

说明书

一种低温等离子体改性金钗石斛多糖、制备方法及其应用

5 技术领域

本公开属于生物工程技术领域，具体地说，涉及一种低温等离子体改性金钗石斛多糖、制备方法及其应用。

背景技术

- 10 多糖自诞生之日起，便因其优良的免疫活性而引起了人们的极大关注，但多糖分子量大，与受体结合能力差，在靶器官上的附着能力差，导致活性多糖的应用非常有限。传统的结构改造和修饰常常改变了多糖的一级结构及其生物活性，因而在多糖的应用中并未起到重要的作用。因此寻找积极有效的改性方法一直是活性多糖研究的难点。
- 15 金钗石斛含有丰富的活性多糖，在抗氧化、防衰老、降血糖、抗肿瘤和免疫调节等方面均有显著活性，而最让研究者们欣喜的正是其突出的免疫调节活性。然而由于金钗石斛多糖亲水性差，无法有效发挥其生物活性，因此除了传统使用方式以外，金钗石斛多糖的应用仍未取得突破性的进展。因此，我们一直在寻找一种安全有效的方法来改善金钗石
- 20 斛多糖的亲水性，并促进其生物活性的发挥。

发明内容

本公开的一个目的是提供一种低温等离子体改性金钗石斛多糖的制备方法的新技术方案。

- 25 根据本公开的一个方面，本公开提供一种低温等离子体改性金钗石斛多糖的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1，制备金钗石斛多糖；

步骤 2，对制备得到的金钗石斛多糖进行低温等离子处理，制备得到低温等离子体改性金钗石斛多糖，其中，电离气体为氧气或氩气，电流强度为

6-10mA，处理时间 10-50s。

可选地，对金钗石斛多糖进行低温等离子处理时，电离气体为氩气，电流强度为 8mA，处理时间为 30s。

可选地，所述制备金钗石斛多糖的具体步骤包括：

5 步骤 1.1，金钗石斛洗净、晒干后粉碎，过筛取粉末；

步骤 1.2，使用石油醚对粉末状的金钗石斛回流提取，过滤，弃滤液，得药渣，药渣加热挥干残留溶剂；

步骤 1.3，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取，过滤，弃滤液，重复提取三次，合并提取液，过滤后浓缩至预设体积。

10 步骤 1.4，加入等预设体积的 sewage 试剂萃取，收集上层清液；

步骤 1.5，量取萃取的上层清液，边搅拌边滴加乙醇使体系中乙醇体积达到 40%，过滤去掉第一沉淀；在溶液中继续滴加乙醇，使体系中含醇量达到 60%，收集第二沉淀；

15 步骤 1.6，对第二沉淀依次用丙酮、乙酸乙酯、无水乙醇洗涤后离心，用去离子水溶解后用大孔树脂 AB-8 纯化，收集多糖液；

步骤 1.7，将收集到的多糖液装入透析袋中用去离子水透析 72h 小时，8h 换一次水；

步骤 1.8，收集透析后透析袋内的溶液经冷冻干燥即得金钗石斛多糖。

可选地，在所述步骤 1.1 中，粉碎后的金钗石斛过 40 目筛取粉末。

20 可选地，在所述步骤 1.2 中，使用 60-90℃ 石油醚对去残溶后的药渣回流提取 1h。

可选地，在所述步骤 1.3 中，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取 2h。

可选地，在所述步骤 1.4 中，所述 sewage 试剂中正丁醇：氯仿的体积比为 1：4。

25 根据本公开的另一个方面，本公开还提供一种低温等离子体改性金钗石斛多糖，所述低温等离子体改性金钗石斛多糖由上述的制备方法制备得到。

根据本公开的再一个方面，本公开还提供上述低温等离子体改性金钗石

斛多糖在药物制剂开发中的应用。

本公开的一个技术效果在于，本公开的制备方法制备得到的低温等离子体改性金钗石斛多糖的亲水性显著增强。

5 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本公开的进一步理解，构成本公开的一部分，本公开的示意性实施例及其说明用于解释本公开，并不构成对本公开的不当限定。在附图中：

图 1 是本公开实施例 1 中对照组的水接触角示意图；

10 图 2 是本公开实施例 1 中低温等离子体处理组水接触角示意图；

图 3 是本公开实施例 1 中低温等离子体处理组的红外检测图谱；

图 4 是本公开实施例 1 中对照组的红外检测图谱。

具体实施方式

15 以下将配合附图及实施例来详细说明本公开的实施方式，借此对本公开如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

根据本公开的一个方面，本公开提供一种低温等离子体改性金钗石斛多糖的制备方法，在一些实施例中，包括以下步骤：

20 步骤 1，制备金钗石斛多糖；

步骤 1.1，金钗石斛洗净、晒干后粉碎，过筛取粉末；

步骤 1.2，使用石油醚对粉末状的金钗石斛回流提取，过滤，弃滤液，得药渣，药渣加热挥干残留溶剂；

25 步骤 1.3，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取，过滤，弃滤液，重复提取三次，合并提取液，过滤后浓缩至预设体积。

