

## 混合磷酸盐法制备款冬花磷酸酯多糖

赵鹏, 张丽华, 王国全, 张婷婷

(陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:**以款冬花多糖为原料,采用混合磷酸盐法制备款冬花磷酸酯多糖。以磷酸基的取代度(DS)为指标,在单因素实验的基础上,采用响应面法对款冬花多糖磷酸酯化的合成工艺进行了优化。得到的最优合成工艺条件为: $m$ [混合磷酸盐(磷酸二氢钠与磷酸氢二钠)]: $m$ (款冬花多糖)=1.5:1, $m$ (磷酸二氢钠): $m$ (磷酸氢二钠)=2.0:1,反应时间6.0 h,反应温度86 °C,尿素用量为反应物总质量的14.25%,在该条件下制备的款冬花多糖磷酸酯,DS平均值为0.697。抗氧化性实验结果表明:款冬花多糖磷酸酯对DPPH·(1,1-二苯基-2-苦肟基)最大清除率为98.91%, $O_2\cdot$ 最大清除率为48.85%, $\cdot OH$ 最大清除率为50.34%,均高于款冬花多糖。

**关键词:**款冬花;磷酸酯多糖;混合磷酸盐法;合成工艺;抗氧化性;中药现代化技术

**中图分类号:**TQ28 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5214(2019)02-0243-08

## Synthesis of Phosphorylated Polysaccharides from *Tussilago farfara* by Mixed Phosphate Method

ZHAO Peng, ZHANG Li-hua, WANG Guo-quan, ZHANG Ting-ting

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China)

**Abstract:** Phosphorylated polysaccharides from *Tussilago farfara* were synthesized by mixed phosphate method. The synthetic process was optimized *via* response surface method on the basis of single factor experiment using the substitution degree (DS) of phosphate group as evaluation index. The results showed that the optimum synthetic conditions were as follows: mass ratio of mixed phosphate to polysaccharides 1.5 : 1, mass ratio of sodium dihydrogen phosphate to disodium hydrogen phosphate 2.0 : 1, reaction time 6.0 h, reaction temperature 86 °C, urea dosage 14.25% (based on the total mass of the reactants). Under the optimized conditions, the average DS of phosphorylated polysaccharides from *Tussilago farfara* was 0.697. The results of antioxidant experiment revealed that phosphorylated polysaccharides from *Tussilago farfara* had better scavenging abilities on DPPH·,  $O_2\cdot$  and  $\cdot OH$  than that of polysaccharides from *Tussilago farfara*, and the maximum scavenging rates to DPPH·,  $O_2\cdot$  and  $\cdot OH$  were 98.91%, 48.85% and 50.34%, respectively.

**Key words:** *Tussilago farfara*; phosphorylated polysaccharides; mixed phosphate method; synthesis process; antioxidant activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

**Foundation items:** Key Laboratory Project of Education Department of Shaanxi Provincial Government (14JS024); Shaanxi Province Social Development Science and Technology Project (2016SF-347); Science Research Project of Shaanxi Provincial Department of Education (14JK1194); Shaanxi University of Chinese Medicine Fund (14XJZR11)

多糖广泛存在于动植物体内,具有抗肿瘤<sup>[1]</sup>、  
调节机体免疫<sup>[2-3]</sup>、降血糖<sup>[4]</sup>、抗肝损伤作用<sup>[5]</sup>等活

性。通过化学合成法对某些多糖的结构进行修饰,  
能够改变其生物利用度和生物活性,这是深化对糖

收稿日期:2018-05-30; 定用日期:2018-11-08; DOI:10.13550/j.jxhg.20180391

基金项目:陕西省教育厅重点实验室项目(14JS024);陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-347);陕西省教育厅专项资助项目(14JK1194);陕西中医药大学校内基金(14XJZR11)

作者简介:赵鹏(1977—),男,教授,博士, E-mail: zhaopeng65@sina.com。

类药物开发的重要途径之一<sup>[6-9]</sup>。磷酸酯化是对糖类分子进行结构修饰的重要方法,一些不具有生物活性或活性较弱的多糖经磷酸酯化后其活性得到明显改善,尤其是增强了其抗肿瘤<sup>[10]</sup>、抗辐射<sup>[11-12]</sup>、抗氧化性<sup>[13]</sup>等活性。

款冬花是菊科植物款冬 (*Tussilago farfara* L.) 的干燥花蕾,临床上用于治疗慢性支气管炎(气管炎)、咳嗽气喘等疾病,主要分布于陕西、宁夏、河北、甘肃等地<sup>[14-17]</sup>。款冬花多糖是款冬花中重要的活性成分之一,有研究报道其具有一定的抑制白血病 K562 细胞和抗氧化活性,但活性相对较弱<sup>[18-19]</sup>。目前对款冬花多糖化学修饰改性的研究较少。

鉴于此,本文以陕西道地药材款冬花中的多糖成分为原料,采用混合磷酸盐法,合成得到了款冬花磷酸酯多糖,并采用响应面法优化其合成工艺,同时初步探讨了其抗氧化活性。旨在为款冬花多糖及其衍生物进一步开发成新的药品提供一定的理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

