

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201709014

引文格式: 杨洋, 王一峰, 马诣欣, 等. 椴木根皮多糖硫酸酯的制备、结构表征及抗氧化活性的研究 [J]. 广西植物, 2018, 38(7): 911-923

YANG Y, WANG YF, MA YX, et al. Preparation and structural characteristics of sulfated polysaccharides from *Aralia chinensis* root-bark and its antioxidant activity [J]. *Guihaia*, 2018, 38(7): 911-923

## 椴木根皮多糖硫酸酯的制备、结构表征 及抗氧化活性的研究

杨 洋, 王一峰\*, 马诣欣, 祁如林, 杨亚军

(西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070)

**摘 要:** 该研究以产自甘肃徽县太白乡的椴木根皮多糖(ACP)为材料,通过氯磺酸-吡啶法(CSA-Py)合成了椴木根皮多糖硫酸酯(SACP)。通过响应面(RSM)实验确定的最佳反应条件:CSA/Py为2.53,反应时间为5.23 h,反应温度为61.25 °C,DS理论最大值为0.57。通过红外光谱分析(FT-IR)、X射线光电子能谱(XPS)对产物进行表征,SACP结构中已引入硫酸基团,S以S<sup>6+</sup>形式存在。气相色谱-质谱联用法(GC-MS)检测显示,SACP由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成。采用体积排阻色谱-激光光散射联用法(SEC-LLS)测得的平均分子量(M<sub>w</sub>)显示,酸性反应导致M<sub>w</sub>降低。体外抗氧化活性发现,SACP有极好的清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>·的能力,有较好的清除DPPH自由基、·OH自由基的能力,还原力很强,对Fe<sup>2+</sup>有较好的螯合能力,具有浓度依赖性。从构效关系来看,清除DPPH自由基、·OH自由基、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基以及还原力的能力均与DS呈正相关。上述研究表明了ACP及SACP的化学结构以及化学修饰对ACP抗氧化活性的影响。

**关键词:** 椴木根皮多糖, 硫酸酯化, 响应面法, 结构表征, 抗氧化活性

中图分类号: Q945.79 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)07-0911-13

## Preparation and structural characteristics of sulfated polysaccharides from *Aralia chinensis* root-bark and its antioxidant activity

YANG Yang, WANG Yifeng\*, MA Yixin, QI Rulin, YANG Yajun

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** *Aralia chinensis* stem-bark polysaccharides (ACP) were from Hui County of Longnan City in Gansu Province, China. Chemical modified *A. chinensis* stem-bark polysaccharide (ACP) was prepared, and the structure-activity relationship was studied. By chlorosulfonic acid pyridine method (CSA/Py), *A. chinensis* root-bark polysaccharide sulfation

收稿日期: 2017-11-17

基金项目: 国家自然科学基金(31460105); 甘肃省自然科学基金(1208RJZA126); 国家中医药管理局项目(201207002) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31460105); the Natural Science Foundation of Gansu Province (1208RJZA126); the State Administration of Traditional Chinese Medicine (201207002)].

作者简介: 杨洋(1992-),女,甘肃兰州人,硕士研究生,主要从事植物生理生态学研究,(E-mail)415357956@qq.com。

\*通信作者: 王一峰,博士,教授,主要从事植物生理生态学研究,(E-mail)wangyifeng6481@aliyun.com。

(SACP) was synthesized. The optimum reaction conditions determined by the response surface (RSM) experiments were as follows: the ratio of CSA/Py was 2.53, the reaction time was 5.23 h, and the reaction temperature was 61.25 °C. Under such conditions, the sulfated polysaccharides with the degree of substitution (DS) of 0.57 were obtained, which was in accordance with the expectations of the model. The result of infrared spectroscopy (FT-IR) and X ray photoelectron spectroscopy (XPS) showed that sulfuric acid groups had been introduced into SACP, and S existed in the form of  $S^{6+}$ . The average molecular weight (Mw) which was tested by size exclusion chromatography with laser light scattering method (SEC-LLS) showed that acidic reaction conditions caused the reduction of Mw. Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis showed that monosaccharide composition of SACP were arabinose, glucose, galactose and mannose. The results of antioxidant activities of SACP and ACP *in vitro* showed scavenging ability on DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide radical in a dose dependent manner, and good potential for reducing power. The free radicals scavenging ability of SACP was higher than that of ACP, which indicated that the introduction of sulfuric acid groups could enhance antioxidant ability of ACP. The above study revealed the structure of ACP and ACS, and the effect of chemical modification on the antioxidant activity of ACP.

**Key words:** *Aralia chinensis* root-bark polysaccharides, sulfation, response surface methodology, structural characteristics, antioxidant activity

近些年对多糖活性的研究发现,多糖具有良好的抗氧化酶活性、清除自由基等生物活性,并且多糖的结构能直接或间接的影响多糖活性。对多糖进行硫酸化修饰后,多糖的抗氧化活性得到了进一步的提高(靳文娟和鲁晓翔,2012;许春平等,2015)。因而多糖的硫酸酯化修饰逐渐成为现今研究热点之一。我国地大物博,多糖的资源极其丰富,尤其是类似于中草药的植物多糖具有很大的开发潜力。近年来我国对灵芝、香菇、川穹、茯苓等中草药多糖进行了大量研究,并取得了巨大的进展(戴则林和董昌武,2005;吕国英和范雷法,2009;杨铁虹等,2003)。但是,对椴木的相关研究却较为少见。

椴木(*Aralia chinensis*),系五加科(Araliaceae)椴木属植物。主要分布于甘肃、陕西、河北中部、山西、云南,椴木以根皮和茎皮入药,具有镇痛消炎(肖本见等,2006)、抗肿瘤(任美萍等,2009)、抗衰老的功效(裘名宜和冯龙飞,2006),可以用来治疗糖尿病、跌打损伤等。赵博等(2015)研究了中国椴木粗多糖对糖尿病大鼠的降血糖作用,ACP能够有效降低糖尿病大鼠的空腹血糖、糖化血红蛋白、总胆固醇、甘油三脂水平,提高高密度脂蛋白水平,有效调节糖尿病大鼠血脂代谢紊乱。本课题组前期对椴木根皮多糖(ACP)的提取进行了

研究。结果显示 ACP 是由 Ara、Glc、Gal 三种单糖组成,重均分子量为  $M_n = 5.259 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。确定了 ACP 的一级化学结构。虽然关于多糖硫酸化的研究较多,但与蛋白质和核酸相比还是有一定的差距。因此,对于多糖在生物体内的作用机制、多糖复杂的高级结构以及构效关系等方面的问题需要我们更加深入地研究。本研究对合成椴木根皮多糖硫酸酯的工艺优化,结构表征及其抗氧化活性进行研究,旨在为今后椴木资源的保护及合理利用提出理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

材料:经纯化后的椴木根皮多糖(产自甘肃徽县太白乡)常规热水浸提的椴木根皮多糖 ACP。取代度为 0.71 的 SACP<sub>M-DS</sub>(M-DS),取代度为 0.34 的硫酸化后的椴木根皮多糖 SACP<sub>L-DS</sub>(L-DS),取代度为 1.18 的硫酸化后的椴木根皮多糖 SACP<sub>H-DS</sub>(H-DS)。

试剂:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),无水乙醇,抗坏血酸 Vc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,水杨酸, HCl, 邻苯三酚, Tris-HCl, 硫酸亚铁, 三氯乙酸, 氯化亚铁, 铁氰化钾, 甲酰胺, 吡啶(3A 分子筛除水), 氯磺酸(CSA), 无水乙醇, 氢氧化钠(NaOH)。