步骤 1.4，加入等预设体积的 sewage 试剂萃取，收集上层清液；

步骤 1.5，量取萃取的上层清液，边搅拌边滴加乙醇使体系中乙醇体积

达到 40%，过滤去掉第一沉淀；在溶液中继续滴加乙醇，使体系中含醇量达到 60%，收集第二沉淀；

步骤 1.6，对第二沉淀依次用丙酮、乙酸乙酯、无水乙醇洗涤后离心，用去离子水溶解后用大孔树脂 AB-8 纯化，收集多糖液；

5 步骤 1.7，将收集到的多糖液装入透析袋中用去离子水透析 72h 小时，8h 换一次水；

步骤 1.8，收集透析后透析袋内的溶液经冷冻干燥即得金钗石斛多糖。

步骤 2，对制备得到的金钗石斛多糖进行低温等离子处理，其中，电离气体为氧气或者氩气，电流强度为 6-10mA，处理时间 10-50s，得到低温等
10 离子体改性金钗石斛多糖。

参考图 1 和图 2，通过检测水接触角来分析亲水性的变化，步骤 1 制备得到的金钗石斛多糖为片状，水滴滴下时，对照组(图 1)形成的角度为 $73.89 \pm 1.24^\circ$ (n=4)，处理组(图 2)形成的角度为 $25.78 \pm 0.56^\circ$ (n=4)，与对照相比，显著减少 ($P < 0.01$)。表明与未经等离子体处理的多糖相比，
15 经过等离子体处理后，多糖的亲水性显著增强。

在一些实施例中，在所述步骤 1.1 中，粉碎后的金钗石斛过 40 目筛取粉末。

在一些实施例中，在所述步骤 1.2 中，使用 60-90℃石油醚对去残溶后的药渣回流提取 1h。

20 在一些实施例中，在所述步骤 1.3 中，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取 2h。

在一些实施例中，在所述步骤 1.4 中，所述 sewage 试剂中正丁醇：氯仿的体积比为 1: 4。

实施例 1

25 步骤 1，制备金钗石斛多糖；

步骤 1.1，金钗石斛洗净、晒干后粉碎，过 40 目筛取粉末；

步骤 1.2，使用 80℃石油醚对粉末状的金钗石斛回流提取 1h，过滤，弃

滤液，得药渣，药渣加热挥干残留溶剂；

步骤 1.3，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取 2h，过滤，弃滤液，重复提取三次，合并提取液，过滤后浓缩至预设体积。

步骤 1.4，加入等预设体积的 sewage 试剂（正丁醇：氯仿的体积比为 1:

5 4）萃取，收集上层清液；

步骤 1.5，量取萃取的上层清液，边搅拌边滴加乙醇使体系中乙醇体积达到 40%，过滤去掉第一沉淀；在溶液中继续滴加乙醇，使体系中含醇量达到 60%，收集第二沉淀；

步骤 1.6，对第二沉淀依次用丙酮、乙酸乙酯、无水乙醇洗涤后离心，
10 用去离子水溶解后用大孔树脂 AB-8 纯化，收集多糖液；

步骤 1.7，将收集到的多糖液装入透析袋中用去离子水透析 72h 小时，8h 换一次水；

步骤 1.8，收集透析后透析袋内的溶液经冷冻干燥即得金钗石斛多糖。

步骤 2，对制备得到的金钗石斛多糖进行低温等离子处理，其中，电离
15 气体为氩气，电流强度为 8mA，处理时间 30s，得到低温等离子体改性金钗石斛多糖。

实施例 2

步骤 1，制备金钗石斛多糖，同实施例 1；

步骤 2，对制备得到的金钗石斛多糖进行低温等离子处理，其中，电离
20 气体为氧气或者氩气，电流强度为 6mA，处理时间 50s，得到低温等离子体改性金钗石斛多糖。

实施例 3

步骤 1，制备金钗石斛多糖，同实施例 1；

步骤 2，对制备得到的金钗石斛多糖进行低温等离子处理，其中，电离
25 气体为氧气或者氩气，电流强度为 10mA，处理时间 10s，得到低温等离子体改性金钗石斛多糖。

实施例 4

步骤 1，制备金钗石斛多糖；

步骤 1.1，金钗石斛洗净、晒干后粉碎，过 40 目筛取粉末；

步骤 1.2，使用 60℃ 石油醚对粉末状的金钗石斛回流提取 1h，过滤，弃滤液，得药渣，药渣加热挥干残留溶剂；

5 步骤 1.3，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取 2h，过滤，弃滤液，重复提取三次，合并提取液，过滤后浓缩至预设体积。

步骤 1.4，加入等预设体积的 sewage 试剂（正丁醇：氯仿的体积比为 1:4）萃取，收集上层清液；

10 步骤 1.5，量取萃取的上层清液，边搅拌边滴加乙醇使体系中乙醇体积达到 40%，过滤去掉第一沉淀；在溶液中继续滴加乙醇，使体系中含醇量达到 60%，收集第二沉淀；