款冬花购自西安市万寿路中药材批发市场,经陕西中医药大学王国全博士鉴定为菊科植物款冬 (*Tussilago farfara* L.) 的干燥花蕾。

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、尿素、钼酸铵、抗坏血酸,AR,天津科密欧化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-苦肼基,BR,日本东京仁成工业株式会社;LS-206 大孔吸附树脂(弱极性,粒径 0.3~1.25 mm),西安蓝深特种树脂有限公司。

OSB-2100 型旋转蒸发仪、DZ5-WS 型低速台式离心机、HB-III 型循环水式真空泵,上海爱朗仪器有限公司;GZX-DH.500BS 型电热恒温干燥箱,上海跃进医疗器械有限公司;ALPHA1-4 型真空冷冻干燥机,德国 Christ 公司;722N 型可见分光光度计,上海鼎科科学仪器有限公司;BSA224S 型分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 款冬花多糖的制备

按照文献<sup>[20]</sup>方法,将在干燥箱中 80 °C 下干燥后的 100 g 款冬花脱脂后粉碎成 60 目颗粒。在 21 mL 水中加入 1 g 款冬花颗粒,在 84 °C 下提取 3 次,提取液过滤后按 1 g 款冬花颗粒浓缩成 1 mL 溶液,浓缩液采用木瓜蛋白酶结合 Sevage 法<sup>[20]</sup>脱蛋白后,再用 LS-206 大孔吸附树脂进行脱色处理,脱色液按 1 g 款冬花颗粒浓缩成 1 mL 溶液,浓缩后用 4 倍体积的无水乙醇醇沉离心后,-20 °C 下冻干 24 h,即得

1.24 g 灰白色粗多糖。粗多糖用 50 mL 去离子水复溶后,在截留分子量为 3.5 kDa 的透析袋中用流动的自来水透析 48 h,去离子水透析 24 h;透析液上 DEAE-cellulose 柱(Φ30 mm×300 mm)纯化,收集富集成分浓缩至 25 mL,再用 Sephadex G-200 凝胶柱(Φ15 mm×300 mm)纯化,共分得 3 个组分,选择其中洗脱峰面积最大的组分,浓缩冻干后得到白色粉末状款冬花多糖。经高效凝胶液相色谱检测为均一多糖,糖含量是 99.2%;相对分子质量为 5.5 kDa;该多糖为甘露糖和葡萄糖两种单糖组成,甘露糖与葡萄糖物质的量比为 1.798:1。

#### 1.2.2 款冬花磷酸酯多糖的制备

参照文献<sup>[21]</sup>方法,并稍作修改。先精确称取 0.1 g 款冬花多糖样品,加入 5 mL 去离子水溶解,常温下将制备的款冬花多糖水溶液、磷酸盐(磷酸二氢钠和磷酸氢二钠按一定质量比混合)与适量催化剂尿素混合均匀。将混合物在水浴中加热一定时间后取出,将反应液装入截留分子量为 3.5 kDa 的透析袋中用流动的自来水透析 48 h。透析液浓缩经冷冻干燥后即得浅褐色粉末状款冬花磷酸酯多糖,其得率为 31.53%。

#### 1.2.3 款冬花多糖磷酸酯化取代度的测定

参照文献<sup>[21]</sup>,测定磷酸酯化款冬花多糖的取代度。精确称取磷酸二氢钾 0.5000 g,用蒸馏水溶解后稀释定容于至 100 mL 容量瓶中,振荡使其混合均匀,配成 5 g/L 的标准磷溶液。精密吸取该溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL,分别移入 9 个 50 mL 容量瓶中,依次分别加入 10 mL 质量分数为 26% 的硫酸溶液、5 mL 质量分数 2% 的钼酸铵溶液、2 mL 质量分数为 5% 的抗坏血酸溶液,振荡使其混合均匀,沸水浴加热 10 min,立即用冷水迅速冷却,并定容至 50 mL。在波长 820 nm 处测定磷酸二氢钾溶液的吸光度  $A$ ,根据所得不同浓度溶液的吸光度值绘制标准曲线,所得回归方程是:

$$y = 0.0215x - 0.0322, R^2 = 0.9997 \quad (1)$$

其中, $y$  表示吸光度值  $A$ , $x$  表示标准品磷酸二氢钾的质量浓度, g/L。

根据磷的标准曲线测得样品中总磷质量分数和游离磷质量分数。结合磷质量分数按式(2)计算:

$$\text{结合磷质量分数} = \text{总磷质量分数} - \text{游离磷质量分数} \quad (2)$$

取代度 DS 按式(3)计算:

$$DS = (\text{磷含量}/31) / [(100 - 3.32 \times \text{磷含量})/162] = (5.23 \times \text{磷含量}) / (100 - 3.32 \times \text{磷含量}) \quad (3)$$

其中:162 为款冬花多糖分子中单糖的摩尔质量, g/mol;31 为磷的摩尔质量, g/mol;3.32 为游离磷换算成结合磷酸酯基团的系数;磷含量为结合磷质量分数, %。