仪器:烧杯,三颈烧瓶,铁架台,搅拌器,冷凝管,滴液漏斗,pH 试纸,透析袋等。设备:Labtech UV1000 紫外可见分光光度计, LGJ-18S 真空冷冻干燥机, SHB-III 循环水式多用真空泵, TDL5M 台式冷冻离心机, SB-35 型旋转蒸发器 (EYELA), LGJ-18S 冷冻干燥机, BL320H 电子分析天平, Allegra 64R 高速冷冻离心机, RE-52AA 旋转蒸发器, UV-2000 紫外可见分光光度计, SHB 循环水式真空泵。

## 1.2 方法

1.2.1 氯磺酸/吡啶法 (CSA/Py) 合成 SACP 取无水吡啶置于三口瓶中,经冰盐浴冷却后,用恒压滴液漏斗缓慢滴加氯磺酸,40 min 内滴完得到酯化试剂,存放备用。精密称取纯化的椴木根皮多糖 (ACP) 300 mg,室温下用 60 mL 甲酰胺溶解 5 h,待溶解后移至恒压滴液漏斗中,缓慢加入上述酯化试剂,搅拌 10 min 后将按照设计好的反应条件进行反应。反应结束后,用饱和 NaOH 调 pH 至 7.5 后,放入透析袋中用蒸馏水透析 48 h。透析袋内液体 50 °C 减压浓缩后,加入少量无水乙醇沉淀,冷冻干燥得到椴木根皮多糖硫酸酯 (SACP)。

根据响应面设计原理,依据不同因素对实验结果的影响,选取 CSA/Py (A)、时间 (B) 和温度 (C) 三个因素进行响应面分析,具体试验设计见表 1。采用 Design expert 9.0 软件进行分析。

表 1 响应面分析因素及水平

Table 1 Independent variables and their levels in Box-Behnken design

水平 Level	A	B	C
	氯磺酸/吡啶 CSA/Py	时间 Time (h)	温度 Temperature (°C)
-1	2 : 1	3	50
0	3 : 1	4.5	60
1	4 : 1	6	70

1.2.2 取代度 (DS) 的测定 硫含量测定是通过 EA3000 元素分析仪。分析条件:载气压力 80 kPa,氧化炉温度 980 °C,氧气压力 50 kPa,加氧量

20 mL,载气流速 125 mL · min<sup>-1</sup>,分析时间 320 s,热导检测器与色谱柱温度 115 °C (刘琴等,2014)。

DS 计算公式:

$$DS = (1.62 \times S\%) / (32 - 1.02 \times S\%) \quad (1)$$

式中, S% 为样品中硫酸基的百分含量。

### 1.2.3 总糖、糖醛酸、蛋白含量及溶解度的测定

1.2.3.1 溶解度和总糖含量的测定 在恒温保温桶中加入适量的蒸馏水,25 °C 下加入多糖样品,每隔 30 min 测定一次溶液中多糖的含量,当结果稳定时达到溶解平衡。当没有溶解的多糖沉于底部后,抽取部分上清液,过滤,从滤液中取样分析多糖含量 (苯酚-硫酸法),计算此温度下的溶解度。总糖含量采用苯酚-硫酸法测定。

1.2.3.2 蛋白含量测定 精确配制 1 000 μg · mL<sup>-1</sup> 的标准牛血清蛋白液,摇匀,分别取 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.1 mL 于带塞试管中,均以蒸馏水补至 1.0 mL,然后各加 5 mL 的考马斯亮蓝 G-250 试剂,混匀,放置 2 min 后,在 595 nm 波长处测定各试管溶液的吸光值 (张惟杰,1999)。

### 1.2.4 SACP 的表征

1.2.4.1 红外光谱分析 (FT-IR) 在玛瑙研钵内放入干燥后的待测多糖样品 1 mg,干燥的溴化钾粉末 100 ~ 200 mg,研磨成均匀粉末进行压片,用 Thermo Nicolet iS10 红外光谱仪进行分析。

1.2.4.2 X 射线光电子能谱 (x-ray photoelectron spectrometry, XPS) XPS (PHI-5702, USA), 激发源为 Mg K<sub>α</sub> 线,能量为 29.35 eV,样品的仓压力为 2 × 10<sup>-9</sup> Torr (2.67 × 10<sup>-7</sup> Pa),电压值 15 kV,功率为 200 W。结合能精度为 0.3 eV, Multipak 6.1a 软件对数据进行处理。

1.2.4.3 分子量测定 多糖样品的分子量采用体积排阻色谱 (size-exclusion chromatograph, SEC) - 光散射联用进行测定。多角度激光光散射仪 (multi-angle laser photometer, MALLS) λ = 690 nm (DAWN EOS, Wyatt Technology Co., USA)。色谱柱 (Ultra-hydrogel™ column, 7.8 mm × 300 mm, Waters, USA)。示差折光检测器 (Optilabrefractometer) (Dawn, Wyatt Technology Co., USA) (宋坤,2014)。

1.2.4.4 单糖组成 10 mg SACP 加入 4 mL 4 mol ·

L<sup>-1</sup>的三氟乙酸,120 ℃油浴水解 8 h(N<sub>2</sub>作保护),60 ℃条件下进行减压浓缩后,加入 10 mg 盐酸羟胺和 0.5 mL 吡啶,在油浴条件下反应 30 min(90 ℃),加入 0.5 mL 的乙酸酐,乙酰化反应 30 min(90 ℃),进行减压浓缩(60 ℃)。氯仿萃取后的衍生物用 0.22 μm 有机滤膜过滤,取 0.2 μL 样品,GC-MS 分析。

GC 条件:进样口温度设置为 250 ℃,柱箱起始温度设置为 160 ℃,保留 3 min,然后以 2 ℃·min<sup>-1</sup>的速度升至 210 ℃,保持 1 min,载气是氦气,流速设置为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

标准单糖为鼠李糖(Rha)、来苏糖(Lyx)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)和半乳糖(Gal)。标品单糖做同上处理(宋坤,2014)。

### 1.2.5 抗氧化活性测定

1.2.5.1 对 DPPH 自由基的清除作用 分别取 2 mL 浓度 0.02、0.05、0.1、0.5、1、2、5 mg·mL<sup>-1</sup>的 SACP 溶液及 Vc 溶液与 0.5 mL 的 DPPH(2×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>)摇匀,30 min 后测各样品吸光值 A<sub>i</sub>。分别取 DPPH 溶液与 70%的乙醇 2 mL 置于待测试管充分混合测得其吸光值 A<sub>0</sub>。分别取 2 mL 待测液与 70%的乙醇振荡摇匀测吸光值 A<sub>j</sub>,70%乙醇做空白。ACP 的 DPPH 自由基清除能力测量方法同上。以 Vc 为对照品(Wang et al,2009)。依据式(2)来计算 ACP、SACP<sub>HDS</sub>、SACP<sub>MDS</sub>、SACP<sub>LDS</sub>对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5.2 对超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-·</sup>)的清除作用 待测试管内分别加入 4.5 mL 的 pH8.20 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>)、4.2 mL 蒸馏水和 5 mmol·L<sup>-1</sup>邻苯三酚溶液 0.3 mL 充分混合,在 325 nm 处测 5 次吸光值,30 s 为一次,计算其吸光值与反映时间的变化率(ΔA<sub>0</sub>)。分别取浓度 0.02、0.05、0.1、0.5、1、2、5 mg·mL<sup>-1</sup>的多糖溶液及 Vc 溶液 2 mL 加入 3.2 mL 蒸馏水混匀,在 325 nm 处测定含样品的邻苯三酚溶液的吸光值,计算其吸光值随时间的变化率(ΔA)。蒸馏水作空白。每个样品重复 3 次,以浓度对清除率的平均值作图(Wang et al,2010)。依据式(3)计算样品对 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>的清除率。

$$\text{清除率} = [(\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0] \times 100\% \quad (3)$$

