

川木瓜多糖的化学修饰及其活性研究

李容^{1,2}, 钟兆银¹, 姜艳¹, 孙科¹, 黄祖良¹, 李振中¹

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;
2. 右江流域特色民族药研究广西高校重点实验室, 广西 百色 533000)

摘要:目的 研究化学修饰对川木瓜多糖抗氧化活性和 α -葡萄糖苷酶抑制作用的影响。方法 对川木瓜多糖进行羧甲基化、乙酰化、硫酸化修饰,用红外光谱表征结构,采用体外试验法测定川木瓜多糖及化学修饰产物的抗氧化活性及对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。结果 红外光谱显示,化学修饰多糖除了有原多糖的红外吸收外,还有羧甲基、乙酰基、硫酸基的特征吸收峰。抗氧化活性试验表明各组分对OH \cdot 和DPPH \cdot 具有一定清除作用,硫酸化多糖清除能力最强。羧甲基川木瓜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用较好,强于修饰前的活性。结论 通过化学修饰可增强川木瓜多糖的抗氧化活性和对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。

关键词: 川木瓜;多糖;化学修饰;抗氧化活性; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2018)05-0418-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.05.004

Study on the chemical modification and the activity of *Chaenomeles speciosa* polysaccharide

Li Rong^{1,2}, Zhong Zhaoyin¹, Jiang Yan¹, Sun Ke¹, Huang Zuliang¹, Li Zhenzhong¹

(1. *Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*;
2. *Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory for Study of Characteristics and Ethnic Medicine in Youjiang Valley, Baise 533000, Guangxi, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of chemical modification on antioxidant activity of *Chaenomeles speciosa* polysaccharide and its inhibitory effect on α -glucosidase. **Methods** The *Chaenomeles speciosa* polysaccharide was modified by carboxymethylation, acetylation and sulfur acidification. The structure was characterized by infrared spectrum. The antioxidant activity of *Chaenomeles speciosa* polysaccharide and its chemical modified products and its inhibitory effect on α -glucosidase were determined *in vitro*. **Results** The infrared spectrum showed that the chemically modified polysaccharides not only had the infrared absorption of the original polysaccharides, but also had the characteristic absorption peaks of carboxymethyl, acetyl and sulfuric acid groups. The antioxidant activity test showed that each component had a certain scavenging effect on OH \cdot and DPPH \cdot and the removal ability of sulfide polysaccharides was the strongest. The carboxymethyl *Chaenomeles speciosa* polysaccharide had a good inhibitory effect on α -glucosidase, which was stronger than that before modification. **Conclusion** The antioxidant activity of *Chaenomeles speciosa* polysaccharide and its inhibitory effect on α -glucosidase can be enhanced by chemical modification.

Key words: *Chaenomeles speciosa*; polysaccharide; chemical modification; antioxidant activity; α -glucosidase

基金项目:广西自然科学基金项目(2015GXNSFBA139163);广西高校科学技术研究项目(KY2015YB226)

第一作者简介:李容(1981-),女,硕士,副教授,研究方向:天然产物有效成分提取分离及活性研究,E-mail:lr1218tt@163.com

天然多糖是生物体内具有重要作用的大分子,许多天然多糖具有多样的生物学活性,且其毒副作用低,已广泛地运用于医药、食品、日化等行业。现代药理学研究表明,天然多糖有抗肿瘤、抗衰老、降血糖、降血脂、提高机体免疫力、防动脉硬化、抗菌等作用。但部分天然多糖因存在着某些缺陷,如溶解性不好、易降解、活性较弱等,限制了它们的应用,化学修饰是解决多糖缺陷的有效途径之一。通过对多糖残基进行衍生化,如磺酰化、硫酸化、乙酰化、羧甲基化等,可改善天然多糖性能,提高多糖应用价值和拓宽用途。

