

文章编号:1001-6880(2016)11-1806-04

硫酸酯化剂和溶剂对海参岩藻聚糖硫酸酯化修饰的影响

王瑞芳*,吴光斌,谢远红,陈素艳

集美大学食品与生物工程学院 福建省食品微生物与酶工程重点实验室,厦门 361021

摘要:比较了以 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和吡啶(Py)两种溶剂,氯磺酸-吡啶(CA-Py)和三氧化硫-吡啶(SO₃-Py)两种硫酸酯化剂对海参岩藻聚糖硫酸酯化的影响。结果表明:以 CA-Py 为酯化剂可使硫酸基的含量高达 50% 以上,以 SO₃-Py 为酯化剂,硫酸基的含量仅达到 20% 左右;DMF 为溶剂时可低温反应,Py 为溶剂时反应温度必须 90 ℃ 以上,但产品得率较高。红外光谱分析显示:硫酸酯化后,四种产品硫酸酯的特征吸收峰均显著增强。抗氧化活性实验结果表明:四种硫酸酯化产品对 1,1-二苯基-苦肼基自由基的清除效果最好,对羟基自由基的清除效果次之,对超氧阴离子自由基的清除效果最小;以 SO₃-Py 为酯化剂所得产品的抗氧化活性优于 CA-Py 为酯化剂的产品,DMF 为溶剂的产品优于 Py 为溶剂的产品。因此,操作简便的 SO₃-Py 法更适于海参岩藻聚糖的硫酸酯化。

关键词:海参岩藻聚糖;硫酸酯化;抗氧化活性

中图分类号:Q539

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.022

Effects of Sulfuric Acid Esterification Agents and Solvents on Sulfation of *Acaudina fucoidan*

WANG Rui-fang*, WU Guang-bin, XIE Yuan-hong, CHEN Su-yan

College of Bio-engineering, Jimei University, Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China

Abstract: The effects of reagents and solvents on the sulfation of *Acaudina fucoidan* (AFuc) were investigated and AFuc was chemically modified by chlorosulfonic acid-pyridine (CA-Py) and sulfur trioxide-pyridine (SO₃-Py) in two solvents including N,N-dimethyl formamide (DMF) and pyridine (Py). The results indicated that the sulfur content of sulfated *Acaudina fucoidan* (S-AFuc) reached more than 50% with CA-Py as the reagent, and only reach about 20% with SO₃-Py as the reagent. The reaction temperature can be low with DMF as solvent and Py must be 90 ℃ or more with higher yield. FT-IR analysis suggested that the characteristic absorption peak of sulfate significantly enhanced. Anti-oxidation analysis revealed the ability of S-AFuc on scavenging DPPH⁺ radical was highest, then hydroxyl radical second and superoxide anion radical least. The antioxidant activity of S-AFuc with SO₃-Py as the reagent was higher than that of CA-Py, DMF as solvent better than Py. Hence, SO₃-Py in DMF for sulfation of AFuc was comparatively simple and feasible.

Key words: *Acaudina fucoidan*; sulfation; antioxidant activity

多糖的硫酸酯化是多糖新药开发和研制的重要途径,也是研究多糖构效关系的重要手段。多糖硫酸酯化后可提高多糖的水溶性、增加其抗病毒活性中起重要作用的负电荷、改变多糖的空间立体结构,从而使其生物学活性明显改变^[1-3]。

海参岩藻聚糖(*Acaudina fucoidan*, AFuc)是低值海参(即海地瓜)中的重要活性成分,是一类主要

有岩藻糖及硫酸酯基团组成的多糖类物质,具有抗凝血、增强免疫、抗胃溃疡、抗氧化等多种功能^[4-6]。本研究对 AFuc 进行硫酸酯化修饰,考察氯磺酸-吡啶(CA-Py)和三氧化硫-吡啶(SO₃-Py)两种硫酸酯化剂,N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和吡啶(Py)两种溶剂对酯化效果的影响^[7,8]。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

海地瓜,连云港绿洋食品有限公司;中性蛋白酶,南宁庞博生物工程有限公司;N,N-二甲基甲酰

胺、吡啶、氯磺酸、三氧化硫-吡啶、明胶、氢氧化钠、硫酸钾、乙醇等试剂,均为分析纯。

1.2 仪器与设备

磁力加热搅拌器(WCT-200型,常州国华电器有限公司);傅里叶红外光谱仪(FT/IR-480型,日本岛津公司);旋转蒸发仪(RE-52AA型,上海亚荣生化仪器厂);真空冷冻干燥机(JDG-0.2B型,兰州科近真空冻干技术有限公司);紫外可见分光光度计(Cary50型,美国Varian公司)。

