

蛹虫草多糖的化学修饰及体外抗氧化能力

曲瑾郁, 任大明*

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 100866)

摘要: 将醇沉法得到的粗多糖, 经柱层析得多糖纯品。对多糖纯品进行硫酸化、羧甲基化、乙酰化化学修饰, 用于体外抗氧化活性研究。纯化后的蛹虫草多糖可以被多种化学试剂修饰, 其取代度大小的顺序是: 羧甲基化>乙酰化>硫酸化; 修饰后的多糖表现出不同程度的抗氧化活性, 其中羧甲基化和硫酸化可以明显提高多糖的抗氧化能力, 对烷基自由基清除率提高最大, 分别达到 95.19% 和 73.58%, 其次是清除羟自由基和超氧阴离子自由基, 乙酰化修饰后抗氧化能力有所下降。因此, 采用合适的修饰方法, 可以明显提高蛹虫草多糖的抗氧化活性。

关键词: 蛹虫草; 多糖; 分离纯化; 化学修饰; 体外抗氧化

Chemical Modification and *in vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Cordyceps militaris*

QU Jin-yu, REN Da-ming*

(College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Liaoning 100866, China)

Abstract: Crude *Cordyceps militaris* polysaccharides obtained by ethanol precipitation were purified by sequential column chromatographies on DEAE-cellulose 52 and Sephadex G-100. Further, purified *Cordyceps militaris* polysaccharides were successfully modified by either sulfation, carboxymethylation or acetylation and their antioxidant activity and that of their modification products were comparatively assessed based on the ability to *in vitro* scavenge superoxide anion, hydroxyl and alkyl free radicals. Carboxymethylation showed the largest degree of substitution for *Cordyceps militaris* polysaccharides, followed by acetylation and sulfation. Three different modification products revealed different antioxidant activities. Sulfation and carboxymethylation could obviously increase the antioxidant activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides and result in the highest increase of respectively 95.19% and 73.58% in the scavenging rate against alkyl radical, followed by hydroxyl and superoxide anion radicals. A decrease in the ability to scavenge superoxide anion, hydroxyl and alkyl free radical, however, was observed after acetylation. Therefore, the antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps militaris* can be improved remarkably through appropriate chemical modifications.

Key words: *Cordyceps militaris*; polysaccharide; purification; chemical modification; anti-oxidation

中图分类号: Q501

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0058-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又称北冬虫夏草, 是一种名贵的中草药。在分类学上为子囊菌亚门(*Ascomycotina*)核菌纲(*Pyrenomycetes*)球壳目(*Sphaeriales*)麦角菌科(*Clavicipitaceae*)虫草属(*Coedyceps*)^[1]。蛹虫草是由子座与菌核两部分组成的复合体, 主产于云南、吉林、辽宁、内蒙古, 生于针阔叶林或混交林地表土层中鳞翅目昆虫的蛹体上^[1]。

蛹虫草所含药用成分主要有虫草素、虫草多糖、虫草酸、超氧化物歧化酶(SOD)等, 可以起到抗疲劳、提高免疫力、抗菌消炎、抗癌等功效^[2]。蛹虫草多糖作为蛹虫草的活性成分之一^[3], 是一种能有效激活免疫

细胞但对宿主正常细胞没有直接毒副作用的高效生物效应调节剂, 具有重要的应用价值^[4]。本实验以蛹虫草培养基为原料, 通过提取分离纯化得到蛹虫草多糖并进行化学修饰, 对化学修饰前后的蛹虫草多糖清除超氧阴离子自由基、羟自由基、烷基自由基进行研究, 以期为蛹虫草多糖药物及功能性食品开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蛹虫草培养基, 由沈阳食用菌研究所提供。

DEAE-纤维素 52、Sephadex G-200 Solarbio 生物

收稿日期: 2010-10-30

作者简介: 曲瑾郁(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: 5572043@163.com

* 通信作者: 任大明(1959—), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物生物化学。E-mail: rendaming@126.com

公司; Sephadex G-100 HE Healthcare 公司; 氯乙酸 成都西亚化工股份有限公司; 乙醇、正丁醇、氯化硝基四氮唑蓝、核黄素 国药集团化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

ALPHA 2-4LD 冷冻干燥机 德国 Christ 公司; N-1001 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司; U-3010 紫外分光光度计 日本 Hitachi 公司。

1.3 方法

1.3.1 蛹虫草多糖的分离与纯化

将蛹虫草培养基粉末, 用 90℃ 蒸馏水分 3 次浸提, 每次 3h^[5]。将合并后的提取液离心、浓缩。浓缩液用 95% 乙醇沉淀过夜, 经 60℃ 干燥后所得粗多糖溶于水, 用 Sevag 法^[6]脱蛋白, 上清液浓缩后用无水乙醇沉淀过夜, 冷冻干燥得脱蛋白粗多糖。粗多糖经 DEAE-纤维素 52 柱层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 用蒸馏水和 0.05mol/L NaCl 溶液进行洗脱, 用苯酚-硫酸法^[7]跟踪检测多糖收集液, 得洗脱曲线。合并含量最多单一洗脱峰的多糖溶液对其进行浓缩, 冷冻干燥得多糖纯品。

