

星点设计-效应面法优化白鲜皮多糖硫酸酯化工艺及抗氧化活性

赵宏^{1,2}, 王瑞瑶¹, 张宇¹, 王宇亮¹, 王丽红¹, 汤威威¹, 王伟铎¹, 张凯¹(1.佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2.黑龙江中医药大学中药学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 利用星点设计-效应面法优化白鲜皮多糖(*Dictamnus dasycarpus* polysaccharide, DDP)硫酸酯化工艺, 考察 DDP 修饰前后结构特征及抗氧化活性。方法 采用氯磺酸-吡啶法, 以酯化试剂比例、酯化试剂与多糖溶液比例、反应温度、反应时间为自变量, 硫酸根取代度(degree of substitution, DS)为因变量, 对自变量各水平进行多元回归拟合, 利用效应面法筛选最佳工艺并进行预测分析; 采用红外光谱及扫描电镜观察其结构特点。测定硫酸酯化白鲜皮多糖(sulfated polysaccharides from *Dictamnus dasycarpus*, SDDP)对 DPPH、OH·、O₂⁻清除能力, 考察其抗氧化活性。结果 最佳工艺条件为酯化试剂比例 1 : 4, 酯化试剂与多糖溶液比例 1 : 1, 反应温度 73 °C, 反应时间 5 h。红外光谱显示 SDDP 在 820 cm⁻¹ 和 1 254 cm⁻¹ 附近出现 C-O-S 和 S=O 硫酸基特征吸收峰, 表明 DDP 修饰成功; 扫描电镜显示 SDDP 表面粗糙, 排列紧密, 且块状体积明显小于 DDP; DDP 和 SDDP 都有清除 DPPH、OH·和 O₂⁻能力, 且 SDDP 对 DPPH、OH·和 O₂⁻清除率强于 DDP。结论 星点设计-效应面法优化 DDP 硫酸酯化工艺方法简便且预测性良好, DDP 经硫酸酯化后, 抗氧化活性有所提高。

关键词: 星点设计-效应面法; 硫酸酯化; 白鲜皮多糖; 抗氧化; 红外光谱; 扫描电镜

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1090-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.013

引用本文: 赵宏, 王瑞瑶, 张宇, 等. 星点设计-效应面法优化白鲜皮多糖硫酸酯化工艺及抗氧化活性[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1090-1095.

Optimization for Sulfation Techniques of *Dictamnus Dasycarpus* Polysaccharide by Central Composite Design-response Surface Method and Study on Its Antioxidant Activity

ZHAO Hong^{1,2}, WANG Ruiyao¹, ZHANG Yu¹, WANG Yuliang¹, WANG Lihong¹, TANG Weiwei¹, WANG Weihua¹, ZHANG Kai¹(1.College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2.Key Laboratory for Chinese Materia Medica of the Education Ministry of China, Heilongjiang Chinese Medicine University, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the sulfated process of *Dictamnus dasycarpus* polysaccharides(DDP) by central composite design-response surface methodology, compared with the polysaccharide structural feature without chemical modification and investigate its antioxidant activity. **METHODS** Chlorosulfonic acid-pyridine method processing technology was optimized by esterification reagent proportion, esterification reagent with polysaccharide solution proportion, reaction temperature, reaction time as independent variables and the degree of substitution as dependent variable, each level of independent variables were fitted by multiple regression fitting. Response surface methodology was used to select optimum processing technology; sulfated polysaccharides from *Dictamnus dasycarpus*(SDDP) were obtained after identified through IR and SEM. Antioxidant activity of SDDP was researched by setting the different concentration of the sample solution and adopting the free radical-scavenging(DPPH, OH·, O₂⁻) capacity of DDP and SDDP as the indicators. **RESULTS** The optimum were as follows: the esterification reagent proportion was 1 : 4, esterification reagent with polysaccharide solution proportion was 1 : 1, reaction temperature was 73 °C, and reaction time was 5 h. The IR spectra exhibited that the characteristic peaks of sulfate at near 820 cm⁻¹ and 1 254 cm⁻¹ of SDDP. The results of IR revealed that DDP was modified successfully after sulfation. The SEM exhibited the surface of SDDP was roughly arranged and the bulk volume was obviously less than DDP. It was discovered that DDP and SDDP both had the strong free radical scavenging ability for DPPH, OH· and O₂⁻. Compared with the polysaccharides without chemical modification, the reducing power of SDDP was stronger. **CONCLUSION** This optimized processing technology of SDDP is simple and feasible with good predictability. After sulfation, the antioxidant activities of DDP have been improved.

