

马齿苋多糖的乙酰化修饰及其抗氧化活性

李银莉, 张安勇, 牛庆川, 李玉萍

(江西科技师范大学生命科学学院, 江西南昌 330013)

摘要: 以马齿苋为原料, 采用热水浸提法提取马齿苋多糖 (Polysaccharides from *Portulaca oleracea* L., POP), 采用乙酸酐法制备乙酰化马齿苋多糖 (acetylated polysaccharides from *Portulaca oleracea* L., Ac-POP)。以取代度为指标, 通过单因素实验方法考察了反应时间、反应温度和料液比对马齿苋多糖乙酰化修饰取代度的影响, 进一步优化了乙酰化修饰马齿苋多糖的工艺条件, 并研究了 POP 和 Ac-POP 的抗氧化活性。实验结果表明: 马齿苋多糖乙酰化修饰的最佳反应时间为 2.78 h、反应温度为 51.90 °C、料液比为 1:28.15 (g/mL), 在该优化条件下, POP 乙酰化取代度达到 0.60。通过对原多糖和乙酰化多糖的红外光谱检测, 显示乙酰化马齿苋多糖制备成功。马齿苋多糖修饰前后对自由基均有一定的清除作用, 且呈现一定的剂量关系。在 0.05~5.0 mg/mL 范围内, 修饰前后的马齿苋多糖对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 69.73% 和 64.54%; 对·OH 的最大清除率分别为 43.48% 和 25.04%; 对 O₂^{·-} 的最大清除率分别为 78.86% 和 79.16%。随着浓度的增加, 乙酰化马齿苋多糖的抗氧化活性逐渐增大。抗氧化研究表明, 与未修饰多糖相比, 乙酰化马齿苋多糖对 DPPH 自由基和·OH 的清除能力减弱, 但对 O₂^{·-} 的清除能力有较大的增强。

关键词: 马齿苋多糖; 乙酰化修饰; 取代度 (DS); 红外光谱 (IR); 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2020)12-84-91

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0480

Acetylation Modification of the Polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. and Their Antioxidant Activities

LI Yin-Li, ZHANG An-yong, NIU Qing-chuan, LI Yu-ping

(School of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract: *Portulaca oleracea* L. was used as the raw material. Polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. (POP) were extracted by hot water, and acetylated with acetic anhydride to yield Ac-POP. Taking the degree of substitution as an index, the effects of reaction time, reaction temperature and material-liquid ratio on the degree of substitution of Ac-POP were investigated by the single factor experiments. The conditions for acetylation modification of POP were further optimized, and the antioxidant activities of POP and Ac-POP were evaluated. The experimental results showed that the optimal conditions for the acetylation modification of POP were: reaction time 2.78 h, reaction temperature 51.90 °C, material-liquid ratio 1: 28.15 (g/mL). Under such optimal modification conditions, the degree of substitution of Ac-POP was 0.60. The infrared spectroscopy analysis of the original polysaccharide and acetylated polysaccharide showed that the acetylation of the polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. was successful. The POPs before and after modification had a certain ability to scavenge free radicals and exhibited a certain dose-dependent relationship. In the range of 0.05~5.0 mg/mL, the maximum scavenging rates were 69.73% and 64.54% for POP and Ac-POP against DPPH free radicals, respectively, 43.48% and 25.04% against ·OH, respectively, and 78.86% and 79.16% against O₂^{·-}, respectively. As the concentration increased, the antioxidant activity of Ac-POP increased gradually. Antioxidant activity studies revealed that compared with POP, the scavenging capacities of Ac-POP against DPPH free radicals and ·OH decreased, but that against O₂^{·-} increased.

Key words: polysaccharide from *Portulaca oleracea* L.; acetylation modification; degree of substitution (DS); infrared spectrum (IR); antioxidant activity

引文格式:

李银莉,张安勇,牛庆川,等.马齿苋多糖的乙酰化修饰及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2020,36(12):84-91

LI Yin-Li, ZHANG An-yong, NIU Qing-chuan, et al. Acetylation modification of the polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. and their antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 84-91

收稿日期: 2020-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360376); 江西省自然科学基金项目 (20132BAB205091); 硕士研究生创新专项资金项目 (YC2019-X01)

作者简介: 李银莉 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物研究与开发; 通讯作者: 李玉萍 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究与开发