1.3.2 蛹虫草多糖的结构分析

红外光谱法: 取 2mg 蛹虫草多糖, 用 KBr 研磨压片后, 在 4000~400cm⁻¹ 范围内进行扫描。

1.3.3 蛹虫草多糖的化学修饰^[8]

1.3.3.1 蛹虫草多糖的硫酸化

取浓硫酸 12mL、正丁醇 3mL, 置于带干燥和搅拌装置的反应瓶中, 再加入硫酸铵 0.125g, 冰浴冷却至 0℃ 搅拌 30min, 缓慢加入多糖粉末 0.5g, 反应 1h。反应结束后用 5mol/L 氢氧化钠调 pH8.0, 混合溶液经透析, 浓缩, 冷冻干燥所的产物即为硫酸化蛹虫草多糖。采用硫酸钡浊度法^[9]计算取代度。

$$DS = \frac{1.62C}{32 - 1.02C} \quad (1)$$

式中: DS 为取代度; C 为硫酸基含量/%。

1.3.3.2 蛹虫草多糖的乙酰化

将 0.5g 蛹虫草多糖溶于 10mL 蒸馏水, 用 0.5mmol/L 氢氧化钠调 pH9.0, 30℃ 保温 4h。期间分 6 次加入乙酸酐, 每次 2.5mL, 并不断滴加 0.5mol/L 氢氧化钠以保持 pH8.0。反应结束后, 用 5mol/L 盐酸调 pH 值至中性, 混合溶液经透析, 浓缩, 冷冻干燥所的产物即为乙酰化蛹虫草多糖。采用高氯酸比色法测定乙酰化蛹虫草多糖的取代度。

$$DS = \frac{1.62C}{43 - 0.42C} \quad (2)$$

式中: DS 为取代度; C 为乙酰基含量/%。

1.3.3.3 蛹虫草多糖的羧甲基化

将 0.5g 蛹虫草多糖溶于 10mL 75% 乙醇中搅拌 30min, 加入 0.5g 氢氧化钠剧烈搅拌 50min, 向反应液中再加入 15mg 氯乙酸持续搅拌 30min 后加热到 50℃ 醚化 3h, 再加入 0.2g 氢氧化钠及少量蒸馏水 50℃ 保温 1h, 冷却后用乙酸滴定至 pH5.0。混合溶液透析, 浓缩, 冷冻干燥得羧甲基化蛹虫草多糖。蛹虫草羧甲基化多糖的取代度^[10]按公式(3)计算。

$$DS = \frac{0.162A}{1 - 0.058A} \quad (3)$$

式中: DS 为取代度; A 为每克羧甲基多糖所需盐酸的毫摩尔数。

1.3.4 蛹虫草多糖化学修饰前后体外抗氧化能力测定

1.3.4.1 蛹虫草多糖的还原能力测定

取化学修饰前后蛹虫草多糖待测液各 1mL, 加入 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲溶液 2.5mL(pH 6.6), 再加入 2.5mL 1g/100mL 的铁氰化钾溶液, 混合均匀后, 于 50℃ 恒温水浴 20min, 然后加入 2.5mL 10g/100mL 的三氯乙酸溶液, 混合均匀, 离心 10min。移取 2.5mL 上清液于另一试管中, 加入 2.5mL 蒸馏水和 0.5mL 0.1g/100mL 三氯化铁溶液, 混合均匀, 在 700nm 波长处测定其吸光度。

1.3.4.2 清除超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的能力测定

采用 NBT 光还原法^[11], 参考 Hassan^[12]的光化学方法建立实验模型反应体系, 取化学修饰前后蛹虫草多糖样品待测液各 0.3mL, 0.5mL 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8), 1.5mL 0.026mol/L 甲硫氨酸, 0.3mL 0.75mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝, 0.3mL 0.02mmol/L 核黄素, 混匀, 将反应体系置于日光下照射 30min 后, 以蒸馏水作空白, 在波长 560nm 处测定各反应溶液的吸光度。按式(4)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (4)$$

式中: A₁ 为空白待测液的吸光度; A₂ 为样品待测液的吸光度。

1.3.4.3 清除羟自由基(·OH)的能力测定

采用 Fenton 反应体系测定蛹虫草多糖对 ·OH 的抑制作用^[12]。取 1mL 9mmol/L FeSO₄、1mL 9mmol/L 水杨酸乙醇溶液、1mL 8.8mmol/L H₂O₂, 加入化学修饰前后蛹虫草多糖样品待测液各 1mL, 混匀, 37℃ 水浴 30min, 以蒸馏水作空白, 在波长 510nm 处测定各反应溶液的吸光度。清除率计算方法同 1.3.4.2 节。

