

南瓜水溶性多糖的制备及硫酸酯化初步研究

孔 倩, 周 婷, 武改兰, 黄景荣, 李全宏*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 采用水提分级醇沉法提取南瓜多糖并进行硫酸酯化修饰初步研究。通过 DEAE-Sephacrose Fast Flow 离子交换层析分离纯化得到南瓜多糖 PL-2。Sephacrose CL-6B 凝胶过滤层析和高效液相色谱鉴定 PL-2 纯度, 证明其组分均一, 且分子量 > 2000kD。采用氯磺酸-吡啶法、三氧化硫-吡啶法、氨基磺酸法对南瓜多糖 PL-2 进行硫酸酯化修饰, BaCl₂-明胶比浊法和红外光谱鉴定取代效果, 结果表明, 三氧化硫-吡啶法的修饰效果相对较好。

关键词: 南瓜多糖; 纯化; 硫酸酯化

Preparation and Sulfation of Polysaccharides from Pumpkin

KONG Qian, ZHOU Ting, WU Gai-lan, HUANG Jing-rong, LI Quan-hong*
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Crude water-soluble polysaccharides were separated from pumpkin by hot water extraction and gradient ethanol precipitation, and purified/fractionated by DEAE-Sephacrose Fast Flow anion-exchange chromatography and a acidic polysaccharide PL-2 was obtained. Sephacrose CL-6B gel filtration chromatography and HPLC analysis demonstrated that the component of PL-2 was homogenous and its molecular weight was more than 2000 kD. The polysaccharide was chemically modified by chlorosulfuric acid-pyridine method, sulfur trioxide-pyridine method and sulfamic acid, respectively. The identification of BaCl₂-gelatin turbidimetry and infrared spectra revealed that sulfur trioxide-pyridine method displayed the best sulfation effect.

Key words: pumpkin polysaccharide; purification; sulfation

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)16-0073-05

多糖又称多聚糖(polysaccharide), 是由单糖聚合而成的极性大分子。研究表明, 多糖具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等生理功能, 并且其活性的发挥与结构有关。分子修饰是通过化学、物理及生物学等手段对化合物分子进行结构改造, 以获得众多结构类型衍生物的方法^[1]。通过分子修饰可以改变多糖的空间构型、分子量及取代基种类、数目和位置而对其活性产生影响。化学基团的引入常常会增强多糖的活性或使多糖产生新的活性。根据目的不同, 对多糖结构修饰方法有多种, 其中硫酸酯化是一个颇为有效的修饰手段^[2-3]。20 世纪 60 年代以来陆续发现, 一些半合成硫酸化多糖, 如香菇多糖、牛膝多糖等的硫酸化衍生物, 是多种胞膜病毒的强大抑制剂, 尤其是具有抗 HIV-1 的活性, 还有葡聚糖经硫酸化也得到与肝素相同的抗凝血活性结果, 引起科研工作者广泛的重视。近几年, 还通过一些天然多糖的硫酸酯化得到了用途更为广泛的多糖衍生物^[4]。

Huheihe 等^[5]研究了红微藻中硫酸多糖的抗单纯疱疹病毒活性。实验表明, 随着浓度的变化, 这种多糖可以完全抑制或减慢引起细胞病变的病毒生长。Qi 等^[6]研究了绿藻门(Chlorophyta)孔石莼(*Ulva pertusa*)不同取代度硫酸酯多糖的抗氧化作用。实验结果表明, 高取代度的多糖具有明显的清除自由基的能力; 与一般多糖相比, 硫酸酯化多糖具有强还原力。Du 等^[7]研究了葡聚糖硫酸化衍生物的抗肿瘤活性。恶性肿瘤小鼠实验结果表明, 硫酸化支链低聚糖具有良好的抗肿瘤活性。

