

硫酸化制备圆苞车前子低黏多糖及其结构表征和抗氧化活性研究

曹磊, 刘伟, 王俊龙, 纳森巴特,
巴哈尔古丽·别克吐尔逊, 松布尔, 冯亚萍, 热合巴提·努尔夏提*

伊犁师范大学化学化工学院 新疆维吾尔自治区教育厅天然产物化学与应用重点实验室, 伊宁 835000

摘要:圆苞车前子 (*Plantago ovata* Forsk) 具有润肠通便, 辅助消化等功效, 但因高黏特性无法对其多糖成分展开系统研究。因此, 本研究以圆苞车前子为研究对象, 采用氯磺酸-吡啶法制备低黏性圆苞车前子硫酸化多糖 (POFP-S), POFP-S 经 DEAE-650M 和 Superdex 200 凝胶分离纯化获得一种中性和一种酸性均一多糖 (POFP-S1、POFP-S2), 其中 POFP-S1 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖和葡萄糖组成, 分子量为 3 556 kDa, 硫酸基取代度为 0.364; POFP-S2 由阿拉伯糖和木糖组成, 分子量为 833.7 kDa, 硫酸基取代度为 1.080; 红外光谱 (FT-IR) 中典型的硫酸基吸收峰证实了硫酸化修饰的成功。X 射线衍射 (XRD) 及刚果红实验结果显示, POFP-S2 是具三螺旋结构的, 晶体与非晶体结构共存的特殊多糖, 也表明硫酸化修饰未影响圆苞车前子多糖的立体结构。采用 DPPH、ABTS 及 OH 等自由基清除实验, 考察了硫酸化多糖的体外抗氧化活性, 发现 POFP-S1 和 POFP-S2 具有显著的抗氧化活性。研究结果将为进一步研究圆苞车前子多糖的结构与活性提供文献依据, 以及开发具有潜力的药食同源产品提供依据, 并为高黏性多糖的研究提供理论参考。

关键词:圆苞车前子多糖; 硫酸化; 抗氧化活性

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)1-0026-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.1.003

Preparation of low viscosity polysaccharide from *Plantago ovata* Forsk by sulfation method and its structural characterization and antioxidant activities

CAO Lei, LIU Wei, WANG Jun-long, NASEN Bate,
BIEKETUERXUN Bahaerguli, SONG Bu-er, FENG Ya-ping, NUERXIATI Rehehati*

Key Laboratory of Natural Product Chemistry and Application, School of Chemistry
and Chemical Engineering, Yili Normal University, Yining 835000, China

Abstract: *Plantago ovata* Forsk has laxative and digestive effects, but due to its high viscosity, it is difficult to conduct systematic research on its polysaccharide components. Therefore, in this study, the low viscosity sulfated polysaccharide of *P. ovata* (POFP-S) was prepared by chlorosulfonic acid-pyridine method. POFP-S was further separated and purified by DEAE-650M and Superdex 200 column to obtain a neutral and an acidic homogeneous polysaccharide (POFP-S1, POFP-S2), of which the POFP-S1 was mainly composed of rhamnose, arabinose, xylose, and glucose, with a molecular weight of 3 556 kDa and a degree of sulfate substitution of 0.364, while POFP-S2 was composed of arabinose and xylose, with a molecular weight of 833.7 kDa and a degree of sulfate substitution of 1.080. The characteristic absorption peaks in infrared spectroscopy (FT-IR) confirm the success of sulfation modification. The results of X-ray diffraction (XRD) and Congo red test show that both POFP-S1 and POFP-S2 have a triple helix structure, and with a crystalline and amorphous structure. This also indicates that sulfation modification does not affect the three-dimensional structure of the polysaccharides. The *in vitro* antioxidant activities of the sulfated polysaccharides were studied using DPPH, ABTS and OH free radical scavenging assays, and it was found that

收稿日期: 2023-06-15 接受日期: 2023-11-06

基金项目: “新疆维吾尔自治区高校科研项目” (XJEDU2022P093); “新疆维吾尔自治区科研创新项目” (XJ2023G263); “天池英才” 引进计划 (2023TCYCQNBS03); 2022 年伊犁师范大学高层次人才科研启动金 (2022RCYJ04)

* 通信作者 Tel: 86-017626048802; E-mail: rehebatinuerxiati17@mails.ucas.ac.cn

both POFP-S1 and POFP-S2 exhibited antioxidant activity. The results will provide a literature basis for further research on the structure and activity of polysaccharides from *P. ovata*, as well as the development of potential medicinal and food products and provide theoretical references for the study of high viscosity polysaccharides.

Key words: *Plantago ovata* Forsk polysaccharides; sulfation; antioxidant activity

多糖大量存在于动物、植物以及微生物中,由于其较低的毒性、优良的生物活性,在食品和医药行业广泛应用。现代研究表明,多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗辐射、降血糖、降血脂、保肝等多种功能^[1-4]。近年来,为了提高多糖的生物活性和优化多糖的理化性质,人们开发了多种多糖衍生方法,如硫酸化、乙酰化、羧甲基化和磷酸化等^[5-7]。多糖的硫酸化可以显著增强多糖的结构特征,提高多糖的生物活性,甚至使多糖具有新的生物活性^[8]。Yang等^[8]研究利用氯硫酸-吡啶法对纳豆多糖进行硫酸化,硫酸化后的纳豆多糖的抑菌活性有所增强。Chen等^[9]采用氯硫酸-吡啶法制备硫酸化山药多糖衍生物,结果表明硫酸化修饰优化了山药多糖理化性质,表现出更加优异的免疫调节活性。Arokiarajan等^[6]通过对海藻多糖的硫酸化修饰,提高了多糖在水中的溶解度,并进一步提高了多糖的提取率。生物结构化合物生物活性的决定性因素, Tao等^[10]利用氯磺酸-吡啶法将天然菌类多糖硫酸化衍生物在体内和体外的抗肿瘤活性进行了对比,发现硫酸化衍生物对 HepG2 细胞的体外抑制率高于原多糖。