KEYWORDS: central composite design-response surface method; sulfation; *Dictamnus dasycarpus* polysaccharide; antioxidant activity; IR; SEM

基金项目: 黑龙江省自然科学基金青年项目(QC2018119); 中国博士后科学基金面上资助项目(2015M571454); 黑龙江省博士后科研基金项目(LBH-Z14204); 黑龙江省北药与功能食品特色学科建设项目(2018-TSXX-02); 佳木斯大学优秀学科团队项目(JDXKTD-2019005)

作者简介: 赵宏, 女, 博士, 副教授 Tel: (0454)8610838 E-mail: 0316zh@163.com

白鲜皮为芸香科植物白鲜 (*Dictamnus dasycarpus* Turcz.) 的干燥根皮, 具有清热燥湿、祛风解毒之功效^[1-2]。研究表明白鲜皮中含有生物碱、香豆素类、黄酮类及多糖等活性成分, 其中多糖是最重要的活性成分之一^[3-4]。

中药多糖为天然产物, 来源广泛、不良反应小、不产生耐药性, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等多种生物活性, 因而备受研究者重视^[5-6]。多糖经修饰后其空间结构、分子量及取代基种类等均发生改变, 选择适当方法对多糖结构进行修饰, 可增强其原有生物活性或获得新生物活性, 有助于研究多糖结构和活性之间的关系^[7]。因此对中药多糖进行结构修饰已成为药学研究和应用的常用改良方法。多糖修饰方法有硫酸酯化、磷酸化、乙酰化等^[8-10], 其中硫酸酯化最常见, 硫酸酯化产物具有良好生物活性, 特别是在抗氧化、抗病毒方面表现优异。

笔者前期发现白鲜皮多糖 (*Dictamnus dasycarpus* polysaccharide, DDP) 具有良好抗氧化、提高免疫和抗银屑病活性^[11], 为进一步提升 DDP 活性, 本研究采用星点设计-效应面法优化 DDP 硫酸酯化工艺, 重点考察酯化试剂比例、酯化试剂与多糖溶液比例、反应温度及反应时间对 DDP 硫酸酯化工艺的影响, 确立 DDP 硫酸酯化最优工艺并验证, 为高效制备硫酸酯化 DDP (sulfated polysaccharides from *Dictamnus dasycarpus*, SDDP) 提供理论依据; 同时初步考察 SDDP 抗氧化活性, 为深入研究 DDP 及其衍生物药用价值及应用提供物质基础和活性研究基础。

1 仪器与试剂

DF-101S 型恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); FDU-1200 型冷冻干燥机(日本东京理化株式会社); DL-5-B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂); FTIR-8400S 型红外光谱仪(日本 Shimadzu 公司); Prox 型扫描电镜(荷兰 Phenom 公司)。

氯磺酸(批号: 201506015; 纯度: 98%)和吡啶(批号: 100109-201102; 纯度: 98%)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。硫酸亚铁(批号: 20150925)和双氧水(批号: 20150715)均购自天津市科密欧化学试剂开发中心; 水杨酸(批号: 20151004)和二苯代苦味酰肼(批号: 20151004)均购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 以上试剂均为分析纯, 水为双蒸水。白鲜皮(佳木斯百草堂药行, 批号:

170508), 经佳木斯大学药学院张宇教授鉴定为芸香科植物白鲜 (*Dictamnus dasycarpus* Turcz.) 的干燥根皮, 符合中国药典 2015 年版规定, 现样品保存于佳木斯大学药学院。

2 方法与结果

2.1 DDP 的制备

取白鲜皮干燥粉末 500 g, 加入 5 倍双蒸水, 100 °C 回流提取 3 次, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 浓缩液加入无水乙醇至上清液乙醇浓度为 80%, 4 °C 静置 48 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥后得 DDP, 得率为 13.6%。