南瓜(*Cucurbita. spp*)作为一种药食同源的蔬菜, 具有降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎等多种生理功能。其中水提南瓜多糖是主要的活性成分, 它直接参与了降血糖、调血脂等有关活动^[8-11]。国内外对南瓜多糖(pumpkin polysaccharide, PL)的相关报道已经很多, 但对其进行硫酸酯化修饰的研究还相对较少。本研究拟采用热水浸提, 分级醇沉的方法提取南瓜多糖, 通过离

收稿日期: 2008-08-27

作者简介: 孔倩(1984—), 女, 硕士, 研究方向为果蔬加工。E-mail: kqxiaoqi@yahoo.cn

* 通讯作者: 李全宏(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然功能成分的提取与结构功能鉴定及农产品加工与综合利用。E-mail: liquanhong66@163.com

子交换层析对粗多糖进行分离纯化。采用氯磺酸-吡啶法、三氧化硫-吡啶法、氨基磺酸法对南瓜多糖进行硫酸化修饰,通过BaCl₂-明胶比浊法测定硫酸根含量,并通过红外光谱(IR)鉴定其修饰效果。硫酸酯化结构修饰旨在为南瓜多糖的功能和结构研究提供参考,进一步了解南瓜多糖分子修饰与结构稳定性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜南瓜(黄金瓜),产地为山西。

DEAE Sepharose Fast Flow 填料、Sephacryl CL-6B 凝胶填料 Pharmacia 公司; Dextran T-10($M_w 10 \times 10^3$)、T-40、T-70、T-110、T-500、T-2000、Glucose($M_w 180$) 葡聚糖标准品、三氧化硫-吡啶混合物 Sigma 公司; D-葡萄糖、结晶牛血清白蛋白 北京拜耳迪生物公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

离子交换层析柱(2.6cm × 20cm)、分子筛层析柱(1.6cm × 70cm) 北京欣经科生物技术有限公司; LGJ-18 型冷冻干燥机 军事医学科学院实验仪器厂; T6 新世纪紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; Agilent 1100 系列高效液相色谱设备 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 南瓜水溶性多糖的提取

南瓜多糖提取工艺流程为:南瓜浆→热水提取→上清液浓缩→Sevag 法脱蛋白→透析→50% 乙醇醇沉→
 → { 上清液继续加乙醇,使其浓度达 80% → 南瓜多糖
 (pumpkin polysaccharide, PL)
 → 沉淀弃去

采用液料比 4:1, 85℃ 热水浸提 4h, 乙醇分级沉淀法提取南瓜多糖^[12]。

1.3.2 南瓜多糖的分离纯化

准确称取样品 70.0mg, 分别溶于 7ml 50mmol/L pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中, 0.45μm 混合纤维素微孔膜过滤, 经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析, 0~0.6mol/L NaCl 梯度洗脱, 洗脱速度 4ml/min, 4ml/管收集, 苯酚-硫酸法跟踪检测。

1.3.3 南瓜多糖的纯度鉴定及分子量测定

1.3.3.1 凝胶过滤层析

准确称取多糖样品 10.0mg, 溶于 2ml 微滤水中, 0.22μm 混合纤维素微孔膜过滤, 经 Sepharose CL-6B 凝胶过滤层析, 洗脱液为 0.15mol/L NaCl, 洗脱速度 0.8ml/min, 4.0ml/管收集, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 透析后冻干。

1.3.3.2 高效液相色谱(HPLC)鉴定多糖纯度及分子量

样品洗脱条件为取样量 10μl, 柱温 60℃, 以去离子水为流动相, 体积流量 1.0ml/min。蒸发光散射检测器跟踪检测, 得到样品在色谱柱中的保留峰。

1.3.4 南瓜多糖的硫酸酯化修饰

人工合成硫酸化多糖的方法很多。根据所用硫酸化试剂不同, 常用的方法有氯磺酸法、三氧化硫-吡啶法等。本实验采用氯磺酸-吡啶法、三氧化硫-吡啶法、氨基磺酸法对南瓜多糖进行硫酸化修饰, 比较修饰效果。

1.3.4.1 氯磺酸-吡啶法^[13-15]

