

羊栖菜褐藻糖胶的结构表征及其抗氧化活性

刘雪¹, 王桂宏^{1,2}, 赵福江^{1,3}, 周鑫¹, Mikhail Kusaikin⁴, 刘昌衡^{1,*}

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东济南 250103;

2. 烟台大境生态环境科技股份有限公司, 山东烟台 264003;

3. 山东极贝尔生物科技有限公司, 山东济南 250014;

4. 俄罗斯科学院远东分院, 太平洋生物有机化学研究所, 酶化学实验室, 俄罗斯海参崴 690022)

摘要:为研究羊栖菜褐藻糖胶的结构及其抗氧化活性,以羊栖菜为原料,经 CaCl_2 溶液提取、DEAE-Sephrose fast flow 分离纯化得到褐藻糖胶组分 SFP-2。采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)、化学法、高效液相法(HPLC)以及傅里叶变换红外光谱法(IR)对多糖的纯度、分子量、理化性质、单糖组成以及官能团进行测定,并通过测定 DPPH 自由基清除活性、超氧阴离子清除活性、ABTS⁺ 自由基清除活性、亚硝酸盐清除活性和还原力,对多糖的体外抗氧化活性进行了评价。结果表明,SFP-2 分子量均一,为 707.0 kDa;总糖含量为 66.9%,蛋白含量为 3.1%,硫酸基含量为 21.2%,不含糖醛酸;SFP-2 主要由岩藻糖和半乳糖构成,还含有少量的甘露糖和氨基葡萄糖;红外光谱显示,SFP-2 具有硫酸化多糖常见官能团的特征吸收峰;上述结果表明 SFP-2 是一种不含糖醛酸的硫酸化岩藻聚糖。SFP-2 具有良好的清除 DPPH 自由基、超氧阴离子、ABTS⁺ 自由基、亚硝酸盐活性,其 EC_{50} 分别为 8.94、8.30、16.04、9.87 mg/mL,且具有一定的还原能力。因此,SFP-2 是一种不含糖醛酸的,抗氧化活性良好的羊栖菜褐藻糖胶。

关键词:羊栖菜,硫酸化多糖,褐藻糖胶,抗氧化活性

Structural Characterization and Antioxidant Activities of Fucoidan from *Sargassum fusiforme*

LIU Xue¹, WANG Gui-hong^{1,2}, ZHAO Fu-jiang^{1,3}, ZHOU Xin¹, Mikhail Kusaikin⁴, LIU Chang-heng^{1,*}

(1. Biology Institute, Qilu University of Technology(Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China;

2. Yantai Dajing Ecological Environment Technology Co., Ltd., Yantai 264003, China;

3. Shandong Jibeier Bio-Technique Co., Ltd., Jinan 250014, China;

4. Laboratory of Enzyme Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia)

Abstract: In order to study the structural characterization and antioxidant activities of fucoidan from *Sargassum fusiforme*, a heterogeneous polysaccharide SFP-2 was obtained by CaCl_2 solution extraction and anion-exchange. Structural characterization of SFP-2 was preliminarily determined by high performance gel permeation chromatography(HPGPC), chemical methods, high performance liquid chromatography(HPLC) as well as fourier-transform infrared(IR). The antioxidant activities were evaluated by scavenging assays involving DPPH radical, superoxide anion, ABTS⁺ radical, nitrite and reducing power. Results indicated that SFP-2 appeared as a single and symmetrical peak in the HPGPC chromatogram and the average molecular weight was 707.0 kDa. The contents of total sugar, protein and sulfate ester were 66.9%, 3.1% and 21.2%, respectively. No uronic acid was detected, SFP-2 was mainly composed of fucose and galactose with a small amount of mannose and glucosamine. IR further proved SFP-2 was a sulfated polysaccharide. From the results, SFP-2 was a sulfated fucoidan without uronic acid. SFP-2 had good scavenging activity for DPPH radical, superoxide anion, ABTS⁺ radical and nitrite. The EC_{50} values of the scavenging assays were 8.94, 8.30, 16.04, 9.87 mg/mL, respectively, with the ability of reducing power. Results above indicated that SFP-2 was a kind of non-glucuronic acid fucoidan which had better antioxidant activity.