2.2 SDDP 的制备

在附有磁力搅拌装置的干燥三颈瓶中, 加入 10 mL 无水吡啶, 置于冰浴中冷却至 0 °C 后, 搅拌下缓慢加入 2.5 mL 氯磺酸, 得到淡黄色固体酯化试剂, -20 °C 冷冻保存, 备用。精密称取 200 mg DDP 于 30 mL 无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 溶解后加入上述酯化试剂, 70 °C 反应 5 h, 反应结束冷却至室温, 用 4 mol·L⁻¹ NaOH 调至中性, 加入无水乙醇至上清液浓度为 80%, 4 °C 静置 48 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 收集沉淀, 流水透析 72 h, 冷冻干燥得 SDDP。

2.3 SDDP 硫酸根取代度测定

采用氯化钡-明胶浊度法, 绘制硫酸根标准曲线方程后^[11], 精密称取 10.0 mg SDDP 于 10 mL 量瓶中, 加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液定容至 10 mL, 振荡至全溶, 100 °C 水解 5 h, 冷至室温, 备用。取糖解液 5 mL 加入 3.5 mL 0.8% 三氯乙酸溶液, 摇匀, 加入 2.5 mL 氯化钡-明胶溶液(氯化钡 1%, 明胶 0.5%), 在 360 nm 处测定吸光度。硫酸根取代度(degree of substitution, DS)参照以下公式计算 (*S*% 为待测样品硫酸基的含量, *W_s* 为糖解液吸光度对应下硫酸基毫克数, *W* 为所取多糖质量):

$$DS = \frac{1.62 \times S\%}{32 - 1.02 \times S\%} \quad S\% = \frac{W_s}{W} \times 100\%$$

2.4 DDP 硫酸酯化工艺优化

2.4.1 星点设计与结果 采用 Design-Expert 8.0.6 软件星点设计方案优化 DDP 硫酸酯化工艺试验。选取酯化试剂比例、酯化试剂与多糖溶液比例、反应温度及反应时间作为自变量, 以 DS 作为因变量, 每个因素设计 5 个水平, 分别用代码 -2, -1, 0, 1, 2 表示, 星点试验设计因素水平见表 1, 星点试验设计及结果见表 2。

表 1 星点试验设计因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of central composite design

因素	水平				
	-2	-1	0	+1	+2
A(氯磺酸:吡啶)	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
B(酯化试剂:多糖溶液)	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
C(反应温度/℃)	50	60	70	80	90
D(反应时间/h)	3	4	5	6	7

表 2 星点试验设计及结果

Tab. 2 Central composite experimental design and results

试验编号	A	B	C	D	DS
1	-1	1	-1	-1	0.42
2	0	-2	0	0	0.39
3	0	0	0	0	1.07
4	0	0	-2	0	0.51
5	0	0	0	-2	0.77
6	-1	-1	1	-1	0.46
7	-1	1	1	1	0.37
8	1	1	-1	1	0.51
9	0	0	0	2	0.57
10	1	-1	1	-1	0.56
11	-1	-1	1	1	0.32
12	0	2	0	0	0.78
13	-2	0	0	0	0.28
14	0	0	2	0	0.86
15	0	0	0	0	0.97
16	1	-1	-1	-1	0.48
17	-1	-1	-1	-1	0.42
18	2	0	0	0	0.37
19	1	-1	1	1	0.43
20	1	1	1	-1	0.73
21	0	0	0	0	0.96
22	0	0	0	0	0.89
23	1	1	1	1	0.62
24	0	0	0	0	1.03
25	-1	-1	-1	-1	0.36
26	0	0	0	0	0.96
27	1	1	-1	-1	0.58
28	-1	1	1	-1	0.49
29	1	-1	-1	1	0.41
30	-1	1	-1	1	0.31

2.4.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行试验数据处理及方差分析,以总评取代度 Y 对各因素(自变量)进行多元线性回归和二项式方程拟合,得酯化试剂比例(A)、酯化试剂与多糖溶液比例(B)、反应温度(C)及反应时间(D)与综合评分之间二次多项回归方程: $Y=0.98+0.056A+0.057B+0.050C-0.050D+0.033AB+0.014AC+3.125\times 10^{-3}AD+0.018BC-6.250\times 10^{-4}BD-0.012CD-0.18A^2-0.12B^2-0.090C^2-$