圆苞车前子为车前属植物圆苞车前子(*Plantago ovata* Forsk)的干燥成熟种子^[11],是中国新疆地区食用和药用的传统药用植物。圆苞车前子具有止泻,利尿,止痛,降热,消肿利咽等功效,主治肾炎水肿,泌尿系统感染,尿频,尿痛,尿血,泻痢等疾病^[12]。圆苞车前子多糖具有高黏的特性,虽然赋予了其润肠通便、促进肠道健康等生理功能,但也给其生产,研究和应用带来了不便。这一问题一直受到广泛关注,但进展缓慢。因此,有必要开发新的方法,在保证低成本,保结构,保活性的前提下,有效降低圆苞车前子多糖的黏度,以促进圆苞车前子多糖的进一步开发利用,提高经济效益。到目前为止,还没有研究报道圆苞车前子多糖的结构修饰及其对生物活性和结构特征报道。

因此,本研究主要以圆苞车前子多糖为研究对象,以硫酸化方法制备低黏性圆苞车前子多糖,再经分离纯化制备均一多糖,并初步研究其结构特征,采用体外抗氧化实验评价其抗氧化活性。据我们所

知,这是首次对圆苞车前子多糖的硫酸化降低黏性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

圆苞车前子购自新疆恩萨尔维吾尔医饮片药业有限公司(批号:201902);乙二胺四乙酸(EDTA)(批号:P2369889,含量 $\geq 99\%$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);透析膜(批号 20230615,3 500 kDa,美国 BioSharp 公司);无水二甲基亚砷(批号:H2211118,含量 $\geq 99\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);碳化二亚胺盐酸盐(批号:A2314104,含量 $\geq 98\%$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);间羟基联苯(批号:J2215393,含量 $\geq 97\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);Superdex 凝胶系列(批号:10341428,含量 $\geq 99\%$,北京英莱克科技发展有限公司);DPPH(批号:D4313,含量 $\geq 99\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);ABTS(批号:718T036,含量 $\geq 99\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);刚果红(批号:P1645856,含量 $\geq 99\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);DMF(批号:P52452225,含量 $\geq 98\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);右旋糖酐标准品(5、25、50、80、150 和 410 kDa)(批号:SM9530,含量 $\geq 98\%$,北京英莱克科技发展有限公司);三氧化硫吡啶配合物($\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$)(批号:20220305,含量 $\geq 97\%$,北京索莱宝生物科技有限公司);DEAE-650 M(批号:0043201,含量 $\geq 99\%$,日本 TOSHO 公司);BCA 试剂盒(批号:23227,含量 $\geq 99\%$,赛默飞世尔科技);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

分析型高效液相(LC-20A,岛津);气相色谱仪(GC-2014C,岛津);傅里叶变换红外光谱仪(NICO-LET6700,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);酶标仪(Spectra Max M5,美国赛默飞世尔科技公司);黏度计(NDJ-5S,上海平轩科学仪器有限公司);能量色散 X 射线仪(E-1045,日立,日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 圆苞车前子的前处理

圆苞车前子原料在 60 °C 下通风干燥 24 h 后,用万能粉碎机粉碎,40 目筛网过筛。先用石油醚在

60 °C 下脱脂 4 h, 再用 85% 乙醇萃取 4 h, 去除色素、小分子、单糖和低聚糖。最后, 将过滤后的残渣收集起来, 在 50 °C 下干燥, 得到预处理后的圆苞车前子。

1.3.2 圆苞车前子粗多糖的制备

采用课题组前期优化方法^[13], 取 50 g 预处理后的圆苞车前子, 采用碱提法提取圆苞车前子多糖, 提取条件: NaOH 浓度为 0.1 mol/L, 料液比 1:40, 提取温度 70 °C, 每次 1 h, 提取两次, 将两次的提取液合并, 减压浓缩至 1/2 体积, 在上清液中缓慢加入冰乙醇, 当乙醇浓度达到 80% 时, 出现大量的沉淀, 离心保留沉淀组分, 沉淀复溶于蒸馏水, 纯水中透析 36 h, 冷冻干燥得到圆苞车前子粗多糖 (*Plantago ovata* Forsk polysaccharide, POFP)。

1.3.3 圆苞车前子多糖的硫酸化修饰

POFP 的硫酸化修饰采用氯硫酸-吡啶法进行^[14]。50 mL 圆底烧瓶中加入 10 mL 无水吡啶, 在冰水浴环境下缓慢加入 5 mL 氯磺酸溶液, 并不断搅拌, 得到淡黄色酯化试剂, 现配现用。取 100 mg POFP 置于 50 mL 梨形瓶中, 加入 10 mL DMF, 充分搅拌, 得到 POFP 悬浊液。将酯化试剂在冰水浴条件下缓慢滴加到 POFP 悬浊液中 (30 min 中内加完), 在 80 °C 下反应 3h。反应结束后, 冷却至室温, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和, 最后, 用蒸馏水透析 (Mw 截止 = 3 500 Da) 36 h, 冷冻干燥得到硫酸化多糖 (sulfated *Plantago ovata* Forsk polysaccharide, POFP-S)。

1.3.4 多糖黏度测试

利用旋转黏度分别以转速 (12、30、60 r/min) 对硫酸化前多糖 POFP 与硫酸化后的多糖 POFP-S 的黏度进行测定。

1.3.5 POFP-S 的分离纯化

采用 DEAE-650M 纤维素柱 (26.6 mm × 126 mm) 对 POFP-S 进行分离。用 NaCl (0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mol/L) 梯度洗脱, 流速为 1 mL/min。用自动收集器收集洗脱液, 用苯酚-硫酸法检测多糖, 收集多糖峰, 透析 (3 500 Da)。分离后多糖进一步用 Superdex 200 凝胶柱 (16 mm × 700 mm) 进行纯化, 以超纯水为溶剂, 0.4 mL/min 流速洗脱, 收集多糖峰, 冷冻干燥得到纯化的圆苞车前子多糖, 命名为 POFP-S1、POFP-S2。

1.3.6 化学组成分析

1.3.6.1 硫酸基取代度的测定

取代度 (degree of substitution, DS) 是指多糖中每个单体单元的取代数。采用元素分析方法测定 POFP-S1、POFP-S2 的硫酸基取代度^[15,16]。简单地

说, POFP-S1、POFP-S2 采用能量色散 X 射线仪进行元素分析。POFP-S1、POFP-S2 的 DS 根据 EDX 结果计算, 计算公式如下。

$$DS = \frac{1.62 \times c}{32 - 1.02c} \quad (1)$$

式中, c 为硫元素含量 (%)。

1.3.6.2 其他化学成分测定

以葡萄糖为标准品, 采用苯酚-硫酸法测定中性糖含量^[17]。以半乳糖醛酸为标准品, 采用四硼酸钠-硫酸法测量糖醛酸含量^[18]。以牛血清蛋白为标准品, 采用 BCA 试剂法测定蛋白质含量^[19]。