马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.) 属于马齿苋科, 别名五行草、长命菜、马齿菜、是一年生草本植物, 分布于世界各地, 且在不同的地理环境中生长良好^[1,2]。几千年来一直被世界许多地区广泛视为食用和药用植物^[3], 《滇南本草》中曾这样描述它的功效: “益气、清暑热、宽中下气、润肠、消积滞、杀虫、疗疮红肿疼痛”。其富含抗氧化维生素、omega-3 脂肪酸、多糖、脂肪酸、黄酮类化合物、香豆素和生物碱等活性成分, 被世界卫生组织命名为“全球灵丹妙药”^[4-8]。马齿苋多糖 (Polysaccharides from *Portulaca oleracea* L., POPs) 是马齿苋的主要活性成分之一, 已有国内外学者的研究证明 POPs 具有增强机体免疫力、神经保护、抗菌、抗病毒、抗糖尿病、抗氧化和抗癌活性等多种功能^[9-16]。

研究显示, 多糖的活性与其结构有着密切的关系, 受多糖主链、支链的性质及多糖的空间结构等因素的影响。为此, 对多糖分子进行修饰和结构改造以便更好发挥多糖的活性具有重要意义。目前, 国内外有大量关于分子修饰多糖从而得到理想活性多糖的实验研究。其中, 乙酰化修饰可以改变多糖的伸展, 导致多糖羟基暴露, 增加多糖的溶解度, 生物活性也得到明显的增强^[17], 使多糖得到更有效地利用。那么, 对马齿苋多糖进行乙酰化修饰会不会有同样的改变呢? 目前尚未见类似的研究报道。为此, 本研究采用乙酸酐法和单因素实验马齿苋多糖乙酰化修饰, 探究马齿苋多糖乙酰化修饰的最佳工艺条件。并以对 DPPH 自由基、·OH 和 O₂· 三种自由基清除能力的强弱为依据探讨乙酰化马齿苋多糖的抗氧化活性, 以期为进一步深入研究和综合利用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

马齿苋, 购于江西省南昌市乐买家超市; DPPH, 阿拉丁生化科技股份有限公司; Tris, 上海碧云天生物技术有限公司; 无水乙醇、木瓜蛋白酶、氯仿、正丁醇、氢氧化钠、乙酸酐、浓盐酸、盐酸羟胺、醋酸钠、氯化乙酰胆碱、六水三氯化铁、三氯乙酸、邻苯三酚、水杨酸、双氧水等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; ALPHA1-2 冷冻干燥机, 德国 Martin Christ 公司; EYELA N-1001 旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社; TGL-5-A 离心机, 上海飞鸽系列离心机厂; PB-10 pH 计, 德国 Sartorius 公司; JJ500 型精密电子

天平, 美国双杰兄弟公司; BCD-602W 冰箱, 青岛海尔股份有限公司; 722 可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; MK3 酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 马齿苋多糖的提取

将马齿苋洗净、干燥粉碎、过筛子、称取 60 g, 加入 900 mL 蒸馏水, 95 °C 水浴加热 1 h, 提取物离心 4000 r/min, 15 min, 合并上清。将上清液旋转蒸发至一定体积, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 4 °C 醇沉过夜。沉淀经离心后复溶多次, 直到沉淀为灰白色为止。上清液倒入玻璃皿中, 用保鲜膜封好冷冻干燥后得到马齿苋粗多糖。

1.3.2 马齿苋多糖的纯化

马齿苋多糖的纯化参照文献^[18]的方法: 称取 3.0 g 的马齿苋粗多糖, 加入 300 mL 超纯水, 再加入一定量的木瓜蛋白酶, 60 °C 水浴 3 h, 100 °C 水浴 10 min。离心取上清液, 旋转蒸发至一定体积后加入等体积的 Sevaige ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$) 试剂用来脱蛋白。超声震荡 15 min, 洗脱三次, 离心加入 4 倍体积的无水乙醇, 4 °C 醇沉过夜。沉淀离心复溶后经冷冻干燥得到脱蛋白马齿苋多糖。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质含量, 以蛋白的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.3 乙酰化马齿苋多糖的制备

称取 POP 0.5 g, 加入 15 mL 蒸馏水充分溶解, 用 NaOH (40 mg/mL) 调节 pH 为 9.0。向溶液中加入一定体积的乙酸酐, 边搅拌边滴加, 滴加完毕以后恒温反应一段时间。待反应结束用浓盐酸调节 pH 为 7.0。上清液离心后装入截留分子量为 15000 u 的透析袋中, 用蒸馏水透析 48 h。透析液经减压浓缩后, 经冷冻干燥得到乙酰化马齿苋多糖。用蒽酮-硫酸法测定^[18], 以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.4 乙酰化取代度 (Degree of substitutin, DS) 的测定

精确称取 53.2 mg 的氯化乙酰胆碱标准品, 用 0.001 mol/L 的醋酸钠溶液溶解, 在 50 mL 容量瓶中定容。取氯化乙酰胆碱标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别放于试管中, 加蒸馏水补足 1 mL, 分别加入 2 mL 新鲜配制的碱性羟胺溶液, 摇匀, 于室温中放置 4 min, 加 1 mL 4 mol/L HCl, 混匀后加 1 mL 0.37 mol/L 三氯化铁-盐酸溶液, 摇匀反应后在 540 nm 波长处测定其吸光度。同时做上述各个标准溶液的空