## 1.2.4 抗氧化能力的测试

### 1.2.4.1 清除 DPPH·实验

按照参考文献[20]方法,进行清除 DPPH·实验。配制不同质量浓度的款冬花多糖溶液、款冬花磷酸酯多糖溶液,分别加入 4 mL  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH·溶液作为样品组;不加 DPPH·的多糖溶液作为对照组;配制 4 mL 体积分数为 60%乙醇溶液,再加入 4 mL  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH·溶液作为空白组,用可见分光光度计在  $\lambda = 517$  nm 处测定吸光度  $A$ ,用下式计算 DPPH·清除率。

DPPH·清除率/% =  $[1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100$  (4)  
式中:  $A_{\text{空白}}$  为空白组吸光度;  $A_{\text{样品}}$  为样品组吸光度;  $A_{\text{对照}}$  为对照组吸光度。

### 1.2.4.2 清除超氧根负离子实验

依据参考文献[20]方法,采用邻苯三酚自氧化法,其中样品多糖溶液和邻苯三酚溶液在 50 mmol/L Tris-HCl (pH=8.2) 缓冲液保温 20 min 后加入,并快速摇匀,然后以 Tris-HCl 缓冲液作空白对照,测定样品在 320 nm 处的吸光度值,每隔 30 s 记录一次,连续记录 4 min。

各管的氧化速率及对  $O_2\cdot$  的清除率按下式计算:

$$V = (A_1 - A_0) / 4 \quad (5)$$

式中:  $V$  为氧化速率,  $\text{min}^{-1}$ ;  $A_0$  为初始吸光度值;  $A_1$  为终止吸光度值; 4 表示测试时间为 4 min。

$$\text{清除率}/\% = (V_{\text{自}} - V_{\text{样品}}) / V_{\text{自}} \times 100 \quad (6)$$

式中:  $V_{\text{自}}$  为不加多糖样品氧化速率,  $\text{min}^{-1}$ ;  $V_{\text{样品}}$  为加多糖样品氧化速率,  $\text{min}^{-1}$ 。

### 1.2.4.3 清除羟自由基实验

依据文献[20]方法,取 5 mmol/L 邻二氮菲溶液,加 pH=7.4、50 mmol/L 的磷酸缓冲液 2.0 mL 充分混匀后,加 7.5 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液 1.0 mL,立即混匀,加入质量分数为 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0 mL,最后以  $\text{H}_2\text{O}$  补充至总体积为 10 mL。37 °C 保温 1 h,在 536 nm 处测吸光度值  $A_{\text{损伤}}$ 。依上述方法,分别加入不同质量浓度多糖溶液后再加  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,然后加入 2 mmol EDTA 在 37 °C 保温 1 h,测  $A_{\text{样品}}$ 。未损伤管不加  $\text{H}_2\text{O}_2$  及多糖溶液测  $A_{\text{未损伤}}$ 。

•OH 清除率/% =  $[(A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}})] \times 100$  (7)  
式中:  $A_{\text{样品}}$  为样品组吸光度;  $A_{\text{损伤}}$  为损伤组吸光度;  $A_{\text{未损伤}}$  为未损伤组吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 磷酸二氢钠与磷酸氢二钠质量比对取代度的影响

称取款冬花多糖 0.1 g 加入 10 mL 去离子水,

混合磷酸盐与款冬花多糖质量比值为 1,尿素为反应物总质量的 10%,于 60 °C 反应 5 h,考察磷酸二氢钠与磷酸氢二钠的质量比对取代度的影响,结果见图 1。

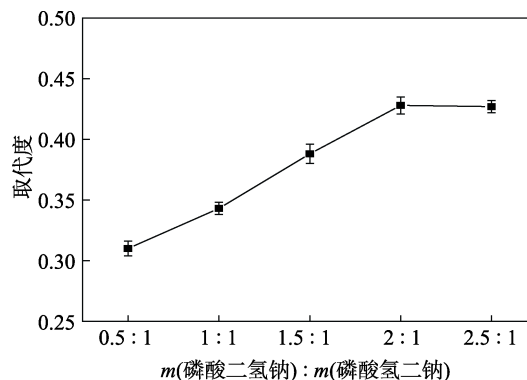


图1 磷酸二氢钠与磷酸氢二钠质量比对取代度的影响  
Fig. 1 Effect of mass ratio of sodium dihydrogen phosphate to disodium hydrogen phosphate on the DS

从图 1 可看出,当  $m$  (磷酸二氢钠) :  $m$  (磷酸氢二钠) = 2 : 1 时,此时得到的款冬花磷酸酯多糖的取代度最高,继续增加质量比,取代度基本没有变化,因此,确定  $m$  (磷酸二氢钠) :  $m$  (磷酸氢二钠) = 2 : 1。

#### 2.1.2 混合磷酸盐与款冬花多糖质量比对取代度的影响

在  $m$  (磷酸二氢钠) :  $m$  (磷酸氢二钠) = 2 : 1,尿素为反应物总质量的 10%,于 60 °C 反应 5 h,考察混合磷酸盐与款冬花多糖质量比对取代度的影响,结果见图 2。