$0.094D^2$, 对该方程模型采用 F 检验进行方差分析并验证模型系数显著性。

二次多项式拟合回归模型 $R^2=0.9272$, 失拟项 $P=0.1464>0.05$, 失拟项不显著,说明模型预测值与实际值差异不显著,模型选择合理、可靠,可用于 DDP 硫酸酯化工艺的预测和分析。 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 二次项具有极显著影响($P<0.01$),一次项有显著影响($P<0.05$)。影响 DDP 硫酸酯化工艺因素显著性顺序为:酯化试剂与多糖溶液比例>酯化试剂比例>反应时间>反应温度。结果见表 3。

表 3 星点试验设计方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of central composite design

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P(F>F_{\alpha})$	显著性
Model	1.58	14	0.11	13.65	<0.0001	**
A	0.076	1	0.076	9.21	0.0084	**
B	0.078	1	0.078	9.49	0.0076	**
C	0.059	1	0.059	7.16	0.0173	*
D	0.061	1	0.061	7.40	0.0158	*
AB	0.018	1	0.018	2.13	0.1651	
AC	3.306×10^{-3}	1	3.306×10^{-3}	0.40	0.5361	
AD	1.563×10^{-4}	1	1.563×10^{-4}	0.019	0.8923	
BC	5.256×10^{-3}	1	5.256×10^{-3}	0.64	0.4371	
BD	6.250×10^{-6}	1	6.250×10^{-6}	7.580×10^{-4}	0.9784	
CD	2.256×10^{-3}	1	2.256×10^{-3}	0.27	0.6085	
A ²	0.89	1	0.89	108.16	<0.0001	**
B ²	0.36	1	0.36	44.23	<0.0001	**
C ²	0.22	1	0.22	27.13	0.0001	**
D ²	0.24	1	0.24	29.43	<0.0001	**
残差	0.12	15	8.245×10^{-3}			
失拟项	0.10	10	0.010	2.65	0.1464	
纯误差	0.020	5	3.920×10^{-3}			
总差	1.70	29				

注:**表示模型组有极显著差异($P<0.01$);*表示模型组有显著性差异($P<0.05$)。

Note:**Indicates very significant difference in the model group($P<0.01$); indicates significant difference in the model group($P<0.05$).

2.4.3 工艺优化 根据多元回归方程绘制响应面分析图及拟合图形曲面形状,分析各变量对提取工艺影响,结果见图 1。响应面 3D 图可以直观地反映酯化试剂比例(A)、酯化试剂与多糖溶液比例(B)、反应温度(C)及反应时间(D)之间相互作用对 DS 的影响。图 1a 与图 1b 因素间交互作用对 DS 的影响最为明显,具体表现为曲线相对来说较陡;其次为图 1c 与图 1d 因素间交互作用;图 1e 与图 1f 因素间交互作用对 DS 的影响不太明显,具体表现为曲线相对比较平缓。得最佳工艺:酯化试剂比例 1:4,酯化试剂与多糖溶液比例 1:1,反应温度 73℃,反应时间 5 h,DS 预测值为 1.00978。

