

猪苓多糖硫酸酯的制备及活性测定

刘军, 白云凤*, 宫凯敏
(银川市中医医院, 银川 750001)

[摘要] 目的: 制备猪苓多糖硫酸酯, 同时测定其活性。方法: 采用醇沉分级、大孔吸附树脂、聚酰胺树脂和脱蛋白法从中药猪苓中提取分离得到猪苓多糖, 硫酸-吡啶法进行硫酸酯化, 经 Sephadex G-75、透析得到硫酸化猪苓多糖, 并体外观察硫酸酯化多糖对羟基自由基清除作用。结果: 猪苓多糖硫酸酯化前后均有清除 Fenton 反应由 Fe^{2+} - H_2O_2 体系产生的羟自由基, 硫酸酯化猪苓多糖对羟自由基的清除能力增强, 并呈明显量效关系。结论: 制备猪苓多糖硫酸酯的方法准确可靠, 为猪苓多糖的进一步开发利用提供实验依据。

[关键词] 猪苓多糖硫酸酯; 制备; 活性测定

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0064-03

[doi] 10.11653/syfy2013140064

Preparation and Activity Assay of Sulfated Polysaccharides from *Polyporus umbellatus*

LIU Jun, BAI Yun-feng*, GONG Kai-min
(Yinchuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750001, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare sulfated polysaccharides from *Polyporus umbellatus* and investigate its anti-oxidation activity. **Method:** Polysaccharides was extracted and isolated by alcohol precipitation, macroporous resin, polyamide resin, deproteinization from *P. umbellatus*. Polysaccharides was sulfated by sulfuric acid-pyridine method, sulfated polysaccharides was deperated by Sephadex G-75 and dialysis, and *in vitro* scavenging

[收稿日期] 20121217(016)

[第一作者] 刘军, 副主任药师, 从事医院制剂开发研究, Tel: 0951-5052643, E-mail: nxlj@163.com

[通讯作者] * 白云凤, 硕士, 从事医院制剂开发的研究, Tel: 18795106052, E-mail: gkm107@163.com

洗脱率分别为 94.66%, 92.38%, 92.43%, 表明采用本方法纯化倒卵叶五加中紫丁香苷的工艺稳定可行。

3 讨论

XDA-1 型大孔吸附树脂呈弱极性, 对倒卵叶五加中紫丁香苷具有较好的吸附性能, 吸附速度快, 解析率高, 工艺稳定, 可行性强。树脂经反复使用, 残留的杂质会不断增加, 从而降低树脂的吸附性能, 通过对树脂吸附性能的考察, 该树脂使用 10 个周期后, 洗脱液中紫丁香苷质量浓度从 $0.982 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 $0.581 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 下降了 30%, 因此必须对树脂进行再生处理后才能使用。

[参考文献]

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第

54 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 103.

[2] 卫平, 于高麦. 短柄五加化学成分研究[J]. 中草药, 1989, 20(4): 8.

[3] 斯建勇, 陈迪华, 常琪. 倒卵叶五加根茎的化学成分[J]. 植物学报, 1993, 35(6): 483.

[4] 邵佳峰, 刘树民, 牟洪, 等. 刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 的大孔树脂分离纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 10.

[5] 毕福均, 钟顺好, 陈霭, 等. HPLC 法同时测定救必应药材中紫丁香苷和长梗冬青苷[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1386.

[6] 李莹, 李艳丹, 刘园, 等. 大孔树脂富集纯化红毛五加中总苷类成分的工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 24.

[责任编辑 仝燕]

effect of sulfated polysaccharides for hydroxyl free radical was observed. **Result:** Before and after sulfated, polysaccharides from *P. umbellatus* showed good antioxidation in scavenging hydroxyl free radical from $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ system, scavenging capacity of sulfated polysaccharides for hydroxyl free radical enhanced, and showed a clear dose-effect relationship. **Conclusion:** This method of preparing sulfated polysaccharides was accurate and reliable, it could provide references for further development and utilization of polysaccharides from *P. umbellatus*.