白,方法与上述步骤相同,但加酸与加碱性羟胺的次序颠倒,绘制乙酰基浓度与吸光度(A=540 nm)的标准曲线^[19]。乙酰化马齿苋多糖溶液按照上述方法进行测定。取代度(DS)按下式计算:

$$\text{乙酰基百分含量}(w, \%) = \frac{M_1}{M_2} \times 100\%$$

$$(DS) = \frac{162W}{4300 - (43 - 1) \times W}$$

式中: M_1 为乙酰化马齿苋多糖中乙酰基的质量 (mg); M_2 为乙酰化马齿苋多糖的质量 (mg), 162 为多糖中单糖残基的相对分子质量; 43 为乙酰基相对分子质量; 1 为氢原子的相对分子质量。

1.3.5 标准曲线的测定

1.3.5.1 POP 中蛋白含量测定

根据标准曲线测定蛋白含量(图1),获得回归方程: $Y=1.3547X+0.0145$, $R^2=0.9965$ 。经测定,纯化前蛋白含量为 79.61%, 纯化后蛋白的含量为 15.73%。

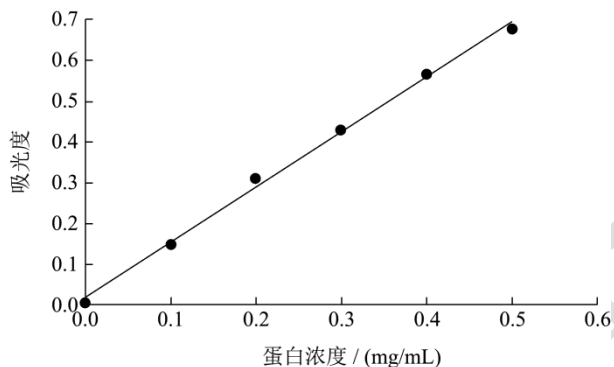


图1 蛋白标准曲线

Fig.1 Protein standard curve

1.3.5.2 Ac-POP 中多糖含量和取代度的测定

根据标准曲线测定多糖含量(图2),获得回归方程: $Y=1.3015X-0.001$, $R^2=0.9994$ 。经测定,乙酰化前多糖含量为 47.07%, 乙酰化后多糖的含量为 37.22%。

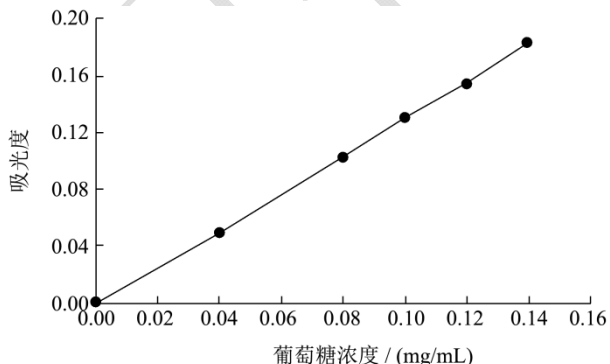


图2 葡萄糖标准曲线

Fig.2 Glucose standard curve

氯化乙酰胆碱标准品乙酰基浓度与其吸光度值的标准曲线见图3,获得回归方程: $Y=3.4338X+0.0057$,

$R^2=0.9999$ 。

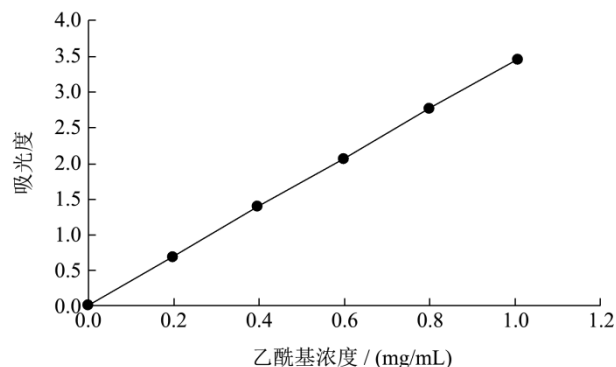


图3 氯化乙酰胆碱标准曲线

Fig.3 The standard curve of acetylcholine chloride

1.3.6 单因素实验

1.3.6.1 反应时间对 POP 乙酰化反应的影响

准确称量 100 mg 精制马齿苋多糖,在反应温度为 50 °C,料液比为 1:30 (g/mL)的条件下,分别研究 1、2、3、4 和 5 h 不同的反应时间对 POP 乙酰化反应的影响,确定最佳反应时间。