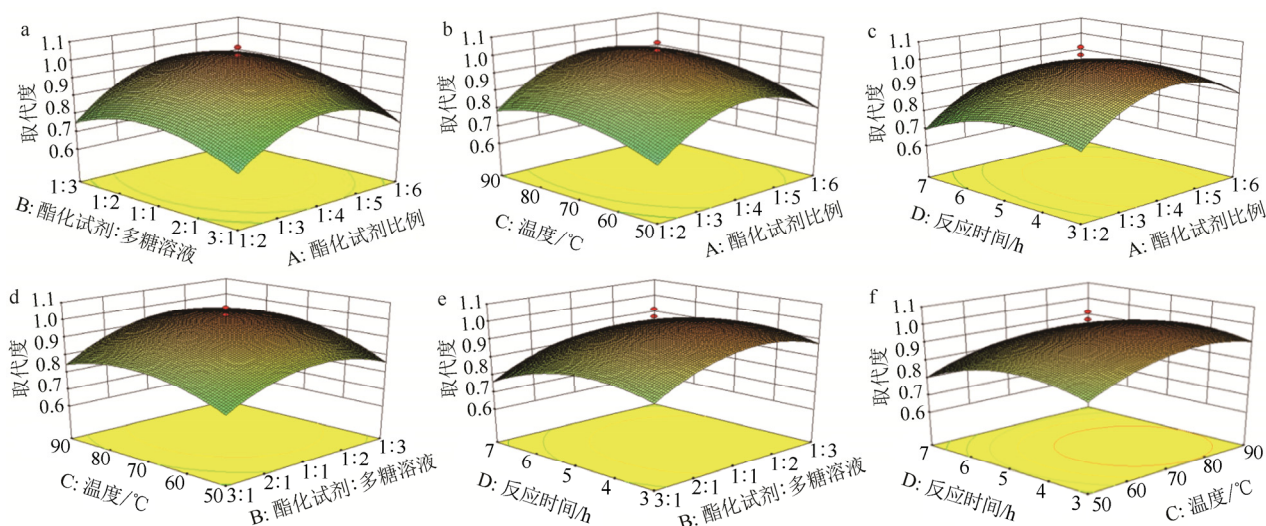


图1 各自变量对硫酸根取代度影响三维曲面

Fig. 1 Three-dimensional surfaces of each independent variable on degree of substitution

2.4.4 DDP 硫酸酯化工艺验证 精密称取 200 mg DDP, 按优选工艺条件重复 3 次试验, 结果 DS 分别为 1.009 42, 1.008 98, 1.009 56, 平均 DS 为 1.009 32, 与模型预测值偏差<5%, 表明该模型预测准确, 可信度高, 优化得到的最佳制备工艺稳定可靠, 重复性良好。

2.5 红外光谱检测

将 DDP 和 SDDP 充分干燥, 分别取 1 mg 样品, 经 KBr 压片, 在 500~4 000 cm^{-1} 内进行红外光谱扫描, 确定其结构特点。

DDP 在 3 424 cm^{-1} 附近有 O-H 伸缩振动吸收峰; 2 941 cm^{-1} 附近有 C-H 伸缩振动吸收峰; 1 646 cm^{-1} 附近有 C=O 伸缩振动峰; 1 420 cm^{-1} 附近为糖分子 C-H 键变角振动峰; 1 079 cm^{-1} 附近为吡喃糖环(C-O-H)伸缩振动吸收峰; SDDP 不仅在 3 426, 2 952, 1 637, 1 029 cm^{-1} 具有多糖特征吸收峰, 在 800, 850 cm^{-1} 有硫酸酯化特征峰, 在 820 cm^{-1} 附近有 C-O-S 特征峰, 在 1 254 cm^{-1} 附近有 -OSO₃S=O 伸缩振动吸收峰。IR 分析表明 DDP 硫酸酯化成功。结果见图 2。

2.6 扫描电镜分析

称取 DDP 与 SDDP 适量于样品杯中, 扫描电镜分析两者形态结构变化, 加速电压为 15 kV。

DDP 与 SDDP 表面立体形态存在显著差异, DDP 呈块状且表面光滑平整排列疏松, SDDP 呈块状且表面粗糙排列紧密, DDP 扫描电镜块状体积明显大于 SDDP, 其空间结构发生明显改变, 结果见图 3。

