

兰州百合多糖硒酸酯的合成及表征

张 继^{1*}, 刘忠旺¹, 王凤霞¹, 杨玉萍¹, 田玉汝¹, 孙文秀^{2, 3}, 王云普²

(1. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃特色植物有效成分与制品工程技术研究中心, 兰州 730070;

2. 甘肃省高分子材料重点实验室, 兰州 730070;

3. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 用水提取兰州百合块茎粗多糖, 经酶和 *savage* 联用法脱蛋白质, 得兰州百合多糖(LP)。在 HNO_3 -

BaCl_2 催化作用下, 利用亚硒酸钠水解产生的 $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{Se}}-\text{OH}$ 对兰州百合多糖的 $-\text{OH}$ 进行修饰, 首次合成了兰州百合多糖硒酸酯(seleno-LP)。通过正交实验得出最佳反应条件是硝酸体积浓度 0.5%, 70℃反应 10h, ICP 测得此时硒含量为 0.784mg/g, 并通过紫外、拉曼光谱和热分析分别对合成产物进行表征, 最后得出硒在合成产物中是以 $\text{Se}=\text{O}$ 的形式存在。

关键词: 兰州百合多糖硒酸酯; 合成; 表征

硒多糖兼有多糖和硒两方面的功能, 因此表现出更有效的生理活性。近来研究发现灵芝硒多糖比灵芝多糖有更显著的抑制肿瘤生长的活性、硒化壳聚糖具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用、硒化卡拉胶可使正常小鼠以及四氧嘧啶糖尿病小鼠的血糖降低^[1~3]。但对硒化兰州百合多糖未见报道, 本文利用 HNO_3 - BaCl_2 法首次合成了兰州百合多糖硒酸酯(seleno-LP)。

兰州百合隶属百合科百合属植物, 我们的研究表明, 兰州百合多糖主要由葡萄糖(Glu)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)三种单糖组成, 摩尔比为 19:10:1, 以 $\beta\text{-Glu}(1\rightarrow4)$ 和 $\alpha\text{-Man}(1\rightarrow3)$ 以接近 2:1 的比例交替形成主链^[4]。药理实验表明 LP 具有抗氧化、抗肿瘤、增强机体免疫功能的作用^[5]。因此, 合成的 seleno-LP 在提高兰州百合多糖原有的生物活性上可能会起很大作用。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

鲜百合(购于兰州市西果园百合生产基地): 采用直接水提法对百合鳞茎中的多糖进行提取, 酶与 *savage* 连用的方法进行脱蛋白处理, 直至在 280nm 处没有吸收峰为止^[6]。浓缩后乙醇沉淀, 冷冻干燥得 LP。Na₂SeO₃、Vc、Na₂CO₃、Na₂SO₄、HNO₃ 和 BaCl₂ 均为分析纯(天津)。UV 1100 紫外分光光度计, DV 4300 ICP-AES, RFS 100 S 傅立叶激光拉曼仪, DE-6300 DAT/TC。

1.2 实验方法

1.2.1 Seleno-LP 的制备^[7] Seleno-LP 合成过程: 1.00g LP 粉末放入三口烧瓶中, 加入体积分数为 0.3%~0.8%的 HNO₃ 水溶液 100mL, 加热搅拌使多糖全部溶解, 得 10mg/mL 的多糖溶液。经油浴加热到 60~80℃时, 加入 0.8g Na₂SeO₃ 和 1.44g BaCl₂, 反应 6~14h(正交实验见表 1)。反应结束后, 反应液冷却到室温后, 抽滤, 无水 Na₂CO₃ 调 pH 值 5~6, 加入适量无水 Na₂SO₄ 沉淀反应液中的氯化钡, 离心去沉淀后的溶液对流水透析, 取透析液少量加入 Vc 检测, 无红色时停止透析, 减压蒸馏至 10~20mL 无水乙醇沉淀, 冰

基金项目: 科技部支撑计划(2008BAK51B05); 国家自然科学基金(50773064);

作者简介: 张继(1963-), 女, 研究员, 主要从事生物高分子研究;

通讯联系人: Tel: 0931-7971140; E-mail: zjlt66@163.com.