步骤 1.6，对第二沉淀依次用丙酮、乙酸乙酯、无水乙醇洗涤后离心，用去离子水溶解后用大孔树脂 AB-8 纯化，收集多糖液；

15 步骤 1.7，将收集到的多糖液装入透析袋中用去离子水透析 72h 小时，8h 换一次水；

步骤 1.8，收集透析后透析袋内的溶液经冷冻干燥即得金钗石斛多糖。

步骤 2，对制备得到的金钗石斛多糖进行低温等离子处理，其中，电离气体为氧气，电流强度为 6mA，处理时间 50s，得到低温等离子体改性金钗石斛多糖。

20 实施例 5

步骤 1，制备金钗石斛多糖；

步骤 1.1，金钗石斛洗净、晒干后粉碎，过 40 目筛取粉末；

步骤 1.2，使用 90℃ 石油醚对粉末状的金钗石斛回流提取 1h，过滤，弃滤液，得药渣，药渣加热挥干残留溶剂；

25 步骤 1.3，使用蒸馏水对去残溶后的药渣回流提取 2h，过滤，弃滤液，重复提取三次，合并提取液，过滤后浓缩至预设体积。

步骤 1.4，加入等预设体积的 sewage 试剂（正丁醇：氯仿的体积比为 1:

步骤 1.5, 量取萃取的上层清液, 边搅拌边滴加乙醇使体系中乙醇体积达到 40%, 过滤去掉第一沉淀; 在溶液中继续滴加乙醇, 使体系中含醇量达到 60%, 收集第二沉淀;

步骤 1.7, 将收集到的多糖液装入透析袋中用去离子水透析 72h 小时, 8h 换一次水:

步骤2, 对制备得到的金钽石斛多糖进行低温等离子处理, 其中, 电离气体为氩气, 电流强度为 10mA, 处理时间 10s, 得到低温等离子体改性金钽石斛多糖。

15 表一，溶解度提高率对比

	电离气体	电流强度 (mA)	处理时间 (S)	溶解度提高率% (Vs: control)
实施例 1	氙气	8	30	85
实施例 2	氧气	6	50	37
实施例 3	氙气	10	10	51

实施例 1-3 制备得到的低温等离子体改性金钽石斛多糖改性多糖为 β -

构型，分子量为 $M_w=7.44 \times 105\text{Da}$ ，分子中-OH 含量显著增加，单糖环由 β -吡喃糖变为 β -呋喃糖，且实施例 1 制备得到的改性后多糖水溶性增加 85%。

参考图 3 和图 4，实施例 1 制备得到的对照组和低温等离子体改性金钗石斛多糖经归一化处理后，从图谱来看， 3453cm^{-1} 处的吸收峰明显增大，提示经低温等离子体处理后金钗石斛多糖样品中连接上了大量的-OH。这是由于实验采用氩气作为等离子体电离气体，氩气本身并不参与反应，而经等离子体处理后的化合物接触空气后，高分子材料表面的化学组成发生相应变化，在 5 高分子材料表面引入含氧活性基团，并生成大量自由基。 2957cm^{-1} 处的吸收峰减少，提示经低温等离子体处理后金钗石斛多糖样品中 C-H 键减少。 1747cm^{-1} 和 1621cm^{-1} 附近的吸收峰显著增大，提示经低温等离子体处理后金钗石斛多糖样品中 C=O 键增多。 1411cm^{-1} 处的吸收峰显著增大，提示经低温等离子体处理后金钗石斛多糖样品中 C=C 增多。 1275cm^{-1} 处的吸收峰变小，提示经低温等离子体处理后金钗石斛多糖样品中 C-O 键减少。 $800-1300\text{cm}^{-1}$ 处的指纹吸收峰有变化，提示经低温等离子体处理后金钗石斛多糖分子的构象和表面结构有了变化。

根据本公开的另一个方面，本公开还提供一种低温等离子体改性金钗石斛多糖，所述低温等离子体改性金钗石斛多糖由上述的制备方法制备得到，且改性后多糖水溶性最大可增加 85%，从而使多糖在体内与受体的结合能力 15 强，使其药效作用增强，故增加多糖的水溶性能有效解决该问题。

根据本公开的另一个方面，本公开还提供上述低温等离子体改性金钗石斛多糖在药物制剂开发中的应用，解决金钗石斛多糖水溶性差而导致其药物 20 制剂研发受限这一难题。

如在说明书及权利要求当中使用了某些词汇来指称特定成分或方法。本领域技术人员应可理解，不同地区可能会用不同名词来称呼同一个成分。本说明书及权利要求并不以名称的差异来作为区分成分的方式。如在通篇说明书及权利要求当中所提及的“包含”为一开放式用语，故应解释成“包含但不 25 限于”。“大致”是指在可接收的误差范围内，本领域技术人员能够在一定误差范围内解决所述技术问题，基本达到所述技术效果。说明书后续描述为实施本公开的较佳实施方式，然所述描述乃以说明本公开的一般原则为目

的，并非用以限定本公开的范围。本公开的保护范围当视所附权利要求所界定者为准。

5 还需要说明的是，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的商品或者系统不仅包括那些要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种商品或者系统所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括所述要素的商品或者系统中还存在另外的相同要素。

10 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。