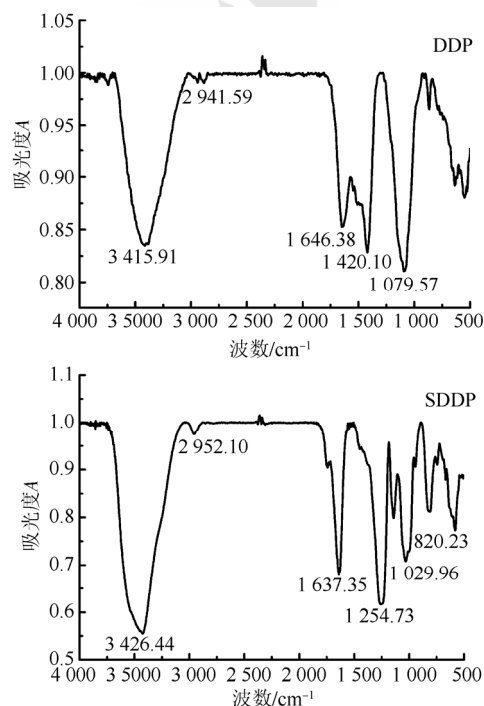


图2 DDP 和 SDDP 红外光谱图

Fig. 2 IR spectrum of DDP and SDDP

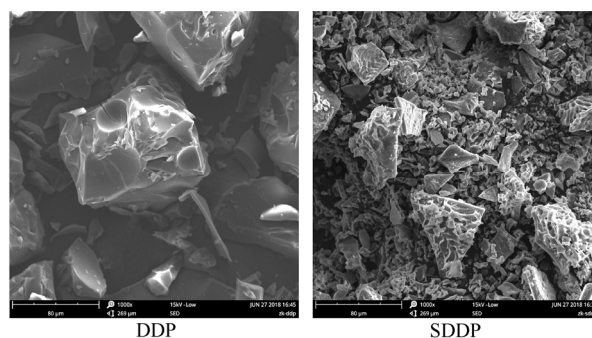


图3 DDP 与 SDDP 扫描电镜图(1 000×)

Fig. 3 SEM pictures of DDP and SDDP(1 000×)

2.7 抗氧化活性

2.7.1 DPPH 清除率测定 分别配制 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·mL⁻¹ DDP 及 SDDP 样品溶液。取 1 mL 样品溶液于 10 mL 试管中, 加入 2 mL 0.2 mmol·L⁻¹ DPPH 乙醇溶液, 充分振荡后, 室温下避光反应 30 min, 517 nm 处测得吸光度 A_1 , 并以蒸馏水代替样品溶液测得吸光度 A_0 , 以无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液测得吸光度 A_2 , 按下式计算 DPPH 清除率:

$$\text{清除率(DPPH, \%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

DDP 及 SDDP 对 DPPH 均有清除作用, 且相同浓度下 SDDP 对 DPPH 清除作用强于 DDP, 表明硫酸酯化后, DDP 对 DPPH 清除作用有一定提高。在样品浓度为 0.5~4 mg·mL⁻¹ 时, DDP 和 SDDP 对 DPPH 清除率呈逐渐增强趋势, 清除率与多糖质量浓度之间呈现出明显量效关系。结果见图 4。

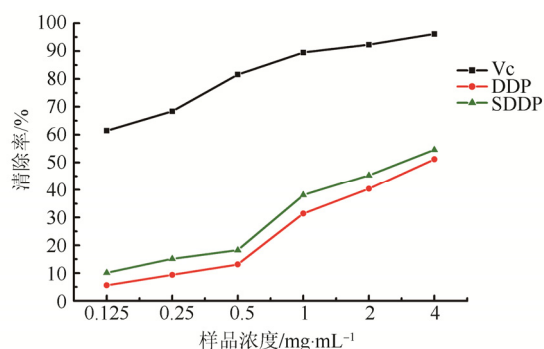


图 4 DDP 和 SDDP 对 DPPH 清除作用

Fig. 4 Scavenging activity of DDP and SDDP on DPPH radical

2.7.2 羟基自由基(OH·)清除率测定 分别配制 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·mL⁻¹ DDP 及 SDDP 样品溶液。9 mmol·L⁻¹ 硫酸亚铁溶液及 9 mmol·L⁻¹ 双氧水溶液各 1 mL 于 10 mL 试管中充分振荡, 静置 10 min, 加入 9 mmol·L⁻¹ 水杨酸溶液 1 mL, 35 °C 水浴 30 min, 510 nm 处测得吸光度 A_1 , 并以蒸馏水代替样品溶液测得吸光度 A_0 , 以蒸馏水代替水杨酸测得吸光度 A_2 , 按下式计算羟基自由基(OH·)清除率:

$$\text{清除率(OH·, \%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

DDP 及 SDDP 对 OH·均有较强清除作用, 相同浓度下 SDDP 清除作用强于 DDP。在样品浓度 1~4 mg·mL⁻¹ 时, SDDP 对 OH·的清除率>50%。清

