

硫酸酯化防风多糖的制备及其抗氧化作用研究

张泽庆, 张 静*, 张宏艳, 孙明礼, 柳 红

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 目的 对防风多糖(SPS)进行硫酸酯化修饰,并研究其抗氧化活性。方法 用三氧化硫²吡啶法对防风多糖进行硫酸酯化修饰得到硫酸酯化防风多糖(Σ SPS),利用紫外、红外分析手段对 Σ SPS进行鉴定,通过气相色谱方法研究其单糖组成,并在体外化学模拟条件下,研究SPS和 Σ SPS的总还原能力以及对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot OH$)的清除作用。结果 SPS和 Σ SPS均由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, Σ SPS的抗氧化活性明显好于SPS。结论 硫酸酯化可以改善防风多糖的水溶性,提高其抗氧化活性,是防风多糖分子修饰的一种好方法。

关键词: 防风多糖;硫酸酯化;抗氧化

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)082-12082-04

许多疾病与自由基导致的生物大分子如蛋白质、脂质以及DNA氧化损伤有关,尤其是活性氧如超氧阴离子自由基、羟基自由基、脂质自由基与心脑血管疾病、糖尿病、癌症等密切相关,而合成的各种抗氧化剂对肝脏的损伤和致癌作用已成为不容忽视的问题^[1]。研究资料表明,药用植物多糖具有较强的抗氧化活性^[2],其活性的大小直接或间接地受到其分子结构的影响,采取一定的方法对多糖的分子结构进行适当修饰能够提高其原有的活性或增加新的活性。目前,对多糖进行修饰的方法有硫酸酯化、磷酸化、乙酰化、烷基化、磺酰化、羧甲基化等,其中硫酸酯化最为常用。硫酸酯化修饰不但可能增强原多糖的某些活性或产生新的生物活性,而且可以改善原多糖的水溶性^[3]。

防风为伞形科多年生草本植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 的根,又名屏风、风肉、茴芸、茴草。研究表明防风水提液具有明显的体内抗肿瘤和增强机体免疫功能的作用,大分子多糖为其主要活性成分。防风多糖的分子修饰,目前国内外尚未见相关文献报道,为此,本实验对防风多糖(SPS)进行了硫酸酯化,并对其抗氧化作用进行了研究,以期对防风多糖的开发利用提供实验数据和参考资料。

1 材料和仪器

1.1 材料与试剂: 防风购于西安市中药材店,经陕西师范大学药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室田先华教授鉴定为 *S. divaricata* (Turcz.)

Schischk 未抽花茎植株的干燥根。邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、邻二氮菲(1,10-菲啰啉)、硫酸亚铁、双氧水、三氯乙酸(TCA)、三氯化铁、铁氰化钾、吡啶、氯化钡、硫酸钾、乙酸酐、盐酸羟胺、明胶、各种单糖标准品、三氧化硫²吡啶等均为分析纯。

1.2 主要仪器: U23010 Spectrophotometer 紫外可见分光光度计(日本日立公司制造);LXJ-0B型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂);ALPHA 1)4型真空冷冻干燥机(德国CHRIST公司);PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司);TRACE气相色谱仪(美国菲尼根);EQUINX55型傅里叶变换红外光谱仪(德国Brucher公司)。

2 实验方法

2.1 SPS的提取: 按照文献方法^[4]优化出的最佳工艺提取SPS。

2.2 硫酸酯化防风多糖(Σ SPS)的制备: 三氧化硫²吡啶法^[5,6]制备 Σ SPS。

2.3 Σ SPS的定性判断与定量分析: 利用紫外和红外光谱扫描判断防风多糖硫酸酯化是否成功,硫酸钡比浊法^[7]测定硫酸基的量,根据公式计算取代度(DS): $DS = 11.62 \times S\% / (32 - 11.02 \times S\%)$ 。

