

薤白多糖的硫酸化修饰及体外抗氧化活性

夏新奎*, 豆成林

信阳农林学院食品科学系, 信阳 464000

摘要:为探讨薤白多糖硫酸化修饰的最佳条件,以及硫酸化修饰提高薤白多糖活性的可能性,采用氯磺酸-吡啶法对醇沉法得到的薤白多糖和柱层析纯化的3种分级薤白多糖进行硫酸化修饰,以氯磺酸-吡啶配比、反应温度和反应时间为自变量,修饰产物的硫酸基取代度(DS)为响应值,应用响应面设计法确定硫酸化修饰的最佳条件,用 H_2O_2/Fe^{2+} 体系法和邻苯三酚自氧化法测定修饰产物的抗氧化活性。结果表明:薤白多糖氯磺酸-吡啶法修饰的最佳条件为氯磺酸:吡啶=1:3,反应温度 $65\text{ }^\circ\text{C}$,反应时间2 h,此条件下硫酸根取代度为0.470,硫酸化修饰能提高薤白多糖的体外抗氧化活性。

关键词:薤白多糖;硫酸化修饰;响应面法优化;抗氧化活性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.05.025

Sulfated Modification of Polysaccharides from *Allium macrostemon* Bge. and *in vitro* Antioxidant Activity

XIA Xin-kui*, DOU Cheng-lin

Department of Food Science, Xinyang College of Agriculture and Forestry, Henan Xinyang 464000, China

Abstract: In order to optimize the sulfated modification conditions of polysaccharides from *Allium macrostemon* Bge. (PAM) and to investigate the probability of enhancing antioxidant activity of PAM after sulfated modification, total PAM was extracted by ethanol precipitation and three fractional PAMs obtained by chromatography were modified by chlorosulfonic acid-pyridine method. The modification conditions were optimized by response surface analysis with the ratio of chlorosulfonic acid to pyridine, reaction temperature and time as the factors. The degree of substitution (DS) was tested by sulfate barium turbidimetric method. The *in vitro* antioxidant activity of modified product was measured by H_2O_2/Fe^{2+} and pyrogallol systems. The result showed the optimal conditions were as follows: chlorosulfonic acid to pyridine of 1:3, reaction temperature of $65\text{ }^\circ\text{C}$ and reaction time of 2 h. Under these conditions, the sulfate substitution degree of 0.470 was obtained. In addition, the *in vitro* antioxidant assays showed that the antioxidant activity of PAM was enhanced by sulfated modification.

Key words: *Allium macrostemon* Bge. polysaccharides; sulfated modification; response surface methodology; antioxidant activity

多糖作为构成生命活动的基本物质之一,在抗肿瘤、抗炎、抗病毒、降血糖、抗衰老、抗凝血等方面均发挥着其特殊的生物活性作用。研究表明,多糖的活性直接或间接地受其分子结构的影响,采取一定的方法对多糖分子结构进行修饰,可以提高或赋予多糖更多活性、降低其毒副作用^[1]。

薤白是一味传统的中药,为百合科植物小根蒜 *Allium macrostemon* Bge. 和薤 *Allium chinensis* G.

Don. 的干燥鳞茎。性味辛、苦、温,有温中通阳,理气宽胸,通阳散结之功效^[2]。其原植物除入药外还可食用,是卫生部2002年公布的88种药食两用中药材之一。现代研究证明,薤白具有抗氧化、防治动脉粥样硬化等作用。薤白中已分离得到挥发油、皂苷、含氮化合物、前列腺素等化学成分,但薤白多糖的研究报道较少。本文在前期对薤白粗多糖提取工艺、分离纯化及组成分析研究的基础上^[3,4],对所得的薤白多糖纯品采用氯磺酸+吡啶法进行硫酸化修饰,用响应面设计法确定硫酸化的最佳条件,并对修饰前后的薤白多糖清除超氧阴离子自由基、羟自由基的能力进行研究,旨在选出硫酸化的最佳条件,为

薤白多糖药物及功能性食品开发提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

薤白粗多糖及分级纯品:由本实验室提供。利用水溶醇沉法得薤白粗多糖(PAM),经DEAE-纤维素柱层析和SephadexG-150柱层析得薤白多糖的三种级分(PAM-Ib、PAM-IIa、PAM-III')^[3,4]。