1.3.6.2 反应温度对 POP 乙酰化反应的影响

准确称量 100 mg 精制马齿苋多糖,在反应时间为 3 h,料液比为 1:30 (g/mL)的条件下,分别研究 40、45、50、55 和 60 °C 不同的反应温度对 POP 乙酰化反应的影响,确定最佳反应温度。

1.3.6.3 料液比对 POP 乙酰化反应的影响

准确称量 100 mg 精制马齿苋多糖,在反应温度为 50 °C,反应时间为 3 h 的条件下,分别研究 1:20、1:25、1:30、1:35 和 1:40 (g/mL)不同的料液比对 POP 乙酰化反应的影响,确定最佳料液比。

1.3.7 红外光谱分析

分别取一定量充分干燥的 POP 和 Ac-POP,与一定量干燥的溴化钾 (KBr) 充分混匀,压片,进行红外光谱扫描(范围: 400~4000 cm^{-1})。

1.3.8 体外抗氧化活性测定

1.3.8.1 对 DPPH 自由基清除能力的测定^[20]

分别取不同浓度 (0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、5.0 mg/mL) 的 POP 和 Ac-POP 溶液 2 mL, 2 mL 的 DPPH 溶液 (30 $\mu\text{g/mL}$), 室温下震荡,完全反应。避光反应 30 min,于 517 nm 处测其吸光度。每个样品设置 5 个平行样,实验重复三次。以蒸馏水代替多糖样液作空白对照,按下式计算清除率:

$$\text{DPPH自由基清除率} / \% = \frac{A - A_0}{A} \times 100\%$$

式中: A 为样品待测液吸光度; A_0 为对照组吸光度。

1.3.8.2 对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定^[21]

分别取不同浓度 (0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、

2.0、5.0 mg/mL) 的 POP 和 Ac-POP 溶液 1 mL, 1 mL 的 FeSO₄ 溶液 (9 mmol/L), 1 mL 的水杨酸-乙醇溶液 (9 mmol/L), 最后加入 1 mL 的 H₂O₂ (9 mmol/L) 来启动反应, 37 °C 水浴反应 30 min。于 510 nm 处测定其吸光度, 记录数据为 A₁, 用蒸馏水替代 H₂O₂, 记录数据为 B₁。用蒸馏水代替多糖溶液作空白对照组, 记录数据为 A₀。每个样品设置 5 个平行样, 实验重复三次, 按下式计算清除率:

$$\text{OH清除率} / \% = 1 - \frac{A_1 - B_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: A₀ 为对照组的吸光度; A₁ 为多糖溶液加 H₂O₂ 的吸光度; B₁ 为蒸馏水替代 H₂O₂ 的吸光度。

1.3.8.3 对 O₂⁻清除能力的测定^[21]

分别取不同浓度 (0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、5.0 mg/mL) 的 POP 和 Ac-POP 溶液 1.0 mL 置于试管中, 加入 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.2) 4.5 mL, 再加入蒸馏水 3.2 mL 混合均匀。在室温 (25 °C) 下静置 20 min, 加入 7 mmol/L 的邻苯三酚 0.3 mL。在室温 (25 °C) 下静置 3 min, 迅速滴 1 滴 10 mol/mL 的 HCl 溶液终止反应, 于 325 nm 处测定其吸光度, 记录数据为 A。蒸馏水代替多糖样品作为空白对照组, 每个样品设置 5 个平行样, 实验重复三次, 按下式计算清除率:

$$\text{O}_2^{\cdot-}\text{清除率} / \% = (1 - \frac{A}{A_0}) \times 100\%$$

式中: A 为多糖溶液的吸光度; A₀ 为对照组的吸光度。

1.3.9 数据处理

本文采用 Design-Expert 8.0、SPSS 数据处理软件, 对结果进行分析。

2 结果与讨论

2.1 POP 的乙酰化修饰

2.1.1 单因素实验结果分析

2.1.1.1 反应时间对 POP 乙酰化反应的影响

反应时间对 POP 乙酰化反应的影响见图 4。由图 4 知, 反应时间对乙酰基取代度的影响较大。随着时间的增长, 乙酰基取代度迅速增大, 当反应时间为 3 h 时, 取代度达到最大 (0.35); 当反应时间大于 3 h 时, 乙酰基取代度显著下降。徐兵^[22]等对银耳多糖进行了乙酰化修饰, 发现银耳乙酰基的取代度随着反应时间的增大而增大, 但是当时间超多 2 h, 乙酰基取代度迅速下降, 其原因可能是浸提时间的延长增加了反应物之间的碰撞几率, 部分产物发生了分解, 引起了乙酰化程度的下降。故最佳反应时间为 3 h。