2.4 SPS和 Σ SPS的气相色谱分析: 分别称取30 mg SPS和 Σ SPS,放入具塞试管中,加入0.15 mol/L硫酸溶液3 mL后,封管,在105℃水解8 h,水解液加少量蒸馏水,用BaCO₃中和后离心,上清液冷冻干燥,干燥后的样品经糖腈乙酸酯衍生化^[8,9]后,进行气相色谱分析。称取10 mg单糖标

* 收稿日期: 200901228

基金项目: 国家自然科学基金(10874108);陕西省自然科学基金研究计划资助(SJ08A16);陕西师范大学实验室开放基金项目资助

作者简介: 张泽庆(1979),男,河南南阳人,硕士,研究方向为植物有效成分开发与利用。E2mail: zeqingzhang@126.com

* 通讯作者: 张 静 E2mail: zhangjin@snnu.edu.cn

准品同法衍生化并气相色谱分析。色谱柱:石英毛细管柱;FID 检测器;柱温, 150 e 保持 01 5 min, 7 e /min 程序升温到 190 e, 再以 15 e /min 程序升温到 250 e;检测器温度, 250 e;进样口温度, 250 e;载气: N₂, 30 mL/min, 空气 2H₂ 是 350 B 35。以肌醇六乙酸酯为内标, 按文献的方法计算样品中各单糖的物质的量的比。

21 5 SPS 和 S2SPS 的抗氧化作用测定

21 51 1 SPS 和 S2SPS 的总还原力测定: 参照曹炜等^[10]的方法, 在 10 mL 试管中分别加入不同质量浓度(1、2、4、6、8 mg/mL)的 SPS 或 S2SPS 溶液 1 mL, 磷酸盐缓冲溶液(01 2 mol/L, pH = 61 6) 01 5 mL 和 01 3% 铁氰化钾 11 5 mL, 置于 50 e 水浴中反应 20 min, 然后加入 10% 的三氯乙酸 1 mL, 混匀后以 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 2 mL, 加 01 3% 三氯化铁溶液 01 5 mL, 摇匀后在 700 nm 处测定吸光度值, 每个浓度平行做 3 管, 取其平均值。

21 51 2 SPS 和 S2SPS 清除超氧阴离子自由基(O⁻)能力测定: 采用邻苯三酚自氧化法^[11], 按照表 1 的方法进行加样, 以空白作对照测定样品在 325 nm 下的吸光度值, 每隔 01 5 min 记录 1 次, 连续记录 4 min, 各管的氧化速率及对 O⁻ 的清除率按下列公式进行计算。

氧化速率= (最后 1 次记录值- 第 1 次记录值)/ 4

清除率= (自氧化管氧化速率- 样品管氧化速率)/ 自氧化管氧化速率 @100%

表 1 邻苯三酚自氧化法加样表

Table 1 Adding samples of selfoxidation of 1, 2, 3phenetriol

试 剂	空白管/mL	自氧化管/mL	样品管/mL
Tri2HCl	41 5	41 5	41 5
蒸馏水	01 48	01 4	)
邻苯三酚	)	01 08	01 08
SPS 或 S2SPS	)	)	01 4
总体积	41 98	41 98	41 98

21 51 3 SPS 和 S2SPS 清除羟自由基(# OH)能力测定: 按照文献方法^[12], 采用邻二氮菲2金属铁离子2 H₂O₂ 体系测定 SPS 和 S2SPS 对 # OH 的清除能力。

3 结果与分析

31 1 SPS 硫酸酯化的结果: 01 500 1 g SPS 经三氧化硫2吡啶法硫酸酯化后得到 01 717 4 g S2SPS, 得率为 1431 45%, 硫酸钡比浊法测得 S2SPS 的硫酸基的量为 191 385 3%, 取代度(DS)为 01 412。SPS 经硫酸酯化后颜色由浅棕色变为棕黄色, 且在水中的溶解性能显著改善。