电热恒温水浴槽:北京市医疗设备厂;Z323K高速冷冻离心机:德国HERML公司;752紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司。

氯磺酸、吡啶、硫酸钾、邻二氮菲、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris),以上试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 硫酸化修饰条件设计

根据文献报道,试剂比例、反应温度和反应时间对修饰的影响较大^[5],因此,在单因素试验的基础上,根据Box-Behnken Design中心组合试验设计原理,以试剂比例(A)、反应温度(B)和反应时间(C)为自变量,产物的硫酸根取代度(DS)为响应值,设计三因素三水平的响应面分析试验,以确定硫酸化修饰的最佳工艺条件。因素水平如表1。

表1 试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	+1
氯磺酸:吡啶(v:v) Chlorosulfonic acid to pyridine	1:3	1:4	1:5
反应温度(℃) Reaction temperature	50	60	70
反应时间(h) Reaction time	1.5	2.0	2.5

1.2.2 硫酸化试剂的制备

在带有搅拌装置和冷凝装置的250 mL三颈烧瓶中加入预冷的无水吡啶,并将烧瓶置于冰盐浴中,较为剧烈地不停搅拌,再将氯磺酸按照表1的比例逐滴缓慢加入(40 min内完成)。滴加完毕后撤去冰盐浴,将酯化试剂于-20℃封存备用。

1.2.3 硫酸化操作

精确称取500 mg薤白多糖(PAM),分散于30 mL无水甲酰胺中制成薤白多糖悬液,室温下加入酯化试剂,按表1设定的反应温度和反应时间在水浴中搅拌反应。反应结束后取出烧瓶冷却至室温,

然后加入预冷的100 mL冰水中,用1 mol/L的NaOH溶液中和至pH 7.5。加入四倍体积的无水乙醇,4℃静置过夜、过滤,将沉淀对自来水透析3 d,蒸馏水透析1 d。透析液再用四倍体积的无水乙醇沉析,沉淀经低温真空干燥得到硫酸酯化薤白多糖衍生物(sPAM)。

1.2.4 产物的硫酸根取代度测定

用硫酸钡比浊法^[6]测定各种修饰产物的硫酸根质量分数。

标准曲线的绘制:配制1.0 mol/L硫酸钾标准溶液,并吸取一系列不同体积的硫酸钾标准溶液于试管中,补充蒸馏水使其体积为10 mL,然后加入10 mL 0.18 mol/L盐酸溶液、1 mL 0.5%明胶溶液,充分振荡混匀,迅速加入2 mL氯化钡-明胶溶液(10 g氯化钡溶于100 mL 0.5%明胶溶液中),振荡混匀,室温放置20 min后以蒸馏水为参比,于360 nm处测定吸光值。以硫酸根量为横坐标,吸收值为纵坐标,绘制标准曲线。

样品取代度的测定:测定薤白多糖硫酸酯化衍生物中硫酸基含量时,取样品10 mg用蒸馏水溶解后加一定体积的浓盐酸至HCl浓度为3 mol/L,封口,100℃水解6 h,冷却,减压旋转蒸干,再用少量水溶解后再次减压旋转蒸干,重复几次后,用超纯水将残留物溶解并定容于10 mL容量瓶中,取此样液50 μL,按照标准曲线方法测定。根据标准曲线计算硫酸基含量并根据以下公式计算取代度:

$$DS = (1.62 \times S\%) / (32 - 1.02 \times S\%)$$

式中S%为硫酸基百分含量。

1.2.5 薤白多糖硫酸化修饰前后体外抗氧化活性测定

1.2.5.1 对·OH的清除率的测定(H₂O₂/Fe²⁺体系^[7])

将各多糖样品配成浓度为4 mg/mL的溶液。取6支试管,分别加入0.75 mmol/L邻二氮菲溶液1 mL,150 mmol/L pH 7.4 PBS 1.5 mL,充分混匀后。加入0.75 mmol/L FeSO₄溶液1 mL,每加1管立即混匀,然后向其中一管加入0.01% H₂O₂ 1 mL(损伤),另一管不加H₂O₂(未损伤),以蒸馏水补充体积,37℃保温60 min后,以磷酸盐缓冲液为参比,分别测536 nm时吸收值,得A_{损伤}与A_{未损伤}。其余4管分别加入一定的各多糖溶液(每次所加的体积不同),混匀,再分别加入0.01% H₂O₂ 1 mL,37℃保温60 min后以同浓度的多糖液作参比,测536 nm