箱中放置过夜, 离心, 沉淀用无水乙醇洗涤, 冷冻干燥得产品。

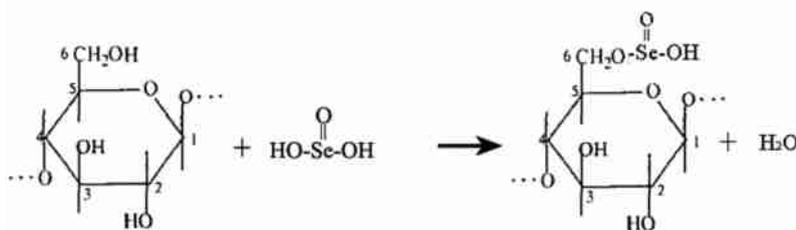
表 1 正交实验表

Table 1 The orthoggnal experiment

实验号	硝酸浓度 /%	反应时间 /h	反应温度 /°C	硒含量 (mg/kg)
1	0.3	6	60	349
2	0.3	10	70	583
3	0.3	14	80	485
4	0.5	6	70	711
5	0.5	10	80	559
6	0.5	14	60	587
7	0.8	6	80	571
8	0.8	10	60	529
9	0.8	14	70	594
均值 1	463	544	488	
均值 2	619	557	629	
均值 3	565	546	529	
极差	0.156	0.013	0.141	

由正交实验可得出合成 Seleno-LP 的最佳条件为: 硝酸体积浓度为 0.5%, 反应温度 70 °C, 反应时间 10h。

LP 主要由 Glu 和 Man 组成, 且都是吡喃糖, 以 Glu 为例, 在反应过程中, 因为糖的 6 位羟基比 2 位和 3 位的活泼, 所以主要发生的反应如下:



1.2.2 Seleno-LP 的紫外光谱 0.02g LP 和 0.02g seleno-LP 样品分别置于 50mL 锥形瓶中, 加入混酸 $\text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$ (1:1:4) 2mL 消化至溶液澄清时, 冷却, 转移到 10mL 容量瓶中定容, 摇匀。选定的方法处理后^[8], 在 300 nm 到 400nm 范围内进行紫外扫描。

1.2.3 ICP-AES 检测 seleno-LP 中硒的含量 0.02g LP 和 0.02g seleno-LP 样品分别置于 50mL 锥形瓶中, 加入混酸 $\text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$ (1:1:4) 2mL, 消化至溶液澄清时, ICP^[9] 测定其硒含量。仪器工作条件为: 泵速: $20\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$, 入射功率: 1200w, 雾化器: V 型凹槽雾化器, 附蠕动泵, 积分时间: 5s, 氩气流量: 等离子气 $12.0\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气: $0.75\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 提取率: $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 观测高度: 5mm, 观测宽度: 0.06mm。

1.2.4 Seleno-LP 的拉曼光谱测定 采用 RFS 100 S 傅立叶激光拉曼仪, Laser: 244nm, 到样品功率: 3mW。

1.2.5 Seleno-LP 的热分析 分别对 LP 和 seleno-LP 样品进行热谱扫描。采用 DE-6300 型综合热分析仪对样品进行热分析, 升温速率 $10\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 升温范围 25 ~ 700 °C。气氛为静态氮气; 参比物为 Al_2O_3 。

2 结果与讨论

2.1 Seleno-LP 的紫外光谱

从图 1 可以看出 LP 和 Seleno-LP 的紫外光谱有所不同。图 1(B) 中, 在 $\lambda = 338\text{nm}$ 处有一个强的吸收

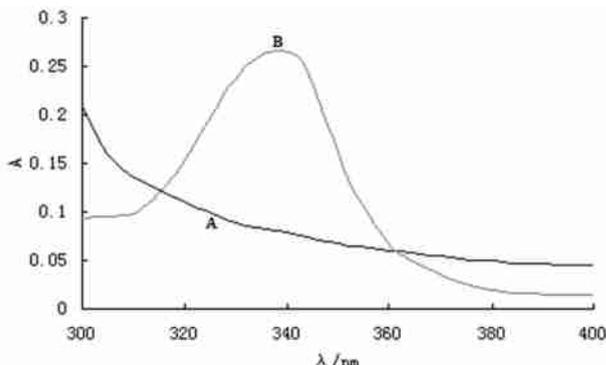


图 1 LP(A) 和 seleno-LP(B) 的紫外光谱

Figure 1 Ultraviolet spectra of LP(A) and seleno-LP(B)

峰,与文献^[10]报道硒在 $\lambda=335\text{nm}$ 的吸收峰基本相吻合,紫外结果表明合成物中含有硒。

2.2 ICP-AES 检测 seleno-LP 中硒

通过 ICP-AES 方法测得 LP 和 seleno-LP 的硒含量分别为 0mg/g 和 0.784mg/g ,与紫外光谱的结果一致。

2.3 Seleno-LP 的拉曼光谱

Seleno-LP 的激光拉曼光谱在 911cm^{-1} 和 699cm^{-1} 附近的吸收峰亚硒酸酯中 $\text{Se}=\text{O}$ 和 $\text{Se}-\text{OH}$ 的伸缩振动^[11],而 LP 在这两处均没有吸收峰。这证实了 seleno-LP 中存在 $\text{Se}=\text{O}$ 键。

