

# 菊粉羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究

范三红\*, 王亚云, 胡雅喃, 刘晓华, 王相帅, 田 琴

山西大学生命科学学院, 太原 030006

**摘要:**以菊粉为原料,采用溶媒法对菊粉进行羧甲基化修饰,研究了碱化时间、醚化时间、NaOH用量、溶剂体积分数四因素对羧甲基菊粉制备的影响,以取代度为指标,确定最佳修饰工艺条件。在该条件下,比较菊粉羧甲基化修饰前后抗氧化活性的变化。结果表明,最佳工艺条件为碱化时间 40 min、醚化时间 70 min、 $m(\text{菊粉}):m(\text{NaOH}):m(\text{氯乙酸})=27:4:13.8$ 、异丙醇 95%,取代度为 0.628,当浓度为 1mg/mL 时,与修饰前菊粉相比,羧甲基菊粉清除羟自由基、DPPH、超氧阴离子自由基分别提高了 12.6%、24.0%、13.9%。

**关键词:**菊粉;羧甲基化修饰;抗氧化活性

中图分类号:TS218

文献标识码:A

## Antioxidant Activities of Inulin and Carboxymethyl Inulin

FAN San-hong\*, WANG Ya-yun, HU Ya-nan, LIU Xiao-hua, WANG Xiang-shuai, TIAN Qing

College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** In this study, the carboxymethylation of inulin was investigated. The modified parameters including alkalization time, etherification time, NaOH dosage and isopropyl alcohol volume fraction were studied using orthogonal test with substitution degree as index. The optimized conditions were as follows: alkalization time 40 min, etherification time 70 min,  $m(\text{Inulin}):m(\text{NaOH}):m(\text{chloroacetic acid})=27:4:13.8$ , isopropyl alcohol volume fraction 95%. Under these conditions, a maximum substitution degree of carboxymethyl inulin of 0.628 was obtained. Compared with unmodified inulin, the scavenging activities of carboxymethyl inulin at 1 mg/mL concentration level on DPPH free radicals, hydroxyl radicals and superoxide anion increased 12.6%, 24.0%, 13.9% respectively.

**Key words:** inulin; carboxymethylation; antioxidant activity

菊粉(Inulin)又名菊糖,是一种天然果聚糖,它由D-呋喃果糖以 $\beta$ -(2,1)糖苷键连接而成,聚合度为2~60。菊粉为可溶性膳食纤维,可降低血浆甘油三酯和胆固醇,提高糖尿病患者的胰岛素耐受性<sup>[1]</sup>,还具有降血脂<sup>[2]</sup>、增殖双歧杆菌、促进金属离子的吸收、防止便秘、增强免疫与抗癌等作用,也可用于脂肪的替代品<sup>[3]</sup>。由于高聚合度菊粉的水溶性不高。而一般糖类的化学修饰可以改变或增加糖类物质的物理特性和生物活性,如纤维素、淀粉等化学修饰后水溶性提高,生物活性增加或增强。大量资料表明,植物多糖及其化学修饰后的多糖具有超强的抗氧化性,如豌豆多糖、桑葚多糖、羧甲基化虎奶多糖、羧甲基化红枣多糖等。

羧甲基菊粉(Carboxymethyl inulin,简称CMI),

可以代替羧甲基淀粉,广泛应用于各种领域,如用做阻垢剂及金属螯合剂<sup>[4]</sup>;在制糖工业中抑制碳酸钙结晶等<sup>[5]</sup>,由于其无毒,而且易消化,还可以作为食品添加剂<sup>[6]</sup>。大多数对羧甲基菊粉的研究均集中于如何提高其取代度,对CMI的生物活性几乎没有研究,本实验对菊粉进行化学修饰,采用溶媒法制备CMI,得到一种水溶性好CMI,并对其抗氧化活性进行研究,为CMI的进一步研究和应用提供依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

菊粉(菊粉含量 $\geq 86\%$ ),山西省益生元生物科技有限责任公司出品;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼),美国Sigma公司;邻苯三酚、一氯乙酸、异丙醇、甲醇、硫酸亚铁等均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-2800AH型紫外可见分光光度计[龙尼柯(上海)仪器有限公司];868型pH测试仪(美国奥

收稿日期:2013-04-07 接受日期:2013-09-05

基金项目:山西省自然科学基金项目(2012011031-4);山西省高等学校高新技术产业化项目(20111003)