1.3.7 分子量测定

POFP-S1、POFP-S2 的分子量 (Mw) 用分析高效液相色谱法^[20]进行测定。准确配制 2.0 mg/mL 多糖溶液, 以水为流动相, 上样量为 10 μL, 色谱柱型号为 TSK-gel G 3 000 PWXL (300 mm × 7.8 mm, 7 μm), 检测器为 RID-10A 示差检测器, 流速为 0.6 mL/min。采用 T-dextran (5、25、50、80、150、410 kDa 和蓝色葡聚糖) 为标准品, 以保留时间为 X 轴, 分子量的对数为 Y 轴, 建立标准曲线, 将多糖样品带入标准曲线中测定相对分子量。

1.3.8 单糖组成分析

单糖衍生物制备: 取 5 mg 多糖样品置于 10 mL 顶口瓶中, 加入 5 mL 2 mol/L 三氟乙酸 (TFA), 于 115 °C 水解 6 h。冷却至室温, 加入 4 mL 甲醇, 用旋转蒸发仪除去溶剂 (重复 3 ~ 5 次)。随后, 加入 8 mg 盐酸羟胺和 0.5 mL 的吡啶在 90 °C 反应 30 min。反应结束后, 冷却至室温, 再加入 0.5 mL 乙酸酐 90 °C 反应 40 min, 冷却后, 氮吹仪吹干, 加入 1 mL 二氯甲烷, 过滤膜 (0.45 μm), 至气相小瓶中供分析。单糖标准品无需酸解, 其他步骤同样品处理。结果与单糖标准品保留时间比对得出单糖组成^[21]。

分析条件: 采用配备色谱柱 (Vondacap df = 0.25 μm, X = 30 mm) 和氢火焰检测器的气相色谱仪, 检测器温度为 250 °C, 进样量为 3 μL, 分流比为 1:70, 载气流量: 氢气, 30 mL/min; 氮气, 30 mL/min; 空气, 150 mL/min。

1.3.9 紫外可见光谱测定

配制 0.5 mg/mL 的 POFP-S1 和 POFP-S2 的样品 10 mL, 利用紫外可见分光光度计在 200 ~ 400 nm 之间测定样品的紫外吸收。

1.3.10 红外光谱测定

称取 1.0 mg 完全干燥的多糖样品, 与 100 mg 完全干燥的 KBr 粉末在玛瑙研钵中研磨均匀, 后压

片,用傅里叶变换红外光谱仪进行红外扫描,扫描范围 4 000 ~ 400 cm^{-1} 。

1.3.11 刚果红螺旋结构测定

POFP-S1、POFP-S2 的三螺旋构象采用刚果红法进行检测^[22],在试管中共加入 2 mL 水和 2 mL 91 $\mu\text{mol/L}$ 刚果红溶液,并加入 2 mL 不同浓度的氢氧化钠溶液(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 和 0.8 mol/L)。同时,按照上述步骤,以 2 mL 水代替氢氧化钠作为空白对照。在 400 ~ 700 nm 处测定最大吸收波长。以最大吸收波长为纵坐标,以氢氧化钠浓度为横坐标,绘制刚果红实验曲线。

1.3.12 X 射线衍射分析(XRD)

采用 X 射线衍射技术研究了 POFP-S1、POFP-S2 的分子结晶特性。方法:取适量多糖样品,在室温下用 X 射线衍射仪扫描一定范围内的衍射峰,扫描条件为:步长:0.01;速度:0.1 s/步。

1.3.13 抗氧化活性研究

1.3.13.1 DPPH 自由基清除实验

采用 Hu 等^[23]的实验方法稍作更改,取 POFP-S1、POFP-S2 (10 mg/mL) 分别稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 mg/mL ,分别等体积加入 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液,混匀,室温下避光反应 30 min。反应结束后取 200 μL 于 96 孔板中利用酶标仪在 517 nm 处测定其吸光度。以普鲁兰多糖为阳性对照(10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 mg/mL),以水为空白对照。按照公式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 的清除率} = \left[\frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_1 为 DPPH 与乙醇溶液的吸光度, A_2 为 DPPH 与多糖溶液的吸光度, A_3 为多糖与乙醇溶液的吸光度。

1.3.13.2 ABTS 自由基清除实验

取 300 μL POFP-S1、POFP-S2 (10 mg/mL) 分别稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 mg/mL ,分别加入 3 倍体积的 0.2 mmol/L ABTS 溶液,混匀,室温下避光反应 10 min。反应结束后取 200 μL 于 96 孔板中利用酶标仪在 730 nm 处测定其吸光度。以普鲁兰多糖为阳性对照(10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 mg/mL),以水为空白对照。按照公式(3)计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 的清除率} = \left[\frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \right] \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_1 为水与 ABTS 溶液的吸光度, A_2 为样

品与 ABTS 溶液的吸光度, A_3 为水与多糖溶液的吸光度。

1.3.13.3 OH 自由基清除实验

取 300 μL POFP-S1、POFP-S2 (10 mg/mL) 分别稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 mg/mL ,分别加入 240 μL 的 6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液和等体积的 6 mmol/L 的 FeSO_4 240 μL ,混匀后加入 0.1% H_2O_2 (400 μL),37 $^\circ\text{C}$ 水浴孵化 30 min。反应结束后取 200 μL 反应液于 96 孔板中,利用酶标仪在 510 nm 处测定其吸光度。以普鲁兰多糖为阳性对照(10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 mg/mL),以水为空白对照。按照公式(4)计算 OH 自由基清除率。

$$\text{OH 的清除率} = \left[\frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \right] \times 100\% \quad (4)$$

式中, A_1 为水与 H_2O_2 溶液的吸光度, A_2 为样品与 H_2O_2 溶液的吸光度, A_3 为水与多糖溶液的吸光度。

1.4 数据处理

每组实验做 3 组平行对照,所有数值均表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。使用 Origin pro 2022 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 硫酸化多糖黏度测试

多糖黏度变化如图 1 所示。由图 1 我们可以发现 POFP 具有极大的黏度,随转速的提高多糖的黏度有所减少,POFP-S 黏度有较大的改变,当转速为 12 r/min 时,POFP-S 的黏度相较于 POFP 降低约 80%;当转速提高到 30 r/min 时,多糖的黏度由 355 $\text{Pa} \cdot \text{s}$ 降至 50 $\text{Pa} \cdot \text{s}$,降低约 85%,在转速达到 60 r/min 时多糖黏度达到最低值 20 $\text{Pa} \cdot \text{s}$,较 POFP 降低约 90%,实验结果表明通过硫酸化修饰可以有效的降低圆苞车前子多糖的黏度。