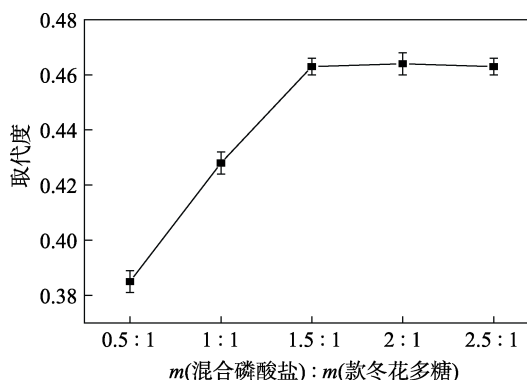


图2 混合磷酸盐与款冬花多糖质量比对取代度的影响  
Fig. 2 Effect of mass ratio of mixed phosphate to polysaccharides on the DS

从图 2 可看出,随着混合磷酸盐与款冬花多糖质量比的增加,款冬花多糖磷酸酯化的取代度快速增加,这说明较大的质量比有利于多糖接触到更多的混合磷酸盐,有利于反应的进行。当  $m$  (混合磷酸盐) :  $m$  (款冬花多糖) = 1.5 : 1 时,款冬花磷酸

酯多糖取代度最高，之后取代度不再发生变化，从节约成本考虑，确定  $m(\text{混合磷酸盐}) : m(\text{款冬花多糖}) = 1.5 : 1$ 。

2.1.3 反应温度对取代度的影响

在  $m(\text{磷酸二氢钠}) : m(\text{磷酸氢二钠}) = 2 : 1$ ，尿素为反应物总质量的 10%， $m(\text{混合磷酸盐}) : m(\text{款冬花多糖}) = 1.5 : 1$ ，反应 5 h，考察不同反应温度对取代度的影响，结果见图 3。

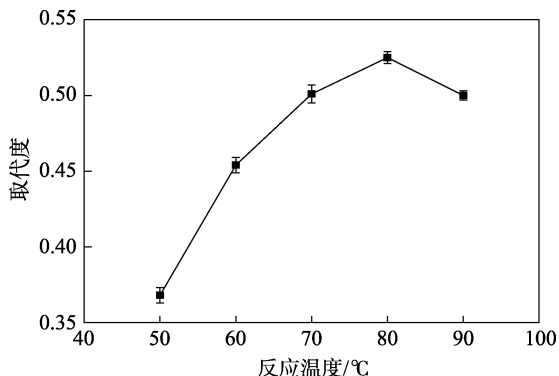


图 3 反应温度对取代度的影响  
Fig. 3 Effect of reaction temperature on the DS

从图 3 可看出，款冬花多糖磷酸酯化的取代度随着温度的升高快速增加，对于酯化反应，温度的升高有利于反应的进行。当反应温度为 80 °C 时，款冬花磷酸酯多糖的取代度最高，继续提高反应温度，取代度略有降低，说明较高的反应温度，可能会造成款冬花磷酸酯多糖的水解，因此，确定反应温度为 80 °C。

2.1.4 反应时间对取代度的影响

在  $m(\text{磷酸二氢钠}) : m(\text{磷酸氢二钠}) = 2 : 1$ ，尿素为反应物总质量的 10%， $m(\text{混合磷酸盐}) : m(\text{款冬花多糖}) = 1.5 : 1$ ，80 °C 反应，考察不同反应时间对取代度的影响，结果见图 4。

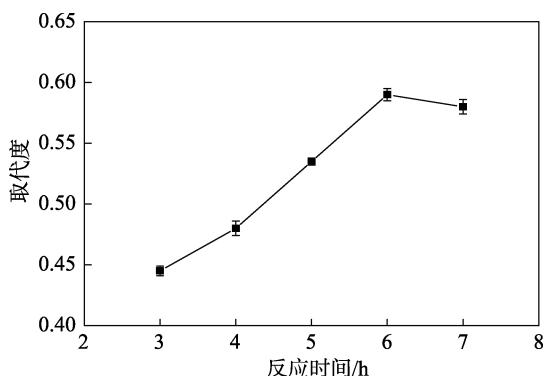


图 4 反应时间对取代度的影响  
Fig. 4 Effect of reaction time on the DS

从图 4 可看出，随着反应时间的增加，款冬花多糖磷酸酯化的取代度快速增加，这是因为反应时

间的增加，使得酯化反应更加充分的缘故，当反应时间为 6 h 时，取代度最高，随后其取代度有所下降，这说明过长的反应时间，可能会引起款冬花磷酸酯多糖的水解，因此，确定反应时间为 6 h。

2.1.5 尿素用量对取代度的影响

在  $m(\text{磷酸二氢钠}) : m(\text{磷酸氢二钠}) = 2 : 1$ ， $m(\text{混合磷酸盐}) : m(\text{款冬花多糖}) = 1.5 : 1$ ，于 80 °C 反应 6 h，考察不同尿素用量对取代度的影响，结果见图 5。