\* 通讯作者 E-mail: fsh729@sxu.edu.cn

立龙公司);HH-4 恒温水浴锅(浙江国华电器有限公司);101-2AB 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 CMI 的制备

准确称取 2.70 g 菊粉置入锥形瓶中,加入一定量 NaOH 和 2 mL 蒸馏水,混匀,在 50 °C 水浴中进行碱化反应一定时间,再加入 1.38 g 一氯乙酸和 0.58 g NaOH 混匀,滴加 4 mL 不同体积分数的异丙醇<sup>[7]</sup>,在 50 °C 条件下进行醚化反应,反应产物用甲醇洗涤,至加入硝酸银溶液无沉淀出现为止,过滤,放入 50 °C 电热鼓风干燥箱中烘干,测其取代度。

取代度的测定<sup>[8]</sup>:准确称取 0.5 g 的 CMI,加入 20 mL 0.01 mol/L 标准 HCl 溶液,使其溶解,用 0.01 mol/L 标准 NaOH 溶液滴定,酚酞作指示剂,记下终点时 NaOH 的体积 V。

$$\text{取代度计算公式: } DS = \frac{0.162A}{1 - 0.058A}, \text{ 其中 } A = \frac{CNaOHVNaOH - CHClVHCl}{m} \times 100\%$$

### 2.2 CMI 制备的单因素实验

碱化时间:在 NaOH 用量为 0.4 g,碱化时间 30、40、50、60、70 min,异丙醇体积分数 90%,醚化时间 40 min,反应产物用甲醇洗涤,至加入硝酸银溶液无沉淀出现为止,测其取代度;醚化时间:在 NaOH 用量为 0.4 g,碱化时间 50 min,异丙醇体积分数 90%,醚化时间 40、50、60、70、80 min,反应产物用甲醇洗涤,至加入硝酸银溶液无沉淀出现为止,测其取代度;异丙醇体积分数:在 NaOH 用量为 0.4 g,碱化时间 50 min,异丙醇体积分数 80%、85%、90%、95%、100%,醚化时间 40 min,反应产物用甲醇洗涤,至加入硝酸银溶液无沉淀出现为止,测其取代度;NaOH 用量:在 NaOH 用量为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g,碱化时间 50 min,异丙醇体积分数 90%,醚化时间 40 min,反应产物用甲醇洗涤,至加入硝酸银溶液无沉淀出现为止,测其取代度。

### 2.3 CMI 制备工艺的优化

在单因素实验的基础上,采用  $L_9(3^4)$  正交实验,以羧甲基取代度为评价指标,进行 4 因素 3 水平正交实验,优化制备工艺,如表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels in the orthogonal array design

| 水平<br>Level | 因素 Factors                             |  |                                 |   |
|-------------|--|--|---------------------------------|---|
|             | A 碱化时间<br>Alkalinization time<br>(min) | B 醚化时间<br>Etherification<br>time (min) | C NaOH 用量<br>NaOH<br>dosage (g) | D 异丙醇体积分数<br>Isopropyl alcohol<br>volume fraction (%) |
| 1           | 40                                     | 50                                     | 0.3                             | 90  |
| 2           | 50                                     | 60                                     | 0.4                             | 95  |
| 3           | 60                                     | 70                                     | 0.5                             | 100   |

### 2.4 菊粉与 CMI 抗氧化活性研究

#### 2.4.1 羟自由基清除率的测定<sup>[9]</sup>

取 11 支 10 mL 具塞试管依次加入浓度为 9.0 mmol/L  $FeSO_4$  1.0 mL、10.0 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1.0 mL,再分别加入 1.0 mL 不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)的 CMI 与菊粉溶液,加蒸馏水至 5.0 mL,最后加入 1.0 mL 6.0 mmol/L 的  $H_2O_2$ ,置于 37 °C 水浴中反应 10 min,在 510 nm 波长处测定其吸光度值  $A_s$ ,重复实验 3 次。按下式计算:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [A_o - (A_s - A_c)] / A_o \times 100\%$$

式中: $A_o$  为用蒸馏水代替多糖溶液; $A_c$  为不加

引反剂  $H_2O_2$ 。

#### 2.4.2 DPPH 自由基清除率的测定

参考文献<sup>[8]</sup>的方法,准确称取 DPPH 4.5 mg,用无水乙醇定容至 100 mL 棕色容量瓶中,得浓度为 0.08 mol/L 的 DPPH 溶液,避光保存,备用。分别取 2.0 mL 不同浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)的 CMI 与菊粉溶液置于 10 mL 的试管中,加入 3.0 mL DPPH 溶液,在温室下避光放置 30 min,以蒸馏水为空白对照,在 517 nm 波长处测定其吸光度值  $A_s$ ,重复实验 3 次。按下式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [A_o - (A_s - A_c)] / A_o \times 100\%$$