Key words: *Sargassum fusiforme*; sulfated polysaccharide; fucoidan; antioxidant activities

收稿日期:2018-04-28

作者简介:刘雪(1992-),女,博士,主要从事海洋多糖方面的研究,E-mail:wenshan389161833@163.com。

* 通讯作者:刘昌衡(1962-),男,大专,研究员,主要从事食品加工及特医食品研发方面的研究,E-mail:1069845456@qq.com。

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC0311200);山东省重点研发计划(2017YYSP005);国家外国专家局 2017 年引进境外技术、管理人才项目计划(20173700017)。

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2019)03-0079-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.013

引文格式:刘雪,王桂宏,赵福江,等.羊栖菜褐藻糖胶的结构表征及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(3):79-84.

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)隶属于褐藻门马尾藻科,广泛分布于中国、日本和韩国,是一种健康食品,具有很高的食用和药用价值,我国药典早有记载,并确定其功能和主治是“软坚散结、消痰、利水、用于瘰疬、瘰癧、睾丸肿瘤、痰饮水肿”。羊栖菜含有丰富的营养物质,包括蛋白质、多糖和矿物质。近年来的研究表明,多糖是羊栖菜中重要的活性物质,具有多种良好的生物活性,如抗凝血、抗肿瘤、降血糖、降血脂等^[1-6]。但是,由于羊栖菜多糖分子量大,粘度高,单糖组成复杂,其分离纯化非常困难,很难得到羊栖菜多糖纯品^[7],而且,羊栖菜多糖并非单一组分,而是由褐藻胶、褐藻糖胶和褐藻淀粉构成,更为其分离纯化带来困难。

褐藻糖胶是羊栖菜中重要的多糖组分,通常定义为含有相当数量的岩藻糖和硫酸基的多糖,是一种岩藻聚糖硫酸酯^[8]。因其具有多种良好的生物活性,近年来受到人们的广泛关注。何丹等^[9]从羊栖菜中分离纯化得到两种褐藻糖胶,通过对 DPPH、羟基自由基的清除能力来评价它们的抗氧化活性,但是这两种褐藻糖胶的分子量分布广泛,纯度相对较低;丁浩森等^[10]从羊栖菜中分离得到三种多糖成分,发现它们具有非常强的羟基自由基清除能力、还原力和抗脂质过氧化能力,但是并未对其结构进行表征。陈琳琳等^[11]采用水提醇沉的方法从羊栖菜中提取得到粗品多糖,发现其对自由基有较好的清除能力。由上述结果可知,羊栖菜多糖抗氧化作用的研究主要集中在混合物方面,纯化组分的抗氧化作用研究相对较少,尤其是羊栖菜褐藻糖胶的纯化组分。

本研究拟从羊栖菜中分离纯化得到纯度高,结构新颖的褐藻糖胶,通过测定 DPPH 自由基清除活性、超氧阴离子清除活性、ABTS⁺ 自由基清除活性、亚硝酸盐清除活性和还原力评价其抗氧化活性,为后续羊栖菜褐藻糖胶的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羊栖菜 购于山东青岛市南区市场;葡聚糖标准品(重均分子量分别为 21.1、47.1、107、200、344、708 kDa,纯度≥99%) 美国 Flu-ka 公司;单糖标准品(甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸,纯度≥99%)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)和标准牛血清白蛋白(纯度≥99%),Griess reagent 美国 Sigma 公司;乙腈(色谱纯) 美国 Tedia 公司;溴化钾(色谱纯) 天津科密欧化学试剂有限公司;其它试剂 均为国产分析纯。

DEAE-Sephrose Fast Flow 美国 GE healthcare 公司;Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm) 美国 Agilent 公司;Shodex ohpak SB

-804HQ 高效凝胶渗透色谱柱 日本 Shodex 公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司;Nicolet Nexus 470 红外光谱仪 美国 Thermo Electron 公司;Infinite M200 PRO 酶标仪 瑞士 Tecan 公司;800Y 高速多功能粉碎机 永康市铂欧五金制品有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 羊栖菜褐藻糖胶的提取 羊栖菜褐藻糖胶的提取参照 Silchenko 等^[12]的方法。新鲜羊栖菜藻体(200 g)用自来水洗净,除去泥沙,40 ℃烘箱干燥 72 h,粉碎机粉碎得藻体粉末。取适量藻体粉末,加入 30 倍体积的 95% 乙醇进行脱脂,室温下搅拌 24 h。脱脂完毕后静置,于 5000 r/min 离心 20 min,收集沉淀部分,40 ℃烘干。取适量脱脂后的藻体粉末,加入 2% CaCl₂ 溶液,料液比为 1:30 g/mL,60 ℃下搅拌 3 h,静置,5000 r/min 离心 20 min,收集上层清液,使用超滤装置进行超滤、浓缩,截留分子量为 100 kDa,待液体体积浓缩至原体积的 1/10,加入 4 倍体积 95% 乙醇,醇沉,4 ℃静置过夜 12 h,5000 r/min 离心 20 min,收集沉淀部分。沉淀经无水乙醇脱水后,得到羊栖菜褐藻糖胶粗品(SFP)(8.6 g)。