川木瓜[*Chaenomeles speciosa* (Sweet)] Nakai,又名贴梗海棠、铁脚梨、酸木瓜等,为蔷薇科木瓜属,在我国安徽、湖北、云南、广西等均有分布^[1]。川木瓜主要活性成分有三萜、有机酸、多糖、皂甙、黄酮、超氧化物歧化酶等,具有降压、降糖、软化血管、护肝降酶和提高人体免疫力等功效^[2]。多糖为川木瓜的主要活性成分之一,课题组从川木瓜中提取了多糖,并进行了相关的活性测试,川木瓜多糖有一定的抗氧化作用,对 α -葡萄糖苷酶也有一定抑制作用。但也存在一些问题,主要存在的问题有水溶性欠佳,抗氧化作用和对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用与阳性对照物还有一定差距。针对川木瓜多糖的这些问题,课题组对多糖分子进行化学修饰,在分子中分别引入羧甲基、硫酸基、乙酰基,得到三种改性多糖,进行活性测试,筛选出具有较好抗氧化活性和对 α -葡萄糖苷酶具有较好抑制作用的化学修饰多糖。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器 材料:川木瓜鲜品,购于广西百色市凌云县农贸市场,将鲜品洗净、切片、晾干、粉碎过筛备用。试剂:1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,上海金穗生物科技有限公司);4-硝基酚-2-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,上海金穗生物科技有限公司);木瓜蛋白酶(上海原叶生物科技有限公司); α -葡萄糖苷酶(sigma公司);阿卡波糖(德国拜耳公司);其余试剂均为分析纯。仪器:CPA64型电子天平(北京赛多利斯仪器公司);UV-1750紫外可见分光光度计(日本岛津);640-IR傅利叶变换红外光谱仪(安捷伦科技有限公司);RE-52AA型旋转蒸发仪(上海安亭实验仪器有限公司);E-201-C型pH复合电极(上海精密科学仪器有限公司);FD-1A-50真空冷冻干燥机(上海比朗仪器有限公司);HHS-21-4电热式恒温水浴锅(江苏金坛宏凯仪器厂)。

1.2 方 法

1.2.1 川木瓜多糖提取与纯化 取川木瓜粉末,加入1.5倍体积石油醚回流提取2h,过滤,晾干滤渣,回收石油醚。将滤渣用85%乙醇再回流提取2h,过滤,晾干滤渣,回收乙醇。将经石油醚和乙醇处理后的川木瓜粉末加入蒸馏水,在85℃提取3h,减压过滤,滤渣继续用蒸馏水在85℃下提取2次,过滤,合并滤液,旋转蒸发浓缩滤液,浓缩至稍黏稠状态,用5倍85%乙醇沉淀多糖,静置一段时间,待多糖沉降后,去上清液,所得沉淀为粗多糖。得到的粗多糖溶液溶于蒸馏水中,用木瓜蛋白酶联用Sevag法脱蛋白,在粗多糖溶液中按1.5%的比例加入木瓜蛋白酶,55℃水浴酶解2h,100℃灭酶10min,离心弃去沉淀。收集上清液,加入Sevag试剂($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$)振荡15min,静置分层后去胶状沉淀,反复操作几次,直到无明显胶状沉淀为止。在脱蛋白后的多糖上清液中加入颗粒活性炭进行脱色素,按10%的比例加入活性炭颗粒,30℃条件下振荡5h,过滤得多糖溶液。将脱蛋白和脱色素后的多糖提取液浓缩至一定体积,加入5倍85%乙醇沉淀多糖,冰箱冷藏过夜,离心分离,去上清液,收集多糖,冷冻干燥得精制多糖。