50ml 三颈烧瓶置于冰盐浴中, 加入 10ml 吡啶(使用前用 3Å 分子筛脱水), 剧烈搅拌下缓慢滴加氯磺酸 10ml。室温下持续搅拌 30min, 得到白色黏稠物质。取多糖样品 100.0mg 溶于 10ml 无水甲酰胺(formamide, FA)中(使用前用 3Å 分子筛脱水), 室温下搅拌 0.5h 后加入至已有酯化剂的三颈烧瓶中, 搅拌, 60℃ 下反应 4h。反应完毕后冰浴中冷却至 0℃, 用预冷的 2.5mol/L NaOH 中和至中性(pH7~8), 蒸馏水透析 3d, 醇沉, 冻干, 得到南瓜硫酸化多糖 SPL-2。

1.3.4.2 三氧化硫-吡啶法^[16-17]

准确称取三氧化硫-吡啶混合物 1g, 溶于 20ml 吡啶(使用前用 3Å 分子筛脱水)中, 搅拌溶解, 制备酯化试剂。准确称取 100.0mg 多糖样品, 溶于 60ml 二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)中, 搅拌均匀分散于溶液中。将其与酯化试剂充分混合后, 60℃ 水浴反应 10h, 待反应完全后加入 50ml 去离子水, 冰浴冷却至 0℃。余下步骤同氯磺酸-吡啶法。

1.3.4.3 氨基磺酸法^[2]

准确称取氨基磺酸 0.5g, 溶于 20ml 吡啶中。称取多糖样品 100mg, 溶于 60ml DMF 中, 搅拌均匀。余下步骤同氯磺酸-吡啶法。

1.3.4.4 收率计算

$$\text{收率}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100$$

式中: m_1 为反应前多糖质量, g; m_2 为反应后多糖质量, g。

1.3.5 多糖和蛋白含量的测定

苯酚-硫酸法测定多糖含量^[18]; 考马斯亮蓝法测定蛋白含量^[19]。

1.3.6 南瓜多糖硫酸酯的鉴定

1.3.6.1 SO₃⁻含量的测定

采用 BaCl₂-明胶比浊法^[20], 以硫酸钠作为标准物, 做两个平行组(A、B), 分别与氯化钡-明胶(0.5%)和明胶(0.5%)混合, 加入三氯乙酸混匀, 室温静置 20min, 360nm 波长处测定吸光度, 以两组吸光度之差(A-B)对

硫酸基浓度作标准曲线。精确称量硫酸酯化多糖 3mg, 溶于 3ml 1mol/L HCl 中, 100℃ 水解 4h。吸取水解液 0.1ml, 按照标准曲线的方法测定其硫酸基含量。硫酸基取代度(DS)按公式(1)计算^[21-22]。

$$DS = \frac{1.62 \times S}{32 - 1.02 \times S}$$

式中: S 为硫酸基含量(%)。

1.3.6.2 红外光谱测定

南瓜多糖 PL-2 和 SPL-2 2.0mg 分别与 100~200mg KBr 粉末在研钵中一起研磨均匀, 置于压模具内, 在减压下压成透明的薄片, 在 4000~400 cm^{-1} 红外波数范围内扫描; 用 Spectrum v3.02 操作软件(13 点平滑)获得二阶导数图谱。

2 结果与分析

2.1 南瓜水溶性多糖的提取及分离纯化

采用热水浸提, 乙醇分级沉淀的方法获得高浓度醇沉南瓜多糖(PL), 得率为 0.02%, 其多糖含量 44.23%、蛋白含量 8.40%。根据理想层析参数, 南瓜多糖 PL 经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析进行分离纯化, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 绘制洗脱曲线如图 1 所示。两个洗脱峰分别命名为 PL-1 和 PL-2, 得率分别为 7.4% 和 91.4%。收集 PL-2, 透析冻干。