除率与多糖浓度呈现近似线性关系, 清除率随浓度升高而增强。结果见图 5。

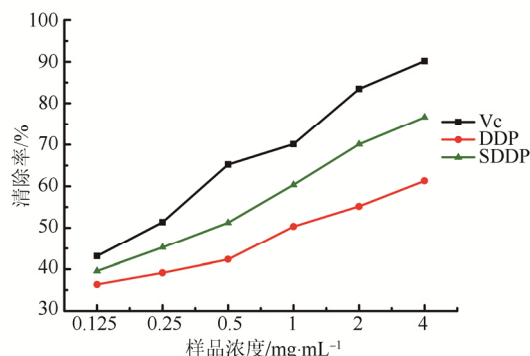


图 5 DDP 和 SDDP 对 OH·清除作用

Fig. 5 Scavenging activity of DDP and SDDP on hydroxyl radical

2.7.3 超氧阴离子(O₂^{-·})清除率测定 分别配制 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·mL⁻¹ DDP 及 SDDP 样品溶液。取 1 mL 样品溶液及 4 mL Tris-HCl 缓冲液于 10 mL 试管中, 充分混匀后, 25 °C 水浴 10 min, 加入 0.3 mL 邻苯三酚溶液, 摇匀, 315 nm 处每隔 30 s 测得吸光度 A_1 , 每次测定吸光度对应时间为 t , 以 $A-t$ 绘图得线性斜率 K_1 为邻苯三酚氧化速率。取 1 mL 蒸馏水代替样品溶液, 315 nm 处测定得吸光度随时间变化自氧化速率 K_0 (以 Vc 作为阳性对照)。按下式计算 O₂^{-·}清除率:

$$\text{清除率(O}_2^{\cdot-}, \%) = \frac{K_0 - K_1}{K_0} \times 100\%$$

DDP 和 SDDP 对 O₂^{-·}均有清除作用, DDP 修饰后清除作用有一定提高, 但差别较小。在样品浓度为 4 mg·mL⁻¹ 时, DDP 和 SDDP 对 O₂^{-·}清除率均>40%。结果见图 6。

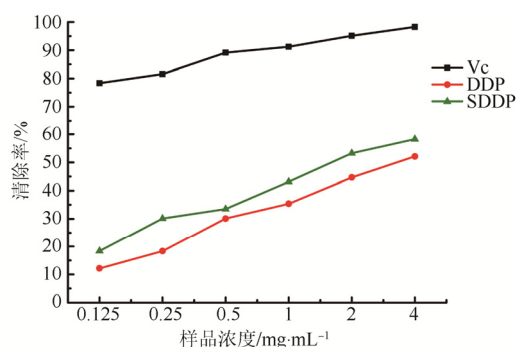


图 6 DDP 和 SDDP 对 O₂^{-·}清除作用

Fig. 6 Scavenging activity of DDP and SDDP on superoxide radical

3 讨论

DDP 具有良好的抗氧化及免疫调节作用, 但水溶性欠佳影响其生物活性发挥, 相关研究表明

硫酸化修饰可以改变多糖在溶液中的构象, 多糖和硫酸化多糖均在水溶液中呈现球形链构象, 而硫酸基团的引入使得多糖的构象变得更为伸展, 进而提高其水溶性, 从而利于其活性的表达^[12], 因此对 DDP 进行结构修饰, 对提高其水溶性和生物利用度具有重要意义。本研究将 DDP 经氯磺酸-吡啶法修饰得 SDDP, 红外显示 SDDP 不仅在 3 426, 2 952, 1 637, 1 029 cm^{-1} 具有多糖特征吸收峰, 且 820 cm^{-1} 和 1 254 cm^{-1} 附近出现 C-O-S 和 S=O 硫酸基特征吸收峰, 结果表明 DDP 结构修饰成功。

经氯磺酸-吡啶法修饰所得多糖, 其取代度往往因酯化试剂比例、酯化试剂与多糖溶液比例、反应时间、反应温度不同而有所差异, 进而影响酯化产物生物活性, 因此可通过响应面法优化硫酸化条件及工艺^[13]。均匀试验设计和正交试验设计可满足一般试验要求, 但试验精密度不高, 无法准确取得最佳点。星点设计-效应面法可通过非线性模型拟合来预测最佳试验条件, 解决均匀试验设计和正交试验设计优化法的不足, 较好地保证试验精度同时也相对减少试验次数^[14]。本研究采用星点设计-效应面法对 DDP 硫酸酯化工艺进行优化, 运用效应曲面模型进行试验设计, 避免了简单的线性模式设计试验预测值与真实值偏差大的缺点, 能够充分考虑各因素的相互作用, 较好保证准确度, 得到准确预测值^[15]。DDP 硫酸酯化工艺最优条件为酯化试剂 1:4, 酯化试剂与多糖溶液比例 1:1, 反应温度 73 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 5 h, 平均 DS 为 1.009 32。各因素二次项对 DS 具有极显著影响且一次项对其有显著影响。