时的吸收值, 即得 $A_{\text{样}}$ 。重复 5 次, 以下式计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}} \times 100\%$$

1.2.5.2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率的测定(邻苯三酚自氧化法^[8])

取 4.5 mL pH8.2 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 4.5 mL 蒸馏水, 混匀后在 25 °C 预热过的邻苯三酚 0.3 mL(以 10 mmol/L HCl 配制, 空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液), 迅速摇匀后倒入比色杯, 325 nm 下每隔 30 s 测定吸光度, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。在加入邻苯三酚前, 先加入一定体积的多糖溶液, 蒸馏水减少, 然后按下述方法计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = (\Delta A_0 - \Delta A) / (\Delta A_0) \times 100\%$$

其中: ΔA_0 为邻苯三酚自氧化速率, ΔA 为加入多糖溶液后邻苯三酚的自氧化速率, 单位均为吸光度每分钟的增加值。

2 结果与分析

2.1 标准曲线方程的建立

根据 1.2.4 节方法进行试验, 结果建立的 S 含量(X) 和吸光度(Y) 标准曲线回归方程为: $Y = 2.4852X + 0.0013$, $R^2 = 0.9986$ 。

2.2 响应面优化试验

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken Design 中心组合试验设计原理, 以试剂比例(A)、反应温度(B)和反应时间(C)为自变量, 产物的硫酸根取代度(DS)为响应值, 设计三因素三水平的响应面分析试验, 试验设计及结果如表 2。

表 2 响应面分析试验设计及结果

Table 2 The results of RSM

试验号 No.	A	B	C	取代度 Degree of substitution
1	0	-1	-1	0.170
2	-1	0	1	0.395
3	0	0	0	0.436
4	0	0	0	0.419
5	0	0	0	0.427
6	0	0	0	0.445
7	-1	1	0	0.430
8	1	-1	0	0.206

9	0	-1	1	0.189
10	-1	0	-1	0.361
11	-1	-1	0	0.234
12	0	1	-1	0.255
13	1	0	1	0.308
14	1	0	-1	0.293
15	0	0	0	0.435
16	0	1	1	0.293
17	1	1	0	0.271

2.2.1 回归方程的建立

利用 Design Expert 8.0.5.0 软件对表 2 数据进行多元回归拟合, 得到硫酸化薤白多糖的硫酸根取代度(DS)对氯磺酸: 吡啶(v:v)(A)、反应温度(B)、反应时间(C)的回归方程为:

$$\text{DS} = -6.69260 + 0.31055A + 0.17249B + 1.21910C - 3.27500 \times 10^{-3} AB - 9.50000 \times 10^{-3} AC + 9.50000 \times 10^{-4} BC - 0.017225A^2 - 1.29725 \times 10^{-3} B^2 - 0.30290C^2$$

方差分析结果见表 3。由表 3 可知, 模型 P 值小于 0.0001, 表明该模型方程高度显著; 不同处理间的差异显著, 说明该方法是准确可靠的, 使用该方程模拟真实的三因素三水平分析可行。失拟性检验结果表明, 失拟不显著($P = 0.1782$), 说明未知因素对试验结果干扰很小, 该回归模型比较理想, 可信度较高。 $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9822$, 说明建立的模型能够解释 98.22% 响应值的变化, 能很好的描述各因素对薤白多糖硫酸根取代度的变化规律。因此, 该模型能准确地模拟各因素对硫酸根取代度的影响。

由表 3 可以看出, 各因素对试验结果的影响排序为 $B > A > C$, 即反应温度对薤白多糖硫酸根取代度的影响最大, 其次为氯磺酸: 吡啶(v:v), 反应时间影响最小。因素 A、B 对薤白多糖硫酸根取代度的影响极显著($P < 0.01$), C 对薤白多糖硫酸根取代度的影响显著($P < 0.05$), AB、 A^2 、 B^2 、 C^2 对薤白多糖硫酸根取代度的影响显著($P < 0.05$), AC、BC 对薤白多糖硫酸根取代度的影响不显著($P > 0.05$)。表明试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系, 二次项对响应值也有很大的影响。