1.2.5.3 对 Fe<sup>2+</sup>的螯合能力 分别量取浓度 0.02、0.05、0.1、0.5、1、2、5 mg·mL<sup>-1</sup>的 SACP 溶液及 EDTA-2Na 溶液 1 mL,以及 0.05 mL 的 FeCl<sub>2</sub>(2 mmol·L<sup>-1</sup>)充分混合,加入 0.2 mL 的 5 mmol·L<sup>-1</sup>菲洛嗪(ferrozine)混匀,10 min 后,用蒸馏水调零,在 562 nm 处测吸光值 A<sub>1</sub>。同样操作以水代替多糖溶液为对照实验测定吸光值 A<sub>0</sub>,同样操作以水代替 FeCl<sub>2</sub>溶液为样品干扰实验测吸光值 A<sub>2</sub>,作空白实验调零用(Wang et al,2010)。以式(4)计算对 Fe<sup>2+</sup>螯合能力。

$$\text{螯合率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (4)$$

1.2.5.4 对羟自由基(·OH)的清除作用 在待测试管中分别加入 2 mL 浓度 0.02、0.05、0.1、0.5、1、2、5 mg·mL<sup>-1</sup>的多糖溶液、Vc 溶液、水杨酸-乙醇溶液(9 mmol·L<sup>-1</sup>)、FeSO<sub>4</sub>溶液(9 mmol·L<sup>-1</sup>)及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(6 mmol·L<sup>-1</sup>),充分混合,水浴锅加热 30 min 温度设定为 37 ℃,510 nm 处测得其吸光值 A<sub>1</sub>。不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>时的溶液吸光值为 A<sub>2</sub>。不加样时的溶液测得吸光值 A<sub>0</sub>。蒸馏水作为参比。测量 ACP 清除羟自由基·OH 的方法同上。用 Vc 作为实验对照。重复 3 次,取浓度对清除率的平均值作图(Zhao et al,2013)。用式(5)计算 SACP<sub>HDS</sub>、SACP<sub>MDS</sub>、SACP<sub>LDS</sub>对羟自由基·OH 的清除率。

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (5)$$

1.2.5.5 还原力 在试管中加入 1 mL 浓度 0.02、0.05、0.1、0.5、1、2、5 mg·mL<sup>-1</sup>的多糖溶液、Vc 溶液,2.5 mL 的 0.2 mol·L<sup>-1</sup>,pH6.6 的磷酸盐缓冲液(PBS)和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>溶液(1%),置于 50 ℃恒温水浴中反应 20 min,立即冷却,加入 2.5 mL TCA(10%),充分混合,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液 2.5 mL 加入 2.5 mL 蒸馏水,FeCl<sub>3</sub>溶液 1 mL(0.1%),摇匀后,蒸馏水调零,700 nm 处测定吸光值,每个浓度重复实验 3 次。还原能力和吸光值呈正相关关系(Qi et al,2006)。

## 2 结果与分析

### 2.1 响应面结果

参数的最佳化分析采用 Design Expert 软件进



行,结果见表2。对数学模型方程求一阶偏导数为零,求出极点值转换为酯化反应,得到最佳测定条件:CSA/Py为2.53,反应时间为5.23 h,反应温度为61.25 ℃,DS理论最大值为0.57。

表2 响应面实验结果

Table 2 Experiment result of response surface

样品 Sample	吡啶/氯磺酸 CSA/Py	时间 Time (h)	温度 Temperature (℃)	取代度 Degree of substitution
SACP <sub>1</sub>	0	0	0	0.83
SACP <sub>2</sub>	1	1	0	0.66
SACP <sub>3</sub>	-1	0	1	0.76
SACP <sub>4</sub>	0	-1	1	0.56
SACP <sub>5</sub>	0	0	0	0.85
SACP <sub>6</sub>	-1	1	0	0.82
SACP <sub>7</sub>	1	0	-1	0.7
SACP <sub>8</sub>	-1	-1	0	0.69
SACP <sub>9</sub>	1	0	1	0.69
SACP <sub>10</sub>	1	-1	0	0.65
SACP <sub>11</sub>	0	1	1	0.8
SACP <sub>12</sub>	-1	0	-1	0.71
SACP <sub>13</sub>	0	0	0	0.86
SACP <sub>14</sub>	0	-1	-1	0.6
SACP <sub>15</sub>	0	1	-1	0.77

以DS为响应值,对实验结果进行回归拟合后建立数学模型为  $Y = 0.85 - 0.035A + 0.069B + 3.75E - 0.03AB - 0.015AC + 0.017BC - 0.055A^2 - 0.087B^2 - 0.077C^2$  (6)

这说明方程的拟合程度较好,通过方程可以很好地预测试验结果。模型的  $\text{Prob} > F$ ,失拟项不显著,表明在回归方程中没有失拟的因素存在,回归式拟合较好,模型可信度高,可以通过该模型优化制备SACP的工艺条件。

利用Design Expert软件对CSA/Py、反应时间、反应温度三个因素进行响应面实验设计,结果见表3。

2.1.1 因素间交互作用 从图1:A和图1:B可以看出,随着酯化时间增加,SACP的DS逐渐升高,

但酯化时间过长,会引起多糖的部分降解。随着反应温度的升高,DS呈先上升后下降的趋势,由此发现温度太低影响酯化反应的进行,同时温度太高多糖又会在高温下降解。

从图1:C和图1:D可以看出,随着时间的增加,DS明显升高,但在高酸性条件下,酯化时间过长会引起多糖部分降解;CSA/Py的体积比小,CSA含量少,SACP的取代度较低;CSA的含量太高,高酸性条件会使得部分多糖降解,降低硫酸化的效果。

从图1:E和图1:F可以看出,温度过高以及酸性太强都不利于酯化反应的进行。

根据实际操作的方便情况,选择CSA/Py = 2.5 : 1,反应温度61 ℃,反应时间5 h进行重复试验,具有较好的重复性,当椴木根皮多糖链中伯羟基上的氢被硫酸基团取代时,此条件下硫酸根取代度为0.56,证明了响应面优化法优化SACP的可行性。

## 2.2 SACP的理化性质

ACP能溶于水,易溶于热水,不溶于乙醇、乙醚、丙酮、氯仿和正丁醇。SACP能溶于水,易溶于热水,不溶于乙醇、乙醚、丙酮、氯仿和正丁醇。从表4可以看出,SACP总糖含量,蛋白含量均有所下降,这是由于多糖发生降解导致的。对多糖进行改性目的之一,是为了提高多糖的溶解性。从表4看出,SACP的溶解性比ACP强很多。这是由于硫酸基团的引入,使多糖溶解性增强。

## 2.3 SACP的表征

2.3.1 FT-IR 从图2可以看出,硫酸化前后多糖母体特征吸收未发生变化。新的吸收峰出现在1 242.11  $\text{cm}^{-1}$ 和808.14  $\text{cm}^{-1}$ 处,分别为S=O不对称伸缩振动,及C-O-S的伸缩振动(刘琴等,2014)。这说明硫酸酯化反应已经发生了,且随着DS升高,1 242.11  $\text{cm}^{-1}$ 和808.14  $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰随之增高。

800~850  $\text{cm}^{-1}$ 之间的区域可用来推测出硫酸基的取代位置。845  $\text{cm}^{-1}$ 、830  $\text{cm}^{-1}$ 和810  $\text{cm}^{-1}$ 分别对应3位、2位和6位取代(Maciel et al,2008)。由此可知,SACP的C-6位发生了取代。这可能是由于SACP结构复杂,空间位阻使得C-2、C-3的羟