1.3 海参岩藻聚糖的制备

向100 g海地瓜粉中加入4000 mL缓冲液(pH5)及10 g中性蛋白酶,50 °C下恒温搅拌酶解4 h后,置于100 °C沸水浴灭酶5 min,冷却后离心(4000 rpm,15 min),取上清液,得AFuc提取液。AFuc提取液经UV200(截留分子量20万)板框超滤膜分离,可将部分色素、无机盐、小分子糖、小分子蛋白质等杂质除去,而大分子多糖、大分子蛋白等被截留浓缩。浓缩液进一步旋蒸浓缩后加入三倍体积的95%乙醇,4 °C下醇沉24 h,离心分离后将沉淀冷冻干燥得AFuc产品。

1.4 海参岩藻聚糖的硫酸酯化

1.4.1 三氧化硫-吡啶用作酯化剂

将15 mL溶剂加入锥形瓶中,磁力搅拌下加入0.6 g SO₃-Py,热水浴加热至反应温度,再加入AFuc产品0.2 g,保温反应1 h。反应完毕后冷却至室温,用2 mol/L的NaOH溶液调至中性,蒸馏水透析72 h,旋蒸浓缩10倍后加入3倍乙醇,4 °C下静置过夜,收集沉淀冷冻干燥,得硫酸酯化海参岩藻聚糖硫酸酯(sulfated *Acaudina fucoidan*, S-AFuc)产品。其中,DMF作溶剂时反应温度60 °C,所得产品记为S-AFuc-1;Py作溶剂时反应温度90 °C,所得产品记为S-AFuc-2。

1.4.2 氯磺酸-吡啶用作酯化剂

CA-Py酯化剂的制备:1.5 mL无水吡啶置于50 mL锥形瓶中,冰水浴冷却至0 °C,磁力搅拌下缓慢滴加2.5 mL氯磺酸,得淡黄色酯化试剂,现配现用。

酯化反应:取10 mL溶剂置于制备酯化剂的反应瓶中,加热至反应温度,磁力搅拌下加入0.2 g的AFuc产品,保温反应1 h;反应结束,后处理同三氧化硫-吡啶法。其中,DMF作溶剂时反应温度30 °C,所得产品记为S-AFuc-2;吡啶作溶剂时反应温度90 °C,所得产品记为S-AFuc-4。

1.5 产品分析鉴定

分别采用以下方法,对AFuc和S-AFuc产品进行化学成分分析:苯酚-硫酸法测定总糖含量^[9];Folin-酚法测定蛋白质含量^[10];Dische法测定岩藻糖含量^[11];明胶-比浊法测定硫酸根的含量^[12];红外光谱分析:称取AFuc和S-AFuc适量,分别与KBr研磨压片,在500~4000 cm⁻¹范围内进行红外扫描。

1.6 抗氧化活性的测定

清除1,1-二苯基-苦肼基自由基(DPPH·)的测定参考相关文献^[13],并加以改进:用无水乙醇配制0.08 mg/mL的DPPH·溶液,分别取2 mg/mL的样品溶液2 mL,加入2 mL的DPPH·溶液,混匀后室温静置30 min。在波长517 nm下测得吸光值记为A_s。按照相同的操作方法,以2.0 mL无水乙醇代替DPPH·-乙醇溶液,吸光值记为A_c;以2.0 mL无水乙醇代替样品溶液,吸光值记为A₀。DPPH·清除率计算公式见式1。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = (1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}) \times 100\% \quad (\text{式1})$$

清除羟基自由基(·OH)的测定参考相关文献^[14-15],并加以改进:在试管中分别加入浓度为9.0 mmol/L的FeSO₄,9.0 mmol/L的水杨酸-乙醇溶液各0.5 mL,再加入浓度为2 mg/mL的样品溶液,补水至5 mL,最后加入0.5 mL的H₂O₂启动反应,37 °C反应30 min,以蒸馏水为参比,在510 nm波长下测定吸光度记为A_s。用相同的方法,用0.5 mL蒸馏水代替H₂O₂溶液,吸光值记为A_c;用0.5 mL蒸馏水代替样品,吸光值记为A₀。·OH清除率计算公式见式2。

$$\cdot \text{OH 清除率} = (1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}) \times 100\% \quad (\text{式2})$$

清除超氧阴离子自由基(O₂^{·-})的测定参考相关文献^[16-18],并加以改进:将2 mg/mL的样品与pH 8.2,0.05 mol/L的Tris-HCl缓冲液混合均匀,25 °C温水浴条件下反应20 min,再加入用10 mmol/L盐酸为溶剂配制的10 mmol/L的邻苯三酚溶液0.4 mL,混匀后25 °C反应5 min,加入1 mol/L的盐酸0.1 mL终止反应。用10 mmol/L盐酸0.5 mL和Tris-HCl缓冲液4.5 mL混合液调零,在波长320 nm下测得吸光值记为A_s。按相同的方法,用0.4 mL盐酸(10 mmol/L)代替邻苯三酚溶液,测得吸光值记为A_c;用0.1 mL的盐酸(10 mmol/L)代替样品溶液,测得吸光值记为A₀。O₂^{·-}清除率计算公式见式3。

$$\text{O}_2^{\cdot} \text{ 清除率} = (1 - \frac{A_s - A_e}{A_0}) \times 100\% \quad (\text{式 3})$$