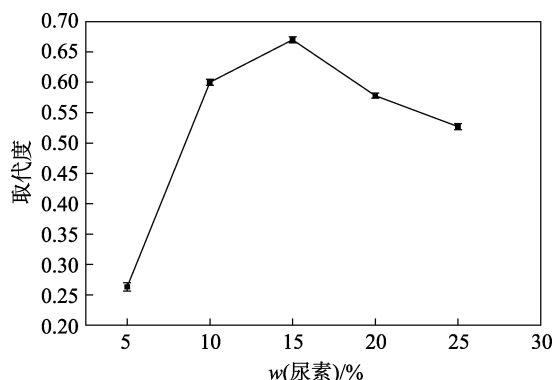


图 5 尿素用量对取代度的影响  
Fig. 5 Effect of urea dosage on the DS

从图 5 可看出，随着尿素用量的增加，款冬花磷酸酯多糖的取代度不断增加；当  $w(\text{尿素}) = 15\%$  时，取代度最高，之后取代度下降，这可能是由于尿素用量的增多，使得反应体系碱性增强，造成了款冬花磷酸酯多糖的水解，因此，确定尿素用量为反应物总质量的 15%。

2.2 响应面实验

根据单因素实验结果，当其他单因素确定后，在  $m(\text{磷酸二氢钠}) : m(\text{磷酸氢二钠}) = 2 : 1$ ， $m(\text{混合磷酸盐}) : m(\text{款冬花多糖}) = 1.5 : 1$ ，款冬花磷酸酯多糖的取代度基本不变，说明这两个因素对取代度的影响不大。因此，选择反应时间、反应温度和尿素用量为影响因素进行响应面优化实验，选择的因素水平见表 1。响应面优化实验结果如表 2 所示。

表 1 响应面实验因素水平选择表  
Table 1 Factor and level of the designed experiment

因素	水平		
	-1	0	1
反应时间 $X_1/h$	5	6	7
反应温度 $X_2/^\circ C$	70	80	90
尿素用量 $X_3/\%$	10	15	20

注： $A = (X_1 - 6)/1$ ， $B = (X_2 - 80)/10$ ， $C = (X_3 - 15)/5$ 。

表 2 响应面分析实验方案及结果  
Table 2 Program and test results of RSM

编号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	取代度
1	6	70	20	0.55
2	6	70	10	0.53
3	7	80	10	0.51
4	7	70	15	0.52
5	7	90	15	0.59
6	6	90	20	0.58
7	5	80	10	0.57
8	5	90	15	0.52
9	6	90	10	0.54
10	5	70	15	0.48
11	6	80	15	0.68
12	7	80	20	0.56
13	6	80	15	0.67
14	6	80	15	0.68
15	5	80	20	0.54

表 3 方差分析表  
Table 3 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.048	9	$5.290 \times 10^{-3}$	112.59	<0.0001
A	$1.361 \times 10^{-4}$	1	$1.361 \times 10^{-4}$	2.90	0.1495
B	$5.253 \times 10^{-3}$	1	$5.253 \times 10^{-3}$	111.81	0.0001
C	$5.780 \times 10^{-4}$	1	$5.780 \times 10^{-4}$	12.30	0.0171
AB	$1.323 \times 10^{-4}$	1	$1.323 \times 10^{-4}$	2.81	0.1542
AC	$2.601 \times 10^{-3}$	1	$2.601 \times 10^{-3}$	55.36	0.0007
BC	$1.000 \times 10^{-4}$	1	$1.000 \times 10^{-4}$	2.13	0.2044
$A^2$	0.018	1	0.018	388.29	<0.0001
$B^2$	0.011	1	0.011	240.26	<0.0001
$C^2$	0.015	1	0.015	322.31	<0.0001
残差	$2.349 \times 10^{-5}$	5	$4.698 \times 10^{-5}$	—	—
失拟误差	$2.302 \times 10^{-4}$	3	$7.675 \times 10^{-5}$	1.97	0.3544
纯误差	$4.667 \times 10^{-6}$	2	$2.333 \times 10^{-6}$	—	—
总和	0.048	14	—	—	—

注: —表示无该项数据。

根据表 3 的分析结果可知, 通过 Design-Expert v7.1.3 软件拟合得到的模型显著性远远小于 0.05 ( $P < 0.0001$ ), 说明该模型是高度显著的, 从失拟性检验结果来看, 失拟误差并不显著 ( $P = 0.3544$ ), 这说明实验中的未知因素对于实验结果影响很小, 预测的回归模型与实际实验结果拟合得较好。而且预测模型的  $R^2 = 0.9933$ , 说明款冬花磷酸酯多糖的取代度实验值与预测值之间有着良好的一致性; 该模型的变异系数  $CV = 1.35\% < 5\%$ , 校正系数  $R_{Adj}^2 = 0.9812$ , 这说明预测的模型能反映 98.12% 响应值的变化, 因此, 通过回归方程能够预测实验真实数据并对真实的实验数据进行分析 and 预测<sup>[22-23]</sup>。通过表 3 分析结果可知, 各单因素中对款冬花磷酸酯多糖

取代度影响最大的是反应温度, 其次是尿素用量, 最不显著的是反应时间, 反应时间与尿素用量之间的交互影响最为显著。

根据 Design-Expert v7.1.3 软件拟合得到的回归方程为:

$$Y = 0.68 - 4.125 \times 10^{-3} A + 0.026 B + 8.50 \times 10^{-3} C + 5.750 \times 10^{-3} AB + 0.025 AC - 5.00 \times 10^{-3} BC - 0.069 A^2 - 0.054 B^2 - 0.062 C^2 \quad (8)$$