表 3 模型系数的显著性检验  
Table 3 Regression coefficient and ANOVA test

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value Prob> <i>F</i>	显著性 Significance
Model 模型	0.11	9	0.012	4.95	0.046 4	显著 Significant
A-氯磺酸/吡啶 CSA/Py	0.009 113	1	0.009 113	3.83	0.107 6	不显著 Not significant
B-时间 Time	0.038	1	0.038	15.90	0.010 5	显著 Significant
C-温度 Temperatural	0.000 05	1	0.000 05	0.021	0.890 4	不显著 Not significant
AB	0.003 6	1	0.003 6	1.51	0.273 3	不显著 Not significant
AC	0.001 225	1	0.001 225	0.52	0.505 1	不显著 Not significant
BC	0.001 225	1	0.001 225	0.52	0.505 1	不显著 Not significant
A2	0.011	1	0.011	4.42	0.089 6	不显著 Not significant
B2	0.029	1	0.029	12.11	0.017 6	显著 Significant
C2	0.021	1	0.021	8.93	0.030 5	显著 Significant
残差 Residual	0.012	5	0.002 378	—	—	—
失拟项 Lack of fit	0.011	3	0.003 808	16.32	0.058 3	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	0.000 466 7	2	0.000 233 3	—	—	—
合计 Total	0.12	14				

表 4 ACP 和 SACP 的总糖、蛋白质和溶解度  
Table 4 Carbohydrate, protein and solubility  
of ACP and SACP

样品 Sample	总糖含量 Carbohydrate content (%)	蛋白含量 Protein content (%)	溶解度 Solubility (25 °C, mg · mL <sup>-1</sup> )
ACP	72.357	2.6	0.089
SACP	56.86	0.32	0.428

基很难发生反应。

2.3.2 XPS XPS 为一种物质表面组成及结合状态的表征手段。从图 3:A 可以看出,SACP 中出现了

S 2p 峰,这说明 S 已经引入到 SACP 中,而样品 ACP 中无 S 2p 峰的存在。从表 5 可以看出 ACP 和 SACP 的表面元素组成,发现 SACP 中出现了含量不同的 S 元素。由此可以确定 SACP 中有 S 的存在。从 XPS 测定的表面元素组成来看,SACP 样品中的 S 含量各不相同,这与我们之前测的元素分析结果有偏差,是因为 XPS 测定的只能是 SACP 表面元素的相对含量,仅用于半定量,无法准确定量,且 XPS 的取样深度小于 100Å。因此,对于结构复杂的分子内部,无法扫描。XPS 主要为了表征 S 的价态,会和体相分析出的硫含量不同(王建祺,1992)。

从图 3:B 可看出,C 存在至少两种以上的能态。

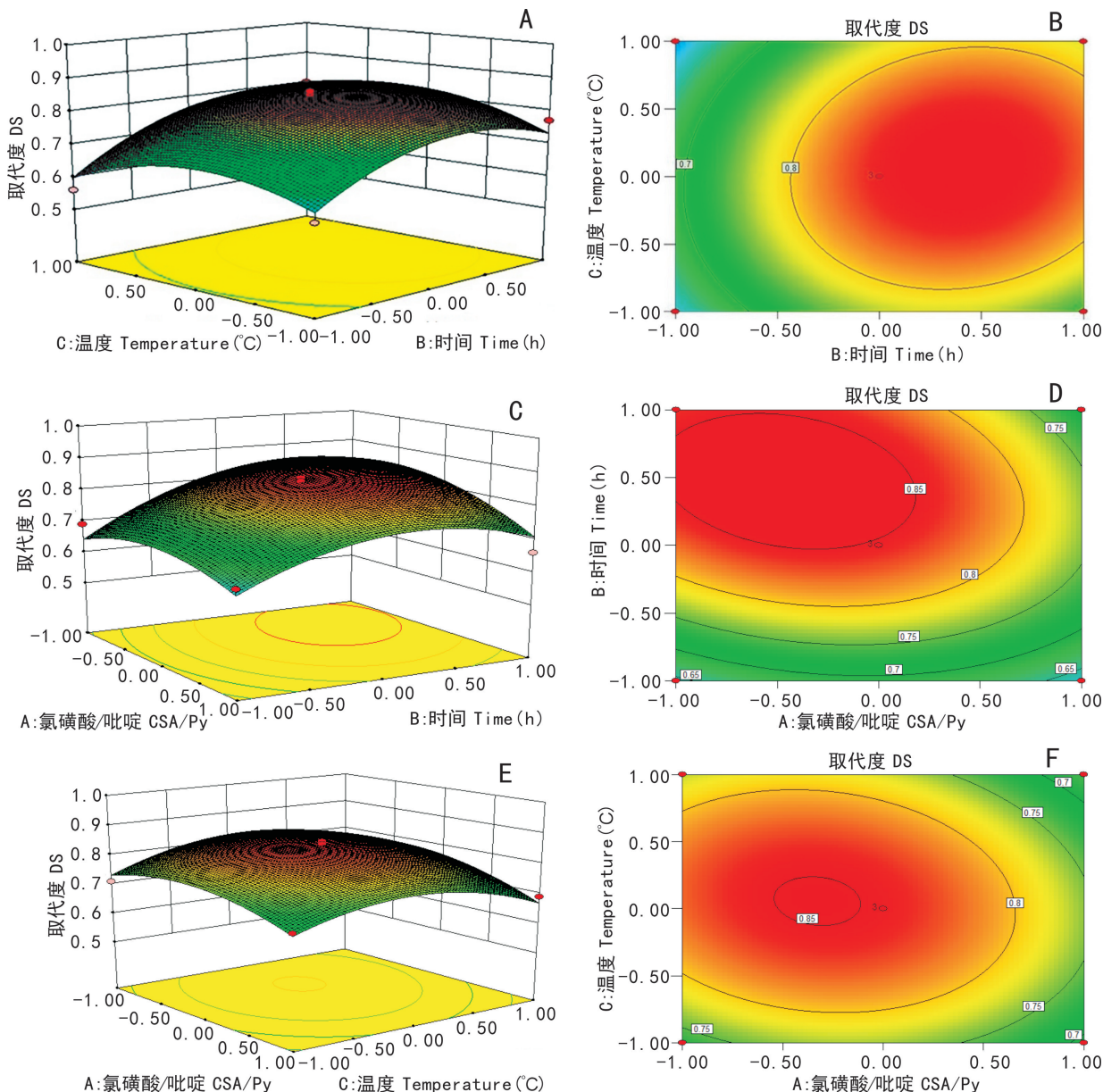


图 1 温度、时间及比例与取代度之间的交互作用

Fig. 1 Interaction of reaction temperature, reaction time and CSA/Py on the degree of substitution (DS)

我们根据谱峰的形状特征对其进行曲线拟合得到图 4。结合能在 284.5 eV 处为 C-H, 在 286.1 eV 处为 C-OH。硫酸化后 C 1s 结合态的比例发生了较大变化, 286.1 eV 的峰减弱了, 说明部分 -OH 发生取代。根据表面元素组成结果得到 ACP 的 C/O 为 1.61, SACP 的 C/O 为 1.27。这说明  $-\text{SO}_3^-$  的引入使 O 的比例增加, 导致 SACP 中 C/O 降低。图 3:C 为 ACP 和 SACP 的 O 1s 谱, 反应前 ACP 的 O

1s 在 535.5 eV 处, 反应后 O 1s 移动了约 0.2 eV, 反应前后出现位移情况说明取代基对 O 产生了影响。图 3:D 为 ACP 和 SACP 的 S 2p 谱, 在 ACP 中没有 S 2p, 在 SACP 中出现了明显的 S 2p 信号峰, 结合能为 170.6 eV, S 2p 的结合能在 170 eV 左右说明 S 为  $\text{S}^{6+}$ , 由此可以得到 SACP 中的 S 以  $-\text{SO}_3^-$  的形式存在。在制备酯化试剂的过程中, CSA 的 S 为  $\text{S}^{6+}$ , 不存在其他氧化还原反应, 由此所得 SACP

