

# 古尼虫草多糖硫酸酯化修饰及其抗氧化活性

朱振元, 原静, 李盛峰, 刘荣强

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 对古尼虫草多糖进行硫酸酯化修饰(修饰后命名为SPS70), 并对修饰后的多糖进行了结构、性质及活性研究。红外光谱分析表明 SPS70 已具备硫酸酯化多糖的硫酸根基团。研究表明修饰后多糖由中性多糖变为酸性多糖。通过高效液相色谱分析发现, 经过 DEAE-Sephadex A-25 分离纯化后, SPS70 纯度达到 92.72%, 抗氧化活性测定显示, SPS70 清除超氧阴离子自由基的能力随样品终质量浓度增大而变强, 而对羟基自由基和 DPPH 自由基的清除能力均在 2.5 mg/mL 时达到最大抑制率, 分别为 71.23% 和 64.12%。

**关键词:** 多糖; 硫酸酯化; 结构分析; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2011)1-1-5

## Preparation of Sulfured Polysaccharides from *Cordyceps gunnii* and its Anti-oxidation Activity

ZHU Zhen-yuan, YUAN Jing, LI Sheng-feng, LIU Rong-qiang

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety (Tianjin University of Science & Technology), Ministry of Education, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In this study, 70% polysaccharides from *Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk. were chemically modified via sulfation and was renamed as SPS70 (*Cordyceps gunnii* 70% sulfated polysaccharides). The structure, property and bioactivity of SPS70 were subsequently investigated. Infrared spectroscopy analysis demonstrated that SPS70 possessed sulfate groups. After modification, the neutral polysaccharides were turn into acidic polysaccharides. After purification by DEAE-sephadex A-25, the purity of SPS70 reached 92.72% and GPC analysis showed that its molecular weight was of approximately 8490 Da. Anti-oxidation analysis revealed that the radical scavenging ability of SPS70 towards superoxide anion increased when increasing the final concentration of the polysaccharide. And the maximum hydroxyl and DPPH scavenging properties were abstained when SPS70 concentration was of 2.5 mg/mL, being of 71.23% and 64.12%, respectively.

**Key words:** polysaccharides; sulfation; structural analysis; anti-oxidation

随着对虫草研究的不断深入, 古尼虫草逐渐成为继冬虫夏草后又一种重要的虫草资源<sup>[1]</sup>。古尼虫草多糖是由古尼虫草(*Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk.)菌丝经浸泡、去脂、去蛋白、醇沉等过程制得。研究发现, 古尼虫草多糖具有抗衰老, 增强免疫力, 增强记忆力, 改善学习记忆、抗病毒等功效<sup>[2]</sup>。

在过去十年, 人们对于多糖的生物活性及其化学多样性予以很大的关注<sup>[3-6]</sup>。适当的分子修饰和结构改造, 例如硫酸酯化(硫酸根基团取代多糖上的某些羟基)能够改善乃至增加多糖的生物活性<sup>[7]</sup>。研究表明, 某些硫酸酯化多糖对比与非硫酸化多糖, 具有抗凝血

收稿日期: 2010-09-20

基金项目: 天津市科技计划项目-应用基础与前沿技术研究计划重点项目(09JCZDJC21800)、天津市高等学校科技发展基金计划项目(20090604)

作者简介: 朱振元, 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 生物资源与功能食品

[8]、抗病毒<sup>[9]</sup>、抗氧化<sup>[10]</sup>、抗肿瘤<sup>[11]</sup>等活性。

本课题组前期对古尼虫草多糖结构及活性等进行了深入的研究, 证明其为一种分子量相对较小的多糖, 具有较好的生物、生理活性。为了得到具有更高生物活性的多糖, 本研究对古尼虫草 70% (V/V) 乙醇沉淀多糖进行硫酸酯化修饰, 并对其进行了结构分析及活性研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

古尼虫草(*Cordyceps gunnii*(Berk.)Berk.)70%多糖(PS70)由天津科技大学生物资源与功能食品研究室提供<sup>[2]</sup>。

#### 1.2 试剂与主要仪器

DEAE-Sephadex A-25购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 分析纯无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿、正丁