本研究采用体外自由基清除实验, 选取非酶类体外抗氧化指标, 探讨 DDP 和 SDDP 对 DPPH、 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除作用。结果表明, DDP 和 SDDP 对 DPPH、 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 都有清除作用, 且相同浓度下 SDDP 清除能力强于 DDP。多糖供氢能力决定多糖抗氧化能力强弱, 硫酸化衍生物中-OSO₃H 基团引入, 使得异头碳上氢原子被激活, 激活程度越高其供氢能力越强。

综上所述, DDP 和 SDDP 均具有良好的抗氧化作用, DDP 经硫酸酯化后其抗氧化作用显著增强, 这与硫酸化衍生物中-OSO₃H 基团引入有关, 为本课题组进一步研究 DDP 衍生物抗肿瘤、抗银屑病等药理活性提供部分实验依据, 为中药多糖

衍生物提取和药理活性研究提供参考。本研究采用星点设计-效应面法为 SDDP 工业化生产提供科学依据, 便于中药多糖衍生物综合利用与开发。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015.
- [2] ZHANG K, ZHANG Y, WANG L H, et al. Study on sulfated modification and anti-psoriasis activity of polysaccharide from *Dictamnus dasycarpus* [J]. China Pharm(中国药房), 2019, 30(8): 1049-1056.
- [3] 李兰兰, 张宇, 赵统超, 等. 白鲜皮多糖闪式提取最佳工艺及抗氧化活性探讨[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(3): 556-558.
- [4] 曹梦, 唐中华, 张衷华. HPLC 双波长法同时测定白鲜皮中 5 种成分的含量[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2860-2862.
- [5] GUO H J, YANG Y G, AN L, et al. Research progress in molecular modification and pharmacological activity of Chinese materia medica polysaccharides [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(7): 1074-1080.
- [6] TIAN R, CHENG C, FENG J, et al. Rheological properties and antioxidant activities of polysaccharide from *Toddalia asiatica* Lam [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(11): 1656-1659.
- [7] ZHANG Z J, ZHANG Y Y. Advances in molecular modification of polysaccharides [J]. Food Ind(食品工业), 2017, 38(5): 253-257.
- [8] WANG Z J, ZHANG L J, ZHONG Y X, et al. Acetylated modification and antioxidant activity of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* [J]. Food Sci(食品科学), 2015, 36(21): 6-9.
- [9] NIU T Z, XU Y J, LI Z J, et al. Research advances of structural modification of lentinan [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(7): 895-900.
- [10] ZHANG Y, CHEN G, ZHAO Z Y, et al. Preparation and solution conformation of acetylated *Sophora alopecuroides* polysaccharide [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(12): 79-83.
- [11] CHU W, LI L L, LI Y, et al. Extraction process and antioxidant activities of Cortex Dictamni polysaccharide [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(7): 1809-1812.
- [12] WANG B J, YANG Q S, CHEN T, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of sulfated water-insoluble polysaccharides from *Russula alutacea* Fr [J]. Southwest China J Agric Sci(西南农业学报), 2017, 30(12): 2673-2679.
- [13] XIE M Y, WANG Z J, XIE J H. Research progress on the sulfated modification of polysaccharides and its structure-bioactivities relationship [J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2015, 15(2): 1-8.
- [14] SUN S G, HAO S J, CHEN L J, et al. Optimization of extraction process of paeonol from Moutan Cortex by central composite design-response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(8): 920-923.
- [15] ZHAO S, XIAO Q M, ZHU Q H, et al. Optimization of the preparation of camptothecin loaded mPEG-S-S-C18 nanoparticles by central composite design-response surface method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(10): 1173-1177.

收稿日期: 2019-03-18

(本文责编: 曹粤锋)