通过 Box-Behnken 实验得到的多元回归模型所做的响应曲面图如图 6 所示, 响应面图能够直观地反映各因素之间的交互关系, 曲面越陡峭, 说明该因素对响应值的影响越显著, 从图中的等高线密集程度可看出对取代度的影响, 越密集说明影响越显著, 越稀疏表明影响越小。

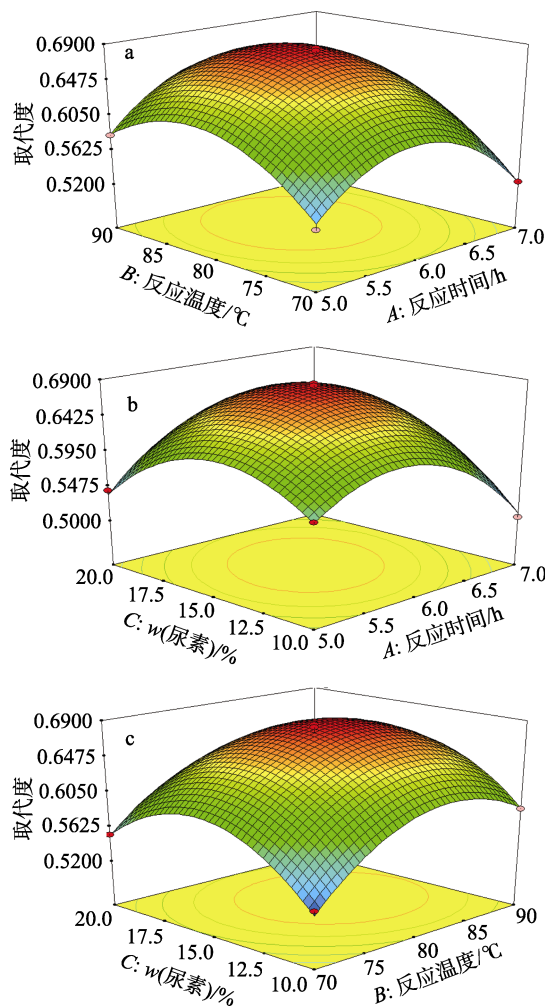


图 6 反应温度与反应时间(a)、反应时间与尿素用量(b)和反应温度与尿素用量(c)对取代度的影响

Fig. 6 Response surface for the effect of temperature and time on the DS(a), response surface for the effect of time and urea dosage on the DS(b) and response surface for the effect of temperature and urea dosage on the DS(c)

从图 6 可以看出, 反应温度所对应的曲面最为陡峭, 反应时间所对应的曲面相对最为平滑, 这说明反应温度对款冬花磷酸酯多糖取代度的影响最显著, 反应时间的影响最小。根据 Box-Behnken 实验拟合得到的回归方程进行一阶偏导, 可得到:  $A=0.03$ ,  $B=0.58$ ,  $C=-0.15$ ; 根据回归模型预测的款冬花磷酸酯多糖合成的最优反应条件是: 反应时间 6.03 h, 反应温度 85.80 °C, 尿素用量为反应物总质量的 14.25%, 磷酸二氢钠与磷酸氢二钠质量比为 2 : 1, 混合磷酸盐与款冬花多糖质量比为 1.5 : 1, 此时得到的款冬花磷酸酯多糖中取代度的预测值是 0.693。按照实际的可操作性, 将上述预测反应条件加以微调, 即: 反应时间 6.0 h, 反应温度 86 °C, 尿素质量分数 14.25%, 磷酸二氢钠与磷酸氢二钠质量比为 2 : 1, 混合磷酸盐与款冬花多糖质量比为 1.5 : 1。按此工艺条件, 分别取款冬花多糖 0.1 g 进行 3 次平行磷酸酯化反应, 所得的款冬花磷酸酯多糖的取代度分别是 0.695、0.698、0.699, 平均取代度为 0.697, 所得结果与预测值十分接近, 说明响应面预测所得模型的正确性。

### 2.3 款冬花磷酸酯多糖的表征

为确认是否得到目标产物, 本研究选择款冬花多糖 (TFP) 和款冬花磷酸酯多糖 (TFPP) 进行红外光谱测定, 结果如图 7 所示。

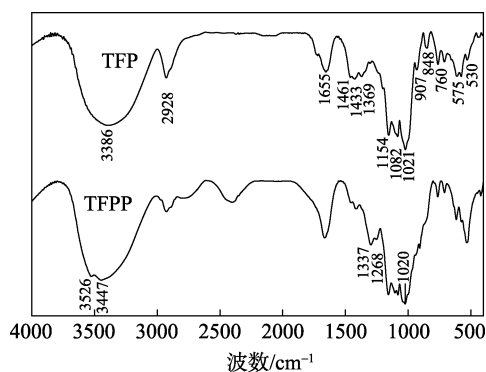


图 7 样品的红外光谱图  
Fig. 7 FTIR spectra of samples

由图 7 可看出, 未经修饰的款冬花多糖, 在  $3386\text{ cm}^{-1}$  出现了一个宽峰, 这是—OH 的伸缩振动, 说明多糖存在分子间与分子内氢键;  $2928\text{ cm}^{-1}$  是多糖分子中 C—H 键伸缩振动峰;  $1655\text{ cm}^{-1}$  处是 C=O 所引起的非对称伸缩振动峰; 在  $1200\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  出现的一组吸收峰是 C—H 引起的变角振动; 在  $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  出现的吸收峰是 C—O 伸缩振动所引起的;  $907\text{ cm}^{-1}$  出现的较大的吸收峰是由呋喃环的对称伸缩振动所引起的,  $848\text{ cm}^{-1}$  出现的小峰是次甲基的横向振动引起的; 经过磷酸酯化的款冬花多糖, 与修饰前比较,  $2927\text{ cm}^{-1}$  处的 C—H 键吸收峰、