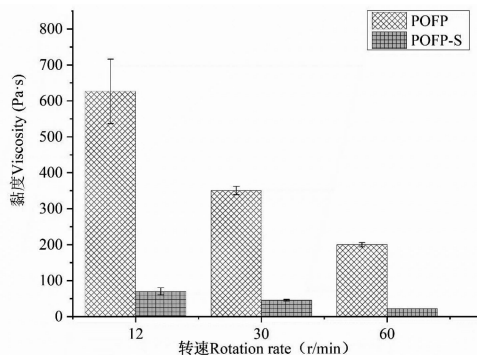


图 1 多糖黏度测定结果

Fig. 1 Polysaccharide viscosity measurement results

2.2 POFP-S 的分离纯化

根据 DEAE-650M 色谱柱的洗脱曲线(见图 2), 得到了两个主要峰, 其中第一个峰为水洗脱中性圆苞车前子多糖(POFP-S1), 最后一个峰为 0.8 mol/L

氯化钠洗脱的酸性多糖(POFP-S2)。收集了这两个主要峰, 利用 Superdex 200 柱进一步纯化。如图 3、图 4 所示, 得到了两个均一的圆苞车前子硫酸化多糖 POFP-S1 和 POFP-S2。

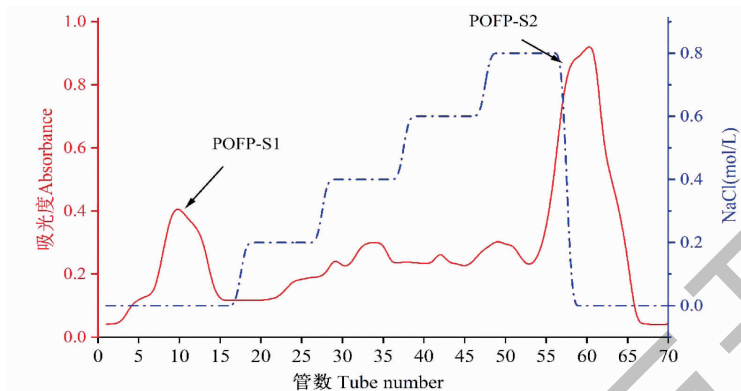


图 2 POFP-S 的 DEAE-650M 洗脱曲线

Fig. 2 DEAE-650M elution curve of sulfated modified polysaccharide POFP-S

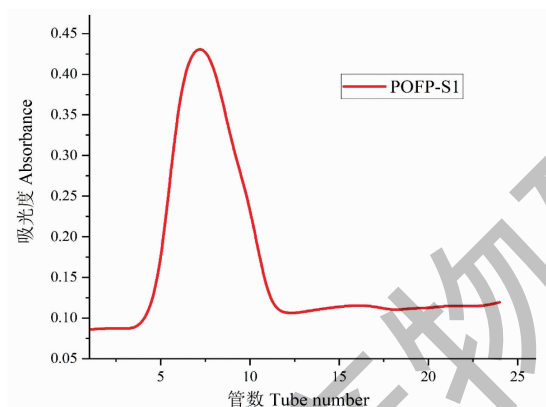


图 3 POFP-S1 的凝胶纯化曲线

Fig. 3 Gel purification curve of sulfated modified polysaccharide POFP-S1

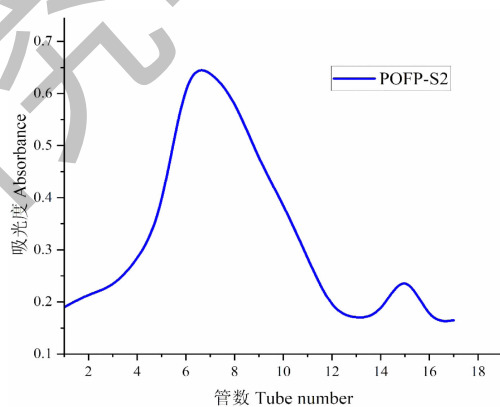


图 4 POFP-S2 的凝胶纯化曲线

Fig. 4 Gel purification curve of sulfated modified polysaccharide POFP-S2

2.3 化学成分测定

POFP-S1、POFP-S2 的化学成分及分子量如表 1 所示, POFP-S1 中性糖含量为 56.46%, 硫酸基含量为 17.55%; POFP-S2 中性糖含量为 66.41%, 硫酸基的含量为 38.09%, 两种多糖在蛋白含量测定实

验中均未检测到蛋白; POFP-S1 多糖的分子量较大, 为 3556.0 kDa, POFP-S2 多糖的分子量为 833.7 kDa。如图 5 所示, 两种多糖的纯度较高分别为 94.20%、98.89%。

表 1 POFP-S1、POFP-S2 中性糖、蛋白质、糖醛酸、硫酸基含量、取代度及其分子量

Table 1 The sugar, protein, uronic acid, sulfate content, degree of substitution, molecular weight of POFP-S1 and POFP-S2

样品 Sample	中性糖 Sugar (%)	蛋白质 Protein (%)	糖醛酸 Uronic acid (%)	硫酸基 Sulfate group (%)	取代度 Degree of substitution	分子量 Molecular weight (kDa)	液相纯度 Liquid phase purity
POFP-S1	56.46	-	2.91	17.55	0.364	3556.0	94.20
POFP-S2	56.41	-	3.68	38.09	1.080	833.7	98.89

注:表中“-”表示样品中未检测到该成分

Note:“-” in the table indicates that the ingredient was not detected in the sample.

