

响应面法优化磷酸酯化龙眼肉多糖的制备工艺

宁苑灵, 蒙法艳, 蒋洁, 黄燕军, 李雪华*
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 优选磷酸酯化龙眼肉多糖的制备工艺。方法: 选取三氯氧磷(POCl_3)进行磷酸化反应制备磷酸酯化龙眼肉多糖, 以磷钼蓝法测定的取代度为指标, 采用单因素试验和响应面法对吡啶与 POCl_3 的体积比、反应温度、反应时间进行优化, 确定最佳制备工艺。结果: 最佳制备工艺为吡啶- POCl_3 3:1, 反应温度 $0\text{ }^\circ\text{C}$, 反应时间60 min, 龙眼肉多糖磷酸酯化取代度高达0.018 4。结论: 优选的磷酸酯化龙眼肉多糖制备工艺稳定可行, 可推广于大生产应用。

[关键词] 龙眼肉; 多糖; 响应面法; 磷酸化; 单因素试验; 取代度

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0050-04

Optimization of Preparation Technology for Phosphorylated Polysaccharides from *Dimocarpus longan* by Response Surface Methodology

NING Yuan-ling, MENG Fa-yan, JIANG Jie, HUANG Yan-jun, LI Xue-hua*
(School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of phosphorylated polysaccharides from *Dimocarpus longan*. **Method:** Phosphorylation reaction was used to prepare phosphorylated polysaccharides from *D. longan* by using POCl_3 , with degree of substitution as index, which was determined by phosphomolybdate blue method, a Box-Behnken central composite design of response surface methodology design and single factor test were used to investigate three factors influencing preparation technology, such as volume ratio of pyridine- POCl_3 , reaction temperature and time. **Result:** Optimum preparation technology was as following: volume ratio of pyridine- POCl_3 3:1, reaction temperature $0\text{ }^\circ\text{C}$, reaction time 60 minutes, a higher degree of substitution of 0.018 4 was obtained. **Conclusion:** This optimized preparation technology was stable and feasible, it could be extended to application in industrial production.

[Key words] *Dimocarpus longan*; polysaccharides; response surface methodology; phosphorylation; single factor test; degree of substitution

对多糖进行磷酸酯化结构修饰, 可改变或赋予某些多糖类化合物特殊的生物活性, 如磷酸酯化牛膝多糖较牛膝多糖能更有效地通过诱导 A549 细胞凋亡来抑制人肺癌 A549 细胞的增殖^[1], 因为

β -(1-3)-D-葡聚糖进行磷酸化后, 其活性大大提高^[2]。因此有必要研究各种多糖及其类似物磷酸酯化后的生理功能, 找到磷酸化后产物生理功能的一些规律, 探索磷酸基团在生理功能中的作用, 为设计生理活性更好的磷酸酯衍生物提供实验依据。目前, 从自然界分离得到的寡糖或多糖的磷酸酯数量有限, 种类也不是很多, 一定程度上影响了对糖的磷酸酯生物活性及磷酸酯在生物体内作用的系统研究, 因此拟采用人工合成方式, 既可合成磷酸化多糖、寡糖, 还可合成其类似物, 同时可进行一些区域选择性的衍生化, 以便更有效、系统地研究构效关系。

[收稿日期] 20121016(005)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013159)

[第一作者] 宁苑灵, 在读硕士, 从事天然产物化学研究, Tel: 14795721957, E-mail: ningyuanling1234@163.com

[通讯作者] *李雪华, 教授, 从事天然产物活性物质提取与活性研究, Tel: 13006918166, E-mail: onlythankforyou@163.com

1 材料

722s 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),TDL-5A 型低速台式离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司),DZF-300 型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司),AL204 型电子天平(METTLER TOLEDO)。

龙眼肉(购自广西南宁交易市场,经广西中医药研究所严克俭检验员鉴定为石碇龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的假种皮), POCl_3 (上海亭新化工试剂厂),吡啶(成都市科龙化工试剂厂,批号 20081006),四水合钼酸铵(广东光华科技股份有限公司,批号 20110923),木瓜蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司,批号 WM20061106),丙烯葡聚糖凝胶 S-300 HR (Sephacryl S-300 HR, 购自 GE Healthcare 公司,批号 15223)。