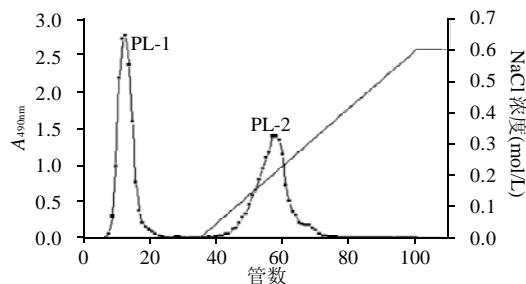


图1 离子交换层析结果

Fig.1 Elution profile of pumpkin polysaccharides on DEAE-Sepharose Fast Flow anion-exchange column

2.2 南瓜多糖的纯度鉴定及分子量测定

2.2.1 凝胶过滤层析

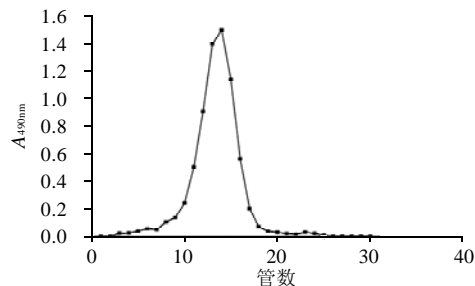


图2 PL-2 Sepharose CL-6B 凝胶过滤曲线

Fig.2 Elution curve of PL-2 on Sepharose CL-6B column

用 Sepharose CL-6B 凝胶过滤层析对南瓜多糖 PL-2 的均一性进行初步鉴定。苯酚-硫酸法跟踪检测, 绘制洗脱曲线见图 2。

由图 2 可知, PL-2 的洗脱曲线为单一对称峰, 可以初步证明其为均一组分。

2.2.2 HPLC 鉴定纯度及分子量

多糖纯度鉴定中, 最常用的方法是 HPLC 法, 它具有速度快、高分辨和重现性好等优点。PL-2 组分在 HPLC 上的洗脱曲线如图 3。

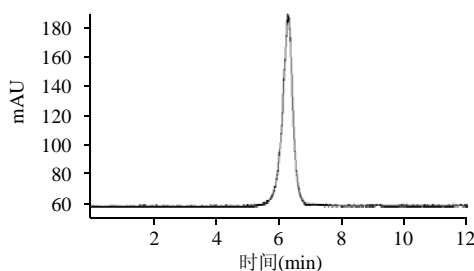


图3 PL-2 的 HPLC 洗脱曲线

Fig.3 HPLC chromatogram of the polysaccharide PL-2

由图 3 可知, PL-2 组分经 HPLC 分离后只得到单一对称峰, 进一步说明其分布均一, 不含有其他杂质。

根据葡萄糖和 T 系列标准葡聚糖的保留时间和其分子量的对数制作标准曲线(图 4), 所得方程为: $y = -1.0759x + 15.403$ ($R^2 = 0.9919$, $n=7$)。PL-2 的洗脱时间为 6.293min, 由于其洗脱时间小于分子量为 2000kD 标准葡聚糖的洗脱时间, 所以推知其分子量大于 2000kD。

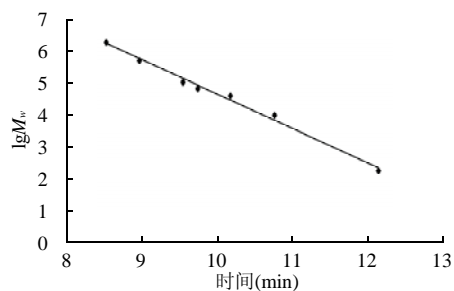


图4 T 系列 Dextran 标准曲线

Fig.4 Standard curve for dextran with different molecular masses

2.3 南瓜多糖的硫酸酯化修饰及鉴定

2.3.1 不同硫酸酯化方法比较

硫酸基团存在与否影响多糖的生物活性, 因此硫酸基取代度是硫酸化反应中重要参数。实验比较了不同硫酸酯化方法对南瓜硫酸化多糖取代度的影响, 结果见表 1。通过比较三种酯化方法对南瓜多糖 PL-2 的修饰效果发现: 三氧化硫-吡啶法 > 氯磺酸-吡啶法 > 氨基磺酸法。因此, 选择三氧化硫-吡啶法对南瓜多糖进行修饰。