式中: $A_o$  为用蒸馏水代替样品测吸光度; $A_c$  为



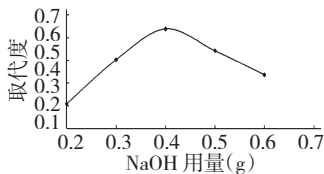


图4 NaOH用量对产物取代度的影响

Fig. 4 Effect of NaOH dosage on substitution degree of CMI

### 3.2 正交实验结果

正交实验结果见表2。由R值可知,在本次实验所选取的水平范围内,4因素的影响顺序为NaOH的用量 > 碱化时间 > 醚化时间 > 异丙醇体积分数。

表2 正交实验结果与分析

Table 2 Results of the orthogonal tests

| 试验号<br>No. | A     | B     | C     | D     | 取代度<br>Degree of substitution |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|
| 1          | 1     | 1     | 1     | 1     | 0.408                         |
| 2          | 1     | 2     | 2     | 2     | 0.683                         |
| 3          | 1     | 3     | 3     | 3     | 0.533                         |
| 4          | 2     | 1     | 2     | 3     | 0.576                         |
| 5          | 2     | 2     | 3     | 1     | 0.537                         |
| 6          | 2     | 3     | 1     | 2     | 0.406                         |
| 7          | 3     | 1     | 3     | 2     | 0.483                         |
| 8          | 3     | 2     | 1     | 3     | 0.378                         |
| 9          | 3     | 3     | 2     | 1     | 0.498                         |
| $k_1$      | 0.541 | 0.489 | 0.397 | 0.481 |                               |
| $k_2$      | 0.506 | 0.533 | 0.586 | 0.524 |                               |
| $k_3$      | 0.453 | 0.479 | 0.518 | 0.496 |                               |
| R          | 0.088 | 0.054 | 0.189 | 0.043 |                               |

### 3.3 菊粉与CMI抗氧化性的研究

#### 3.3.1 清除羟自由基能力

羟自由基是一种毒性最强的活性氧自由基,它可以使组织病变,从而导致各种疾病的发生和加速机体的衰老。适当的补充外源性的清除羟自由基的功能性食品,可有效地预防这类现象的发生。

由图5可知,在所选多糖浓度范围内,CMI及菊粉对羟自由基都具有较好的清除作用,并随着质量浓度的升高而增大,在多糖浓度为0.2~0.4 mg/mL,CMI对羟自由基的清除作用小于菊粉的清除作用,可能是由于此时CMI的质量浓度太小,不足以对羟自由基有清除作用,但当随着CMI多糖质量浓度的增加,CMI对羟自由基的清除能力显著增强且

从k值可以得出因素的最佳水平组合为 $A_1B_2C_2D_2$ ,即本次实验的最佳工艺参数为:碱化时间为40 min、醚化时间70 min、NaOH用量0.4 g、异丙醇体积分数95%,按此工艺条件制备CMI,重复三次,取平均值,所得的产物取代度为0.682。本实验优化所得工艺与任海伟报道的羧甲基化菊粉工艺有一定差别<sup>[7]</sup>,本实验未采用超声辅助制备,虽然耗时比较长,但羧甲基化菊粉取代度在其基础上提高了70.5%,为下一步验证CMI与菊粉抗氧化性之间的差异提供技术参数。

大于菊粉的清除能力,清除率能达到51.8%。

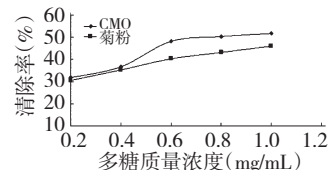


图5 菊粉与CMI对羟自由基的清除作用

Fig. 5 Scavenging rate of inulin and CMI on hydroxyl free radical

#### 3.3.2 清除DPPH能力

DPPH是一种比较稳定的自由基,与其它自由基的评价指标相比,它能够快速方便的反应样品的抗氧化活性,其在517 nm附近有强的吸收峰。当自

由基清除剂存在时, DPPH 上的孤对电子被配对, 所以在 517 nm 的吸收峰被消失或减弱, 通过测定吸收减弱的程度, 可快速评价反应样品的抗氧化活性。

由图 6 可知, 菊粉和 CMI 对 DPPH 自由基都有一定的清除能力, 在多糖质量浓度为 0.2 mg/mL 时, CMI 与菊粉对 DPPH 自由基的清除作用基本相同。但随着多糖质量浓度的逐渐增大, CMI 的清除作用明显强于菊粉, 且对 DPPH 清除率的差距越来越大。当浓度为 1 mg/mL 时, 清除率达到 43.36%。