1.2.2 SFP 的分离纯化 利用 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换柱(4.0 cm × 30 cm)对 SFP 进行分离纯化^[12]。称取 8.4 g SFP 样品,每 400 mg 进行一次上样,将其溶于 2 mL 去离子水中,超声(400 W, 40 kHz)使其完全溶解,5000 r/min 离心 10 min,吸取上层清液,加至阴离子交换柱中。采用 0、0.5、1、2、3 mol/L NaCl 溶液对 SFP 进行梯度洗脱,收集 0.5 mol/L 洗脱组分,透析除盐,浓缩冻干。所得样品复溶后,按照前述方法,采用阴离子交换柱再次分离纯化,0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱,收集洗脱液,透析除盐,浓缩冻干,所得组分命名为 SFP-2(0.97 g)。多糖纯化时,少量多次上样且反复纯化,可提高样品的纯度。

1.2.3 SFP-2 纯度和分子量测定 将不同分子量的系列葡聚糖标准品和待测多糖样品配制成 5 mg/mL 的溶液,采用 HPGPC 法测定多糖分子量。分析柱:Shodex ohpak SB-804HQ(7.6 mm × 300 mm),示差折光检测器在线检测,流动相:0.1 mol/L Na₂SO₄,流速:0.5 mL/min,柱温:35 ℃,进样量:20 μL。运用 GPC 软件以标准多糖分子量的对数对保留时间作图,绘制标准曲线,根据标准曲线回归方程计算样品的分子量,根据峰型判断 SFP-2 的纯度^[13]。

1.2.4 理化性质分析 采用硫酸苯酚法,以岩藻糖为标准品,测定总糖含量^[14];采用 Folin-酚法,以牛血清蛋白为标准品,测定蛋白含量^[15];采用氯化钼明胶比浊法,以硫酸钾为标准品,测定硫酸基含量^[16];采用吡啶-硫酸法,以葡萄糖醛酸为标准品,测定糖

醛酸含量^[17]。

1.2.5 单糖组成分析 采用 PMP 柱前衍生高效液相色谱法,对单糖组成进行分析^[18]。准确称取 2 mg 多糖样品,加入 1 mL 2 mol/L 三氟乙酸,于 105 ℃ 条件下水解 6 h,水解液减压蒸干,除掉多余的三氟乙酸,得完全酸水解单糖样品。对单糖标准品及完全酸水解单糖样品进行 PMP 衍生,首先将其溶于 100 μL 蒸馏水,加入 100 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液及 120 μL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液,70 ℃ 水浴反应 60 min。反应完毕后中和,用二氯甲烷萃取三次,尽量将未反应的 PMP 除去,上层液体过 0.22 μm 的微孔滤膜后进行高效液相色谱分析。色谱条件为: C18 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 柱温 35 ℃, 流动相为磷酸缓冲溶液/乙腈 (83: 17, V/V), 流速 1.0 mL/min, 紫外检测器检测。

1.2.6 红外光谱分析 采用 KBr 压片法进行红外光谱测定^[19]: 以纯 KBr 压片为空白, 适量 SFP-2 与 KBr 粉末混合压片测定样品的红外图谱。分析仪器: Nicolet Nexus 470 红外光谱仪; 扫描范围: 400 ~ 4000 cm⁻¹。

1.2.7 抗氧化能力的测定

1.2.7.1 DPPH 自由基清除活性 DPPH 自由基清除活性参照 Shimada 等^[20]的方法,并以维生素 C (V_C) 为阳性对照。将 1 mL 浓度分别为 0.75、1.5、3、6、12 mg/mL 的 SFP-2 溶液加至 3 mL 的 0.004% DPPH 乙醇溶液中。避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度值, 并根据以下公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100$$