[**Key words**] sulfated polysaccharide from *Polyporus umbellatus*; preparation; activity assay

多糖多具有增强免疫的生物活性,且这种活性在多糖被硫酸化后更加明显。硫酸化多糖是指糖羟基上含有硫酸根的多糖,包括从植物中提取的各种硫酸多糖、天然中性多糖的硫酸衍生物及人工合成的各种硫酸化多糖,具有抗病毒、增强免疫、抗肿瘤及抗凝血等生物学活性^[1]。本实验从猪苓药材中提取猪苓多糖,对其进行硫酸酯化,通过所得产品的得率比较两种酯化溶剂的优劣,对产物猪苓多糖硫酸酯进行相关鉴定,并考察猪苓多糖硫酸酯的抗氧化性活性,为开发猪苓的药用价值提供实验依据。

1 材料

TU-1900 型分光光度计(北京普析)。猪苓购自宁夏明德饮片有限公司,经银川市中医医院副主任药师刘军鉴定为多孔菌科真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 的干燥菌核。D101 型大孔树脂、聚酰胺树脂(30~60 目,沧州宝恩),葡聚糖凝胶 G-75 和 G-150(国药集团化学试剂有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取^[2] 将猪苓药材粉碎后过 60 目筛,于 60 °C 恒温干燥,石油醚回流脱脂。挥去石油醚,分别加 10,8 倍量热水浸提 2 次,合并药液,抽滤,滤液浓缩成 1 g·mL⁻¹ 药液上 D101 型大孔树脂(药液与吸附剂用量比 1:10),收集流出液及水洗脱液,浓缩成相对密度 1.10(20 °C)的浓缩液,备用。

2.2 多糖的精制 浓缩液加 95% 乙醇至含醇量 85%,滤取沉淀,沉淀用水分散成 1 g·mL⁻¹ 药液上聚酰胺树脂(药液与吸附剂用量比 1:10)进行脱色,收集流出液和水洗脱液进行浓缩,得相对密度 1.15(20 °C)的粗多糖浓缩液。将粗多糖浓缩液稀释 100 倍,加入等体积 50 g·L⁻¹ 三氯乙酸,混匀,于 4 °C 冰箱静置 24 h,离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液浓缩至相对密度 1.10 g·mL⁻¹,加无水乙醇至含醇量 85%,静置过夜,滤取沉淀,用等量丙酮和乙醚分别洗涤,干燥,即得猪苓多糖精制品^[2],称定质量。

2.3 多糖的纯化 将葡聚糖凝胶 G-150 用适量蒸馏水浸泡 12 h 后,于 100 °C 溶胀 4 h,搅拌均匀,沿

玻璃棒小心缓慢地加至柱中,柱尺寸 4 cm,填料高 50 cm。用 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液平衡柱子 1 d,洗脱液为 0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液。上样量为 10 g·L⁻¹ 精致多糖溶液 10 mL。流出液分管收集,约 5 mL/管,用蒽酮-硫酸法显色,通过紫外分光光度计在 620 nm 处测定吸光度(A),以管数-A 关系绘制洗脱曲线,合并峰洗脱液,用自来水流水透析脱盐 2 d,再用蒸馏水透析 1 d,减压浓缩,冷冻干燥,即得猪苓多糖纯化后的柱分离物。

2.4 硫酸酯化多糖的制备 将 2 个附有冷凝管的圆底烧瓶置于冰盐浴中,分别加入吡啶、二甲基亚砜 5 mL,各加入氯磺酸 5 mL 后进行搅拌,温度保持 < 0 °C,待烧瓶中出现大量固体时,撤去冰水浴,取适量多糖悬浮于甲酰胺中,转移至已经加入氯磺酸-吡啶、氯磺酸-二甲基亚砜的圆底烧瓶(冰盐浴)中,开始搅拌,溶解后沸水反应 1 h,在冰盐浴中分别加入 NaOH 溶液调 pH 7.5,过滤,滤液于透析袋内先用自来水透析 2 d,再用蒸馏水透析 2 d,透析液减压浓缩至一定体积后加乙醇进行沉淀,得猪苓多糖硫酸酯化产物,采用紫外分光法测定硫酸基 A。结果显示,以氯磺酸-吡啶为反应试剂的产品得率 78%,以氯磺酸-二甲基亚砜为反应试剂的产品得率 28%,故选用吡啶为溶剂。