2 结果与分析

2.1 海参岩藻聚糖产品的分析检测

AFuc 提取液经超滤浓缩纯化、醇沉、冻干后, 多糖得率为 24.9%, 产品中总糖含量为 56.12%, 蛋白含量为 6.37%, 岩藻糖含量为 36.34%、硫酸根含量为 10.75%。

2.2 酯化反应现象的比较

CA-Py 酯化剂必须现配现用, 配制过程中放出大量热量, 冰水浴下(0 °C)仍反应剧烈, 冒出大量白

烟, 酯化反应液为黑色, 所得酯化产品为褐色。SO₃-Py 为酯化剂时, 操作简便, 反应液为绛红色, 酯化产品为黄色或土黄色。DMF 为酯化剂的良溶剂, 常温下即可溶解, 反应过程可低温操作, Py 为溶剂时, 低温下酯化剂不溶解, 必须加热至 90 °C 才可溶解。

2.3 酯化衍生物的硫酸基含量及得率

由表 1 可知: 以 CA-Py 为酯化剂可使硫酸基的含量高达 50% 以上, 产品颜色较深; 以 SO₃-Py 为酯化剂, 硫酸基的含量仅达到 20% 左右, 产品颜色稍浅; 酯化剂相同时, DMF 为溶剂所得产品的硫酸基含量稍高, 但 Py 为溶剂时, 产品得率较高, 可达 80% 左右。

表 1 四种酯化方法所得产品的测定结果

Table 1 The determination results of products derived from four esterification methods

产品编号 Product code	酯化剂 Reagent	溶剂 Solvent	硫酸基含量 Sulfur content (%)	产品得率 Product rate (%)	产品颜色 Product color
S-AFuc-1	SO ₃ -Py	DMF	24.58	23	土黄色
S-AFuc-2	SO ₃ -Py	Py	18.25	86	黄色
S-AFuc-3	CA-Py	DMF	59.53	13	深褐色
S-AFuc-4	CA-Py	Py	52.14	78	灰褐色

2.4 红外光谱分析

图 1 为 AFuc 和 S-AFuc 产品的红外光谱图, 图中 1240 cm⁻¹ (S=O 伸缩振动峰) 和 848 cm⁻¹ (C-O-S 的伸缩振动峰) 是硫酸酯的特征吸收峰^[19,20], 四种

酯化产品的 S=O 伸缩振动峰均显著增强。对比图 1A、图 1B 可知, CA-Py 为酯化剂时, S=O 伸缩振动峰明显加宽, 可能原因在于: CA-Py 为酯化剂时, 酯化反应剧烈, 硫酸基的含量较高(达 50% 以上)。

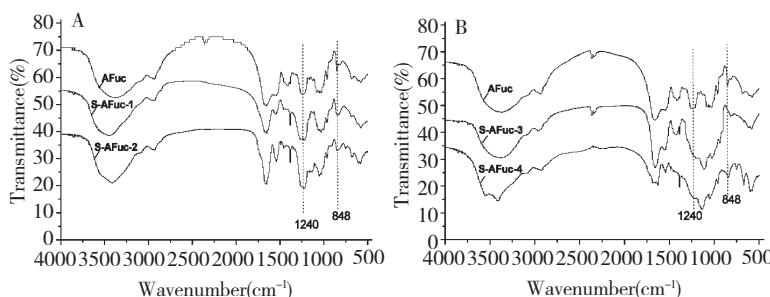


图 1 AFuc 和 SO₃-Py 法(A) 及 CA-Py 法(B) 制备的 S-AFuc 的红外光谱

Fig. 1 IR spectra of AFuc and S-AFuc prepared by the method of sulfur trioxide-pyridine (A) and chlorosulfonic acid-pyridine (B)

2.5 抗氧化活性

测定了四种硫酸酯化法所得产品对三种自由基的清除效果, 如图 3 所示。图 3 显示, S-AFuc 对 DP-PH· 的清除效果最好, 对 ·OH 的清除效果次之, 对 O₂· 的清除效果最小; 以 SO₃-Py 为酯化剂所得产品的抗氧化活性优于 CA-Py 为酯化剂的产品; 酯化剂相同时, DMF 为溶剂的产品抗氧化活性优于 Py 为