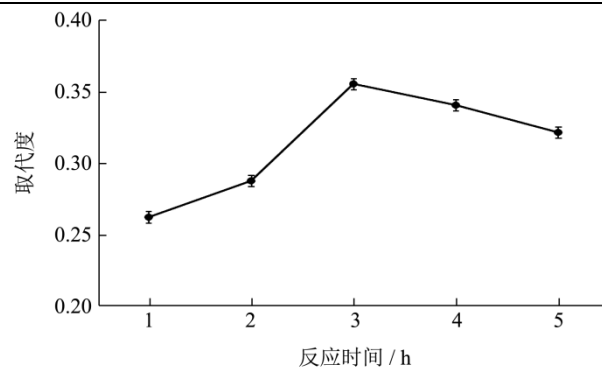


图 4 反应时间对 POP 乙酰基取代度的影响

Fig.4 Effect of reaction time on substitution degree of Ac-POP

2.1.1.2 反应温度对 POP 乙酰化反应的影响

反应温度对 POP 乙酰化反应的影响见图 5。由图 5 知, 在一定温度范围内, 乙酰基的取代度随着温度的增加而增大, 当反应温度为 50 °C 时, 取代度达到最大 (0.36); 当温度高于 50 °C 的时候, 乙酰基的取代度明显下降。徐兵^[22]等对银耳多糖进行了乙酰化修饰, 发现在 30~60 °C 范围内银耳乙酰基的取代度逐渐增大, 但是当反应温度超过 60 °C, 乙酰基取代度下降, 可能是由于水浴的温度升高导致了乙酸酐的水解, 乙酰基与多糖的结合力降低, 从而影响了乙酰基的取代。故最佳反应温度为 50 °C。

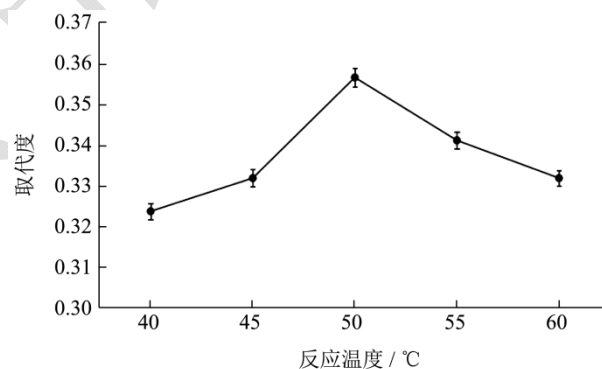


图 5 反应温度对 POP 乙酰基取代度的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on substitution degree of Ac-POP

2.1.1.3 料液比对 POP 乙酰化反应的影响

料液比对 POP 乙酰化反应的影响见图 6。由图 6 知, 随着料液比的减少, 乙酰基取代度先逐渐增大, 当料液比为 1:30 (g/mL) 时, 乙酰基取代度达到最大 (0.59)。之后随着料液比的减少, 乙酰化取代度降低至 0.1 (料液比为 1:40 g/mL)。陈义勇^[23]对猴头菇多糖进行了乙酰化修饰, 发现随着料液比的减少乙酰基的取代度先增大后减小, 当料液比为 1:35 g/mL 时取代度达到最大, 乙酰基取代度下降可能是由于生成的乙酰化多糖对反应起抑制作用导致, 故最佳料液比为 1:30 (g/mL)。

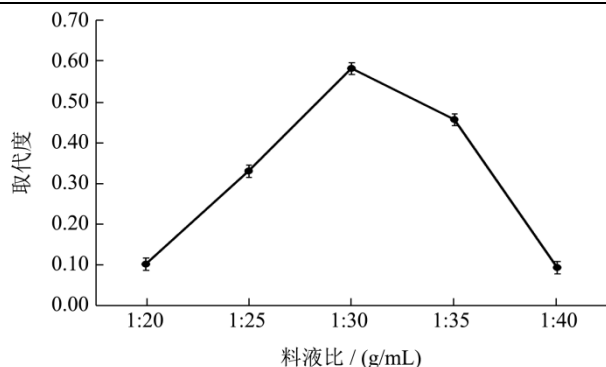


图6 料液比对 POP 乙酰基取代度的影响

Fig.6 Effect of material-liquid ratio on substitution degree of Ac-POP

2.1.2 响应模型的建立与分析

表1 响应面实验因素与水平设计

Table 1 Factors and levels designed for response surface

水平	因素		
	反应时间/h	反应温度/°C	料液比/(g/mL)
-1	2	40	1:25
0	3	50	1:30
1	4	60	1:35

在单因素实验结果的基础上，以取代度为指标，选取反应温度，反应时间和料液比为三个考察因素，进行三因素三水平的实验设计。实验因素和水平设计见表1，实验结果见表2，方差分析结果见表3。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface

analysis				
实验号	A	B	C	取代度
1	-1	0	1	0.358
2	0	0	0	0.59
3	0	0	0	0.585
4	0	0	0	0.547
5	1	0	1	0.495
6	1	0	-1	0.359
7	0	1	-1	0.478
8	0	0	0	0.59
9	1	1	0	0.402
10	0	-1	1	0.338
11	0	0	0	0.591
12	0	1	1	0.437
13	-1	0	-1	0.565
14	-1	-1	0	0.419
15	0	-1	-1	0.358
16	1	-1	0	0.373
17	-1	1	0	0.461