$1664\text{ cm}^{-1}$  处的 C=O 吸收峰、 $1200\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  出现的一组 C—H 吸收峰、 $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  出现的 C—O 吸收峰以及  $907\text{ cm}^{-1}$  呋喃环吸收峰并没有发生明显变化, 这说明修饰对于多糖本身结构的影响不大, 基本保持了多糖的原有性质; 修饰后的多糖也出现了一些新的变化, 其中 OH 峰的吸收值变小, 且分裂成  $3447$  和  $3526\text{ cm}^{-1}$  两个吸收峰, 说明多糖中部分—OH 参与了磷酸酯化反应;  $1337\sim 1268\text{ cm}^{-1}$  处是 P=O 伸缩振动峰,  $1020\text{ cm}^{-1}$  处是 P—O—C 伸缩振动峰; 此图的特征峰同已有磷酸酯多糖谱图相比, 基本相符合<sup>[11,13]</sup>, 说明得到的产品确定为款冬花磷酸酯多糖。

### 2.4 款冬花磷酸酯多糖的抗氧化活性

#### 2.4.1 清除 DPPH·实验

DPPH·是一种稳定的自由基, 当加入自由基清除剂后, DPPH·的单电子就会配对, 使其溶液颜色由紫色变浅, 因此可用于评价自由基清除剂清除自由基的能力, 以抗坏血酸  $V_C$  做参照试剂进行清除 DPPH·的测试, 结果如图 8 所示。

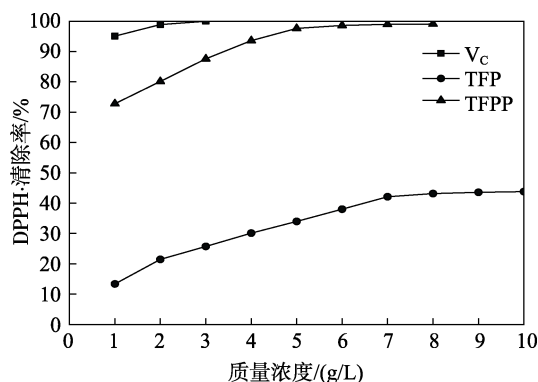


图 8 不同质量浓度的样品对清除 DPPH·的影响  
Fig. 8 Effect of mass concentration of sample on the scavenging rate to DPPH·

从图 8 可以看出, 款冬花多糖和款冬花磷酸酯多糖均有一定的清除 DPPH·能力, 随着多糖浓度的增加, 清除能力逐渐增大。相比较而言, 款冬花磷酸酯多糖的清除能力较好, 当质量浓度为 6 g/L 时, 其清除率最高为 98.91%, 几乎与对照品 ( $V_C$  的清除能力相当)。这说明用磷酸酯化的方法来修饰款冬花多糖改善了其抗氧化活性。

#### 2.4.2 清除超氧阴离子实验

超氧阴离子 ( $O_2\cdot^-$ ) 的毒性是机体发生氧中毒的主要原因, 它能够造成膜损伤、线粒体氧化磷酸化作用的改变及其他一系列的变化。通过邻苯三酚在碱性条件下自氧化生成带色的中间产物  $O_2\cdot^-$ , 当释放出的  $O_2\cdot^-$  受到抑制或清除时, 就可以阻止中间产物的积累。因此, 通过测定样品对邻苯三酚自氧化抑制作用, 即可表征其对超氧阴离子清除作用。以

抗坏血酸  $V_C$  做参照试剂进行清除  $O_2\cdot$  的测试, 结果见图 9。

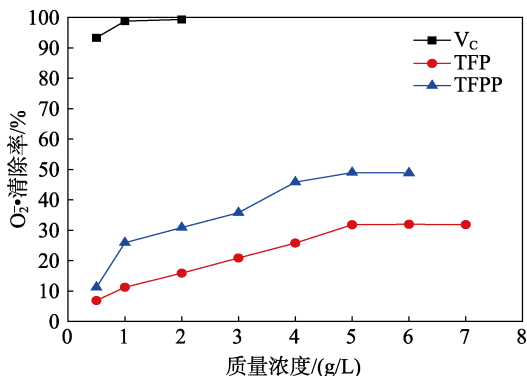


图 9 不同质量浓度的样品对清除  $O_2\cdot$  的影响

Fig. 9 Effect of mass concentration of sample on the scavenging rate to  $O_2\cdot$