1.3.4.4 清除烷基自由基(R·)的能力测定^[13]

产生 R· 的反应体系含有 50% 乙醇 2mL、体积分

数0.01%大豆油1mL、0.1mol/L的 FeSO_4 -EDTA1mL、0.1mol/L的磷酸缓冲液(pH 8.0)2mL及化学修饰前后蛹虫草多糖待测液各1mL,将反应体系用紫外线照射60min,然后加入20%的三氯乙酸1mL,混匀,加0.67%的硫代巴比妥酸(TBA)1.5mL,沸水浴10min,MDA可与TBA发生反应生成红色的物质,以蒸馏水作空白,在532nm波长处测定各反应溶液的吸光度。清除率计算方法同1.3.4.2节。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草多糖的纯度鉴定

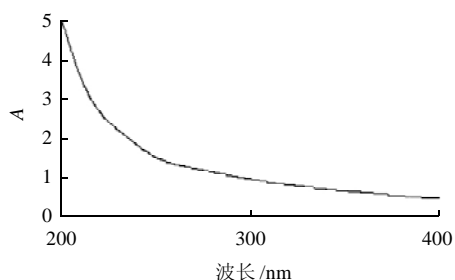


图1 蛹虫草多糖紫外扫描图谱

Fig.1 UV scanning spectrum of purified *Cordyceps militaris* polysaccharides



图2 蛹虫草多糖的电泳图

Fig.2 Electrophoresis of purified *Cordyceps militaris* polysaccharides

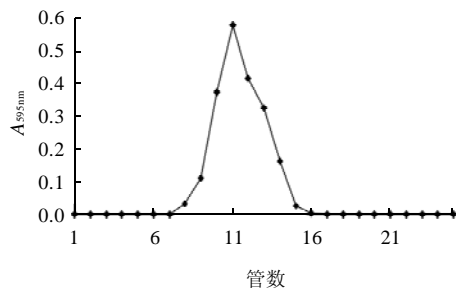


图3 蛹虫草多糖的G-100凝胶柱层析洗脱曲线

Fig.3 Elution profile of purified *Cordyceps militaris* polysaccharides on Sephadex G-100 column

纯化后的蛹虫草多糖经紫外扫描检测(图1),除200nm波长处有多糖的特征吸收峰,在260、280nm波

长处无特征吸收峰;可以认为该多糖不含有杂蛋白、多肽和核酸;蛹虫草多糖醋酸纤维薄膜电泳(图2)结果为单一的蓝色斑点,经Sephadex G-200凝胶柱层析(图3),洗脱曲线为单一的对称峰,说明该多糖较纯且为单一组分。

2.2 蛹虫草多糖红外光谱分析

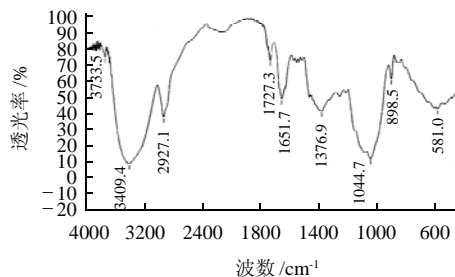


图4 蛹虫草多糖的红外吸收图谱

Fig.4 IR spectrum of purified *Cordyceps militaris* polysaccharides

由图4可知,在 3409cm^{-1} 有强吸收,为O—H伸缩振动峰;在 2927cm^{-1} 有弱吸收,为C—H伸缩振动峰;在 1651cm^{-1} 有吸收,为C=O非对称伸缩振动峰;在 1376cm^{-1} 有吸收,为C=O对称伸缩振动峰;在 1044cm^{-1} 有吸收,为C—O—H变形振动;在 898cm^{-1} 有吸收峰,表明蛹虫草多糖存在 β -糖苷键。

2.3 蛹虫草多糖化学修饰前后的体外抗氧化能力

2.3.1 蛹虫草多糖化学修饰

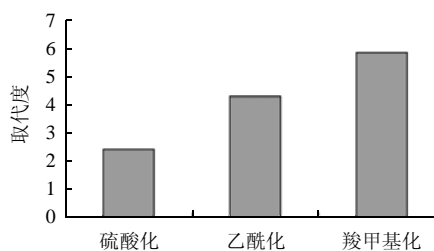


图5 蛹虫草多糖的取代度

Fig.5 Degrees of substitution of *Cordyceps militaris* polysaccharides after chemical modifications