1.2.2 化学修饰川木瓜多糖的制备 羧甲基川木瓜多糖的制备^[3]:称取1.0g精制川木瓜多糖于三口瓶中,加入50ml异丙醇,在常温下搅拌20min,缓慢加入20%NaOH10ml,继续搅拌40min,加入0.2g氯乙酸,升温至60℃反应4h,反应完成后,冷却至室温,用稀盐酸调pH至中性,流动自来水透析24h,蒸馏水透析24h,浓缩,3倍90%乙醇沉淀、离心,得沉淀多糖,冻干后得羧甲基川木瓜多糖。

乙酰化川木瓜多糖的制备^[4]:参照文献制备硫酸化川木瓜多糖,称取1.0g精制川木瓜多糖于三口瓶,加入30ml蒸馏水搅拌溶解,加4mol/LNaOH溶液调pH值为9,滴加乙酸酐5ml,滴加过程中用NaOH调节pH,使体系pH保持在9左右,反应2h,反应结束后调pH值至中性,流动自来水透析24h,蒸馏水透析24h,浓缩,3倍90%乙醇沉淀、离心,得沉淀多糖,冻干后得乙酰化川木瓜多糖。

硫酸化川木瓜多糖的制备^[5]:称取1.0g精制川木瓜多糖于小烧杯中,加入30ml甲酰胺,磁力搅拌分散均匀,将此分散体系转移至硫酸酯化反应体系($V_{\text{氯磺酸}}:V_{\text{吡啶}}=1:5$)中,升温至65℃反应2h,反应结束后冷却至室温,转移至100ml的冰水中,用NaOH溶液调pH值为7,流动自来水透析24h,蒸馏水透析24h,浓缩,3倍90%乙醇沉淀、离心,得沉淀多

糖,冻干后得硫酸化川木瓜多糖。

1.2.3 化学修饰川木瓜多糖的红外光谱分析 取少量样品与溴化钾粉末研磨、压片,用红外光谱仪在4000~400 cm^{-1} 区间扫描分析。

1.2.4 化学修饰川木瓜多糖抗氧化活性

1.2.4.1 对 $\text{OH}\cdot$ 的清除作用 用水杨酸法进行测定四种多糖对 $\text{OH}\cdot$ 的清除作用^[6]。在试管中分别加入不同浓度的多糖溶液 2 ml、5 mmol/L FeSO_4 2 ml、5 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2 ml,后加入0.3% H_2O_2 2 ml,在37℃恒温水浴反应30 min,测510 nm处吸光度。实验重复3次,取平均值,计算清除率。

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

式中, A_0 为蒸馏水替代多糖溶液的吸光度, A_1 为加入多糖溶液后的吸光度, A_2 为蒸馏水替代 H_2O_2 溶液的吸光度。

1.2.4.2 对 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除作用 测定 $\text{DPPH}\cdot$ 清除作用参照文献的方法^[7-8],略作修改进行。在试管中加入0.2 mg/ml $\text{DPPH}\cdot$ 1 ml,不同浓度的多糖溶液1.5 ml,在室温下反应30 min,测517 nm处的吸光度值。以Vc作为阳性对照,实验重复3次,取平均值,计算清除率。

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

式中, A_0 为无水乙醇水替代多糖溶液的吸光度, A_1 为加入多糖溶液后的吸光度, A_2 为无水乙醇水替代 $\text{DPPH}\cdot$ 的吸光度。

1.2.5 化学修饰川木瓜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 参考文献测定多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用^[9]。在试管中依次加入2 ml 磷酸盐缓冲体系(pH为6.8),0.1 U/ml α -葡萄糖苷酶0.2 ml,待测样品1 ml,于37℃恒温15 min,加入20 mmol/L PNPG 0.3 ml,继续37℃恒温反应20 min,加入0.1 mol/L Na_2CO_3 2 ml终止反应,在400 nm处测定吸光度值。实验重复3次,取平均值,计算抑制除率。

$$\text{抑制率}\% = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100$$

式中, A_0 为磷酸缓冲液替代多糖溶液的吸光度, A_1 为加入待测样品溶液后的吸光度, A_2 为磷酸缓冲液替代PNPG的吸光度。

2 结果

2.1 川木瓜多糖及化学修饰川木瓜多糖的红外光谱分析 川木瓜多糖的红外光谱如图1所示,分析可知,在3444 cm^{-1} 处强而宽的峰为-OH的伸缩振动峰,2929 cm^{-1} 处为亚甲基C-H伸缩振动峰,1463 cm^{-1} 为C-H的变角振动峰,这三组峰为典型糖类的特征峰;