醇、甲醇、氯化钠、浓硫酸、苯酚, 购自上海生物工程技术有限公司。

主要仪器有旋转蒸发仪购自郑州长城科工贸有限公司, 紫外可见分光光度计购自上海沪西分析仪器厂, 真空冷冻干燥机、高速冷冻离心机购自美国热电公司, TH-300梯度混合器购自上海复日科技有限公司, DBS-100电脑全自动部分收集器购自上海青浦沪西仪器厂。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 硫酸酯化多糖的制备<sup>[12]</sup>

取浓硫酸 7.5 mL, 正丁醇 2.5 mL, 置于装有冷凝管和搅拌装置的三颈瓶中, 加入硫酸铵 0.125 g, 搅拌并冰浴冷却至 0 °C。缓慢加入古尼虫草多糖粉末 0.5 g 并于 0 °C 反应 30 min, 反应后用氢氧化钠中和。中和后蒸馏水透析 48 h, 减压浓缩、冷冻干燥后即得硫酸酯化多糖粗品。

#### 1.3.2 硫酸酯化多糖的纯化

硫酸酯化多糖的纯化使用分子筛层析柱 (16×30 cm), 凝胶介质为DEAE-Sephadex A-25。三蒸水-氯化钠溶液梯度洗脱, 流速为0.5 mL/min。定时接收洗脱液, 4 min/试管, 共收集45个试管。使用苯酚-硫酸法检测<sup>[13]</sup>多糖, 将含有较多多糖的组分冷冻干燥即得硫酸酯化多糖纯品, 命名为SPS70 (*Cordyceps gunnii* 70% Sulfated Polysaccharides)。

#### 1.3.3 旋光度法<sup>[14]</sup>

称取30 mg C-SPS70, 溶于15 mL蒸馏水中, 测定其比旋光度值。计算公式如下

$$[\alpha]_D = a/CL$$

a-所测旋光度; C-溶液的质量浓度(g/mL); L-试管长度(dm)。

#### 1.3.4 红外光谱分析

称取1.0~1.5 mg干燥的SPS70置于KBr混合压片中, 使用红外光谱仪在4000~400 cm<sup>-1</sup>范围扫描。

#### 1.3.5 高效液相色谱 (HPLC) 分析

准确称取SPS70多糖1 mg溶于0.5 mL三蒸水中, 取20 μL注入高效液相色谱仪进行分析, 分析仪器和条件如下:

仪器: Agilent 1100 高效液相色谱仪; 检测: 示差检测器; 色谱柱: TSK-gel G3000SW 凝胶色谱柱 (300×7.5 mm); 流动相: 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0); 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 30 °C。

#### 1.3.6 SDS-PAGE电泳

SDS-PAGE电泳使用浓度为18%的分离胶, 上样量为20 μL, 使用阿利新兰染料染色。阿利新兰染料可与

多糖上的酸性基团特异性结合, 使酸性多糖染色, 而中性多糖则无法染色。脱色液为10%甲醇和10%乙酸。

#### 1.3.7 SPS70 抗氧化活性测定

##### 1.3.7.1 清除超氧阴离子 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 活性测定<sup>[15]</sup>

取 2.25 mL Tris-HCl 缓冲液 (50 mM, pH 8.2) 于 25 °C 下预热 20 min, 分别加入终质量浓度为 0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL 的 SPS70 多糖溶液和 0.2 mL 邻苯三酚溶液 (25 mM), 迅速混匀, 在 25 °C 下反应 30 s 后测定 320 nm 波长处溶液的吸光度。

O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除率计算式:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%$$

A<sub>i</sub>: 以水代替样品测定在 320 nm 测得的吸光度值; A<sub>0</sub>: 样品在 320 nm 下的吸光度值。

##### 1.3.7.2 清除羟自由基活性测定

根据Smirnoff等的方法改进<sup>[16]</sup>, 具体方法为: 在1.5 mL离心管中分别加入6 mM的FeSO<sub>4</sub>溶液100 μL, 6 mM的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液100 μL, 终质量浓度为0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL的样品溶液100 μL, 混匀后静置10 min。然后向各离心管中加入6 mM的水杨酸溶液100 μL, 混匀静置30 min, 并用酶标仪测定各管510 nm下的吸光度值 A<sub>i</sub>。