由图5可知,不同修饰方法取代度的大小顺序是:羧甲基化>乙酰化>硫酸化。硫酸化蛹虫草多糖取代度:以硫酸盐标准品为标准绘制标准曲线,所得方程为 $y=0.00816x+0.1244(R^2=0.9991)$ 。根据标准曲线计算样品的硫酸基含量为18.9656%,取代度为2.427。乙酰化蛹虫草多糖取代度:以乙酸甲酯为标准绘制标准曲线,所得方程为 $y=1.1675x+0.0303(R^2=0.9991)$ 。根据标准曲线及乙酰基含量公式,计算样品的乙酰基含量为53.9458%,得出取代度为4.296。羧甲基化蛹虫草多糖取代度为5.897。

2.3.2 蛹虫草多糖化学修饰前后体外抗氧化能力测定

表 1 蛹虫草多糖经化学修饰后的体外抗氧化作用

Table 1 Antioxidant activities of *Cordyceps militaris* polysaccharides from after chemical modifications

样品	取代度	还原能力 (A_{700nm})	清除率/%		
			超氧阴离子自由基	羟自由基	烷基自由基
纯化蛹虫草多糖	0	0.049	5.78	18.86	65.34
硫酸化蛹虫草多糖	2.427	0.054	6.08	21.34	73.58
乙酰化蛹虫草多糖	4.296	0.069	4.32	15.74	50.12
羧甲基化蛹虫草多糖	5.897	0.088	9.56	42.10	95.19

化学修饰可以改变多糖的生物学性质。由表 1 可知, 硫酸化和羧甲基化可以明显提高多糖的抗氧化能力, 而羧甲基化作用大于硫酸化作用, 其中对烷基自由基清除率提高最大, 分别达到 95.19% 和 73.58%, 其次是清除羟自由基和清除超氧阴离子自由基^[14]。乙酰化多糖比未经修饰的蛹虫草多糖的抗氧化能力有不同程度的下降, 这可能与取代基的种类、位置及取代度的多少有关。

3 讨 论

随着人们年龄的增大, 机体内自由基清除剂的能力逐渐下降, 从而削弱了对自由基损害的防御能力, 自由基是人体组织中许多生化反应的中间代谢物。在正常情况下, 人体内的自由基总是处于不断产生和不断消除的动态平衡中。但如果自由基产生过多或消除过少, 就会造成对组织的伤害, 从而导致各种疾病的发生和加速机体的衰老^[15]。因此, 必须向生命机体中引入一些外源性的自由基清除剂, 从而达到抵抗疾病的目的。本研究结果表明, 蛹虫草多糖具有清除自由基的能力, 可将其开发为一类新型的生物免疫调节剂, 因而, 充分

利用我国的资源优势, 大力扶持开发蛹虫草多糖, 将具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] 刘春泉, 宋江峰, 李达婧, 等. 北冬虫夏草多糖组分的分离纯化及结构研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 370-373.
- [2] 王菊凤, 杨道德, 李鸽鸣, 等. 虫草多糖的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(5): 附 6-8.
- [3] 王蕾, 于荣敏, 张辉, 等. 人工培养蛹虫草多糖的分离纯化及其结构的初步研究[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(1): 23-25.
- [4] 王永敏, 祝文兴, 安利国, 等. 蛹虫草胞外多糖的提取纯化及免疫活性研究[J]. 食品与药品, 2009, 11(3): 8-11.
- [5] 刘红锦, 蒋宁, 李建军, 等. 蛹虫草多糖提取及纯化工艺研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(12): 80-82.
- [6] 刘玲, 安家彦, 金凤燮. 蛹虫草多糖除杂蛋白的方法[J]. 大连轻工业学院学报, 2002, 21(1): 33-37.
- [7] 张志军, 刘建华, 李淑芳, 等. 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 193-195.
- [8] 梁进. 茶叶多糖的化学修饰及体外抗凝血作用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [9] 柳红. 南瓜多糖的修饰、结构分析及抗氧化活性的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.
- [10] 聂凌鸿. 淮山活性多糖的分离纯化、结构与生物活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2004.
- [11] 张文军, 葛超. NBT 光还原法、邻苯三酚自氧化法测定 SOD 酶活性的比较[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2000, 14(2): 68-70.
- [12] HASSAN H M. Determination of microbial damage caused by oxygen free radicals, and the protective rule of superoxide dismutase//PACKER L. Methods in enzymology[M]. New York: Academic Press, 1984, 105: 404-412.
- [13] 谭延华, 何西利, 张玉叶, 等. 抗坏血酸对 Fenton 反应 $\cdot\text{OH}$ 生成的影响及 $\cdot\text{OH}$ 清除剂的作用[J]. 西北药学杂志, 1994, 4(9): 51-53.
- [14] 高春燕, 田成瑞. 枸杞多糖体外抗氧化特性研究[J]. 粮食与油脂, 2005 (7): 28-29.
- [15] FRANKEL E N, MEYER A S. Review: the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants[J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 1925-1941.