式中: A_{空白} 为不加待测样品的吸光度, A_{样品} 为加入待测样品的吸光度。

1.2.7.2 超氧阴离子自由基清除活性 超氧阴离子自由基清除活性参照 Marklund 等^[21]的方法,并以 V_C 为阳性对照。将 1 mL 浓度分别为 0.75、1.5、3、6、12 mg/mL 的 SFP-2 溶液与 3 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.2) 混合, 25 ℃ 孵育 10 min。然后加入 200 μL 预热的 30 mmol/L 邻苯三酚溶液, 充分混匀后于 25 ℃ 下反应 4 min, 加入 0.5 mL 浓盐酸终止反应, 并于 320 nm 处测定吸光度值。清除率按照以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100$$

式中: A_{空白} 为不加待测样品的吸光度, A_{样品} 为加入待测样品的吸光度。

1.2.7.3 ABTS⁺ 自由基清除活性 ABTS⁺ 自由基清除活性参照 Re 等^[22]的方法,以水溶性维生素 E (VE) 为阳性对照,并稍作修改。将 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液等量混合, 避光反应 12~16 h。取适量上述混合液,用甲醇稀释至吸光度值稳定在 0.7 ± 0.02, 即得 ABTS⁺ 工作液。将 4 mL 工作液与 100 μL 浓度分别为 0.75、1.5、3、6、12 mg/mL 的 SFP-2 溶液混合, 室温避光孵育 5 min, 于 734 nm 处测定吸光度。清除活性按照以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100$$

式中: A_{空白} 为不加待测样品的吸光度, A_{样品} 为加入待测样品的吸光度。

1.2.7.4 亚硝酸盐清除活性 亚硝酸盐清除活性参照赵二劳等^[23]的方法,以 V_C 为阳性对照,并稍作改进。向 1 mL 1 mmol/L NaNO₂ 中加入 1 mL 浓度分别为 0.75、1.5、3、6、12 mg/mL 的 SFP-2 溶液,用 1 mol/L 的盐酸溶液定容至 10 mL, 37 ℃ 下孵育 60 min。取上述反应液 1 mL, 加入 4 mL 2% 醋酸溶液和 0.4 mL Griess reagent, 混合均匀, 室温孵育 15 min, 于 520 nm 处测定吸光度值, 清除活性按照以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100$$

式中: A_{空白} 为不加待测样品的吸光度, A_{样品} 为加入待测样品的吸光度。

1.2.7.5 还原力测定 还原力实验参照 Dorman 等^[24]的方法,并以 V_C 为阳性对照。分别向 1 mL 浓度分别为 0.75、1.5、3、6、12 mg/mL 的 SFP-2 溶液中加入 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH6.6) 和 1% 的铁氰化钾溶液各 2.5 mL, 混合均匀, 50 ℃ 下孵育 20 min, 加入 10% 的三氯乙酸溶液, 混匀后离心 (6000 r/min, 10 min)。取 2.5 mL 上清液, 加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 静置使其充分反应后于 700 nm 处测定吸光度值。

1.3 数据处理

分子量标准曲线及回归方程采用 GPC 软件处理, 抗氧化活性数据采用 Microsoft Office Excel 2007 处理。

2 结果与分析

2.1 多糖纯度和理化性质分析

通过高效凝胶渗透色谱对多糖的纯度进行分析, 结果如图 1 所示, SFP-2 在 HPGPC 色谱上呈现单一对称峰, 峰型高窄, 峰宽在 5 min 以内, 表明多糖的纯度较高^[25]。根据分子量标准曲线 (图 2) 计算可得, SFP-2 的分子量为 707.0 kDa。理化性质分析表明 (表 1), 多糖的总糖含量为 66.9%; 蛋白含量为 3.1%, 表明蛋白含量较低; 硫酸基含量为 21.2%, 表明多糖为硫酸化多糖; 未检测到糖醛酸, 说明多糖不含糖醛酸, 这与以往的研究显著不同^[26-27]。Hu 等^[26]分离得到的羊栖菜褐藻糖胶均含有糖醛酸, 且含量较高, 这可能是由于藻类生长地域、生长环境不同造成的。