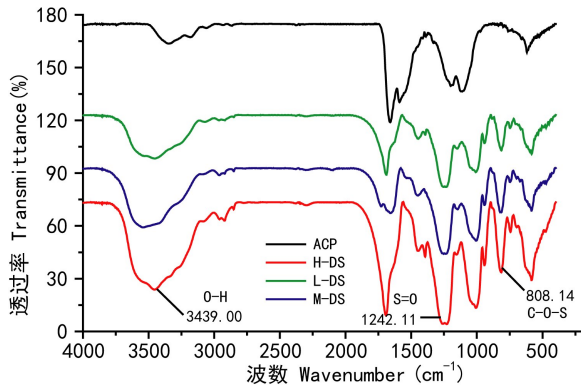


图2 CSA/Py合成的SACP的红外图谱

Fig. 2 FI-IR of SACP synthesized by CSA/Py method

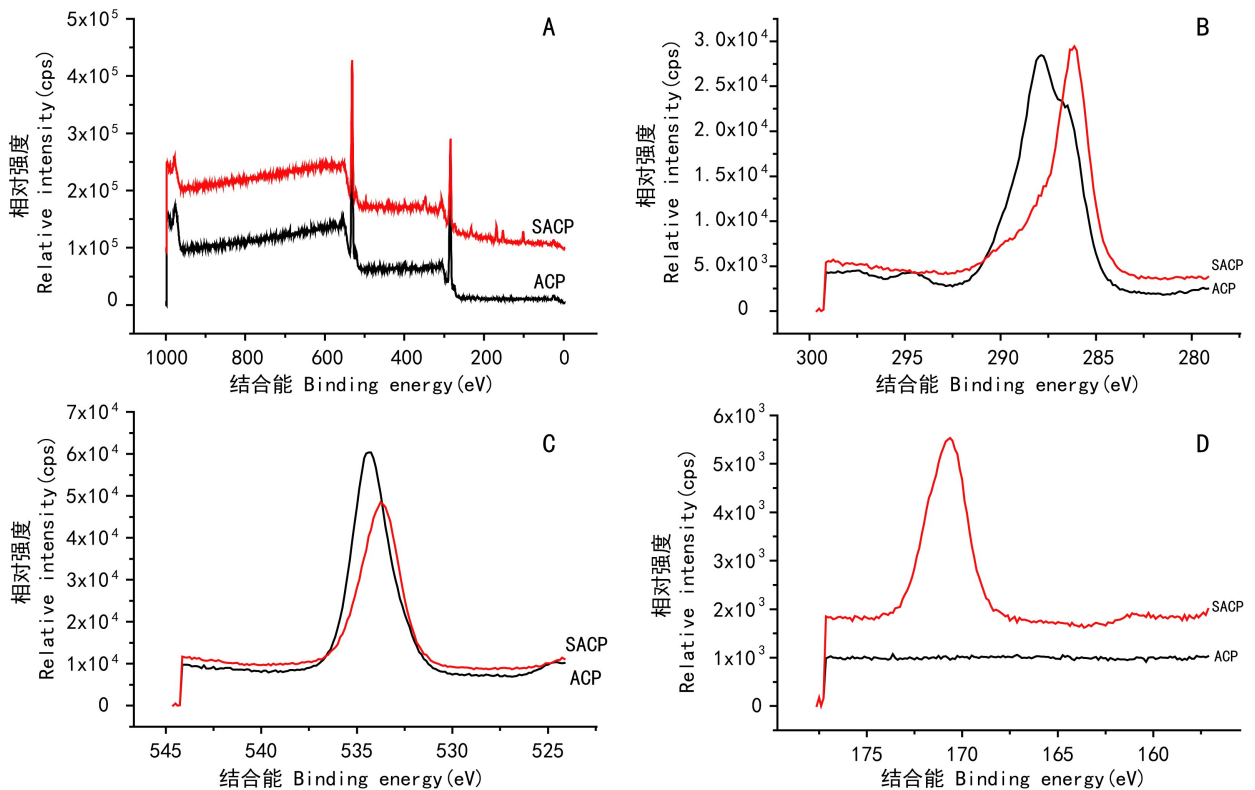


图3 SACP的XPS谱(A)全谱、(B)C 1s谱、(C)O 1s谱和(D)S 2p谱

Fig. 3 XPS spectra of SACP (A) survey spectra, (B) C 1s, (C) O 1s, (D) S 2p

中的S为S<sup>6+</sup>。

**2.3.3 分子量** SACP的SEC-LLS色谱图如图5所示,图5显示为单一对称峰值,表明SACP的均匀性,与ACP相比SACP的出峰时间晚于ACP。根据体积排阻色谱原理,分子量越小出峰时间越晚。ACP的分子量:重均分子量  $M_w = 1.308 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,数均分子量  $M_n = 4.373 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,分子量分布指数  $M_w/M_n = 2.991$ 。SACP的分子量:重均分子量  $M_w = 1.96 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,数均分子量  $M_n = 6.06 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,分子量分布指数  $M_w/M_n = 3.234$ 。通过数据可以得到,硫酸化后多糖分子量比硫酸化前小很多。这可能是在制备SACP的过

程中,强酸对分子链发生了降解,导致分子量变小(Yang et al, 2005)。多糖的降解可能是由于多糖在酸性条件下不稳定发生了水解反应,所以在多糖硫酸化的反应中去除残留水是至关重要的一个

步骤(Zou et al, 2008)。

**2.3.4 单糖组成** 从图6和表6可以看出,ACP和SACP中4个峰的保留时间与单糖标品中Ara、Man、Glc、Gal的色谱峰相吻合,说明SACP的组成



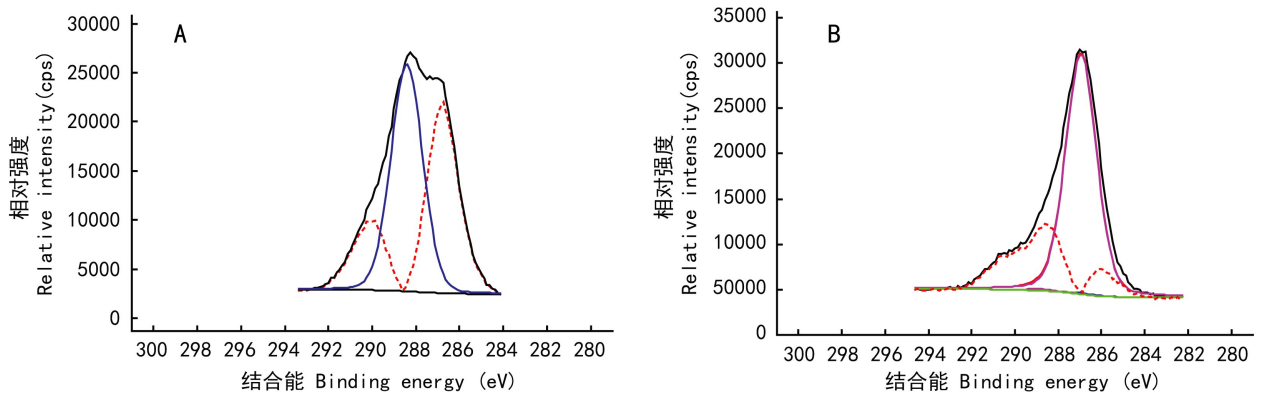


图 4 C 1s 曲线拟合 ACP (A) 和 SACP (B)  
Fig. 4 Curve-fitting of C 1s spectra for ACP (A) 和 SACP (B)

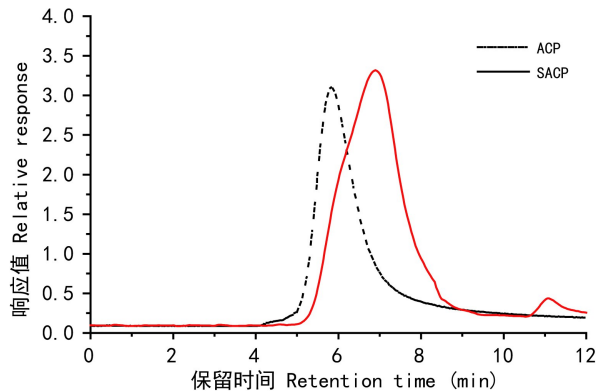


图 5 ACP 和 SACP 的 SEC-LLS 检测结果图  
Fig. 5 SEC-LLS detection diagram of ACP and SACP