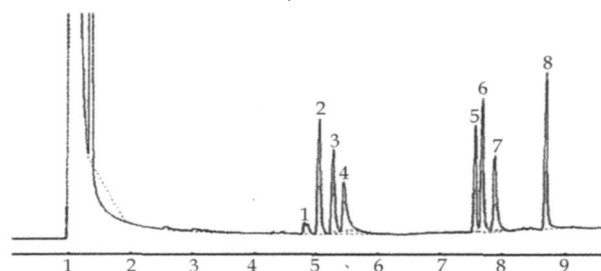
31 2 S2SPS 的光谱学鉴定结果: 紫外光谱扫描显示, S2SPS 在 218、264 nm 左右处出现了 2SO₂和 2SO₃ 的吸收, 而 SPS 在 200~ 400 nm 范围内没有出现吸收峰, 初步说明 SPS 硫酸酯化已经成功。

SPS、S2SPS 的红外光谱显示, 硫酸酯化前后的 SPS, 在吸收波形、波数、吸收峰强度、峰宽等指标上十分接近, 说明两者的成分非常相似。S2SPS 的红外光谱显示了两个特征吸收带, 一个在 1 2401 86 cm⁻¹ 的是由于 OSO₃ 中不对称 S= O 伸缩振动引起的, 另一个在 8101 97 cm⁻¹ 的是由于对称的 C2O2S 振动引起的, 进一步证明 S2SPS 制备成功。

31 3 SPS 和 S2SPS 的气相色谱分析结果: 图 1 为混合标准单糖糖腈乙酸酯衍生化后的气相色谱分析结果, 图 2 为 SPS、S2SPS 水解产物糖腈乙酸酯衍生化后的气相色谱分析结果。SPS、S2SPS 的 GC 图和混合标准单糖的 GC 图比较结果表明, SPS、S2SPS 的单糖组成基本相同, 均由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 只是各种单糖之间的比例略有差别。SPS 中各种单糖组成的物质的量比: 鼠李糖2阿拉伯糖2甘露糖2葡萄糖2半乳糖为 01 52 B 31 88 B 01 92 B 71 99 B 31 16; S2SPS 中各种单糖组成的物质的量比则为 鼠李糖2阿拉伯糖2甘露糖2葡萄糖2半乳糖为 01 20 B 21 17 B 01 76 B 21 32 B 21 84。葡萄糖、阿拉伯糖在 S2SPS 中所占比例比在 SPS 中所占比例显著降低, 这可能与硫酸基团的引入有关。

31 4 SPS 和 S2SPS 的抗氧化试验结果

31 41 1 SPS 和 S2SPS 的总还原力测定结果: 一般情况下, 物质的还原能力越强, 其抗氧化活性也越高。根据 21 51 1 的方法, 各个样品反应后的生成物