2 方法与结果

2.1 龙眼肉多糖的提取和纯化^[3-5] 将龙眼干果剥壳去核,加 4 倍量水于 90 °C 提取 4 h,重复 4 次,合并滤液,65 °C 减压浓缩,醇沉得龙眼肉粗多糖。用木瓜蛋白酶酶解法和 H_2O_2 还原法除去龙眼肉粗多糖的蛋白和色素。DEAE 纤维素柱(2.5 cm × 40 cm)分级纯化龙眼肉多糖,依次用水,0.125 mol·L⁻¹ NaCl,0.30 mol·L⁻¹ NaOH 溶液进行洗脱。取 NaCl 流分,用 Sephacryl S-300 HR 柱(2.0 cm × 40 cm)作进一步纯化,用水洗脱(0.25 滴/s),洗脱流份分别进行减压浓缩,醇沉,沉淀真空干燥,取第 1 个洗脱峰的成分(LYP1)进行龙眼肉多糖磷酸酯化试验。

2.2 取代度的测定^[6-7] 采用磷钼蓝法测定,样品经过硫酸-硝酸混酸消化处理后,即将有机磷转变为无机磷酸根后,对磷酸根进行定量分析,测定磷酸酯化龙眼肉多糖中结合磷含量,计算取代度(D_s)。

2.3 单因素试验^[8-12] 固定磷酸酯化试剂 POCl_3 1.00 mL,加入相应体积的吡啶,于 0 °C 反应 15 min 后,缓慢加入 0.025 g·mL⁻¹ LYP1 溶液 20.0 mL,于相应温度和时间下进行反应,反应结束后加入 10 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调至 pH 7.0,透析 24 h,倾出溶液,加入 1.5 倍量无水乙醇醇沉,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取沉淀物,用 90% 乙醇洗涤沉淀物 3 次,45 °C 减压干燥,即得磷酸酯化龙眼肉多糖。

2.3.1 反应温度考察 固定吡啶- POCl_3 体积比和反应时间,考察不同温度(-5,0,5,10,15,20 °C)对龙眼肉多糖磷酸酯化取代度的影响。结果 D_s 分别为 0.004 0, 0.015 6, 0.015 0, 0.014 5, 0.014 2,

0.014 1;说明 0 °C 时磷酸酯化的 D_s 达到最高值,当温度 >0 °C 时, D_s 反而降低,可能是由于部分 POCl_3 遇水生成磷酸,使反应温度升高,从而加快水解的速率,导致取代度的下降;因此选择反应温度 0 °C。

2.3.2 吡啶与 POCl_3 体积比考察 固定反应温度(0 °C)和反应时间,考察不同吡啶与 POCl_3 体积比(1:1,2:1,3:1,4:1,5:1)对龙眼肉多糖磷酸酯化取代度的影响。结果 D_s 分别为 0.011 3, 0.014 8, 0.015 6, 0.012 5, 0.012 3;说明吡啶- POCl_3 为 3:1 时, D_s 达到最高值,当吡啶- POCl_3 > 3:1 时,吡啶与 POCl_3 生成的中间产物会影响龙眼肉多糖磷酸酯化,由于吡啶为有机碱,能在一定程度上降低反应液 pH,减少龙眼肉多糖的水解;当吡啶- POCl_3 < 3:1 时,pH 相对较低,不利于磷酸酯化的反应,故选择吡啶- POCl_3 体积比 3:1。

2.3.3 反应时间对龙眼肉多糖磷酸酯化取代度的影响 固定反应温度(0 °C)和吡啶- POCl_3 (3:1),考察不同反应时间(20,40,60,80 min)对龙眼肉多糖磷酸酯化取代度的影响。结果 D_s 分别为 0.010 9, 0.015 6, 0.018 3, 0.017 8;说明随反应时间的增加,取代度逐渐增加,当反应时间 > 60 min 时,取代度反而呈下降趋势,说明反应时间越长龙眼肉多糖的水解情况也在加剧。因此反应时间控制在 60 min。

2.4 响应面分析 在单因素试验基础上,选取反应温度、吡啶- POCl_3 体积比及反应时间为考察因素,以 D_s 为响应值,因素水平见表 1,响应面设计安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 龙眼肉多糖磷酸酯化响应面分析因素水平

水平	X_1 吡啶- POCl_3	X_2 温度/°C	X_3 时间/min
-1	2:1	-10	40
0	3:1	0	60
1	4:1	10	80

由表 3 可知,失拟项不显著,而模型显著,复相关系数(R^2) = 0.970 5,说明试验误差较小,该模型是合适的。模型的二次项回归方程 $D_s = 0.018 + 2.625 \times 10^{-4} X_1 - 3.625 \times 10^{-4} X_2 - 1.250 \times 10^{-4} X_3 - 4.750 \times 10^{-4} X_1 X_2 + 4.500 \times 10^{-4} X_1 X_3 - 1.200 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 2.696 \times 10^{-3} X_1^2 - 3.146 \times 10^{-3} X_2^2 - 1.571 \times 10^{-3} X_3^2$ 。在所选取的因素水平范围内,一次项不显著,但二次项显著,说明反应时间、反应温度和吡啶- POCl_3 体积比对取代度的影响不是线性关系,而是成抛物线关系,交互因素中只有