采用 Design Expert 8.0.5.0 软件作出 3 个因素之间的响应曲面图如图 1 所示。

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

变异来源 Sources of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	0.15	9	0.017	99.26	<0.0001
A	0.015	1	0.015	87.71	<0.0001
B	0.025	1	0.025	151.86	<0.0001
C	1.405×10^{-3}	1	1.405×10^{-3}	8.43	0.0229
AB	4.290×10^{-3}	1	4.290×10^{-3}	25.71	0.0014
AC	9.025×10^{-5}	1	9.025×10^{-5}	0.54	0.4858
BC	9.025×10^{-5}	1	9.025×10^{-5}	0.54	0.4858
A ²	1.249×10^{-3}	1	1.249×10^{-3}	7.49	0.0290
B ²	0.071	1	0.071	425.09	<0.0001
C ²	0.024	1	0.024	144.85	<0.0001
残差 Residual	1.167×10^{-3}	7	1.667×10^{-4}		
失拟误差 Fitting error	7.840×10^{-4}	3	2.613×10^{-4}	2.73	0.1782
纯误差 Pure error	3.828×10^{-4}	4	9.570×10^{-5}		
总和 Total	0.15	16			

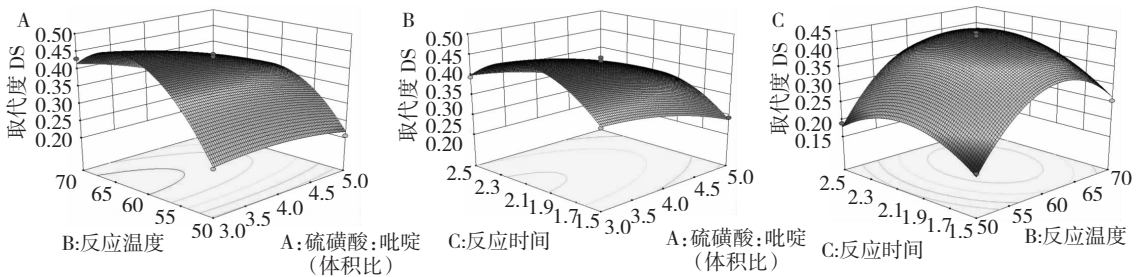


图1 氯磺酸:吡啶与反应温度(A)、氯磺酸:吡啶与反应时间(B)及反应温度与反应时间(C)对取代度影响的响应曲面图
Fig.1 Response surface plots showing the effects of chlorosulfonic acid to pyridine ratio and reaction temperature (A), chlorosulfonic acid to pyridine ratio and reaction time (B) and reaction temperature and reaction time (C) on the DS

2.2.2 模型的优化和验证

利用 Design Expert 8.0.5.0 软件进行优化, 薤白多糖硫酸化修饰的最佳条件为: 氯磺酸: 吡啶 = 1:3, 反应温度 63.45 °C, 反应时间 2.07 h, 在此条件下硫酸根取代度为 0.474。根据实际操作的情况, 选择氯磺酸: 吡啶 = 1:3, 反应温度 65 °C, 反应时间 2 h, 此条件下硫酸根取代度为 0.470, 与预测值接近, 说明该模型可以很好地预测薤白多糖硫酸化

条件与硫酸根取代度之间的关系。同时也证明了响应面优化法优化薤白多糖硫酸化修饰条件的可行性。

2.3 薤白多糖硫酸化修饰产物的体外抗氧化活性

2.3.1 薤白多糖硫酸化修饰前后对·OH的清除作用

薤白多糖及各组分硫酸化修饰前后对·OH的清除影响如表4。

表4 薤白多糖硫酸化修饰前后对·OH的清除的影响

Table 4 Scavenging effect of PAM and sPAM on ·OH

样品 Sample	PAM	sPAM	PAM-I b	sPAM-I b	PAM-II a	sPAM-II a	PAM-III'	sPAM-III'
清除率(%) Scavenging rates	41.01	50.02	8.03	16.45	0.08	11.26	69.08	72.01