t/min

1 果糖 2 鼠李糖 3 阿拉伯糖 4 木糖

5 甘露糖 6 葡萄糖 7 半乳糖 8 内标

1 fructose 2 rhamnose 3 arabinose 4 xylose

5 mannose 6 glucose 7 galactose 8 internal standard

图 1 混合标准单糖气相色谱图谱

Fig 1 Gas chromatogram of mixed standard monosaccharides

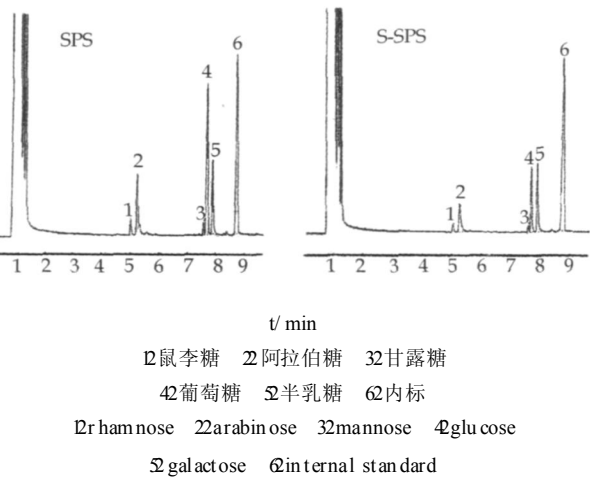


图 2 SPS、S-SPS 水解产物气相色谱图谱

Fig 2 Gas chromatogram of hydrolyzed SPS and S-SPS

表 2 SPS 和 S-SPS 的还原能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Reducing power of SPS and S-SPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样 品	700 nm 下的吸光度值				
	1 mg# mL ⁻¹	2 mg# mL ⁻¹	4 mg# mL ⁻¹	6 mg# mL ⁻¹	8 mg# mL ⁻¹
SPS	0.098 ± 0.001	0.151 ± 0.001	0.263 ± 0.005	0.424 ± 0.002	0.442 ± 0.007
S-SPS	0.120 ± 0.002	0.219 ± 0.001	0.403 ± 0.002	0.644 ± 0.003	0.758 ± 0.002

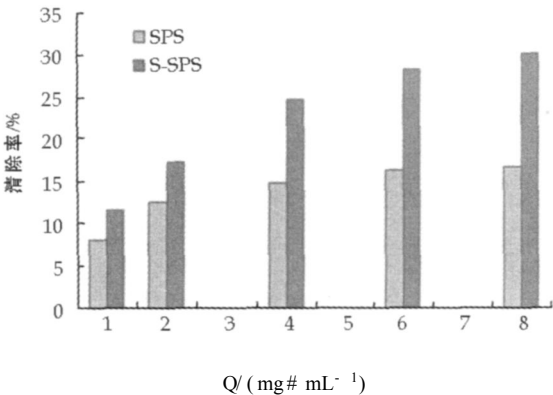


图 3 SPS 和 S-SPS 对 O₂^{·-} 的清除作用

Fig 3 Scavenging effect of SPS and S-SPS on O₂^{·-}

明显的量效关系,随着质量浓度增加,清除率逐渐增强,在同样的质量浓度下,S-SPS 对 O₂^{·-} 的清除作用明显高于 SPS,这可能与硫酸基的引入改变了多糖的结构有关。

3.1.4.3 SPS 和 S-SPS 对 #OH 的清除作用:SPS 和 S-SPS 对 #OH 的清除作用结果见图 4。由图 4 可以看出,SPS 和 S-SPS 对 #OH 均具有显著清除作用,并且清除率与多糖质量浓度呈现良好的线性关系,质量浓度越高,清除率越强,其中 S-SPS 作用效果明显好于 SPS,质量浓度在 8 mg/mL 时,S-SPS 对 #OH 的清除率可达 91.257 7%,远高于 SPS 的 66.043 6%。

4 讨论

在 700 nm 处的吸光度值的大小即反映了其抗氧化能力的大小,值越大则样品的还原能力越强,SPS 及 S-SPS 的还原力测定结果见表 2。可以看出,在实验质量浓度范围内(1~ 8 mg/mL),SPS 和 S-SPS 的还原力与其质量浓度呈现明显的线性关系,随着质量浓度增大,还原力逐渐增强,且在每种质量浓度下 S-SPS 的还原力均强于 SPS,可能是由于 SPS 经硫酸酯化后,多糖残基上的某些羟基接上了硫酸基团,这种结构上的改变引起了活性的增强。