溶剂的产品。

3 讨论与结论

多糖硫酸酯化改性常用的酯化试剂为 CA-Py 和 SO₃-Py, 常用的溶剂为 DMF 和 Py。实验结果表明, 采用 SO₃-Py 为酯化剂比使用 CA-Py 所得 S-AFuc 产品的硫酸基含量较低, 但抗氧化活性却更

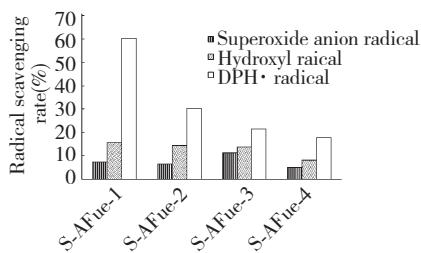


图2 四种酯化方法所得 S-AFuc 产品对三种自由基的清除效果

Fig. 2 Scavenging effect on three kinds of radical of S-AFuc products derived from four esterification methods

高;CA-Py 酯化剂的配制需冰水浴且反应剧烈,而 SO₃-Py 法操作简便、反应更易控制。Py 为溶剂时,温度必须达 90 ℃ 及以上两种酯化剂才可溶解,而 DMF 为酯化剂的良溶剂,低温下也可进行酯化反应,且 DMF 为溶剂时硫酸基的负载量稍高,产品的抗氧化活性更好。因此,DMF 为溶剂的 SO₃-Py 法是较适于海参岩藻聚糖酯化改性的方法。

参考文献

- Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, et al. Antitumor polysaccharides from Mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol*, 2007, 18(1):4-19.
- Li YH(李玉华), Wang FS(王凤山), He YL(贺艳丽). Research status of the chemical modification methods of polysaccharides. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2007, 28(1):62-65.
- Yin XZ(尹馨梓), Zhang PH(张佩华), Chen SG(陈士国), et al. Research progress on sulfating modification of polysaccharides and its anticoagulant activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:566-571.
- Kariya Y, Mulloy B, Imai K, et al. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of *Sea cucumber stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydr Res*, 2004, 339:1339-1346.
- Chen S, Xue C, Yin L, et al. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different *Sea cucumbers*. *Carbohydr Polym*, 2011, 83: 688-696.
- Yu L(于龙). Structural analysis of several fuction from Sea cucumber and their structure-activity relationship study. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), MSc. 2014.
- Zhu ZY(朱振元), Yuan J(原静), Li SF(李盛峰), et al. Preparation of sulfured polysaccharides from *Cordyceps gunii* and its anti-oxidation activity. *Mod Food Sci Technol*(现代食品科技), 2011, 27(01):1-5.
- Wang WX(王文侠), Wang LY(王龙艳), Song CL(宋春丽), et al. Optimization on sulfuric acid esterification process conditions of *Bean dregs polysaccharide* and antioxidant activity. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2013, 39:103-107.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Biochem*, 1956, 28:350-356.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem*, 1951, 193: 265-275.
- Dische Z, Shettles LB. A specific color reaction of methylpentoses and spectrophotometric micromethod for their determination. *Biol Chem*, 1948, 175:595-603.
- Dodgson KS, Price RG. A Note on the determination of the ester sulphate content of sulphate polysaccharides. *Biol Chem*, 1962, 84:106-110.
- Zhang XL(张晓璐), Xu KH(徐凯宏). Study on DPPH and superoxide free radical scavenging capacity of total flavonoids from *Hawthorn leave*. *Forest Sci Technol*(林业科技), 2008, 5:51-54.
- Xu HS(许海顺), Jiang JP(蒋剑平), Xu P(徐攀), et al. Antioxidant activity of polysaccharide from *Radix ginseng rubra*. *J Zhejiang Chin Med Univ*(浙江中医药大学学报), 2011, 6:909-912.
- Gao QP(高秋萍), Ruan H(阮红), Mao TJ(毛童俊), et al. Study on the antioxidant activity of polysaccharide from Purple sweet potato. *Acta Nutr Sin*(营养学报), 2011, 33(1):56-60.
- Yuan H, Zhang W, Li X, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ-carrageenan oligo-saccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivates. *Carbohydr Res*, 2005, 34:685-690.
- Liu F, Ooi VEC, Chang S T. Free radicals scavenging activity of *Mushroom polysaccharide extracts*. *Life Sci*, 1997, 60:763-771.
- Liu ZD(刘志东), Guo BH(郭本恒), Qu YH(曲映红), et al. Antioxidant activity of hydrolysates of *Casein*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:19-23.
- Wang XY(王新宇). Studies on preparation of sulfated polysaccharides and activity of *Hericium caput-medusae* (*Bull. : Fr*) pers.. Changchun:Jilin Agricultural University (吉林农业大学), MSc. 2011.
- Liu H(柳红). Study on chemical modification, structure and antioxidant activity of Pumpkin polysaccharides. Xian: Xi'an Normal University(陕西师范大学), MSc. 2008.