从表 4 可以看出, 薤白多糖硫酸化修饰后对 H_2O_2/Fe^{2+} 体系通过 Fenton 反应产生的 $\cdot OH$ 清除率都有所提高, 尤其是对 PAM-IIa 影响最大。PAM-IIa 修饰前几乎没有清除 $\cdot OH$ 的作用(清除率 0.08%), 但硫酸化修饰后清除率提高到 11.26%,

表 5 薤白多糖硫酸化修饰前后对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除的影响

Table 5 Scavenging effect of PAM and sPAM on $O_2^{\cdot -}$

样品 Sample	PAM	sPAM	PAM- I b	sPAM- I b	PAM- II a	sPAM- II a	PAM- III'	sPAM- III'
清除率 Scavenging rates(%)	51.32	55.02	19.83	22.36	0.04	10.38	0.035	11.04

由表 5 可以看出, 薤白多糖硫酸化修饰后对邻苯三酚自氧化过程中产生的 $O_2^{\cdot -}$ 的抑制作用均有所提高, 尤其对 PAM-IIa、PAM-III' 影响最大。PAM-IIa、PAM-III' 修饰前对 $O_2^{\cdot -}$ 几乎没有清除作用, 但硫酸化修饰后清除效果明显, 说明薤白多糖硫酸化修饰可提高其体外抗氧化性。

3 结论

本试验采用氯磺酸-吡啶法对薤白多糖进行硫酸化修饰, 并通过响应面优化试验研究了各因素对取代度的影响和最优工艺条件。各因素对试验结果的影响排序为 $B > A > C$, 即反应温度对薤白多糖硫酸根取代度的影响最大, 其次为氯磺酸: 吡啶(v:v), 反应时间影响最小, 得到硫酸化修饰的最优工艺条件为: 氯磺酸: 吡啶 = 1:3, 反应温度 65 °C, 反应时间 2 h, 此条件下硫酸根取代度为 0.470, 与预测值接近, 说明该模型可以很好地预测薤白多糖硫酸化条件与硫酸根取代度之间的关系。同时也证明了响应面优化法优化薤白多糖硫酸化修饰条件的可行性。

体外抗氧化试验表明, 薤白多糖硫酸化修饰后清除 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 的能力明显提高, 说明薤白多糖硫酸化修饰可改变或增加其生物学活性, 为薤白多糖硫酸化产物在保健因子、功能性食品或药品领域的应用提供理论依据, 在实践中具有指导意义。

参考文献

1 Li YH(李玉华), Wang FS(王凤山), He YL(贺艳丽). Research status of the chemical modification methods of pol-

说明硫酸化修饰可改变或增加多糖的生物学活性。

2.3.2 薤白多糖硫酸化修饰前后对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用
薤白多糖及各组分对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率结果如表 5。

ysaccharides. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2007, 28:62-65.

2 Editorial Group of Chinese Medicine Citing(中药辞海编审组). *Chinese Medicine Citing* (中药辞海). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1997.

3 Xia XK(夏新奎), Yang HX(杨海霞), Li C(李纯), et al. Study on the extraction technology of polysaccharide from *Allium macrostemon* Bge. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2006, 34:4403-4405.

4 Xia XK(夏新奎), Yang HX(杨海霞), Li C(李纯), et al. Study on extraction, purification and component of polysaccharide from *Allium macrostemon* Bge. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 1:244-247.

5 Lu Y(卢宇), Hu YL(胡元亮), Sun JL(孙峻岭), et al. Optimization of sulfated modification conditions in epimedium polysaccharide. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2008, 39:357-359.

6 Huang XY(黄小燕), Kong XF(孔祥峰), Wang DY(王德云), et al. Research progress on sulfating modification of polysaccharides and sulfated polysaccharides. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 4:328-332.

7 Jia ZS(贾之慎), Wu JM(邬建敏), Tang MC(唐孟成). Colorimetric determination of hydroxyl radical from Fenton reaction. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1996, 23:184-186.

8 Cui WX(崔文新), Zhang JJ(张静静), Geng Y(耿越). Free radical scavenging qualities of several natural edible pigments. *J Shandong Normal Univ, Nat Sci* (山东师范大学学报, 自科版), 2006, 21:105-107.