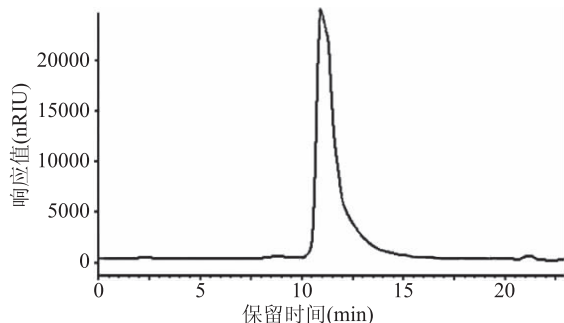


图1 多糖 SFP-2 的高效凝胶渗透色谱图

Fig.1 HPGPC chromatography of the polysaccharide SFP-2

2.2 单糖组成分析

SFP-2 的柱前衍生 HPLC 色谱图如图 4 所示, 与

表1 SFP-2 的理化性质分析

Table 1 Physico-chemical analysis of SFP-2

样品	分子量(kDa)	总糖含量(%)	蛋白含量(%)	硫酸基含量(%)	糖醛酸含量(%)
SFP-2	707.0	66.9	3.1	21.2	-

注:“-”表明未检测到。

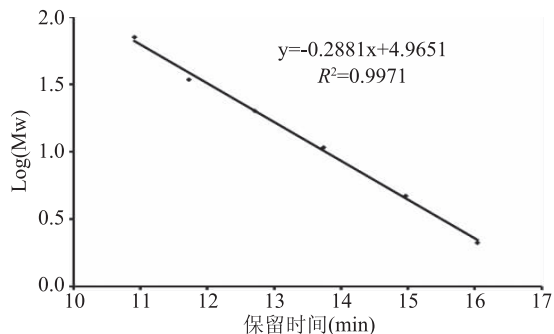


图2 分子量标准曲线

Fig.2 The standard curve of the molecular weight

单糖标准品的色谱图(图3)对比可知,SFP-2 主要含有岩藻糖和半乳糖,还含有少量的甘露糖和氨基葡萄糖,Fuc(岩藻糖):Gal(半乳糖):Man(甘露糖):GlcN(氨基葡萄糖)摩尔比约为2.50:1.0:0.15:0.01,不含糖醛酸,这与理化性质分析相符。SFP-2 的单糖组成比较简单,只含四种单糖,不含糖醛酸。这与以往的研究显著不同,李波等^[27]从羊栖菜中得到的褐藻糖胶含有七种单糖,包括岩藻糖、甘露糖、半乳糖、木糖、葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖,Hu等^[26]从羊栖菜中得到的褐藻糖胶也含有七种单糖,其中包含了两种糖醛酸,葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸。此外,根据岩藻糖和硫酸基含量可知,SFP-2 是一种岩藻聚糖硫酸酯,即褐藻糖胶。

2.3 红外光谱分析

红外光谱图可以给出多糖中常见官能团的吸收峰^[28]。多糖组分 SFP-2 的红外光谱如图5所示。3458 cm⁻¹处为多糖的 O-H 伸缩振动吸收峰;2943 cm⁻¹处为多糖 C-H 伸缩振动吸收峰;1645 cm⁻¹处为多糖类物质常见的微量水分缔合羟基造成;1046 cm⁻¹处的吸收信号为多糖糖残基之间糖苷键 C-O-C 的伸缩振动吸收峰,各糖残基之间的连接方式及顺序的不同导致此处的峰形不规则,1046 cm⁻¹处的两个主峰因糖苷键比例不同大小、位置略有变化;1245 cm⁻¹处的强峰为 S=O 伸缩振动吸

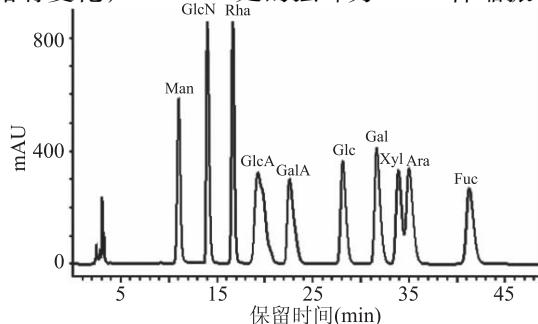


图3 单糖标准品的液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of the standard monosaccharides

收峰,835 cm⁻¹处为 C-O-S 的伸缩振动吸收峰,均为硫酸基的特征吸收峰,进一步证明此多糖为硫酸化多糖。

2.4 抗氧化活性分析

对 SFP-2 进行了体外抗氧化活性测定,包括 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、ABTS⁺ 自由基、亚硝酸盐清除活性以及还原力等指标,多方面评价了多糖的抗氧化活性。