通过 Design-Expert 8.0 软件分析表2 实验数据，拟合得到乙酰化取代度对各因素的二次回归方程为：

$$Y=0.58-0.022A+0.036B-0.016C-3.250\times 10^{-3}AB+0.086AC-5.250\times 10^{-3}BC-0.063A^2-0.10B^2-0.074C^2$$

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.14	9	0.016	25.14	0.0002	显著
A	3.784×10^{-3}	1	3.784×10^{-3}	6.10	0.0429	显著
B	0.011	1	0.019	16.93	0.0045	显著
C	2.178×10^{-3}	1	2.178×10^{-3}	3.51	0.1032	
AB	4.225×10^{-4}	1	4.225×10^{-4}	0.068	0.8019	
AC	0.029	1	0.029	47.38	0.0002	显著
BC	1.102×10^{-4}	1	1.102×10^{-4}	0.18	0.6861	
A ²	0.017	1	0.017	26.64	0.0013	显著
B ²	0.046	1	0.046	73.60	< 0.0001	显著
C ²	0.023	1	0.023	36.81	0.0005	显著
残差	4.346×10^{-3}	7	6.208×10^{-4}			
失拟项	2.913×10^{-3}	3	9.708×10^{-4}	2.71	0.1799	不显著
纯误差	1.433×10^{-3}	4	3.583×10^{-4}			
总离差	0.14	16				

注：p<0.05 差异显著；p<0.01，差异极显著。

由表3 可知回归模型极显著，失拟项不显著，且 R²=0.9317，表明自变量与响应值之间的模型关系显著。

此外，失拟项 p=0.1799>0.05，说明未知因素对实验结果的干扰很小。因此，可以使用该模型方程代替真实

试验点对结果进行分析和预测。由表 3 可以看出，一次项中 A、B 和 C 均为差异显著 ($p < 0.05$)，说明反应时间、反应温度和料液比对乙酰化取代度有显著的影响，影响的主次顺序为：反应温度 > 反应时间 > 料液比，其中，反应时间对方程的影响极显著。

2.1.3 响应面分析与优化

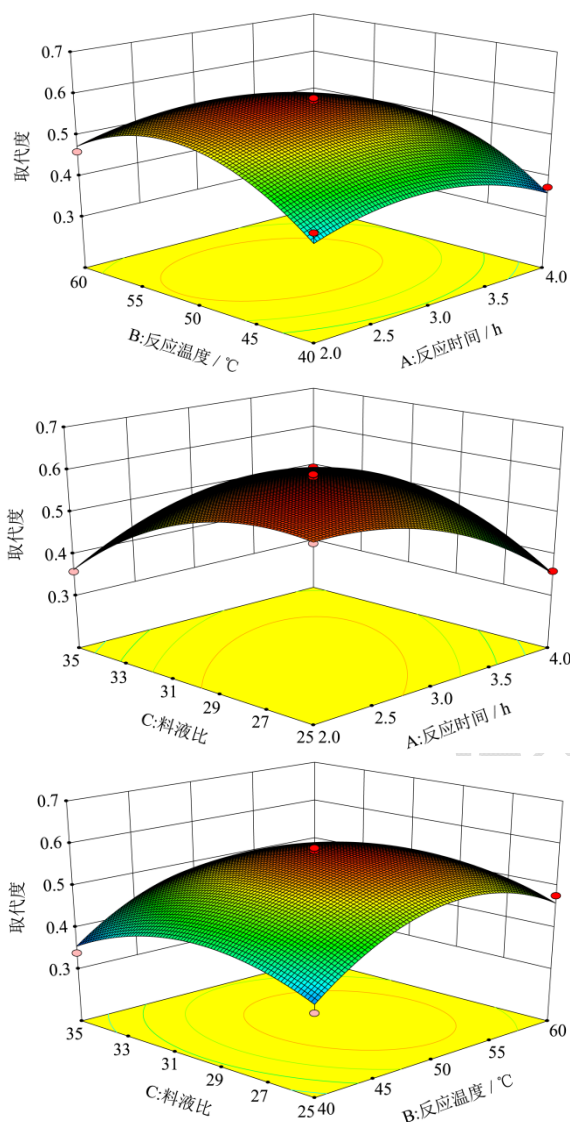


图 7 各因素交互作用对乙酰化的取代度的作用

Fig.7 Effects of interactions among reaction conditions on DS

利用 Design-Expert 8.0 软件对响应面试验结果进行分析，可预测得到 POP 乙酰化修饰最佳工艺条件为：反应时间为 2.78 h、反应温度为 51.90 °C、料液比为 1:28.15 (g/mL)。此时的取代度为 0.60。