1142 cm^{-1} 和1099 cm^{-1} 分别代表C-O-C和C-O的伸缩振动峰,1010 cm^{-1} 为 C_6 -O-H的角变振动峰^[10],提示结构中含有吡喃环。

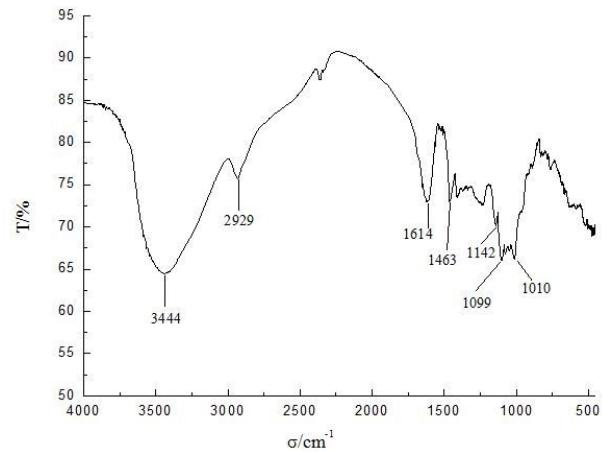


图1 川木瓜多糖红外光谱

图2~图4分别为羧甲基化川木瓜多糖、乙酰化川木瓜多糖、硫酸化川木瓜多糖的红外谱图,从图可知,三种修饰多糖基本保留了原多糖的特征吸收峰,但也出现了一些新的特征吸收峰。羧甲基多糖在1627 cm^{-1} 、1429 cm^{-1} 的吸收峰为 $-\text{COO}^-$ 的非对称和对称伸缩振动吸收,1346 cm^{-1} 为O-H的面内变角振动峰,1028 cm^{-1} 为C-O-C对称伸缩振动^[11],羧甲基化形成醚后吸收峰增强,这些均提示多糖已羧甲基化。乙酰化多糖在2954 cm^{-1} 、1454 cm^{-1} 、1382 cm^{-1} 处出现了 $-\text{CH}_3$ 的特征吸收峰,1745 cm^{-1} 为酯类C=O的伸缩振动,1247 cm^{-1} 为C-O伸缩振动明显加强,表明了乙酰基的存在。硫酸化多糖的 OSO_3^- 主要特征峰在1242 cm^{-1} 、813 cm^{-1} 、588 cm^{-1} ,分别是S=O的伸缩振动峰、C-O-S的伸缩振动峰、S=O的变角振动峰^[12],几组特征峰表明多糖已硫酸化修饰。