表 5 XPS 测定的 SACP 表面元素组成

Table 5 Elemental compositions at the surfaces of SACP obtained by XPS detailed scans

样品 Sample	碳 C (%)	氧 O (%)	硫 S (%)	碳/氧 C/O ratio
ACP	60.27	37.46	-	1.61
SACP	51.78	40.67	5.34	1.27

与未反应前基本一致。从 Ara、Man、Glc、Gal 几种单糖组成可以看出,酯化反应仅对取代基产生了影响,但是组成 SACP 单糖的摩尔比却发生了较大

变化。Ara 由反应前的 11.58 变为 2.65, Man 由反应前的 4.85 变为 4.24, Glc 由反应前的 53.08 变为 42.87, Gal 由反应前的 16.87 变为 10.08。这说明在进行酯化反应时,酯化试剂对多糖链进行了降解。由于 Ara、Glc、Gal 比例的明显降低,可推测出 ACP 的分子链在酯化反应中降解的很厉害,导致了 Ara、Glc、Gal 单糖片段在整个反应中的大量损失。

## 2.4 抗氧化活性测定

2.4.1 对 DPPH 自由基的清除作用 以 Vc 作为阳性对照。样品 ACP 和 SACP 都具有良好的清除 DPPH 自由基作用,测定结果如图 7 所示。在整个有效浓度范围内,随着样品浓度的增加,对 DPPH 的清除能力都呈现增长趋势,具有浓度依赖性。高 DS 的多糖硫酸酯显示出较强的清除 DPPH 自由基能力,其半抑制浓度  $IC_{50}$  为  $1.219 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。中等 DS 和低 DS 的清除 DPPH 自由基能力较弱,其半抑制浓度  $IC_{50}$  分别为  $3.268 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $2.364 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。SACP 对 DPPH 的清除能力都远高于 ACP ( $IC_{50} = 3.902 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,差异增大。这说明硫酸化修饰可以显著增强 SACP 对 DPPH 自由基清除活性,DS 越高清除能力越强。多糖抗氧化活性的作用主要是由于其苯酚结构的供氢质子的能力,可使有高度氧化性的自由基还原 (Wang et al, 2014)。本研究中, H-DS 具有最强的清除 DPPH 自由基的能力,可能是由

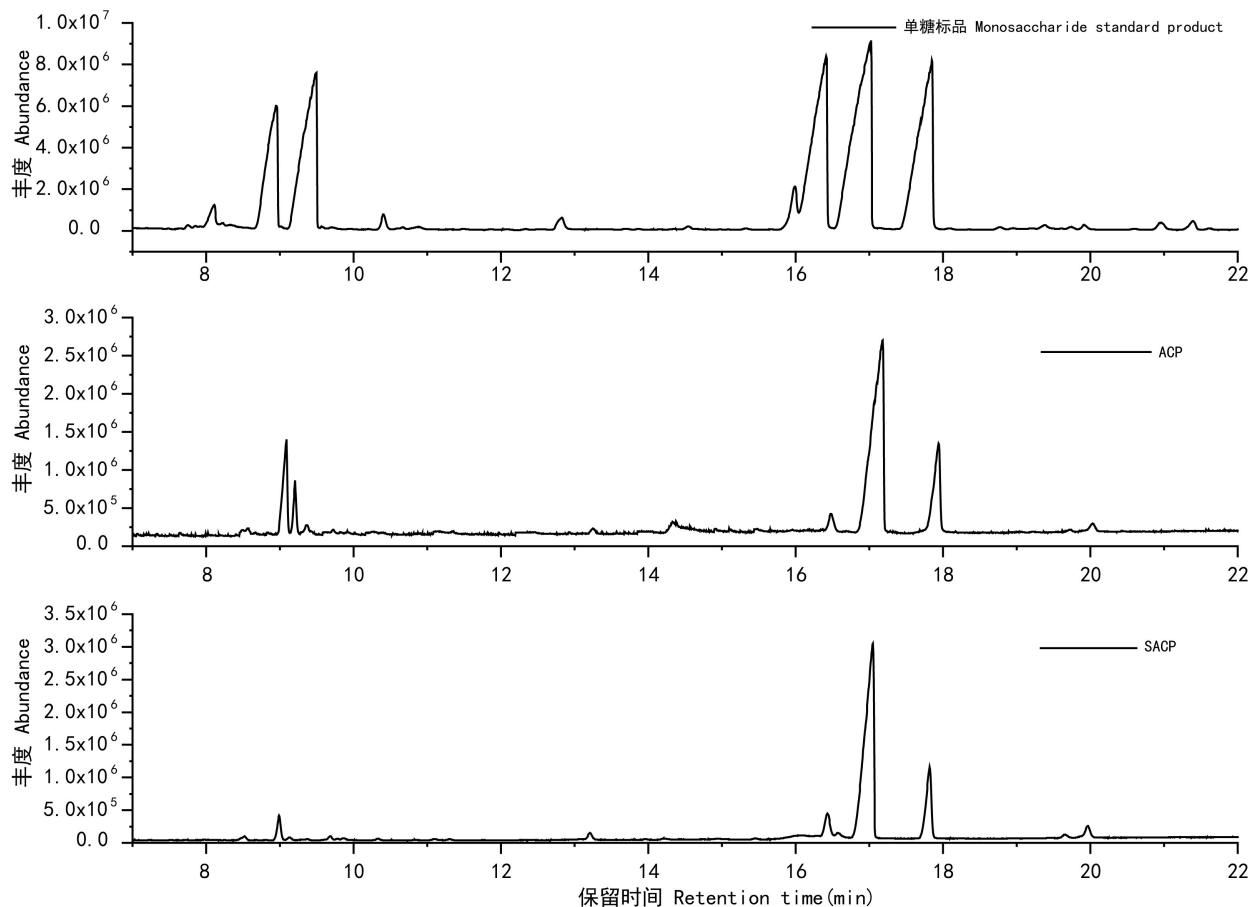


图6 GC-MS 色谱图

Fig. 6 GC-MS of standard monosaccharides

表6 ACP和SACP的单糖组成及摩尔比

Table 6 Monosaccharide composition and molar ratio of ACP and SACP

单糖种类 Sample	阿拉伯糖 Ara	木糖 Xyl	来苏糖 Lyx	甘露糖 Man	葡萄糖 Glc	半乳糖 Gal
ACP	11.58	—	—	4.85	53.08	16.87
SACP	2.65	—	—	4.24	42.87	10.08

于DS高的样品具有更强的活化异头碳氢原子的能力,其氢原子分解能力较强。

#### 2.4.2 对超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )的清除作用

ACP和SACP对超氧自由基的清除作用效果如图8所示。SACP和ACP均具有清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力,但不同浓度的样品对超氧自由基的清除能力是不同的,随着浓度增加清除 $O_2^{\cdot-}$ 效果逐渐增强。由图8

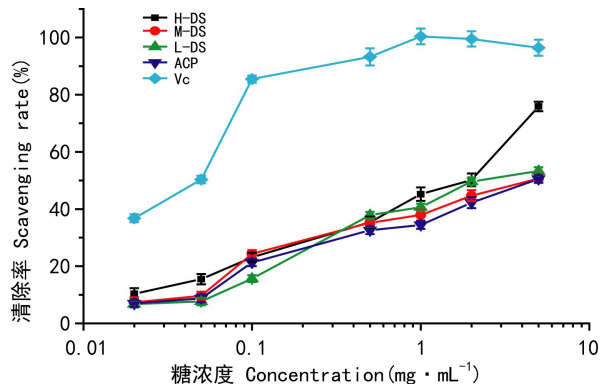


图7 ACP和SACP的DPPH自由基清除能力

Fig. 7 DPPH radical scavenging activities of ACP and SACP

可知,在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时H-DS、M-DS、L-DS和ACP对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率分别为76.59%、70.32%、72.43%、