表 2 龙眼肉多糖磷酸酯化响应面分析 Box-Behnken 设计安排

No.	X_1	X_2	X_3	D_s
1	0	1	-1	0.014 5
2	1	-1	0	0.013 9
3	0	1	1	0.011 7
4	0	0	0	0.018 1
5	1	1	0	0.012 6
6	-1	1	0	0.012 1
7	-1	-1	0	0.011 5
8	-1	0	-1	0.014 8
9	-1	0	1	0.013 8
10	0	0	0	0.018 7
11	0	-1	1	0.015 2
12	1	0	1	0.014 3
13	0	0	0	0.018 3
14	1	0	-1	0.013 5
15	0	-1	-1	0.013 2

表 3 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	7.307×10^{-5}	9	8.119×10^{-6}	18.25	0.002 6 ¹⁾
X_1	5.512×10^{-7}	1	5.512×10^{-7}	1.24	0.316 3
X_2	1.051×10^{-6}	1	1.051×10^{-6}	2.36	0.184 8
X_3	1.250×10^{-7}	1	1.250×10^{-7}	0.28	0.618 7
X_1X_2	9.025×10^{-7}	1	9.025×10^{-7}	2.03	0.213 6
X_1X_3	8.100×10^{-7}	1	8.100×10^{-7}	1.82	0.235 1
X_2X_3	5.760×10^{-6}	1	5.760×10^{-6}	12.95	0.018 7 ¹⁾
X_1^2	2.638×10^{-5}	1	2.638×10^{-5}	60.32	0.000 6 ¹⁾
X_2^2	3.654×10^{-5}	1	3.654×10^{-5}	80.24	0.000 3 ¹⁾
X_3^2	9.111×10^{-6}	1	9.111×10^{-6}	20.48	0.006 3 ¹⁾
残差	2.224×10^{-6}	5	4.448×10^{-7}		
失拟项	2.037×10^{-6}	3	6.792×10^{-7}	7.28	0.123 2
纯误差	1.867×10^{-7}	2	9.333×10^{-8}		
总变异	7.530×10^{-5}	14			

注: ¹⁾ $P < 0.05$ 。

X_2X_3 影响显著,说明反应温度和反应时间的交互作用对 D_s 影响显著,各因素对 D_s 的影响排序 $X_2^2 > X_1^2 > X_3^2 > X_2X_3$ 。

由模型分析得出的最佳反应条件为吡啶- $POCl_3$ 体积比 3.05:1,反应温度 $-0.60\text{ }^\circ\text{C}$,反应时间 59.82 min。根据实验室条件,确定采用吡啶- $POCl_3$ 体积比 3:1,反应温度 $0\text{ }^\circ\text{C}$,反应时间 60 min。按优选的条件进行 3 次重复试验,结果平均 $D_s = 0.018 4$,与模型预测值(0.018 385 1)基本一致,说明其相关性很好,误