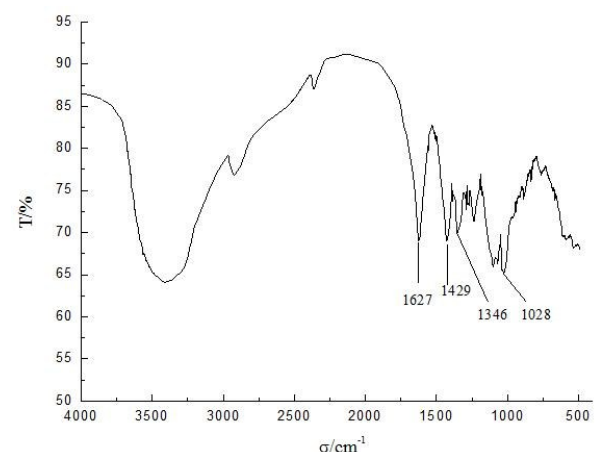


图2 羧甲基化川木瓜多糖红外光谱

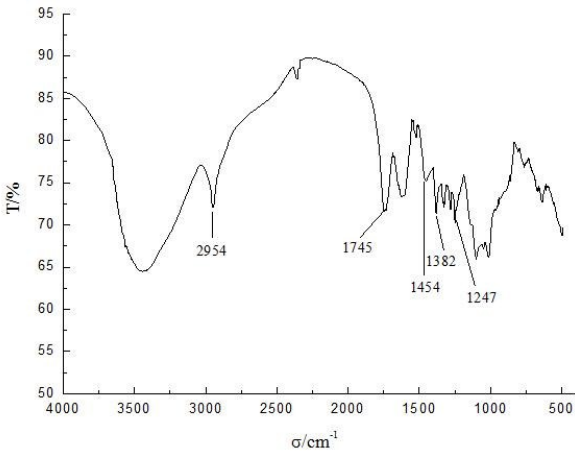


图 3 乙酰化川木瓜多糖红外光谱

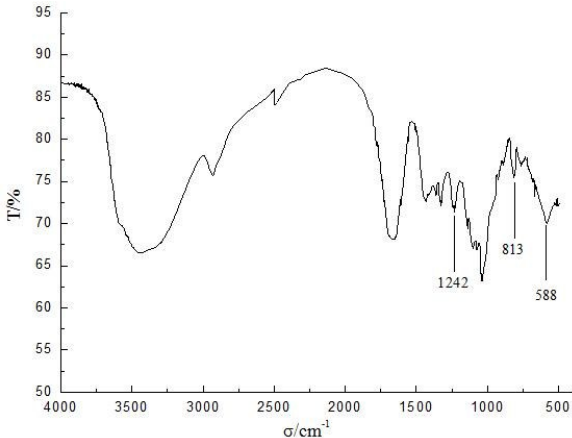


图 4 硫酸化川木瓜多糖红外光谱

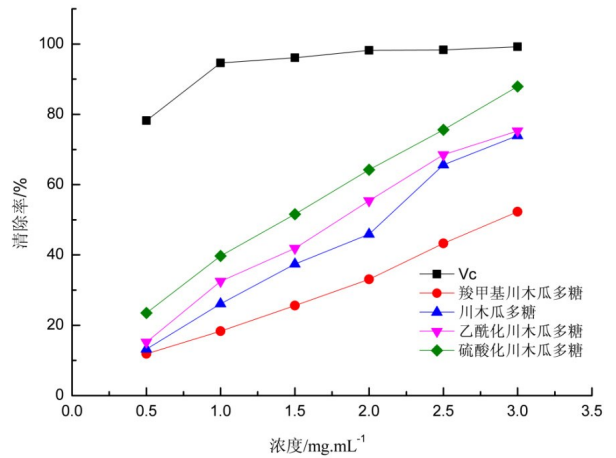


图 5 多糖和 Vc 对 OH· 的清除作用

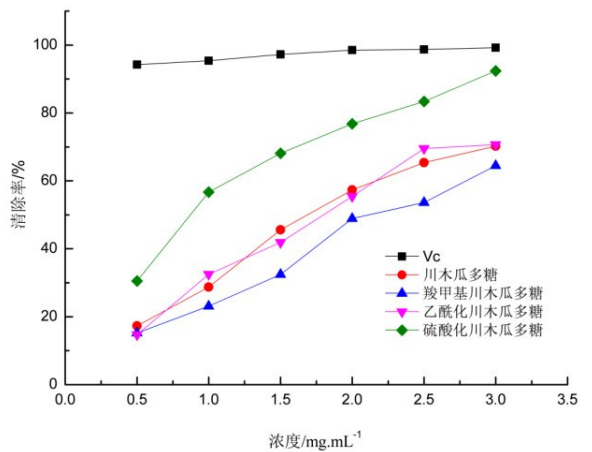


图 6 多糖和 Vc 对 DPPH· 的清除作用

2.2 对 OH· 的清除作用 川木瓜多糖、化学修饰川木瓜多糖、Vc 对 OH· 的清除能力如图 5 所示。从图 5 可知,各物质对 OH· 的清除能力均随浓度增加,还原能力增强,呈量效关系。化学修饰多糖与原多糖对比,硫酸化川木瓜多糖的清除作用明显高于原多糖,在浓度为 3 mg · ml⁻¹ 时,清除率可达 87.92%,但比常见的阳性参照 Vc 的清除作用要弱一些。乙酰化川木瓜多糖比修饰前的清除作用稍微大一点,而羧甲基川木瓜多糖的清除作用比修饰前清除作用降低,浓度为 3 mg · ml⁻¹ 时,清除率为 52.36%。各物质对 OH· 的清除能力强弱为 Vc > 硫酸化川木瓜多糖 > 乙酰化川木瓜多糖 > 川木瓜多糖 > 羧甲基化川木瓜多糖。

2.3 对 DPPH· 的清除作用 川木瓜多糖、化学修饰川木瓜多糖、Vc 对 DPPH· 的清除能力如图 6 所示。从图 6 可知,各多糖对 DPPH· 均有一定清除作用,但较 Vc 还有差距。硫酸化川木瓜多糖比修饰前的清除能力明显提高,在低浓度时,清除率增长较快,当浓度大于 1.5 mg · ml⁻¹ 后,清除率增长相当缓慢。