认为,提高氯磺酸的比例有利于酯化反应,但实际操作中氯磺酸比例高,会出现板结,搅拌困难,以致反应不均^[6~8]。

参考文献:

[1] Dace R. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides [J]. *Thrombosts Res*, 1997, 87(1): 113-121.

[2] Nada Kovačević, Miodrag Čolić, Aleksandar Backović, *et al.* Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum in vitro* [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77: 561-567.

[3] 胡元亮,孔祥峰,李祥瑞,等. 10种中药成分对 CEF 的增殖和

抵抗 NDV 感染的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(3): 301-305.

[4] Lu Y, Wang D Y, Hu Y L, *et al.* Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71(2): 180-186.

[5] 李德耀. 淫羊藿多糖的分离纯化、结构分析和免疫活性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2005.

[6] 陈景耀,吴国荣,王建安,等. 正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究 [J]. *中草药*, 2005, 36(1): 43-46.

[7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社. 1999.

[8] 燕航,钟耀广,王淑琴,等. 硫酸酯化香菇多糖衍生物制备的研究 [J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(3): 44-46.

[9] 刘占峰,孙汉文. 多糖的化学修饰研究进展 [J]. *河北大学学报: 自然科学版*, 2005, 25(1): 104-108.

超滤和纳滤分离技术提取纯化地黄低聚糖的研究

董 艳¹,高瑞昶^{1*},潘 勤²,阎晓楠²

(1. 天津大学化工学院,天津 300072; 2. 天津中新药业集团股份有限公司技术中心,天津 300457)

摘 要: 目的 通过不同截留相对分子质量的超滤膜对地黄多糖分离纯化,再利用纳滤膜对超滤液进行浓缩纯化。方法 采用不同截留相对分子质量超滤再纳滤的工艺流程。结果 两次超滤得到低聚糖,最佳操作条件为:料液质量浓度为13~132 mg/ mL,操作压力为0.25~0.275 MPa,温度20~40℃。然后采用纳滤膜对超滤液进行浓缩纯化,适宜工艺条件为:料温为20~40℃,操作压力0.59~0.79 MPa,浓缩倍数可达3倍。应用超滤-纳滤技术,低聚糖得率为46.63%,质量分数达到93.3%,凝胶过滤法验证低聚糖制品的相对分子质量低于6 000。结论 该工艺能有效分离纯化地黄低聚糖,简单可行,操作简便。

关键词: 地黄低聚糖;超滤;纳滤;分离;纯化

中图分类号:R 286.1 文献标识码:A 文章编号:0253- 2670(2008) 03- 0359- 05

* 收稿日期: 2007-09-29
 作者简介:董 艳(1981—),女,河北沧州人,硕士,研究方向为膜分离技术与化学工程。E-mail: yan yan-422@ 126.com
 * 通讯作者 高瑞昶 E-mail: gaoruichang@ yahoo. com. cn