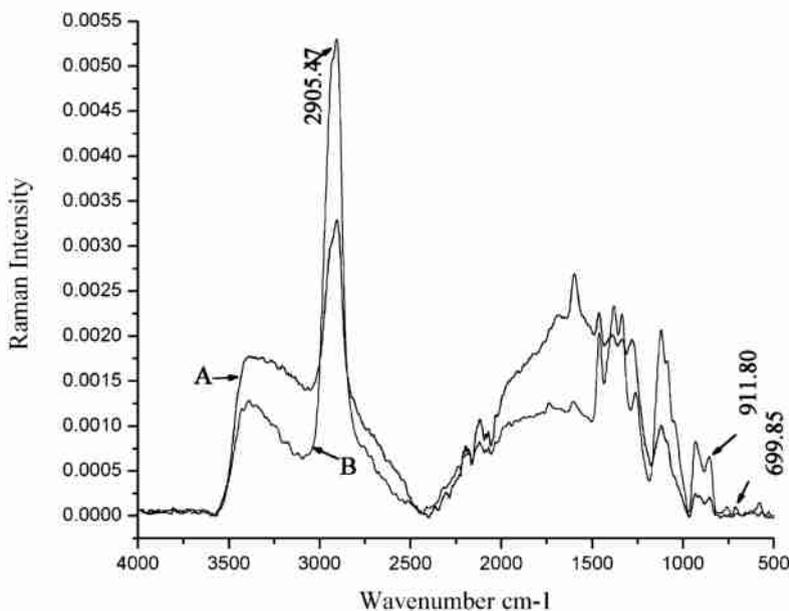


图 2 LP 和 seleno-LP(B) 的拉曼光谱

Figure 2 Laser-Raman spectrum of LP(A) and seleno-LP(B)

2.4 Seleno-LP 的热分析

图 3 为 LP and seleno-LP 的差热图谱,曲线纵坐标为试样与参比物的温度差(ΔT)。从图 3 可以看出,两种样品的差热图谱具有一定的相似性和相异性,二者表现出了 3 个明显的放热峰和 2 个明显的吸热峰。差别在第一个峰,seleno-LP 的温度要明显低于 LP。seleno-LP 的 2 个吸热峰峰顶温度和前 2 个放热峰都要低于 LP 的放热峰和吸热峰峰顶温度。这与 seleno-LP 热稳定性低于 LP 的热稳定性相一致^[12]。

图 4 为 LP and seleno-LP 的热失重图谱,在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 以前主要是 LP and seleno-LP 中吸附水和结晶水的失重,两者差别不是很明显。温度上升到 $113\text{ }^\circ\text{C}$ 时,seleno-LP 开始分解,由于酯的量比较少,所以在很短的时间内完全分解。当温度上升到 $246\text{ }^\circ\text{C}$ 时,LP 和 seleno-LP 都开始分解。引起的原因主要是多糖长链的断裂

分解。

LP 和 seleno-LP 在 480 °C 和 700 °C 时的失重百分数 85.9%, 89.9% 和 91.6%, 98.0%, 且 seleno-LP 的起始分解温度为 113 °C, LP 的起始分解温度是 240 °C, 可以看出 seleno-LP 的稳定性比 LP 的差, 而形成酯是其重要的原因。