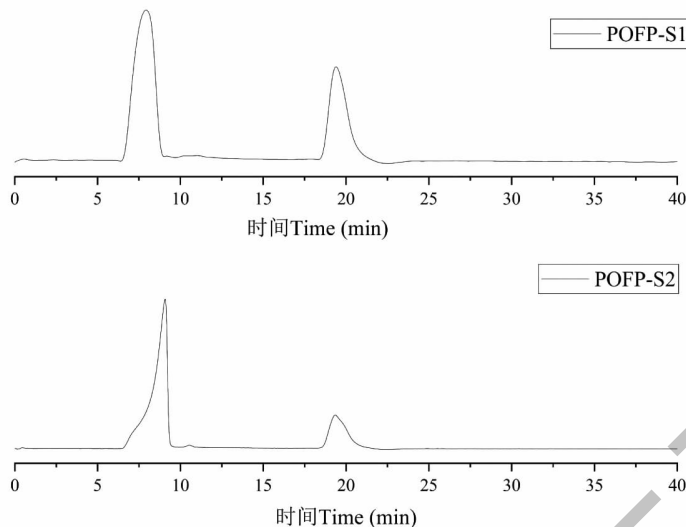


图 5 POFP-S1、POFP-S2 高效液相色谱图

Fig. 5 The HPLC chromatograms of POFP-S1 and POFP-S2

2.4 单糖组成分析

如表 2 和图 6 所示, POFP-S1 主要由鼠李糖 (rhamnose, Rha)、阿拉伯糖 (arabinose, Ara)、木糖 (xylose, Xyl)、葡萄糖 (glucose, Glu) 组成 (7. 58:

21. 67: 67. 66: 3. 09), POFP-S2 主要由 Ara 和 Xyl 组成 (35. 27: 64. 73), 其中 POFP-S1 和 POFP-S2 中 Xyl、Ara 为主要单糖成分。

表 2 POFP-S1、POFP-S2 的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of POFP-S1 and POFP-S2

样品 Sample	鼠李糖 Rha (%)	木糖 Xyl (%)	阿拉伯糖 Ara (%)	葡萄糖 Glu (%)
POFP-S1	7. 58	67. 66	21. 67	3. 09
POFP-S2	-	64. 73	35. 27	-

注:表中“-”表示样品中未检测到该成分
Note:“-” in the table indicates that the ingredient was not detected in the sample.

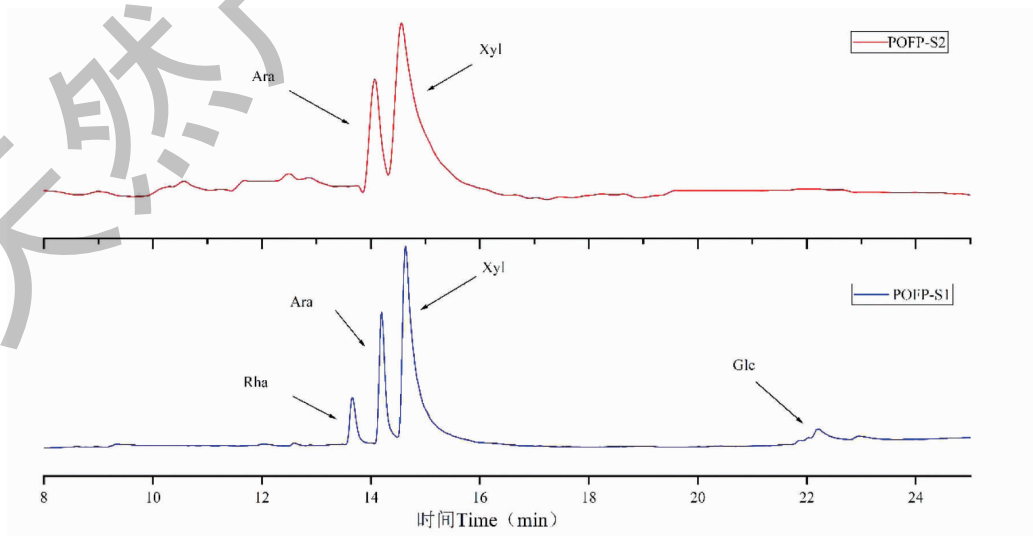


图 6 POFP-S1、POFP-S2 的单糖组成分析

Fig. 6 Analysis of POFP-S1 and POFP-S2 monosaccharide composition

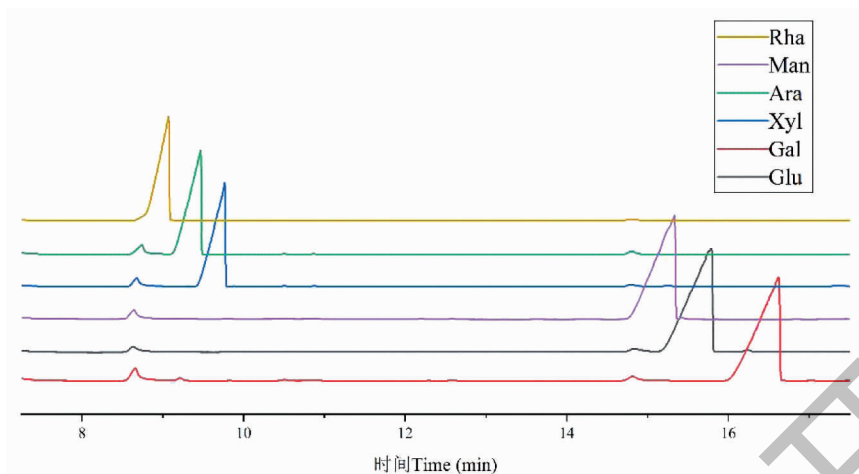


图7 标准品的单糖分析气相图

Fig. 7 GC analysis of standard monosaccharides

2.5 紫外可见光谱解析

POFP-S1、POFP-S2 的紫外可见光谱如图 8 所示,谱图显示,POFP-S1、POFP-S2 的吸收平滑,只在 260 nm 处有较高的吸收峰,这是由于硫酸基的 $n-\pi$