OH·清除率计算式:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

A<sub>i</sub>: 样品在 510 nm 下的吸光度; A<sub>j</sub>: 以蒸馏水代替底物水杨酸在 510 nm 下的吸光度; A<sub>0</sub>: 以蒸馏水代替样品在 510 nm 下的吸光度。

##### 1.3.7.3 清除 1, 2-二苯代苦味肼基自由基 (DPPH·) 能力的测定

在200 μL的5 μM的DPPH·乙醇溶液中分别加入终质量浓度为0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL的样品溶液, 封闭反应60 min后测定在517 nm波长的测吸光度A<sub>i</sub>。

DPPH·清除率计算式:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

A<sub>i</sub>: 样品在 517 nm 下的吸光度值; A<sub>j</sub>: 以蒸馏水代替 DPPH·乙醇溶液在 517 nm 下的吸光度值; A<sub>0</sub>: 以蒸馏水代替样品在 517 nm 下的吸光度值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 70%古尼虫草多糖的硫酸酯化修饰

根据1.3.1中所述方法对70%乙醇沉淀古尼虫草多糖经硫酸酯化修饰, 经中和, 透析, 冷冻干燥等步骤

后得到硫酸酯化多糖粗品, 通过干重法计算其硫酸酯化多糖得率约为62.34%。

### 2.2 硫酸酯化70%古尼虫草多糖的分离纯化

冷冻干燥的硫酸酯化多糖粗品经DEAE-Sephadex A-25分子筛层析柱分离, 主要分离得到了一种多糖, 命名为SPS70, 分离图谱见图1。

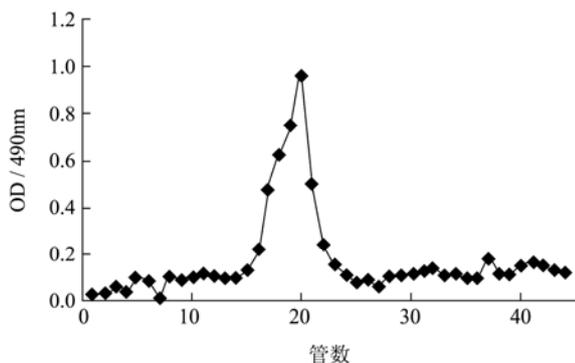


图1 CSPS70 DEAE-Sephadex A-25层析图谱

Fig.1 DEAE-Sephadex A-25 chromatographic profile of SPS70

### 2.3 比旋光度测定结果

根据1.3.3中比旋光度的计算公式, 测得PS70与SPS70的比旋光度如表1所示。

表1 SPS70与PS70的比旋光度测定

Table 1 Determination of specific rotation of SPS70 and PS70

| 样品    | 1      | 2      | 3      | 平均      | [α] <sub>D</sub> |
|-------|--------|--------|--------|---------|------------------|
| PS70  | +0.090 | +0.085 | +0.080 | +0.085  | +20.83°          |
| SPS70 | -0.640 | -0.630 | -0.655 | -0.6417 | -32.08°          |

旋光现象是偏振光透过旋光性物质的分子时所造成的。比旋光度是待测物质溶液在规定条件下测得的旋光度值。比旋光度仅决定于物质的结构。因此, 比旋光度是物质结构的特有的物理常数。