2.4.1 DPPH 自由基清除活性 SFP-2 的 DPPH 自由基清除活性如图6所示,清除率呈现剂量依赖性,随着浓度的增加,清除能力逐渐增加,当浓度为12 mg/mL时,清除率达59.12%。SFP-2 显示了较好的清除 DPPH 自由基的活性,其 EC₅₀ 为 8.94 mg/mL。V_c 作为阳性对照,具有极强的清除自由基的活性,当浓度为0.75 mg/mL时,清除率为93.68%,浓度继续升高,清除率几乎不变,表明达到最大清除活性。上述结果表明,SFP-2 是相对有效的 DPPH 自由基清除剂,可有效防止 DPPH 自由基引起的损害。SFP-2 的 DPPH 自由基清除活性高于陈琳琳等^[11]提取得到的羊栖菜多糖提取物 EFSP,浓度为15 g/L时,EFSP 的清除率为57.02%;低于何丹等^[9]所得两种羊栖菜褐藻糖胶的清除活性。

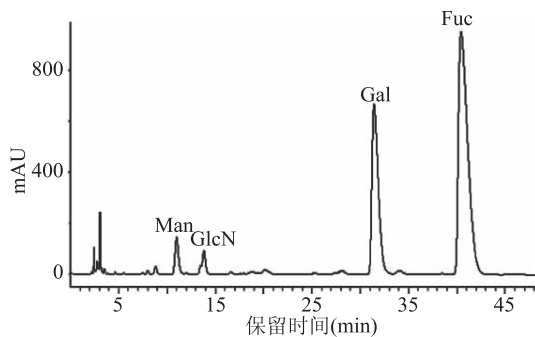


图4 SFP-2 的单糖组成分析

Fig.4 The monosaccharide composition analysis of polysaccharide SFP-2

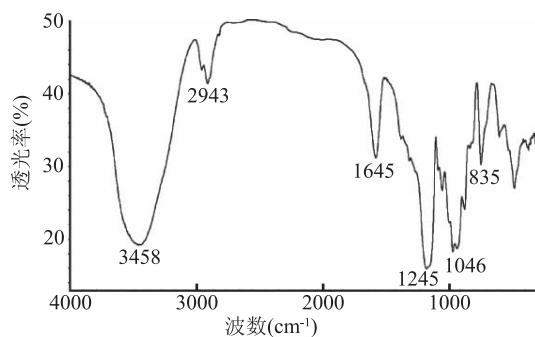


图5 多糖 SFP-2 的红外光谱图

Fig.5 IR spectrum of polysaccharide SFP-2

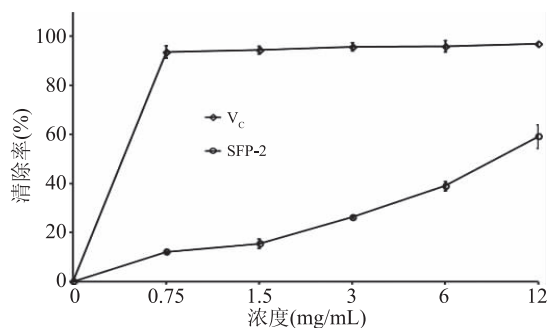


图6 DPPH 自由基清除活性

Fig.6 Scavenging ability of DPPH radicals

2.4.2 超氧阴离子清除活性 SFP-2 的超氧阴离子清除活性如图 7 所示,随着多糖浓度的增加,清除能力增强,且当浓度为 12 mg/mL 时,清除率达 54.27%,其 EC_{50} 为 8.30 mg/mL。上述结果表明,SFP-2 具有良好的清除超氧阴离子活性。但是,此清除率低于丁浩森等^[10]从羊栖菜中分离得到的三种多糖成分,这三种多糖中,其中一种超氧阴离子清除活性略优于阳性对照 V_c ,而 SFP-2 的清除率明显低于 V_c 。

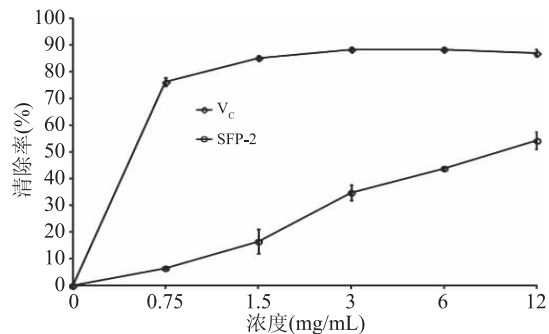
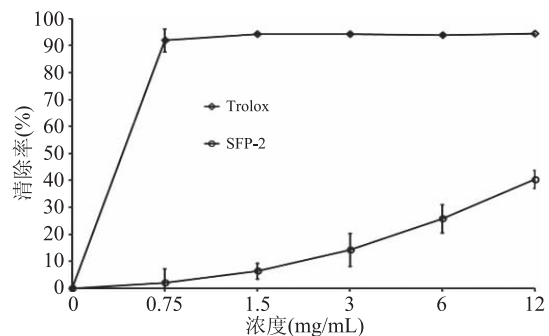