表1 南瓜多糖 PL-2 不同酯化方法比较

Table 1 Comparison of sulfation efficiency of the polysaccharide PL-2 by three different methods

名称	多糖量(mg)	产物(mg)	收率(%)	S(%)	DS
氯磺酸-吡啶法	100	115.0	115.0	3.27	0.19
三氧化硫-吡啶法	100	118.6	118.6	3.45	0.20
氨基磺酸法	100	90.1	90.1	0.47	0.02

2.3.2 红外光谱鉴定

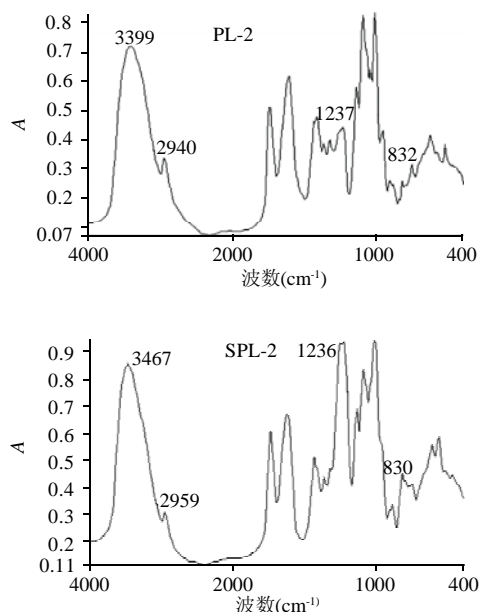


图5 PL-2和SPL-2的红外光谱图

Fig.5 IR spectra of the polysaccharide PL-2 and its sulfated derivative

由图6所示,在 $3600\sim 3200\text{cm}^{-1}$ 区域为糖O—H的伸缩振动特征吸收峰,修饰后从 3399cm^{-1} 移动到 3467cm^{-1} ,且峰形变窄,说明其分子间的氢键被部分破坏而分子内氢键数量提高,表明部分羟基已被硫酸酯化;亚甲基($-\text{CH}_2$) 2940cm^{-1} 振动吸收移向高波数 2959cm^{-1} ,且吸收峰减弱,表明硫酸化取代反应可能发生在 C_6 位;SPL-2在 1236cm^{-1} 出现S—O的伸缩振动峰、C—O—S的拉伸振动多在一般 $810\sim 830\text{cm}^{-1}$,因此SPL-2在 830cm^{-1} 出现C—O—S的拉伸振动,说明糖链上已经引入了硫酸基团。而PL-2多糖母体在 832cm^{-1} 处的振动为 α -型差向异构体的C—H取平伏键的吸收峰(是 α -D-甘露吡喃糖、半乳吡喃糖或 α -D-葡萄糖吡喃糖的特征吸收峰),因此PL-2在硫酸化后糖在 830cm^{-1} 处的吸收峰变宽,比多糖母体 832cm^{-1} 的吸收峰略向低波数移动。

3 讨论

多糖是来自高等植物、动物细胞膜、微生物细胞中的天然大分子物质,是所有生命有机体的重要组成部

分^[23]。近几年多糖受到越来越多的重视,人们在水糖的来源、提纯、结构分析、生物活性方面已经做了大量的研究工作。本实验采用热水浸提,乙醇分级沉淀的方法制备南瓜多糖。通过DEAE-Sephacrose Fast Flow离子交换层析分离纯化得到南瓜多糖PL-2。Sephacrose CL-6B凝胶过滤层析和高效液相色谱鉴定PL-2纯度,证明其组分均一,且分子量大于 2000kD 。