表1结果表明古尼虫草70%多糖经过硫酸酯化后, 比旋光度由右旋20.83°变为左旋32.08°。可见, 硫酸酯化修饰改变了多糖的结构。

### 2.4 红外光谱分析

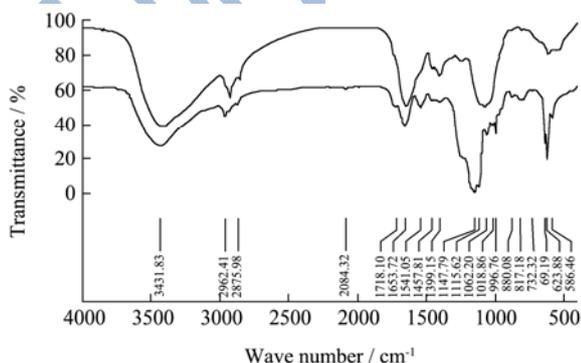


图2 SPS70与古尼虫草70%多糖红外光谱对比图

Fig.2 Comparison of SPS70 and PS70 IR spectra

红外光谱分析显示, SPS70在3500~2800 cm<sup>-1</sup>和1675~1635 cm<sup>-1</sup>之间有特征吸收峰, 表明经过硫酸酯化后的古尼虫草多糖SPS70仍具有多糖母体, 其中3500~3000 cm<sup>-1</sup>处的峰是糖分子中羟O-H的伸缩振动吸收, 2895~2940 cm<sup>-1</sup>的一组峰是糖分子中C-H键的伸缩振动吸收, 1600 cm<sup>-1</sup>左右出现的峰为-CHO的C=O键的伸缩振动峰。

由图2可见SPS70除具有多糖母体外, 在817 cm<sup>-1</sup>处的中强度峰为糖环C-O-S的伸缩振动特征峰。623 cm<sup>-1</sup>处为硫酸酯键的特征吸收峰。

### 2.5 高效液相色谱分析SPS70分子量

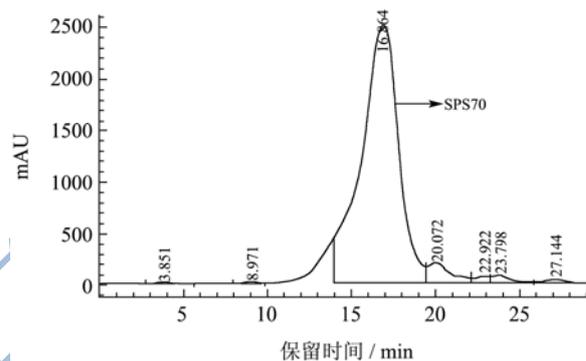


图3 SPS70高效液相图谱分析

Fig.3 HPLC chromatography of SPS70

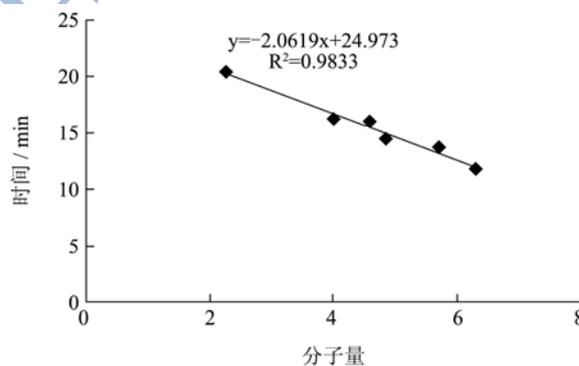


图4 SPS70分子量的测定

Fig.4 Determination of SPS70 molecular weight by HPLC

经过图3, 可知SPS70的保留时间为16.484 min。根据图4的糖分子量标准曲线计算得, SPS70分子量约为8490, SPS70纯度达到92.72%。

### 2.6 SDS-PAGE电泳分析结果

图5为SPS70与PS70聚丙烯酰胺凝胶电泳图。阿利新蓝属于阳离子染料, 是显示酸性黏液物质最特异的染料。所以, 阿利新蓝染料只能对酸性多糖进行染色, 中性多糖无法染色。由此可见, 为经过硫酸酯化后, 古尼虫草多糖由中性多糖变为酸性多糖, 而且SPS70呈均一条带。



图5 SPS70 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.5 Polyacrylamide gel electrophoresis of SPS 70

2.7 抗氧化活性研究

2.7.1 SPS70 清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·阴离子分析结果

本研究采用邻苯三酚法对 SPS70 清除超氧阴离子活性进行了测定。利用邻苯三酚在碱性溶液中易发生氧化反应，生成有色中间物质和超氧阴离子，随着时间的进行，有色产物得到积累，同时超氧阴离子抑制剂能减小反映体系在 320 nm 处的吸光度。如图 6 所示，SPS70 对超氧阴离子的抑制率随着浓度的增加逐渐增大，当浓度大于 2.5 mg/mL 时，对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·阴离子的清除能力相对平缓。