跃迁导致^[20]的,进一步说明了 POFP 硫酸化成功;并且在 280 nm 处没有吸收,再次说明硫酸化后的多糖没有蛋白成分。

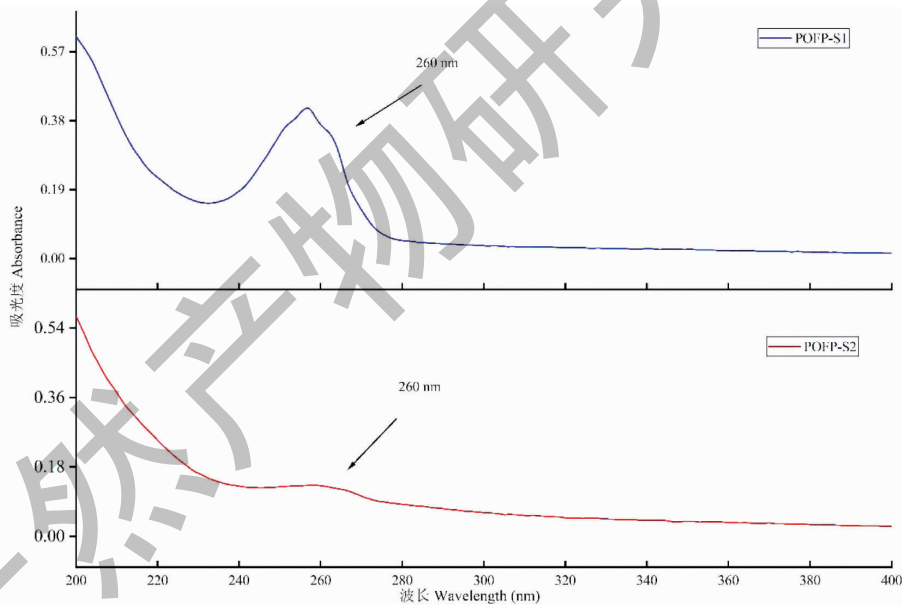


图8 POFP-S1、POFP-S2 紫外吸收光谱图

Fig. 8 Ultraviolet absorption spectra of POFP-S1 and POFP-S2

2.6 红外光谱分析

圆苞车前子硫酸化多糖 POFP-S1、POFP-S2 的红外光谱如图 9 所示。3 439 cm^{-1} 和 2 927 cm^{-1} 处的强且宽的吸收峰归属为多糖上 O-H,是多糖常见的特征吸收峰^[24]。1 734 cm^{-1} 处有强吸收峰,是 C = O 伸缩振动的特征吸收峰^[25],表明样品中含有糖醛酸

结构。810 cm^{-1} 处和在 1 249 cm^{-1} 处的吸收峰分别是 C-O-S、S = O 基团的伸缩震动峰,这两处的伸缩震动也是硫酸化多糖的特征吸收峰^[7],并且可以观察到 POFP-S2 与 POFP-S1 在这两个位置的吸收峰面积有较大差别,可能与硫酸化程度有关,并且与硫酸基取代度的结果一致。

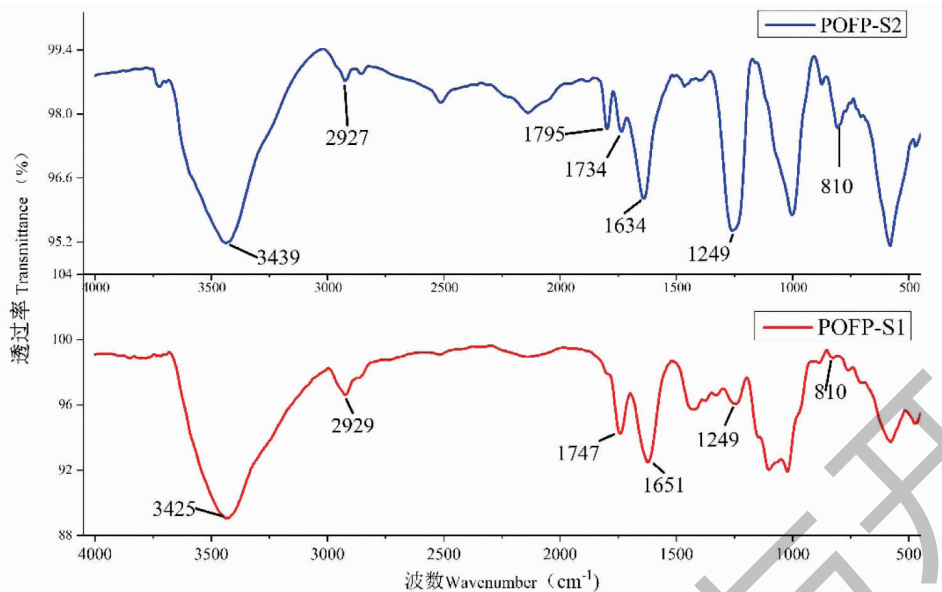


图9 POFP-S1、POFP-S2 红外光谱图

Fig. 9 Infrared spectra of POFP-S1 and POFP-S2

2.7 三螺旋结构测定

多糖的活性与它的三螺旋结构具有密不可分的关系^[13]。刚果红实验结果如图 10 所示,我们发现 POFP-S2 的最大吸收波长随着 NaOH 浓度的增大而红移,表明多糖与刚果红试剂形成了络合物,而在 NaOH 浓度达到 0.4 mol/L 时出现了明显的蓝移,可能是由于 NaOH 浓度过高破坏了多糖螺旋结构形成了单链结构^[26]。然而,POFP-S1 和空白对照水一直呈现蓝移,表明 POFP-S1 不具备三螺旋结构。

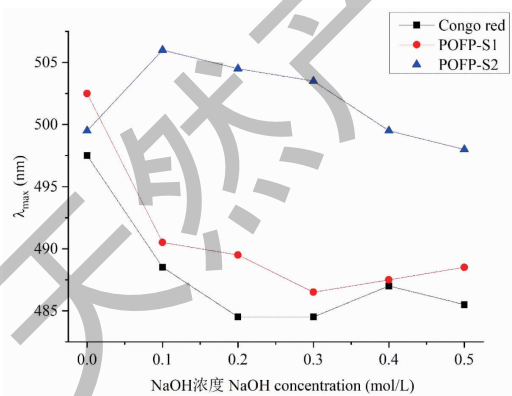


图 10 多糖三螺旋结构测定曲线

Fig. 10 Curve of triple helix structure determination

2.8 X 射线衍射分析(XRD)

多糖的 X 射线衍射如图 11 所示,可以看出当 2θ 约为 18° 、 30° 、 41° 时均出现了尖锐且强烈的峰,这是由于多糖的晶体结构所导致的,并且在图中也

可以发现存在较为平缓的部分,这也证明多糖具有非晶体结构。因此可以推断出 POFP-S1、POFP-S2 多糖是晶体与非晶体结合所形成的具有特殊结构的多糖分子。相较于未硫酸化 POFP 多糖^[13],硫酸化的多糖也显示出了其特殊的晶体结构。

2.9 抗氧化活性分析

2.9.1 DPPH 自由基的清除

对 DPPH 自由基的清除是鉴别物质体外抗氧化能力的一种常用方法^[27]。如图 12 所示,POFP-S1 与 POFP-S2 对 DPPH 自由基的清除能力与浓度并不存在特殊的线性关系,清除能力随浓度的增加呈先增加后减少再增加的趋势,POFP-S1、POFP-S2 在浓度为 5 mg/mL 时对自由基的清除均达到最大值。并且通过对比阳性对照,发现多糖 POFP 的清除能力高于 Pullulan 多糖。