2.5 硫酸酯化多糖的精制 将制备的硫酸酯猪苓多糖 0.5 g 注入葡萄糖凝胶 G-75,用 NaCl 平衡后上样,洗脱,进行纯化,采用苯酚-硫酸法跟踪测定。用 0.9% NaCl 进行洗脱,合并出峰溶液,合并液透析后经减压浓缩干燥,得纯化后硫酸酯猪苓多糖。

2.6 猪苓多糖硫酸酯化的理化鉴定 猪苓多糖硫酸酯精制品与苯酚-硫酸反应呈阳性,说明糖类组分中有糖类的典型反应,与茚三酮和碘-碘化钾反应呈阴性,说明猪苓多糖硫酸酯精制品中无蛋白质类物质和淀粉,能被 3 倍量无水乙醇醇析成白色絮状物,这是多糖的特征表现。样品能溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。猪苓多糖硫酸酯精制品与氯化钡反应生成白色沉淀,这是 SO_4^{2-} 和 Ba^{2+} 发生反应生成沉淀的结果。

2.7 紫外分析 对反应后产物在 200 ~ 400 nm 扫描, 结果发现产物在 240 ~ 280 nm 有 1 个明显吸收峰, 何智健等^[4] 研究发现, 硫酸化多糖紫外光谱在 218, 264, 268, 286 nm 左右表示有 -S-O- 和 -SO₃ 的吸收, 为猪苓多糖硫酸酯上的 -SO₃ 的特征吸收。

2.8 硫酸根离子含量的测定(硫酸钡浊度法)

2.8.1 标准曲线的制备 精密称取于 105 °C 干燥至恒重的 K₂SO₄ 7.25 mg, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸水解, 定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 即得硫酸基标准贮存液 (0.072 5 g·L⁻¹)。分别量取该贮存液 0.0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 mL 于量瓶中, 分别加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液至 2.0 mL, 以 2.0 mL 盐酸溶液作空白, 分别加入 3% 三氯乙酸溶液 3.8 mL 及 5 g·L⁻¹ 氯化钡-明胶溶液 1 mL, 摇匀, 室温静置 15 min, 于 360 nm 测 A₁, 以 5 g·L⁻¹ 明胶溶液 1 mL 代替氯化钡-明胶溶液于量瓶中测定 A₂。以硫酸基毫克数为横坐标, A₁ - A₂ 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 0.831 6 X + 0.003 2 (R^2 = 0.999 6)$, 表明 SO₄²⁻ 在 0 ~ 0.145 mg 呈良好线性关系。

2.8.2 供试品溶液的制备 精密称量硫酸酯猪苓多糖 20 mg 于 10 mL 量瓶中, 加 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液 2 mL, 将量瓶置于 100 °C 恒温水浴中水解 4 h, 冷却, 加盐酸溶液至刻度。即得 2 g·L⁻¹ 硫酸酯多糖供试品溶液, 备用。将水解后的供试品溶液冷至室温, 加 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液补至刻度, 准确量取样品溶液 0.5 mL 置于具塞管中, 加 3% 三氯乙酸溶液 1 mL, 准确量取氯化钡-明胶溶液 1.0 mL 于试管中测定 A₁, 用明胶溶液 1.0 mL 于试管代替氯化钡-明胶溶液测得 A₂, 计算 SO₄²⁻ 含量。以氯磺酸-吡啶进行硫酸化时, 若以吡啶作为溶剂, 所得产品的得率(硫酸酯猪苓多糖/加入反应的猪苓多糖)、硫酸基质量分数、取代度分别为 78%, 14.32%, 1.33。