3.1.4.2 SPS 和 S-SPS 对 O₂^{·-} 的清除作用:SPS 和 S-SPS 对 O₂^{·-} 的清除作用结果见图 3。

可以看出,SPS 和 S-SPS 对 O₂^{·-} 均具有一定的清除作用,并且清除率与多糖质量浓度之间呈现出

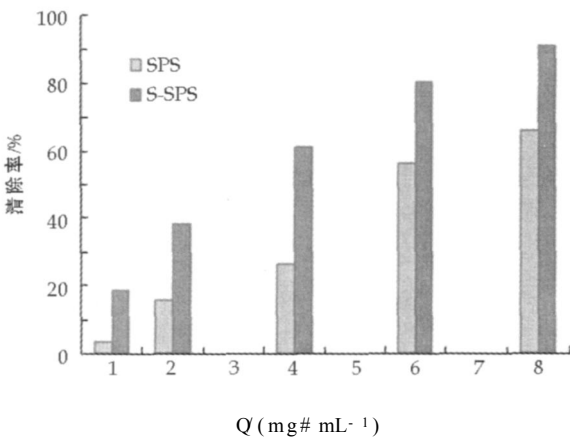


图 4 SPS 和 S-SPS 对 #OH 的清除作用

Fig 4 Scavenging effect of SPS and S-SPS on #OH

多糖作为一类重要的生物活性物质,到目前为止,虽然只有云芝多糖、猪苓多糖、香菇多糖、裂褶多糖、茯苓多糖等少数应用于临床,但它们在抗肿瘤、抗凝血、抗突变、调血脂、抗衰老、抗病毒等疑难病症的治疗方面已显示了广阔的前景。为了提高多糖的原有活性或增加新活性,通过合适的方法对多糖的结构进行分子修饰是必要的。本研究结果表明,三氧化硫-吡啶法对 SPS 进行硫酸酯化后,其水溶性和抗氧化活性明显增强,这可以为防风多糖类药物的开发利用提供借鉴与参考。

参考文献:

[1] Wang Z J, Luo D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from Gynostemma pentaphyllum

- lum Makino [J] Carbohydr Polymer, 2007, 68(1): 54258
- [2] Kardosova A, Machova E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides [J] Fitoterapia, 2006, 77(5): 362373
- [3] 邓成化, 杨祥良, 王 雁, 等. 硫酸酯化虎奶多糖的制备及其抗氧化作用研究 [J] 中国生化药物杂志, 2001, 22(1): 241
- [4] 张泽庆, 张 静. 防风多糖提取工艺的研究 [J] 陕西农业科学, 2007(3): 10213
- [5] 田庚元, 李寿桐, 宋麦丽, 等. 牛膝多糖硫酸酯的合成及其抗病毒活性 [J] 药学报, 1995, 30(2): 1072111
- [6] 刘燕琼, 黄雪松. 硫酸化大蒜多糖的制备及其鉴定 [J] 食品科学, 2007, 28(2): 91293
- [7] 丛建波, 王长振, 李 妍. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定硫酸钡比浊法研究 [J] 解放军药学报, 2003, 19(3): 1812183
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M] 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999
- [9] 朱小莹, 潘建明, 刘小涯, 等. 沉积物中多糖的微波消解及气相色谱分析 [J] 分析化学, 2007, 35(8): 112211311
- [10] 曹 炜, 卢 珂, 陈卫军, 等. 不同种类蜂蜜抗氧化活性的研究 [J] 食品科学, 2005, 26(8): 352356
- [11] 艾志录, 王育红, 潘泊利, 等. 苹果渣中多酚物质的抗氧化活性研究 [J] 食品科学, 2006, 27(12): 162163
- [12] 柳 红, 张 静. 不同南瓜多糖体外清除羟自由基作用的研究 [J] 武汉植物学研究, 2007, 25(4): 352359