图7 超氧阴离子清除活性

Fig.7 Scavenging ability of superoxide radicals

2.4.3 ABTS⁺ 自由基清除活性 ABTS⁺ 自由基清除活性是衡量化合物抗氧化能力的重要指标,图 8 显示了 SFP-2 对 ABTS⁺ 自由基的清除活性,随着多糖浓度的增加,清除能力逐渐增强,当浓度为 12 mg/mL 时,清除率达到 40.41%,其 EC_{50} 为 16.04 mg/mL,相对于其他自由基清除活性,清除能力稍弱,但是,仍旧具有一定的 ABTS⁺ 自由基清除活性。

图8 ABTS⁺ 自由基清除活性Fig.8 Scavenging ability of ABTS⁺ radicals

2.4.4 亚硝酸盐清除活性 图 9 显示了 SFP-2 对亚硝酸盐的清除活性,随着浓度的增加,清除率逐渐增加,当浓度为 12 mg/mL 时,清除率可达 50.72%,其

EC_{50} 为 9.87 mg/mL,表明多糖有良好的清除亚硝酸盐的能力。

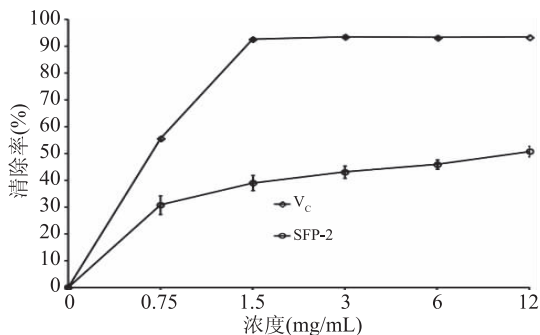


图9 亚硝酸盐清除活性

Fig.9 Scavenging ability of nitrite

2.4.5 还原力 还原力可代表待测物的总体抗氧化水平,图 10 显示了 SFP-2 的还原能力。随着浓度的增加,还原力呈现增强趋势,浓度越大,吸光度值越大。当浓度为 12 mg/mL 时,吸光度值为 1.49,而 V_c 组的吸光度值为 3.10,多糖样品的吸光度值约为 V_c 的一半,这表明 SFP-2 具有一定的还原力活性。但是,SFP-2 的还原力低于丁浩森等^[10]从羊栖菜中分离得到三种多糖成分,三种多糖中,有一种组分还原力活性高于阳性对照 V_c ,而 SFP-2 的还原力与 V_c 相差较大。

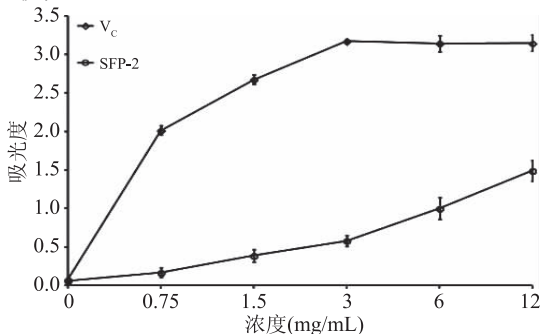


图10 还原力

Fig.10 Reducing power

多糖 SFP-2 的结构、抗氧化活性均与以往的研究有所不同,这可能与羊栖菜本身的生长环境、生长地域、多糖的提取方式、纯化方式有关。

3 结论

从羊栖菜中提取得到褐藻糖胶,并通过纯化得到电荷密度均匀、分子量均一的组分 SFP-2,测定了其纯度、分子量、理化性质、单糖组成、红外光谱等。结果表明,SFP-2 是一种分子量较大、不含糖醛酸的岩藻聚糖硫酸酯。活性测定结果表明,SFP-2 具有良好的抗氧化活性,其抗氧化活性呈现剂量依赖性,随着浓度的升高活性逐渐增强。SFP-2 的 DPPH 自由基清除活性、超氧阴离子清除活性、ABTS⁺ 自由基清除活性、亚硝酸盐清除活性 EC_{50} 分别为 8.94、8.30、16.04、9.87 mg/mL,且具有一定还原能力。本文为进一步研究羊栖菜褐藻糖胶的精细结构、体内抗氧化活性以及抗氧化作用机制提供了参考。

参考文献

[1] Dobashi K, Nishino T, Fujihara M, et al. Isolation and

preliminary characterization of fucose - containing sulfated polysaccharides with blood - anticoagulant activity from seaweed *Hizikia fusiforme* [J] . Carbohydrate Research, 1989, 194: 315-320.