差小。响应面曲面图见图 1,说明 3 个响应面曲图为山丘状,有极大值存在,不需要作岭分析。

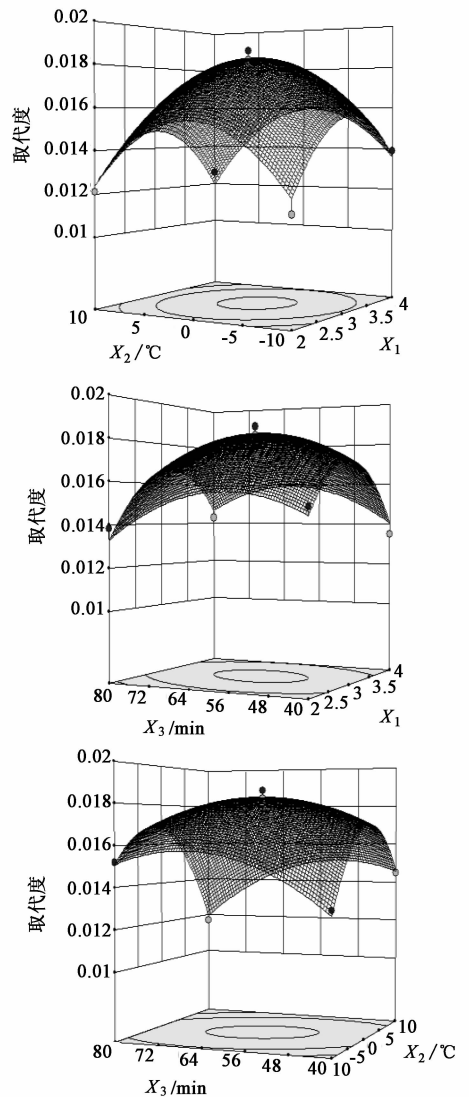


图 1 温度、吡啶- $POCl_3$ 及反应时间交互作用对取代度的影响

3 讨论

多糖可用三聚磷酸钠、正磷酸盐及 $POCl_3$ 等进行磷酸酯化。三聚磷酸钠和正磷酸盐进行磷酸酯化时,反应温度相对较高,虽然可合成单酯^[13],但高温容易改变多糖的空间结构,可影响其药理活性。 $POCl_3$ 的酰化能力较强,可获得高取代度的产物,但得到的产物通常均一性不好。本实验利用吡啶的碱性和低温反应,可减少副反应,可制备出相对均一的磷酸酯化龙眼肉多糖。响应面分析作为一种有效的试验设计方法,可进行多因素多水平试验研究,并可考察因素间的交互作用,根据综合指标得到最优工艺,利用响应面分析法可有效分析各因素对磷酸酯化龙眼肉多糖制备的影响,结果拟合度较高,说明优选的工艺稳定可行。

二次回归正交旋转组合设计优化白芷香豆素 磷脂复合物的制备工艺

董自亮^{1,2}, 傅超美^{1*}, 徐瑞超^{1,2}, 高飞¹, 秦郁文², 黄静², 秦少容²

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 重庆 408000)

[摘要] 目的: 优选白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺。方法: 采用四因素二次回归正交旋转组合设计方法, 以复合率为指标, 选取投料比、白芷香豆素质量浓度、反应温度、反应时间为考察因素, 优化白芷香豆素磷脂复合物的制备工艺。结果: 最佳制备工艺为以四氢呋喃为反应溶剂, 白芷香豆素与磷脂投料比例 1:3, 药物质量浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 反应时间 101 min, 复合物结合率达 98.58%。结论: 该优选的制备工艺稳定可行, 为白芷香豆素新制剂的进一步研究提供参考。

[关键词] 白芷香豆素; 磷脂复合物; 二次回归正交旋转组合设计; 制备; 优化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0053-04

[收稿日期] 20121015(026)

[第一作者] 董自亮, 执业药师, 从事药物新剂型、新技术研究, Tel:18225129378, E-mail: dzlcutem@163.com

[通讯作者] * 傅超美, 博士, 教授, 从事中药新剂、新剂型与新技术研究, Tel:028-61800231, E-mail: chaomeifu@126.com

[参考文献]

- [1] 薛胜霞, 金丽琴, 叶发青, 等. 牛膝多糖硫酸酯和磷酸酯衍生物对人肺癌 A549 细胞的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(6): 406.
- [2] David L Williams, Rose B McNamee, Ernest L Jones, et al. A method for the solubilization of a (1→3)- β -d-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Carbohydr Res, 1991(219): 203.
- [3] 张伟杰, 王鹏, 林茜, 等. 3 种中药多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 19.
- [4] 李雪华, 贾琦. 龙眼肉多糖分离及结构研究[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(1): 46.
- [5] 魏学军, 林先燕, 李雪营, 等. 民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.
- [6] 国家标准局信息分类编码研究所. GB/T22427.11-2008 淀粉及其衍生物磷总含量的测定[S]//全国文献工作标准化技术委员会, 文献工作国家标准汇编. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1.
- [7] Blennow A, Engelsens B, Nielsen H T, et al. Starch phosphorylation; a new front line in starch research[J]. Trends Plant Sci, 2005, 7(10): 445.
- [8] Yuan Huamao, Zhang Weiwei, Li Xuegang, et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives [J]. Carbohydr Res, 2005(340): 685.
- [9] Wang Jing, Zhang Quanbin, Zhang Quanbin, et al. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro [J]. Int J Biol Macromol, 2009(44): 170.
- [10] Yin Xiulian, You Qinghong, Jiang Zhonghai. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology [J]. Carbohydr Polym, 2011(86): 1358.
- [11] 冉建明, 张发森. 响应面法优化淫羊藿黄酮磷脂复合物制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 69.
- [12] 李瑾, 侯淑珍, 王景媛, 等. 响应面分析法优化牛蒡根多糖提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 21.
- [13] 陈晓明, 田庚元. 多糖磷酸酯化的研究进展[J]. 有机化学, 2002, 22(11): 835.

[责任编辑 仝燕]