2.9 猪苓多糖衍生物的抗氧化活性研究 利用 Fenton 反应即 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 产生 OH, 在体系内加入水杨酸后捕捉 OH 会产生有色物质, 510 nm 处有最大吸收。加入具有清除 OH 功能供试品溶液后, 与水杨酸竞争 OH, A 发生改变, 以此表征样品溶液对 OH 的清除作用^[3]。取 5 mmol·L⁻¹ 的 FeSO₄ 各 1 mL 于 8 支比色管中, 向其中 6 支试管中分别加入 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 g·L⁻¹ 猪苓多糖硫酸酯溶液 1 mL, 另外 2 支试管分别为损伤管(不加猪苓多糖硫酸酯溶液)和未损伤管(不加 H₂O₂), 同法制备相同浓度下未酯化的猪苓多糖溶液进行抗氧化研究, 样品溶液于 37 °C 保温 1 h, 分别测定各管在 510 nm

处 A, 计算猪苓多糖硫酸酯溶液及硫酸多糖溶液的 OH 清除率^[4]。

$$R_1 = (A_2 - A_1) / (A_0 - A_1) \times 100\%$$

式中: R₁ 为 OH 清除率, A₂ 为多糖样品管于 510 nm 处吸光度, A₁ 为未损伤管在 510 nm 处吸光度, A₀ 为损伤管在 510 nm 处吸光度, 结果见图 1。结果显示不同质量浓度的猪苓多糖硫酸酯溶液对 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 体系产生的羟基自由基清除能力明显高于未经硫酸酯化的多糖溶液, 且随质量浓度的增加, 效果不断增强, 即清除率与猪苓多糖硫酸酯用量存在一定的量效关系, 试验结果均稳定可靠, 且操作简便。

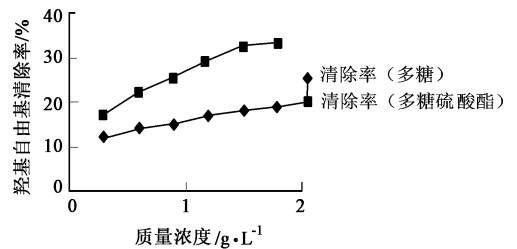


图 1 不同浓度的猪苓多糖硫酸酯溶液清除·OH 的能力曲线

3 讨论

猪苓多糖对 OH 的清除作用已有相关报道, 本实验在相关报道基础上, 验证了其对于 OH 的清除作用, 同时对猪苓多糖硫酸酯产物进行了取代度的测定以证明酯化反应的可行性, 同时对产物与底物之间对 OH 的清除作用进行比较。得出产物对 OH 具有清除作用, 且在一定范围内对其清除作用呈现良好的量效关系, 清除率均高于未酯化的猪苓多糖, 为有效地开发猪苓多糖打下基础。文中未对制备的多糖衍生物进行相应的毒力性和安全性试验, 验证其是否为有毒物质或致突变物质, 需进一步对硫酸酯化茯苓多糖制备过程中各反应条件进一步优化, 寻求最佳制备工艺。

[参考文献]

- [1] 罗佳捷, 张彬, 王洁, 等. 硫酸化多糖的最新研究进展 [J]. 广东饲料, 2012, 21(6): 29.
- [2] 魏学军, 林先燕, 李雪营, 等. 名族药金耳环总多糖的提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 41.
- [3] 刘莉, 李泳怡, 潘育方. 荔枝核多糖脱蛋白工艺考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 52.
- [4] 张德莉, 黄应平, 罗光富, 等. Fenton 及 Photo-Fenton 反应研究进展 [J]. 环境科学, 2006, 25(2): 121.
- [5] 李志洲, 陈均. 大枣多糖的提取与抗活性氧的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 115.

[责任编辑 全燕]