2.9.2 ABTS 自由基的清除

硫酸化多糖对 ABTS 自由基的清除结果如图 13 所示,多糖的清除能力与其浓度呈正相关,随着浓度的增加多糖的自由基清除能力增强,对比阳性对照,POFP 对 ABTS 的清除能力强于普鲁兰多糖,并且可以观察到多糖 POFP-S1 在 ABTS 自由基的清除上具有显著优势,当浓度达到 5 mg/mL 时,POFP-S1 的清除能力达到最大值 41.8%。

2.9.3 OH⁻ 自由基的清除

多糖对 OH⁻ 自由基的清除结果如图 14 所示,当 POFP-S2 的浓度达到 1.25 mg/mL 时达到清除率的

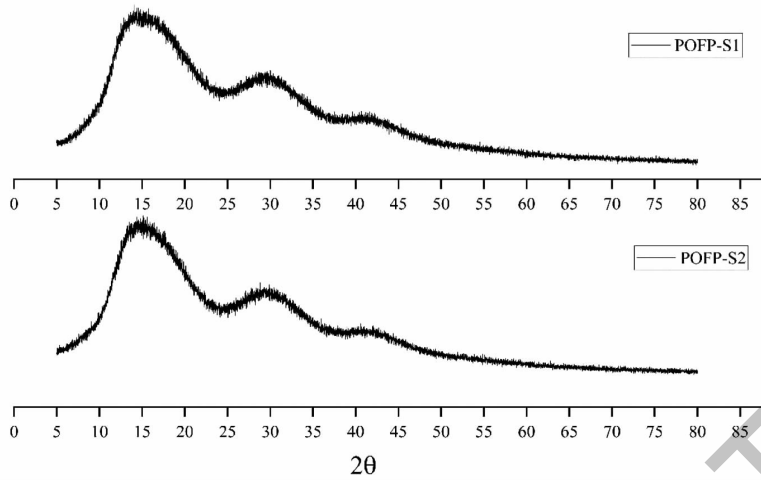


图 11 POFP-S1、POFP-S2 XRD 曲线

Fig. 11 The POFP-S1 and POFP-S2 XRD curve

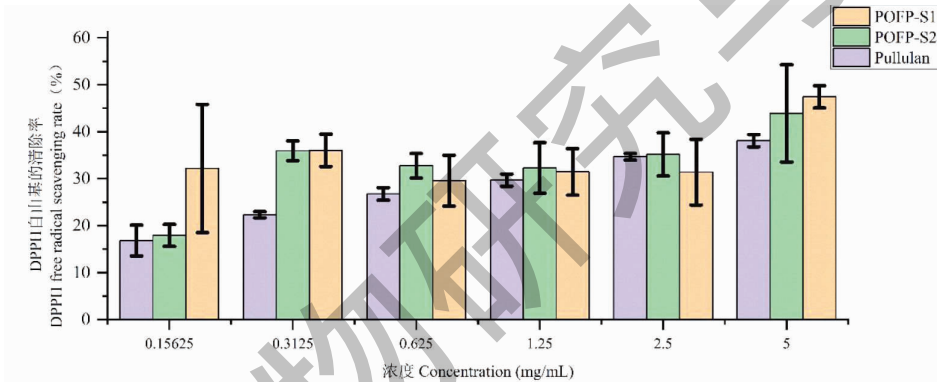


图 12 多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 12 DPPH free radicals scavenging ability of polysaccharide

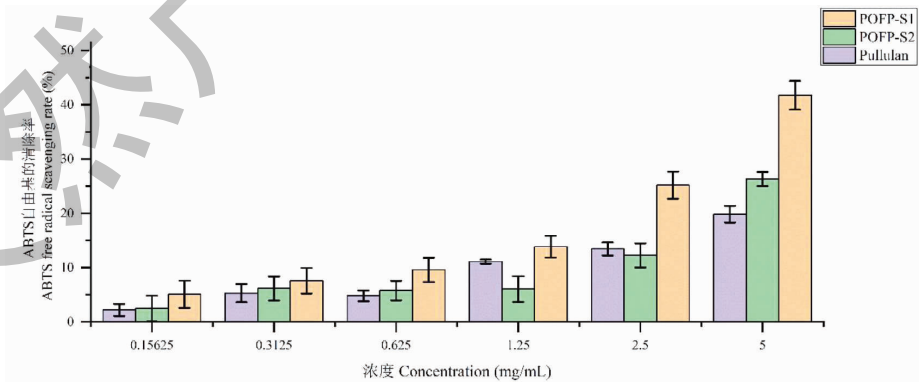
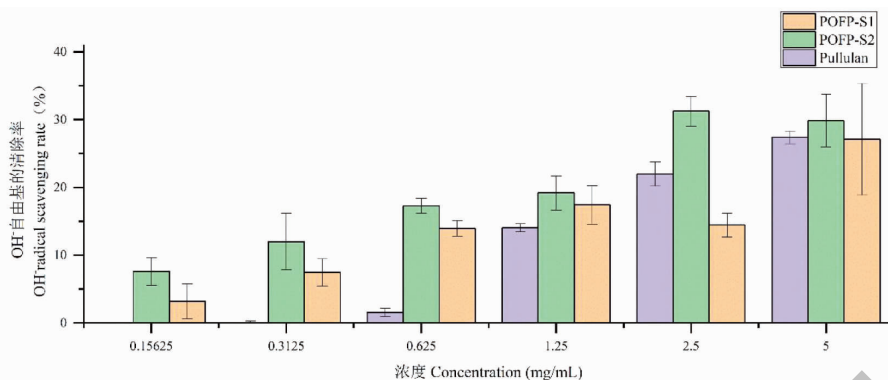


图 13 多糖对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 13 ABTS free radicals scavenging ability of polysaccharide

最大值。相较于对 ABTS 自由基的清除,两种多糖的清除能力发生改变,但相较于普鲁兰多糖有了较大提升,并且在低浓度时普鲁兰多糖并没有明显的清除能

力。结果也表明 POFP-S2 对 OH⁻ 自由基的清除能力强于 POFP-S1 的清除能力,这可能是由于 POFP-S2 具备更高的糖醛酸含量及硫酸基含量导致的。