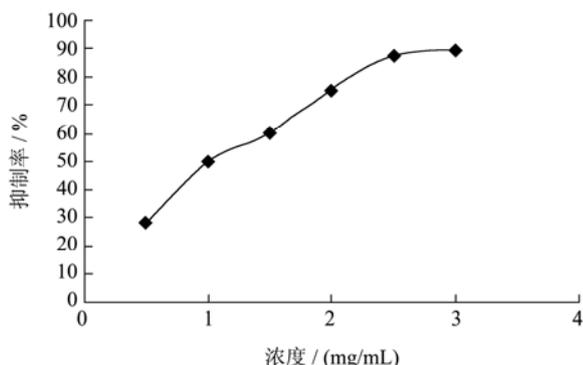


图6 SPS70清除超氧阴离子

Fig.6 O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging property of SPS70

2.7.2 清除 OH·自由基活性

本研究采用 Feton 法测定 SPS70 对羟基自由基的抑制活性，原理为：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 Fe<sup>2+</sup>混合发生 Fenton 反应，生成具有很高反应活性的 OH·自由基，它被水杨酸有效捕捉，并生成在 510 nm 下有最大吸收的有色物质；具有清除·OH 作用的物质与水杨酸竞争减少羟基自由基的生成有色物质的量。由图 7 所示，SPS70 对羟自由基的清除能力，随着样品浓度的增大而增大，在终质量浓度达到 2.5 mg/mL 除 OH·自由基的能力达到最大，为 71.23 %。终质量浓度超过 2.5 mg/mL 后，清除 OH·自由基的能力不但没有增强，反而降低。

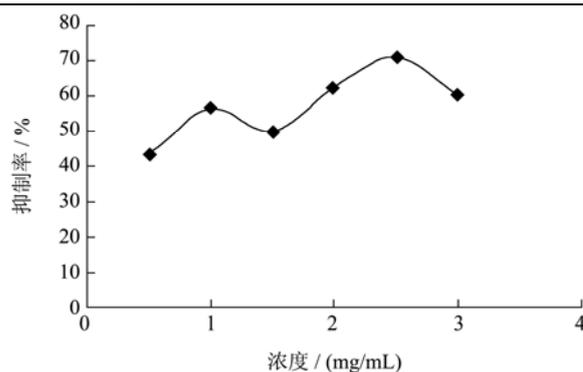


图7 SPS70清除OH·自由基

Fig.7 Elimination effect of SPS70 on OH· free radicals

2.7.3 清除 DPPH·能力的测定

DPPH·是一种较为稳定的人工合成的自由基，DPPH·的稳定性主要来自共振稳定作用及三个苯环的空间障碍，从而使加在其中的氧原子上的不成对电子不能挥发其应有的电子成对作用。DPPH·在 517 nm 波长处有一强吸收，当有自由基清除剂存在时，由于其与单电子配对而使其吸收逐渐消失，用清除率表示，清除率越大，其抗氧化能力越强，并且褪色程度与其接受的电子数量呈定量关系。

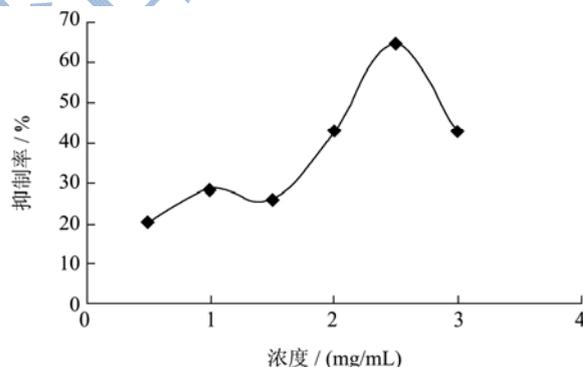


图8 SPS70清除DPPH·自由基

Fig.8 Elimination effect of SPS 70 DPPH on free radicals

如图 8 所示，SPS70 对 DPPH·的清除能力随着样品浓度的增大而增加，当终质量浓度达到 2.5 mg/mL 时，清除 DPPH·自由基的能力达到最大 64.12%，当终质量浓度继续增大时，清除 DPPH·自由基的能力反而降低。