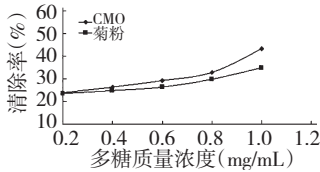


图 6 菊粉和 CMI 对 DPPH 清除作用

Fig. 6 Scavenging rate of inulin and CMI on DPPH ·

### 3.3.3 清除超氧阴离子自由基作用

研究表明, 体内过量的超氧阴离子可以抑制或降低人体中酶的活性而影响代谢, 从而造成氧中毒。由图 7 可知, 菊粉和 CMI 对超氧阴离子自由基都具有一定的抑制作用, 且抑制能力均随着多糖浓度的增大抑制率增强。菊粉经过羧甲基化修饰以后, 对超氧阴离子自由基有明显的抑制作用, 明显增加了菊粉的活性。在质量浓度为 1 mg/mL 时, CMI 对超氧阴离子的抑制率能达到 40.09%。

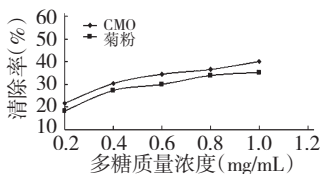


图 7 菊粉与 CMI 对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig. 7 Scavenging rate of inulin and CMI on superoxide anion free radical

## 4 结论

本实验通过单因素和正交试验确定 CMI 制备的最佳工艺参数为碱化时间 40 min、醚化时间 70 min、m(菊粉):m(NaOH):m(氯乙酸) = 27:4:13.8、异丙醇体积分数 95%, 在此条件下, CMI 产物的取代

度为 0.682。在抗氧化研究中, 菊粉和 CMI 均能有效清除羟自由基、DPPH 自由基、超氧阴离子自由基。随着多糖浓度的增加清除作用也随之增强; 和菊粉相比较, 羧甲基化后的菊粉具有更好的抗氧化活性, 证明羧基的引入会增强菊粉的活性, 因此羧甲基化修饰可以提高菊粉的抗氧化活性, 但其抗氧化机理还不明确, 针对 CMI 产物的取代位置及其抗氧化机理有待进一步深入研究。

### 参考文献

- Williams CM. Effects of inulin on lipid parameters in humans. *J Nutr*, 1999, 129(7 Suppl):1471S-1473S.
- Causey JL, Feirtag JM, Gahaher DD, et al. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutr Res*, 2000, 20:191-201.
- Zeng XY(曾小宇), Luo DL(罗登林), Liu SN(刘胜男), et al. Recent advance and future trend of inulin research and development. *China Food Add* (中国食品添加剂), 2010, 109:222-227.
- Christiann VS, Alessia M. Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource and its industrial applications. *Biomacro Mole*, 2001, 2:1-16.
- Verraest DL, Peters JA, Batelaan JG, et al. Carboxymethylation of inulin. *Carbohydr Res*, 1995, 271:101-112.
- Johannsen FR. Toxicological profile of carboxymethyl inulin. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41:49-59.
- Ren HW(任海伟), Liu CX(刘春霞), Zhang HJ(张红建), et al. Carboxymethylation modification of inulin and structural characterization. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2010, 36(11):63-66.
- Li Y(李毅). Determination method of the degree of substitution in carboxymethylstarch. *Shanxi Chem Ind* (山西化工), 2003, 23:15-17.
- Xu HS(许海顺), Jiang JP(蒋剑平), Xu P(徐攀), et al. Antioxidant activity of polysaccharide from radix ginseng rubra. *J Zhejiang Chin Med Univ* (浙江中医药大学学报), 2011, 35:909-912.
- Tan P(谭萍), Fang YM(方玉梅), Wang YH(王毅红), et al. The antioxidation of polysaccharide in tatar buckwheat. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2011, 32(4):5-7.