2.2 POP 和 Ac-POP 的红外光谱分析

由图 8 可知，修饰前后的马齿苋多糖均具有多糖类物质红外的特征吸收峰：3366.2 cm^{-1} 左右为糖分子内或分子间氢键 O-H 伸缩振动峰，2936 cm^{-1} 左右为次甲基 (-CH₂-) 中的 C-H 的伸缩振动的吸收峰。而乙

酰化修饰的马齿苋多糖在 1244.6 cm^{-1} 波长处有酯基的 C-O 单键的伸缩振动^[22]，在 1740 cm^{-1} 波长处出现较强的酯基 C=O 双键伸缩振动峰，说明乙酰化产物中成功的引入了乙酰基。而在 3300~1900 cm^{-1} 处红外光谱变化比较明显，表明乙酰化修饰明显的改变了马齿苋多糖的结构。(样品干燥后很容易受潮，而且修饰时长时间高温加热也影响多糖的结构，样品批次也不一样，都可能影响多糖的吸收峰。)

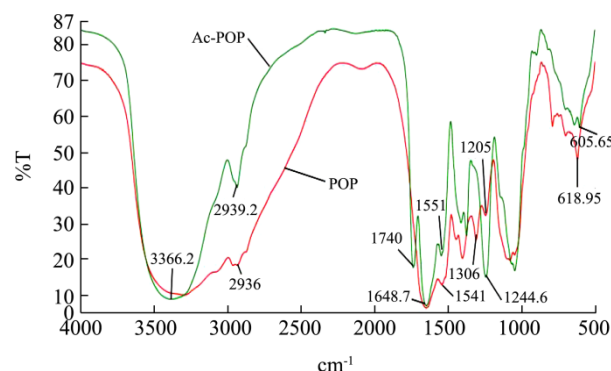


图 8 POP 与 Ac-POP 的红外光谱图

Fig.8 Infrared spectra of POP and Ac-POP

2.3 POP 与 Ac-POP 的抗氧化活性

2.3.1 POP 和 Ac-POP 对 DPPH 自由基的清除作用

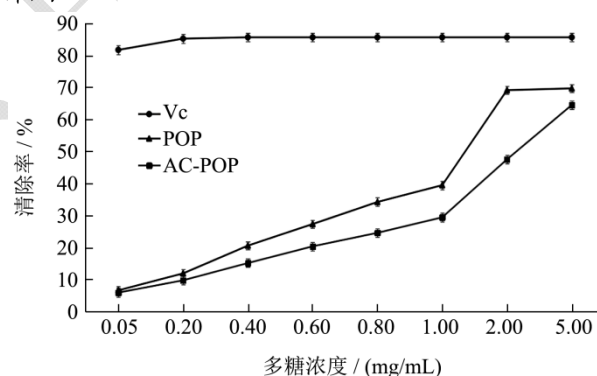


图 9 POP 和 Ac-POP 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.9 Scavenging capacity of POP and Ac-POP on DPPH free radicals

POP 和 Ac-POP 对 DPPH 自由基的清除能力如图 9。由图 9 知，多糖浓度范围在 0.05~5.0 mg/mL 内，修饰前后的马齿苋多糖对 DPPH 自由基的清除作用与多糖的浓度呈正相关。当多糖浓度为 5.0 mg/mL 时，POP 对 DPPH 的清除率最大为 69.73%；Ac-POP 对 DPPH 的清除率最大为 64.54%。贾红倩^[19]等对杏鲍菇的三个不同取代度多糖进行了乙酰化修饰，发现修饰后的三个乙酰化多糖对 DPPH 的最大清除率分别为 62.60%、58.40%、49.60%，比修饰前杏鲍菇多糖的最大清除率 65.10% 分别降低了 2.50%、6.70%、15.50%；

徐田甜等^[24]对松树藁多糖进行了乙酰化修饰,发现乙酰化松树藁多糖对 DPPH 自由基的清除活性比未修饰的低。与本实验结果相似。这可能是因为马齿苋多糖对不同自由基的活性部位不同,乙酰化修饰过程中导致不同自由基活性部位被修饰,从而导致抗氧化活性的差异。