印度块菌的化学成分研究

吴少华, 陈有为, 杨丽源, 李绍兰, 李治滢*

(云南大学云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘 要: 目的 研究印度块菌 *Tuber indicum* 的化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH20 柱色谱进行化学成分的分离纯化, 根据理化性质和波谱数据进行结构鉴定。结果 从印度块菌的 95% 乙醇提取液中分出 10 个化合物, 分别鉴定为星鱼甾醇(stellasterol, $\hat{N}$)、麦角甾醇过氧化物(ergosterol 5A, 8 $\hat{A}$ peroside, $\hat{O}$)、菜子甾醇(brassicasterol, $\hat{O}$)、麦角甾醇(ergosterol, $\hat{O}$)、啤酒甾醇(cerevisterol, $\hat{O}$)、(2S, 3S, 4R, 2cR)22N2(2 $\hat{A}$ hydroxy2tricosanoyl)2o $\hat{A}$ tadecan21, 3, 4 $\hat{A}$ triol($\hat{O}$)、脑苷脂 B(cerebroside B, $\times$)、尿嘧啶核苷(uridine, $\hat{O}$)、腺嘌呤核苷(adenosine, $\hat{U}$)、阿洛糖醇(allitol, $\hat{U}$)。结论 化合物 $\hat{N} \sim \hat{O}$ 为麦角甾醇类衍生物, $\hat{O} \times$ 为植物鞘氨醇型鞘酯, 化合物 $\hat{N}$ 为首次从该菌中分离得到。

关键词: 印度块菌; 真菌; 星鱼甾醇

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1211-04

印度块菌 *Tuber indicum* Cooke et Massed 为块菌科块菌属真菌, 分布在海拔 1 200~2 800 m 的高原坡地上, 与高山针叶林和高山阔叶栎林有共生关系, 主要分布于四川省及云南省, 鲜时口尝菌肉有清甜味, 并具有奇特的香味和营养价值, 在世界上为最名贵的野生食用菌之一, 有商品价值出口外销。为了探讨其化学成分和食用价值的关系, 笔者对采自云南省永胜县的印度块菌进行了化学成分的研究, 从其乙醇提取物中分离得到 10 个化合物, 经理化鉴定和波谱分析, 分别确定为星鱼甾醇(stellasterol, $\hat{N}$)、麦角甾醇过氧化物(ergosterol 5A, 8 $\hat{A}$ peroside, $\hat{O}$)、菜子甾醇(brassicasterol, $\hat{O}$)、麦角甾醇(ergosterol, $\hat{O}$)、啤酒甾醇(cerevisterol, $\hat{O}$)、(2S, 3S, 4R, 2cR)22N2(2 $\hat{A}$ hydroxy2tricosanoyl)2octadecan21, 3, 4 $\hat{A}$ triol($\hat{O}$)、脑苷脂 B(cerebroside B, $\times$)、尿嘧啶核苷(uridine, $\hat{O}$)、腺嘌呤核苷(adenosine, $\hat{U}$)、阿洛糖醇(allitol, $\hat{U}$)。其中化合物 $\hat{N} \sim \hat{O}$ 为麦角甾醇类衍生物, $\hat{O}$ 和 $\times$ 为植物鞘氨醇型鞘酯, 该类化合物具有抗肿瘤和免疫调节的作用^[1]。化合物 $\hat{N}$ 为首次从该菌中分离得到。

1 仪器与材料

熔点用四川大学科仪厂生产的 XRC) 1 型显微熔点仪测定, 温度计未校准; IR 光谱在 Bio2Rad FT2135 红外光谱仪上测定; 核磁共振谱用 Bruker AM) 400 型超导核磁共振仪测定, TMS 为内标; 质谱由 VG Auto Spec) 3000 型质谱仪测定。薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶均为青岛海洋化工厂出品。印度块菌新鲜子实体采集于云南省永胜县, 标本由云南大学云南省微生物研究所陈有为研究员鉴定。

2 提取与分离

印度块菌新鲜子实体切片后风干, 干质量 405 g, 用 95% 工业乙醇冷浸 3 次, 滤过, 回收乙醇,

* 收稿日期: 2009-02-16

作者简介: 吴少华(1975), 女, 云南省昆明人, 博士, 副研究员, 现在云南大学云南省微生物研究所工作, 主要从事天然产物化学研究。

Tel: (0871) 5032423 E-mail: shwu123@126.com