34.29%,而在  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时 H-DS、M-DS、L-DS 和 ACP 对  $\text{O}_2^{\cdot -}$  的清除率分别为 92.76%、88.56%、84.45%、80.33%。由此可以得到在有效浓度范围内,清除率与浓度呈正相关。在  $0.02 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内,改性后样品清除  $\text{O}_2^{\cdot -}$  的能力要强于 Vc 和 ACP,所有改性后的样品清除  $\text{O}_2^{\cdot -}$  的效果优于未改性前,随着硫酸基含量升高多糖对  $\text{O}_2^{\cdot -}$  的清除作用越强。Wang et al (2008) 的研究表明 DS 较高的样品显示出更强的清除超氧自由基的作用,与本研究结果一致。因此,从 DS 角度分析,清除  $\text{O}_2^{\cdot -}$  能力与 DS 呈正相关,DS 越高,清除  $\text{O}_2^{\cdot -}$  能力越强。

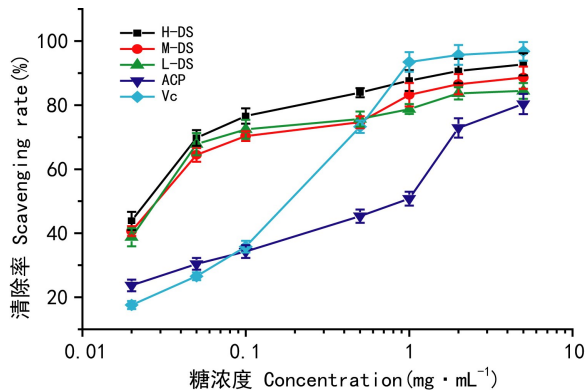


图 8 ACP 和 SACP 的超氧阴离子自由基清除能力  
Fig. 8 Superoxide radical scavenging activities of ACP and SACP

2.4.3 对  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力 从图 9 可以看出,ACP、H-DS、M-DS、L-DS 都具有一定的金属螯合能力,且随着浓度不断增大,对金属的螯合能力不断增强,所有样品  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力与浓度呈依赖的关系。从图 9 看出硫酸化前后多糖对  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力都不是很强,并没有明显的 DS 依赖关系。姚磊等 (2012) 对豆渣纤维多糖进行了改性,之后测定其对亚铁离子的螯合能力,发现其样品的亚铁离子螯合能力和浓度呈剂量性依赖,和本实验结果一致。

2.4.4 对羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 的清除作用 由图 10 可知,ACP 和 SACP 对  $\cdot\text{OH}$  自由基都具有较好的清除作用。在  $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内,仅 H-DS 对  $\cdot\text{OH}$  的清除略高于 ACP,而 M-DS 和 L-DS

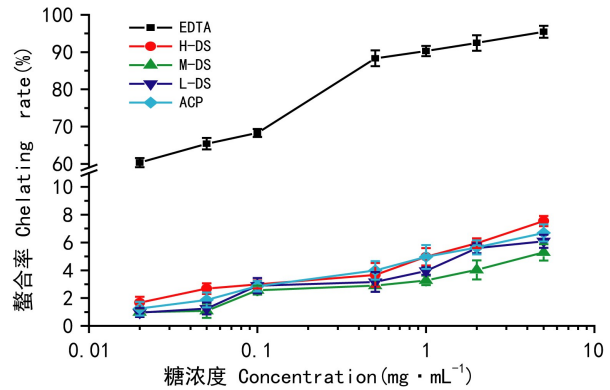


图 9 ACP 和 SACP 对  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力  
Fig. 9 Chelating abilities of ACP and SACP on ferrous ions

对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用与 ACP 差别很小。浓度大于  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,硫酸基含量和多糖清除  $\cdot\text{OH}$  自由基的能力呈正相关。浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,H-DS、M-DS、L-DS 和 ACP 对  $\cdot\text{OH}$  的清除率分别为 43.33%、39.31%、35.51%、30.13%。SACP、ACP 对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力均低于同浓度的 Vc。说明这些样品中 H-DS 对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力最好,可能与样品的分子量有关。Zou et al (2008) 发现,分子量最低的样品 ( $1.27 \times 10^4$ ) 具有最好的清除  $\cdot\text{OH}$  的能力。说明样品清除  $\cdot\text{OH}$  自由基能力与 DS、浓度呈正相关,DS 越高浓度越大,清除  $\cdot\text{OH}$  自由基能力越强。由此可以推断出硫酸基和样品的分子量对  $\cdot\text{OH}$  的清除起到重要作用。这与 Qi et al (2005) 的研究结果一致,其机理可能是由于高取代度样品分子中一部分的  $-\text{OH}$  被  $-\text{OSO}_3\text{H}$  取代了,从而提高了  $\cdot\text{OH}$  清除能力。

2.4.5 还原力 还原能力是潜在抗氧化活性的一个重要指标。由图 11 可知,在所选浓度范围内,ACP 及不同 DS 的 SACP 都具有还原能力,总还原能力和浓度呈正相关关系,SACP 的总还原力大于 ACP,且这种趋势在取代度增大的情况下越加明显。Wang et al (2008) 制备了海带多糖硫酸酯,并测定其还原力,发现改性后的海带多糖的还原力明显提高,与本研究结果一致。这说明硫酸基的引入能提高 SACP 的还原力,可能是由于 SACP 较强的供氢能力。多糖的分子量是影响其抗氧化活

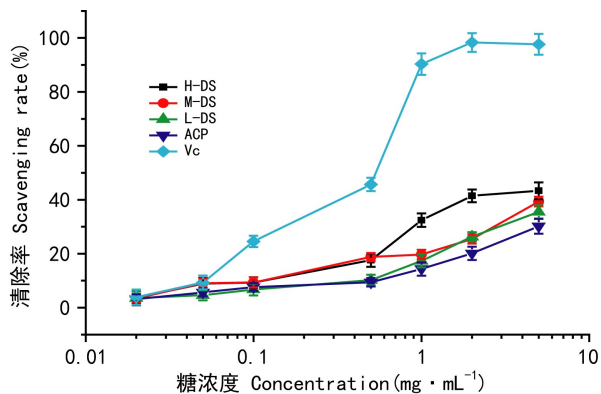


图 10 ACP 和 SACP 的羟基自由基清除能力  
Fig. 10 Hydroxyl radical scavenging activities of ACP and SACP

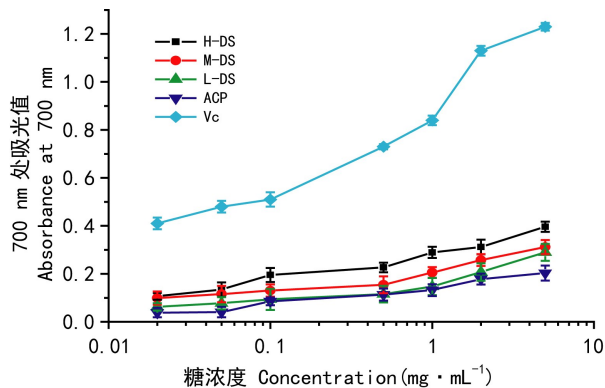


图 11 ACP 和 SACP 的还原能力  
Fig. 11 Reducing power of ACP and SACP

性的一个重要参数,本研究结果显示,DS 较高而分子量较低的多糖样品的还原力较好。因此,多糖抗氧化能力的强弱不是由单个因素决定的,而是多种因素共同作用的结果。

### 3 结论

本研究采用氯磺酸-吡啶法(CSA-Py)合成了椴木根皮多糖硫酸酯(SACP),通过响应面(RSM)实验确定了最佳反应条件:CSA/Py 为 2.53,反应时间为 5.23 h,反应温度为 61.25 ℃。采用红外光谱(FT-IR)、X 射线光电子能谱(XPS)、体积排阻