从图 9 可以看出, 款冬花多糖和款冬花磷酸酯多糖清除  $O_2\cdot$  的能力较弱, 随着多糖浓度的增加, 清除能力逐渐增大。相比较而言, 款冬花磷酸酯多糖的清除能力较好, 当质量浓度为 6 g/L 时, 其清除率最高为 48.85%。这说明用磷酸酯化的方法来修饰款冬花多糖改善了其抗氧化活性。

#### 2.4.3 清除羟自由基实验

羟自由基 ( $OH\cdot$ ) 是最活泼的自由基, 它可和活细胞中的任何分子发生反应而造成损伤, 而且反应速度极快, 被破坏的分子遍及氨基酸、磷脂、核苷和有机酸等。通过测定样品对 Fenton 反应产生羟自由基的清除作用, 即可表征其对羟自由基的清除作用。以抗坏血酸  $V_C$  做参照试剂进行清除  $OH\cdot$  的测试, 结果见图 10。

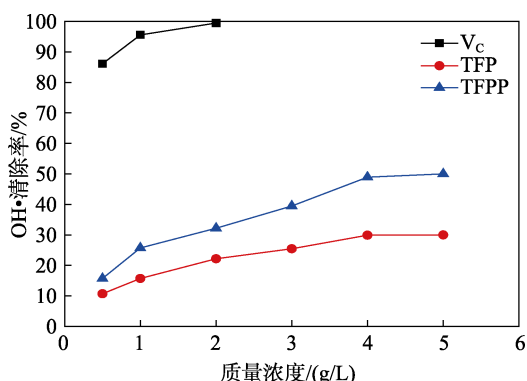


图 10 不同质量浓度的样品对清除  $OH\cdot$  的影响

Fig. 10 Effect of mass concentration of sample on the scavenging rate to  $OH\cdot$

从图 10 可以看出, 款冬花多糖和款冬花磷酸酯多糖清除  $OH\cdot$  的能力较弱, 随着多糖浓度的增加, 清除能力逐渐增大。相比较而言, 款冬花磷酸酯多糖的清除能力较好, 当质量浓度为 5 g/L 时, 其清

除率最高为 50.34%。这说明用磷酸酯化的方法来修饰款冬花多糖改善了其抗氧化活性。

### 3 结论

本研究针对款冬花磷酸酯多糖的合成工艺路线进行了优化, 在单因素实验基础上, 利用响应面实验分析方法对其合成工艺条件进行了优化, 最终确定的工艺条件为: 反应时间 6.0 h, 反应温度 86 °C, 尿素用量为反应物总质量的 14.25%,  $m$  (磷酸二氢钠) :  $m$  (磷酸氢二钠) = 2 : 1,  $m$  (混合磷酸盐) :  $m$  (款冬花多糖) = 1.5 : 1。在此工艺条件下, 所得的款冬花磷酸酯多糖的平均取代度为 0.697, 以款冬花多糖计, 款冬花磷酸酯多糖得率为 31.53%。

本法操作条件相对温和, 但反应时间较长, 在今后的研究中, 将进一步探讨通过微波或超声辅助的方式来提高反应效率。根据款冬花磷酸酯多糖抗氧化性实验可以看出, 磷酸酯化修饰款冬花多糖有利于提升其抗氧化能力。本实验可为款冬花多糖的深入研究及同类研究提供一定的理论参考。

#### 参考文献:

- [1] Lin Jun (林俊), Li Ping (李萍), Chen Kaoshan (陈靠山). Advance in studies on anti-tumor activity of polysaccharides in latest five years[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2013, 38(8): 1116-1125.
- [2] Tang Xiaofang (汤小芳), Liu Xiang (刘想), Hu Meihua (胡美华), et al. Research progress on the immune regulation of polysaccharides related to immune system[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2018, 39(9): 325-331, 341.
- [3] Li Jingwen (李婧文), Zhou Changlin (周长林). Immunomodulatory activity of polysaccharides and research progresses of polysaccharides medicine[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics (中国生化药物杂志), 2016, 36(4): 24-28.
- [4] Dai Rong (代荣), Liu Ruming (刘如明), Xiao Jianjun (肖建辉). Research progress on hypoglycemic effect and its mechanism of action of medicinal fungal polysaccharides[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2015, 40(2): 174-179.
- [5] Deng Qingfang (邓青芳), Zhou Xin (周欣), Chen Huaguo (陈华国). Advance in study on hepatoprotective effects and its mechanism of polysaccharides[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2016, 41(16): 2958-2967.
- [6] Li Yushan (李玉山), Wang Fengshan (王凤山), He Yanli (贺艳丽). Research advance on modification of natural polysaccharide[J]. Journal of Fisheries Research (渔业研究), 2017, 39(2): 157-162.
- [7] Zhang Hua (张华), Wang Zhenyu (王振宇), Wang Xue (王雪), et al. Research advancements of chemical modification of polysaccharide and their biological activities[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2010, 36(7): 102-107.
- [8] Guo Haojie (郭浩杰), Yang Yange (杨严格), An Le (安乐), et al. Research progress in molecular modification and pharmacological activity of Chinese materia medica polysaccharides[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2015, 46(7): 1074-1080.