图 14 多糖对 OH[·] 自由基的清除能力Fig. 14 OH[·] free radicals scavenging ability of polysaccharide

3 结论

鉴于圆苞车前子多糖高黏特性无法进行纯化及活性检测,本文以硫酸化法对圆苞车前子多糖(POFP)进行硫酸化修饰,修饰后的多糖黏性大幅降低。通过对 POFP-S 分离纯化,制备了两种均一多糖,其中 POFP-S1 的多糖、糖醛酸、硫酸基的取代度及其纯度分别为 38.96%、2.91%、0.364、94.20%; POFP-S2 的多糖、糖醛酸以及硫酸基的取代度分别为 52.55%、3.68%、1.080、98.89%,两种多糖均未检测到蛋白质;其中,POFP-S1 具有较大的分子量和较丰富的单糖组分。紫外(UV)、红外光谱(FT-IR)发现 POFP-S1 和 POFP-S2 均具有典型的硫酸化多糖特征吸收峰,表明硫酸化修饰的成功;X 射线衍射(XRD)及刚果红实验发现 POFP-S2 均具晶体与非晶体共存的,具特殊螺旋结构的多糖。在抗氧化方面,POFP-S1 多糖对 DPPH, ABTS 自由基的清除能力相较于 POFP-S2 更强,这可能与具有较大的分子量和其单糖组成(葡萄糖)有关,而对羟基自由基的清除中 POFP-S2 的清除能力较强,这可能是由于 POFP-S2 多糖中硫酸基的取代度较大有关。本研究为进一步研究圆苞车前子多糖的结构与活性提供文献依据,以及开发具有潜力的药食同源产品提供理论依据,为多糖的硫酸化研究提供思路。

参考文献

- Wei H, Shi Y, Yuan Z, et al. Isolation, identification, and anti-inflammatory activity of polysaccharides of *Typha angustifolia* [J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22: 2451-2459.
- Tsakagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, et al. Krestin (PSK) [J]. *Cancer Treat Rev*, 1984, 11: 131-155.
- Duan HY, Zhang Q, Huang XF. Advances in the application

- of *Plantago ispaghula* shell in diabetes [J]. *Res Integr Tradit Chin West Med* (中西医结合研究), 2021, 13: 256-259.
- Liu PY, Wang K, Liang S, et al. Advances in understanding the structure and biological activity of *Poria cocos* polysaccharides [J]. *Food Sci* (食品科学), 2023, 44: 380-391.
- Jimenez-Escrib A, Gomez-Ordóñez E, Ruperez P. Seaweed as a source of novel nutraceuticals: sulfated polysaccharides and peptides [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2011, 64: 325-337.
- Arokiarajan MS, Thirunavukkarasu R, Joseph J, et al. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 194: 870-981.
- Neto ÉD, Maciel JD, Cunha, PLR, et al. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide [J]. *J Braz Chem Soc*, 2011, 22: 1953-1960.
- Yang B, Yang G, Chen YJ, et al. Sulfuration modification of natto polysaccharides [J]. *J Univ Shanghai Sci Technol* (上海理工大学学报), 2020, 42: 497-503.
- Liu X, Chen XX, Xie LM, et al. Sulfated Chinese yam polysaccharide enhances the immunomodulatory activity of RAW 264.7 cells via the TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13: 1316-1326.
- Tao YZ, Zhang, L, Cheung PCK. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341: 2261-2269.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol II (中华人民共和国药典: 第二部) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 331-340.
- Nanjing University of Chinese Medicine. A Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006: 584-590.
- Nuerxiati R, Mutailifu P, Lu C, et al. Optimization of alkali

- extraction, structure, and antioxidant activity of protein-bound polysaccharide from seeds of *Plantago ovata* Forssk [J]. Ind Crops Prod, 2022, 183:114920.
- 14 Li H, Wang X, Xiong Q, et al. Sulfated modification, characterization, and potential bioactivities of polysaccharide from the fruiting bodies of *Russula virescens* [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 154:1438-1447.
- 15 Yang Y, Chen J, Lei L, et al. Acetylation of polysaccharide from *Morchella angusticeps* Peck enhances its immune activation and anti-inflammatory activities in macrophage RAW 264.7 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 125:38-45.
- 16 Wu W, Xu X, Zhang L, et al. Chain conformation and anti-tumor activity of derivatives of polysaccharide from Rhizoma Panacis Japonici [J]. Carbohydr Polym, 2014, 105:308-316.
- 17 Zhang LX, Zhou XQ, Li DQ, et al. Research progress on the chemical composition, analytical methods, and pharmacological effects of *Ophiopogon* polysaccharides [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2017, 40:279-284.
- 18 Chen QQ, Wan Q, Wang ZZ, et al. A Method for determination of the uronic acids in polysaccharides isolated from *Panax ginseng* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18:121-124.
- 19 Lin CB, Li LJ, Feng J, et al. Aptamer-modified magnetic SERS substrate for label-based determination of cardiac troponin I [J]. Microchim Acta, 2022, 189:22-30.
- 20 Nuerxiati R, Mutailipu P, Abuduwaili A, et al. Effects of different chemical modifications on the structure and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don [J]. Adv J Food Sci Technol, 2021, 86:2434-2444.
- 21 Mutailifu P, Nuerxiati R, Lu, CF, et al. Extraction, purification, and characterization of polysaccharides from *Alhagi pseudoalhagi* with antioxidant and hypoglycemic activities process biochemistry [J]. Process Biochem, 2022, 121:339-348.
- 22 Jiao LL, Li JM, Liu FR, et al. Characterisation, chain conformation and antifatigue effect of steamed *Ginseng* polysaccharides with different molecular weight [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:712836.
- 23 Hu YB, Zhai LY, Liu Y, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Osmunda japonica* [J]. Food Sci (食品科学), 2022, 43:59-66.
- 24 Xu L, He D, Zhang CL, et al. The regulated function of polysaccharides and oligosaccharides that with sulfate group on immune-related disease [J]. J. Funct Foods, 2022, 88:104870.
- 25 Sun YE, Wang WD, Wan T. Study on sulfation modification of inulin [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2011, 37:95-98.
- 26 Wu HY, Shang HM, Guo Y, et al. Comparison of different extraction methods of polysaccharides from cup plant (*Silphium perfoliatum* L.) [J]. Process Biochem, 2020, 90:241-248.
- 27 Zhang RB, Yang YH, Li CH, et al. Research progress on pharmacological action and mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35:879-887.