色谱-激光光散射联用法(SEC-LLS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)对 SACP 进行结构表征。结果发现,通过红外光谱分析得知(FT-IR),新的吸收峰出现在 $1\ 242\ \text{cm}^{-1}$ 和 $808\ \text{cm}^{-1}$ 处。通过 X 射线光电子能谱(XPS)从全谱中可以很明显的看出,SACP 中出现了 S 2p 峰,S 2p 的结合能在 $170.6\ \text{eV}$ 左右说明 S 为 $\text{S}^{6+}$ 。因此可以得到,SACP 中的 S 以 $-\text{SO}_3^-$ 的形式存在。采用体积排阻色谱-激光光散射联用法(SEC-LLS)测得的平均分子量( $M_w$ )显示,酸性反应导致 $M_w$ 降低。气相色谱-质谱联用法(GC-MS)检测显示 SACP 由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成。通过实验检测修饰前后产物抗氧化活性的变化,发现 SACP 有极好的清除 $\text{O}_2\cdot^-$ 的能力,有较好的清除 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$  自由基的能力,还原力也很强,对 $\text{Fe}^{2+}$ 也有较好的螯合能力,具有浓度依赖性。这说明经硫酸化修饰后,引入的硫酸根基团使得多糖活性得到提高。这为今后椴木根皮多糖(ACP)的利用和药理机制提供了进一步的参考价值。

### 参考文献:

- DAI ZL, DONG CW, 2005. Advances on the research of *Ganoderma lucidum* polysaccharides biological activities [J]. J Anhui Univ Chin Med, 24(5):60-62. [戴则林,董昌武,2005.灵芝多糖的生物活性研究进展[J].安徽中医药大学学报,24(5):60-62.]
- JIN WJ, LU XX, 2012. Antioxidant activity of sulfating *Cantharellus cibarius* polysaccharide *in vitro* [J]. Food Sci Technol, (10):177-181. [靳文娟,鲁晓翔,2012.硫酸化鸡油菌多糖的体外抗氧化作用研究[J].食品科技,(10):177-181.]
- LÜ GY, FAN LF, 2009. Development of research on lentinan [J]. Acta Agric Zhejiang, 21(2):183-188. [吕国英,范雷法,2009.香菇多糖研究进展[J].浙江农业学报,21(2):183-188.]
- LIU Q, SONG K, YIN ZX, et al, 2014. Study on preparation, chemical structure and antioxidant activity of polysaccharide sulfate from watermelon [J]. Sci Technol Food Ind, 35(14):107-113. [刘琴,宋坤,殷振雄,等,2014.籽瓜多糖硫酸酯的制备工艺、化学结构及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,35(14):107-113.]
- MACIEL JS, CHAVES LS, BWS S, et al, 2008. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae* [J]. Car-



- bohyd Poly, 71(4):559-565.
- QI H, ZHANG Q, ZHAO T, et al, 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro* [J]. Intern J Biol Macromol, 37(4):195-199.
- QI H, ZHANG Q, ZHAO T, et al, 2006. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoyleated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) [J]. Bioorg Med Chem Lett, 16(9):2441-2445.
- QIU MY, FENG LF, 2006. Reserch on the anti-aging effect of saponin of *Aralia decaisneana* Hance [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 17(2):2480-2481. [裘名宜, 冯龙飞, 2006. 黄毛椴木皂苷的抗衰老作用研究 [J]. 时珍国医药, 17(12):2480-2481.]
- REN MP, LIU MH, CHEN Y, et al, 2009. Research on antitumor activity of *Aralia saponins* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 20(1):2480-2481. [任美萍, 刘明华, 陈怡, 等, 2009. 椴木皂苷抗肿瘤活性研究 [J]. 时珍国医药, 20(1):2417-2418.]
- SONG K, 2014. Study on extraction, purification, monosaccharide composition, sulfation and hypoglycemic effect of *Sphalerocarpus gracilis* polysaccharide [D]. Lanzhou: Northwest Normal University:54-59. [宋坤, 2014. 黄参多糖的提取、分离纯化、单糖组成、硫酸化修饰和降血糖作用研究 [D]. 兰州:西北师范大学:54-59.]
- WANG J, NIU S, ZHAO B, et al, 2014. Catalytic synthesis of sulfated polysaccharides II: Comparative studies of solution conformation and antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 107(1):221-231.
- WANG JL, ZHANG J, WANG XF, et al, 2009. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides with conventional method: Molecule structure and antioxidant activities evaluation [J]. Intern J Biol Macromol, 45(5):483-492.
- WANG JL, ZHANG J, ZHAO BT, et al, 2010. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* polysaccharides with conventional method: Molecule structure and antioxidant activities evaluation [J]. Carbohydr Poly, 80(1):84-93.
- WANG J, ZHANG QB, ZHANG ZS, et al, 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica* [J]. Intern J Biol Macromol, 42(2):127-132.
- WANG JQ, 1992. Electronspectroscopy (XPS/XAES/UPS) introduction [M]. Beijing: National Defence Industry Press: 38-98. [王建祺, 1992. 电子能谱学(XPS/XAES/UPS)引论 [M]. 北京:国防工业出版社:38-98.]
- XIAO BJ, TAN ZX, LIANG WM, 2006. Studies on anti-inflammatory and immune effect of root bark of *Aralia echinocalis* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 23(6):438-440. [肖本见, 谭志鑫, 梁文梅, 2006. 刺茎椴木根皮抗炎和免疫作用的研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 23(6):438-440.]
- XU CP, ZHAO SS, YANG CC, et al, 2015. Sulfation and antioxidative activity of polysaccharide from flue-cured tobacco leaves [J]. Tobacco Sci Technol, 48(7):41-45. [许春平, 赵珊珊, 杨琛琛, 等, 2015. 烤烟多糖的硫酸化修饰及抗氧化活性 [J]. 烟草科技, 48(7):41-45.]
- YANG J, DU Y, HUANG R, et al, 2005. The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: Effect of carboxyl group and position of sulfation [J]. Intern J Biol Macromol, 36(1-2):9.
- YAO L, WANG ZY, ZHAO HT, et al, 2012. Antioxidant activities of polysaccharides from soil bean meal [J]. J NE Agric Univ, 43(11):16-19. [姚磊, 王振宇, 赵海田, 等, 2012. 豆渣纤维改性多糖的抗氧化活性研究 [J]. 东北农业大学学报, 43(11):16-19.]
- YANG TH, JIA M, MEI QB, 2003. Immunoloregulation effect of angelica polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* [J]. Chin Pharma Bull, 19(4):448-450. [杨铁虹, 贾敏, 梅其炳, 2003. 当归多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 19(4):448-450.]
- ZHAO B, WANG YF, HOU HH, 2015. Hypoglycemic effect of crude polysaccharide extract from *Aralia chinensis* on diabetic rice [J]. Food Sci, 36(13):211-214. [赵博, 王一峰, 侯宏红, 2015. 中国椴木粗多糖对糖尿病大鼠的降血糖作用 [J]. 食品科学, 36(13):211-214.]
- ZHAO BT, ZHANG J, GUO X, et al, 2013. Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation [J]. Food Hydrocolloid, 31(2):346-356.
- ZOU C, DU Y, LI Y, et al, 2008. Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity *in vitro* [J]. Carbohydr Poly, 73(2):322-331.
- ZHANG WJ, 1999. Saccharide complex biochemical research technology [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press:7-126. [张惟杰, 1999. 糖复合物生化研究技术 [M]. 浙江:浙江大学出版社:7-126.]