乙酰化川木瓜多糖与修饰前的清除能力基本相当,浓度为 3 mg · ml⁻¹ 时清除率为 70% 左右。羧甲基川木瓜多糖清除效果比修饰前降低,浓度为 3 mg · ml⁻¹ 时清除率为 64.55%。

2.4 化学修饰川木瓜多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用 川木瓜多糖、化学修饰川木瓜多糖、阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用如图 7 所示。几种多糖及阳性参照阿卡波糖均对 α-葡萄糖苷酶有抑制作用,随浓度的增大抑制作用增强。在试验范围内,当浓度为 0.8 mg · ml⁻¹ 时,阿卡波糖、羧甲基化川木瓜多糖、川木瓜多糖、硫酸化川木瓜多糖、乙酰化川木瓜多糖的抑制率分别为 90.35%、84.61%、72.41%、65.10%、47.74%。化学修饰的取代基对 α-葡萄糖苷酶的抑制能力有较大的影响。羧甲基川木瓜多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用在高浓度范围接近阿卡波糖,而乙酰化多糖和硫酸化多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用相对修饰前较弱。各物质对 α-葡萄糖苷酶的抑制能力强弱为阿卡波糖 > 羧甲基化川木瓜多糖 > 川木瓜多糖 > 硫酸化川木瓜多糖 > 乙酰化川木瓜多糖。

3 讨论

本文从川木瓜中提取分离出川木瓜多糖,并对多糖进行羧甲基化、乙酰化、硫酸化修饰,用红外光谱对原多糖和修饰后的多糖进行表征,考察了几种多糖对 OH· 和 DPPH· 的清除作用,以及对 α-葡萄糖苷酶