对南瓜多糖PL-2进行硫酸酯化修饰初步研究,比较了3种修饰方法,结果表明,三氧化硫-吡啶法对南瓜多糖的修饰效果最好,取代度达到0.2。红外光谱(IR)显示多糖引入了硫酸基团,但与文献报道相比还存在一定差距。如香菇多糖硫酸酯化后取代度可以达到2.34^[24];白芨多糖由硫酸酯化后取代度可达到1.31^[25]等。对比而言,南瓜多糖PL-2的取代度并不高,初步认定原因与南瓜多糖本身结构有关,PL-2分子量很大,结构复杂,使硫酸基团不易发生取代反应。因此下一步可以对南瓜多糖进行结构研究,从而对多糖稳定性和分子修饰之间的关系进行推断。

参考文献:

- [1] 赖萍,林跃鑫.天然多糖分子修饰研究进展[J].生命的化学,2003,23(3):183-187.
- [2] 张珏.灵芝多糖的硫酸化修饰及其衍生物抗肿瘤活性的初步研究[D].无锡:江南大学,2005.
- [3] 李玉华,王凤山,贺艳丽.多糖化学修饰方法研究概况[J].中国生化药物杂志,2007,28(1):62-65.
- [4] 何智健,陈建伟,李祥.多糖的硫酸酯化研究探要[J].中医药学刊,2003,21(12):2087-2088.
- [5] HUHEIHEL M, ISHANU V, TAL J, et al. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*[J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 50: 189-200.
- [6] QI H M, ZHANG Q B, ZHAO T T, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*[J]. Int J Biol Macromol, 2005, 37: 195-199.
- [7] DU Y G, GU G F, HU Y X, et al. Synthesis and antitumor activities of glucan derivatives[J]. Tetrahedron, 2004, 60: 6345-6351.
- [8] 刘丽华,黄金华.南瓜多糖对四氧嘧啶致糖尿病小鼠降糖作用的研究[J].中国伤残医学,2007,15(1):27-29.
- [9] 刘颖,金宏,许志勤,等.南瓜多糖对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J].中国应用生理学杂志,2006,22(3):358-361.
- [10] 熊学敏,曹珏.南瓜多糖降糖有效部位的提取分离及降糖作用的研究[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(4):266-268.
- [11] 朱红艳,朱清,顾锦华,等.南瓜多糖降血糖作用的实验研究[J].南通大学学报:医学版,2005,25(6):418-419.
- [12] 付才力.南瓜糖肽和木葡聚糖的分离纯化及其功能研究[D].北京:中国农业大学,2006.
- [13] YANG X B, GAO X D, HAN F, et al. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro*[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1725: 120-127.
- [14] MARTINICHEN-HERRERO J C, CARBONERO E R, SASSAKI G L, et al. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically

- sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2005, 35: 97-102.
- [15] TAO Y Z, ZHANG L N, CHEUNG P C K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides[J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341: 2261-2269.
- [16] YANG J, DU Y, HUANG R, et al. The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: effect of carboxyl group and position of sulfation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2005, 36(1/2): 9-15.
- [17] YANG J, DU Y, WEN Y, et al. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents[J]. *Carbohydr Polym*, 2003, 52: 397-403.
- [18] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28: 350-356.
- [19] 袁道强, 黄建华. 生物化学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 235-236.
- [20] 刘辉. 松花粉多糖的提取、纯化、硫酸酯化及活性研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2007.
- [21] 刘颖华, 何开泽, 杨敏, 等. 川牛膝多糖硫酸酯的体外抗单纯疱疹病毒2型活性[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(1): 46-50.
- [22] 郑维发, 陈才法, 鲍康德. 新月菱形藻胞外多糖的成分及其硫酸酯的制备[J]. *中草药*, 2005, 36(12): 1790-1793.
- [23] 张兴桃, 高贵珍. 多糖研究进展[J]. *宿州学院学报*, 2005, 20(5): 85-88.
- [24] 燕航, 钟耀广, 王淑琴, 等. 硫酸酯化香菇多糖衍生物制备的研究[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(3): 44-46.
- [25] 陈景耀, 张卫明, 芮海云, 等. 白及多糖硫酸酯化前后理化性质和结构的比较研究[J]. *中草药*, 2006, 37(10): 1465-1467.