3 结论

本文对古尼虫草 70%多糖进行硫酸酯化修饰，得率为 62.34%。并通过 DEAE Sephadex A-25 对硫酸酯化多糖分离纯化，得较纯的硫酸酯化多糖 C-SPS70，经比旋光度的测定，SPS70 与 PS70 的比旋光度分别为 -32.08°和 20.83°，比旋光度是由于偏振光透过旋光性物质的分子式所造成的，比旋光度是显示物质结构

的特有的物理常数。由此可见,经过硫酸酯化修饰后,SPS70 的结构产生变化。

由高效液相色谱分析计算得出,SPS70 多糖纯度 92.72%,分子量约为 8490,可见在化学修饰过程中,多糖部分糖链发生水解,使得分子量相对变小。通过 SDS-PAGE 电泳分析得知,硫酸酯化修饰使得 SPS70 由中性多糖变为酸性多糖,其与理论相符,因为 SPS70 上的  $\text{SO}_4^{2-}$  为酸性基团,可与阿利新蓝染料特异性的结合。而 PS70 为中性多糖,其不具有酸性基团,所以阿利新蓝染料无法染色。通过抗氧化活性的测定,SPS70 具有良好的抗氧活性,其中,对超氧阴离子的清除能力显示出明显的浓度依赖性,对  $\text{OH}\cdot$  自由基与 DPPH· 自由基的清除能力在样品终质量浓度达到 2.5 mg/mL 时达到最大,最大清除率分别为 71.23% 和 64.12%。

#### 参考文献

- [1] 张永明,张倩,梁宗琦.古尼虫草的研究现状与发展动态[J].贵州农业科学,2006,34(2):121-123
- [2] 刘安军,祝长美,朱振元,等.古尼虫草多糖对衰老模型小鼠的影响[J].现代食品科技,2008,24(2):201-203
- [3] Han F, Yao W, Yang X, et al. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 36: 201-207
- [4] Soeda S, Ohmagari Y, Shimeno H, Nagamatsu A. Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation their antithrombotic activities [J]. Thrombosis Research, 1993, 72: 247-256
- [5] Xing R, Liu S, Yu H, et al. Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro [J]. Carbohydrate Polymer, 2005, 61: 148-154
- [6] Yang J, Du Y, Huang R, et al. Chemical modification and antitumor activity of Chinese lacquerpolysaccharide from lac tree *Rhus vernicifera* [J]. Carbohydrate Polymer, 2005, 59: 101-107
- [7] 刘占峰,孙汉文.多糖的化学修饰研究进展[J].河北大学学报,2005,25(1):104-108
- [8] Haroun-Bouhedja F, Ellouali M, Sinquin C, et al. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans [J]. Thrombosis Research, 2000, 100(5): 453-459
- [9] Talarico L, Pujol C, Zibetti R, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell [J]. Antiviral Research, 2005, 66: 103-110
- [10] Yang X, Gao X, Han F, Tan R. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties in vitro [J]. BBA-General Subjects, 2005, 1725(1): 120-127
- [11] Lin Y, Zhang L, Chen L, et al. Molecular mass and antitumor activities of sulfated derivatives of  $\alpha$ -glucan from *Poria cocos* mycelia [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2004, 34(5): 231-236
- [12] Matsuda M, Shigeta S, Okutani K. Antiviral Activities of Marine *Pseudomonas* Polysaccharides and Their Over sulfated Derivatives [J]. Marine Biotechnology, 1999, 1: 68-73
- [13] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994,24(1):17-21
- [14] 刘安军,钟玥如,朱振元,等.古尼虫草多糖提取分离及初步分析[J].现代食品科技,2008,24(1):28-31
- [15] 王书芳,王勤,潘静.吡咯啉氮氧自由基及衍生物抗大鼠不同组织脂质过氧化损伤[J].中国药理学通报, 2001, 17 (4): 424 - 427
- [16] Smirnov N, Cumbes Q. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060