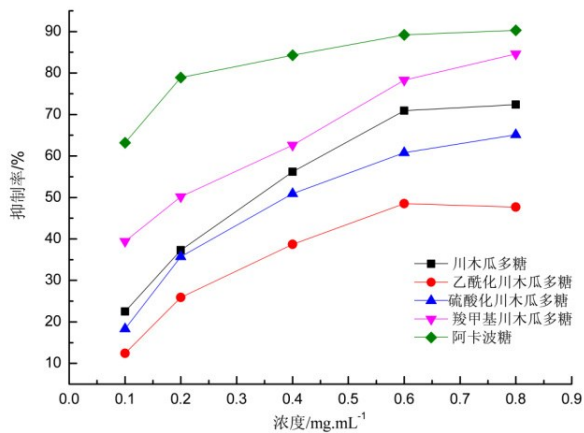


图7 多糖和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

的抑制作用。红外光谱结果显示,几种取代基成功接枝到川木瓜多糖的结构中,得到了三种化学修饰多糖。三种化学修饰多糖中,硫酸化川木瓜多糖对 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除作用比原多糖的增强。对 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除作用是评价物质抗氧化活性的重要指标,其作用机制可以是直接作用在自由基,或是间接消耗掉容易生成自由基的物质,防止发生进一步反应^[13]。羧甲基川木瓜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用明显优于修饰前的活性。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以延缓单糖吸收,降低餐后高血糖,使胰岛素的分泌得到改善,成为我国糖尿病防治指南推荐的一线药物。本试验初步筛选出有较高活性的多糖衍生物,不同的取代基对多糖的活性有较显著的影响。修饰基团对活性影响的相关的机理研究还有待考证。在后续的研究中应进一步讨论化学修饰方法、取代度等因素对活性的影响,同时还应考虑化学修饰后多糖的毒副作用的变化。

天然多糖的结构复杂,其性质与它的单糖组成、分子量、空间构象、糖苷键类型、分支度等因素密切相关^[14]。多糖的结构修饰是多糖天然产物研究的一个重要方向,它可以改善水溶性、增强活性或产生新的活性、降低毒副作用等,可通过结构修饰拓宽其应用范围。

广西凌云县种植有5000多亩川木瓜,川木瓜是凌云县的特产,在当地目前主要作腌制水果食用,与之相对应的高附加值产品开发非常滞后,几乎没有深加工产业链,造成了资源的浪费。通过多糖分子改性来提高川木瓜多糖的生物学活性,深加工开发具有高活性

的改性川木瓜多糖,可应用在药品、食品、保健品等行业,具有良好市场前景,显著提高川木瓜产业附加值,不仅可以优化资源利用,而且可以拉动当地的经济展。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.
- [2] 王有为,何敬胜,范建伟,等. 木瓜道地起源与道地产区形成研究:2009年全国中药学术研讨会论文集[C]. 2009.
- [3] 曹莉莉,李亮,王芳,等. 羧甲基化修饰余甘多糖及生物活性研究[J]. 中国食品学报,2017,17(10):57-63.
- [4] 赵鹏,张婷婷,宋道. 倒卵叶五加多糖的乙酰化工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(9):1492-1496.
- [5] 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.
- [6] 李容,梁榕珊,覃涛,等. 白茅根多糖抗氧化活性及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 食品研究与开发,2014,35(7):9-12.
- [7] 赵永安,陈冠,陶遵威. 苦豆子多糖及其衍生物的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):229-232.
- [8] 刘丹丹,韩唯凡,蒋建新,等. 无患子果皮多糖微波提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业,2018,38(4):109-116.
- [9] 邱明阳,赵武,刘玉婷,等. 五味子抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的比较研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(5):840-846.
- [10] 杨夏,孙从永,余江南,等. 玉米须酸性多糖的结构表征及降血脂活性[J]. 江苏大学学报(医学版),2018,28(4):333-338.
- [11] Wu Y, Ye M, Du Z, et al. Carboxymethylation of an exopolysaccharide from Lachnum and effect of its derivatives on experimental chronic renal failure[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 114:190-195.
- [12] 谢建华. 青钱柳多糖的分子修饰及生物活性研究[D]. 南昌:南昌大学,2014.
- [13] 赵芷芊,王敏,张志清. 植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展[J]. 食品工业科技,2018,39(13):337-342.
- [14] 谭西,周欣,陈华国. 植物多糖构效关系研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(21):4104-4109.

收稿日期:2018-08-19;修回日期:2018-09-18