[2] 季宇彬,高世勇,张秀娟.羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J].中草药,2003,34(7):638-640.

[3] 季宇彬,高世勇.羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其作用机制的研究[J].中草药,2003,34(12):1111-1114.

[4] 王兵,李靖,马舒冰,等.羊栖菜多糖降血压作用的实验研究[J].中国海洋药物,2000(3):33-35.

[5] 冯磊,沈健,徐明智.羊栖菜降血糖作用[J].中华预防医学杂志,2001,35(5):324.

[6] 宁淮梅,王勤,林之川.羊栖菜多糖降血糖、调节血脂效果研究[J].中国食品学报,2003(21):126-129.

[7] 邵平,陈蒙,裴亚萍,等.径向流色谱分离纯化海藻多糖及其抗氧化活性比较分析[J].核农学报,2013,27(5):635-640.

[8] Chizhov A O, Dell A, Morris H R, et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum* [J] . Carbohydrate Research, 1999, 320(2):108-119.

[9] 何丹,张旭,肖保衡,等.羊栖菜多糖的提取和抗氧化活性研究[J].海洋科学,2016,40(12):24-29.

[10] 丁浩森,李伟强,汪财生,等.羊栖菜活性组分多糖的体外抗氧化能力比较[J].核农学报,2016,30(5):920-925.

[11] 陈琳琳,谢志新,程晶,等.羊栖菜多糖提取物及其润肤霜的保湿和抗氧化活性[J].日用化学工业,2018(1):31-36.

[12] Silchenko A S, Rasin A B, Kusaykin M I, et al. Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri* [J] . Carbohydrate Polymers, 2017, 175:654-660.

[13] Yan M X, Mao W J, Chen C L, et al. Structural elucidation of the exopolysaccharide produced by the mangrove fungus *Penicillium solitum* [J] . Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 485-491.

[14] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J] . Analytical Chemistry, 1956, 28:350-356.

[15] Zhang X Q, Paul L B, Margaret J K. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers [J] . Water Science and Technology, 1998, 37(4-5):345-348.

[16] Therho T T, Hartiala K. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans [J] . Analytical Biochemistry, 1971, 41:471-476.

[17] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J] . Analytical Biochemistry, 1962, 4:330-334.

[18] Qi X H, Mao W J, Gao Y, et al. Chemical characteristic of an anticoagulant - active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata* [J] . Carbohydrate Polymers, 2012, 90:1804-1810.

[19] Synytsya A, Čopíková J, Matějka P, et al. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins [J] . Carbohydrate Polymers, 2003, 54:97-106.

[20] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J] . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40:945-948.

[21] Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radicals in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J] . European Journal of Biochemistry, 1974, 47:469-471.

[22] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J] . Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237.

[23] 赵二劳,梁泽,张海容.沙棘叶对亚硝酸盐清除能力的研究[J].食品工业科技,2006,27(3):81-82.

[24] Dorman H J D, Hiltunen R. Fe(III) reductive and free radical - scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions [J] . Food Chemistry, 2004, 88:193-199.

[25] 李娜,李菁,刘雪,等.抗凝血活性海洋硫酸多糖 HP1-1 的结构研究[J].中国海洋药物,2015,34(5):7-12.

[26] Hu P, Li Z X, Chen M C, et al. Structural elucidation and protective role of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* on ameliorating learning and memory deficiencies in mice [J] . Carbohydrate Polymers, 2016, 139:150-158.

[27] 李波,许时婴.羊栖菜褐藻糖胶的分级纯化和结构分析[J].无锡轻工大学学报,2004,23(2):86-93.

[28] 林聪,赵春琦,李娜,等.1种绿藻硫酸化多糖的化学组成及其结构表征[J].中国海洋药物,2014,33(4):55-58.

全国中文核心期刊
轻工行业优秀期刊