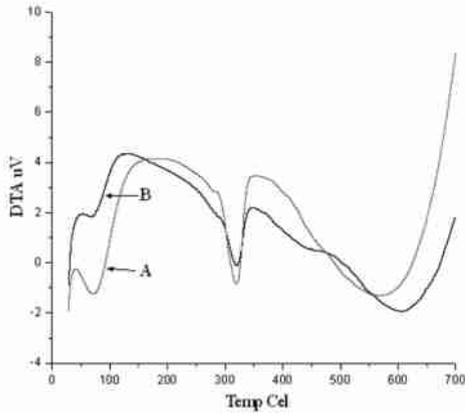


图 3 LP (A) 和 seleno-LP (B) 的差热图谱

Figure 3 DTA curves recorded for the LP (A) and seleno-LP (B) gel

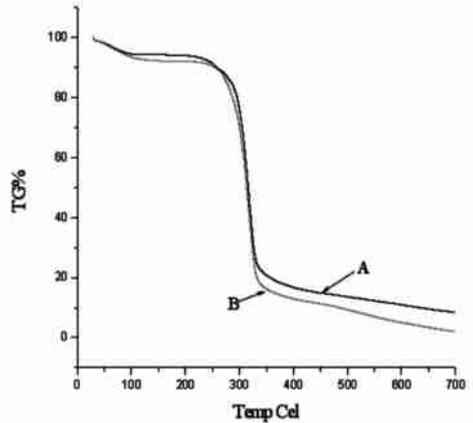


图 4 LP (A) 和 seleno-LP (B) 的热失重图谱

Figure 4 TG curves recorded for the LP (A) and seleno-LP (B) gel.

4 结论

用 $\text{HNO}_3\text{-BaCl}_2$ 的方法首次合成了 seleno-LP, 并且通过紫外, ICP-AES, 拉曼光谱和热分析的方法对 seleno-LP 进行了表征。合成产物在 UV-Vis $\lambda=334\text{nm}$ 处的吸收峰说明合成产物中存在硒, ICP 测出硒的含量为 0.784mg/g 。在拉曼光谱图中, 911cm^{-1} 和 699cm^{-1} 附近的吸收峰显示亚硒酸酯中 $\text{Se}=\text{O}$ 和 Se-OH 的伸缩振动。从而证明了硒在合成产物中是以酯的形式存在, 热分析的方法证实了这一点, 与文献^[11]推断硒在多糖内最可能以酯的形式结合相吻合。

合成具有良好生物活性和广泛用途的多糖硒酸酯, 且易被人体所吸收, 且毒性比无机硒大大降低^[13]。因此, 合成的产物 seleno-LP 作为一种新药或健康食品的开发可能具有良好的前景。

参考文献:

- [1] 高林, 尚德静, 崔乔. 食用菌学报, 2001, 8(3): 34~38.
- [2] 邓守恒, 孙各琴, 朱名安, 等. 广东微量元素科学, 2006, 13(1): 23~26.
- [3] 张敖珍, 刘雯, 江明华. 上海医科大学学报, 1993, 20(5): 385~387.
- [4] 高义霞. 兰州百合多糖的提取分离及药理活性研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2008.
- [5] 王振恒. 兰州百合多糖结构研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2006.
- [6] 邓时锋, 刘志礼, 李兆兰, 等. 南京大学学报, 2000, 36(5): 200~202.
- [7] 赵玉苹. 海藻硒多糖的合成及生物活性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- [8] 邓斌, 蒋刚彪, 陈六平, 等. 微量元素与健康研究, 2008, 25(1): 40~41.
- [9] 曾冬铭, 陈伟. 江西有色金属, 2006, 20(2): 40~41.
- [10] 刘有芹, 王笑研. 广东微量元素科学, 2008, 15(3): 41~45.
- [11] 徐辉碧, 黄开勋. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用(M). 武汉: 华中理工大学出版社, 1994. 66~76.
- [12] 王书军, 高文远, 陈海霞, 等. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 296~299.
- [13] 王艳预, 吴海歌, 高大彬, 等. 化学与生物工程, 2008, 25(2): 7~9.

Synthesis and Characterization of Seleno-*Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb Polysaccharides

ZHANG Ji^{1*}, LIU Zhong-wang¹, WANG Feng-xia¹, YANG Yu-ping¹,
TIAN Yu-ru¹, SUN Wen-xiu^{2,3}, WANG Yun-pu^{2,3}

(1. College of life Science of Northwest Normal University, Gansu Engineering Technical Research Centre for active ingredient of special plants and product thereof Lanzhou, China;

2. Gansu Key Laboratory of Polymer Material, Lanzhou, China;

3. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia, China)

Abstract: *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb raw polysaccharides were extracted from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb by distilled water. The *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb polysaccharides were isolated through deproteinization by papain and savage. Seleno-*Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb polysaccharides (Seleno-LP) were

prepared by employing sodium selenite which hydrolyze generation of $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{Se}}-\text{OH}$ to modify the LP under the catalysis of nitric acid-barium chloride. The favor reaction conditions were at 70 °C for 10 hours in the 0.5% (v/v) nitric acid. The selenic content of seleno-polysaccharide determined by ICP-AES was 0.784mg/g. The title products were characterized by Ultraviolet spectra, Laser-Raman spectrum and differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetric analysis (TG). We come to the conclusion that Se exist in the fom of Se=O in the title products.

Key words: Seleno-LP; Synthesis; Characterization