2.3.2 POP 和 Ac-POP 对·OH 自由基的清除作用

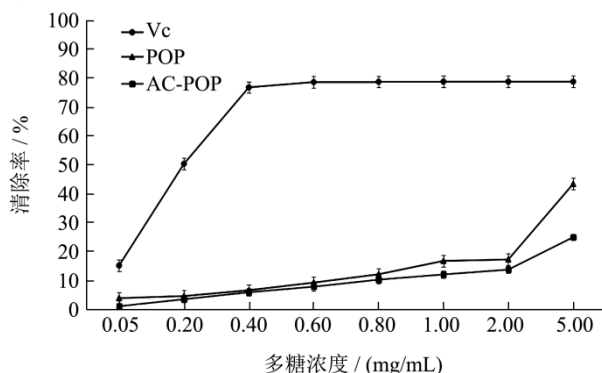


图 10 POP 和 Ac-POP 对·OH 自由基的清除作用

Fig.10 Scavenging capacity of POP and Ac-POP on hydroxyl free radicals

POP 和 Ac-POP 对·OH 自由基的清除能力如图 10。由图 10 知,多糖浓度范围在 0.05~5.0 mg/mL 内,POP 和 Ac-POP 对·OH 的清除作用随着浓度的上升而逐渐增大。当多糖浓度为 5.0 mg/mL 时,POP 对·OH 的清除率达到最大为 43.48%; Ac-POP 对·OH 的清除率最大为 25.04% ($p<0.01$),马齿苋多糖的乙酰化修饰降低了对·OH 的清除能力。这与徐兵^[22]的研究报道结果相似,其结果显示乙酰化银耳多糖对羟基自由基的最大清除率为 60.11%,比乙酰化修饰前多糖的最大清除率 77.52%降低了 17.41%。可能是因为多糖分子的横向次序和定向性被乙酰基改变了,从而导致多糖的空间排布被改变,影响了其活性。然而,也有研究者报告乙酰化修饰后的金银花多糖对·OH 自由基的最大清除率(76.32%)比未修饰前多糖的最大清除率(60.21%)提高了 26.71%,明显增强了对·OH 自由基的清除作用^[25]。这可能是由于不同来源的多糖种类和结构种类差异导致修饰前后多糖抗氧化活性的差异。

2.3.3 POP 和 Ac-POP 对 O₂⁻ 的清除作用

POP 和 Ac-POP 对 O₂⁻ 的清除能力如图 11。由图 11 知,多糖浓度范围在 0.05~5.0 mg/mL 内,POP 与 Ac-POP 对 O₂⁻ 均有一定的清除作用。不同的是 POP 在质量浓度为 1.0 mg/mL 时清除率最大为 78.86%,随着浓度的上升,对 O₂⁻ 的清除率逐渐下降;而 Ac-POP 在浓度为 5.0 mg/mL 时达到了最大清除率 79.16% ($p<0.01$)。陈义勇对猴头菇多糖进行了乙酰化修饰,

发现乙酰化修饰后多糖的最大清除率为 30.20%,比乙酰化修饰前多糖的最大清除率 17.20%提高了 13.00%。邵珠领^[26]等对桦褐孔菌多糖进行了乙酰化修饰,发现乙酰化修饰后多糖的最大清除率为 78.40%,比修饰前多糖的最大清除率 61.80%提高了 16.60%。与本实验结果相似。这可能是因为乙酰化修饰改变了原来多糖的空间构效,使其更易于提供羟基,捕捉超氧阴离子,从而提高了抗氧化活性,具体的机理还需要更进一步的研究。

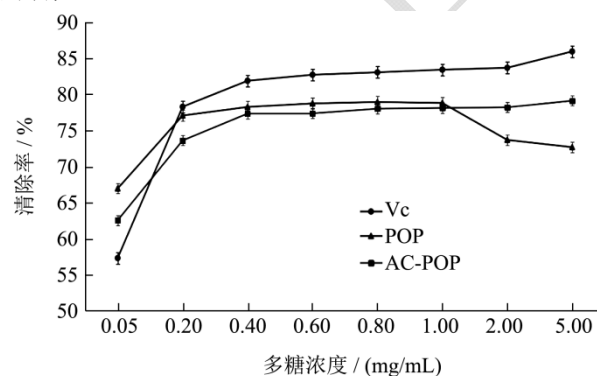


图 11 POP 和 Ac-POP 对 O₂⁻ 的清除作用

Fig.11 Scavenging capacity of POP and Ac-POP on superoxide anion free radicals

注:当浓度大于 2.0 mg/mL 时,POP 与 Ac-POP 对 O₂⁻ 的清除作用的均值差异显著 $p=0.01<0.05$ 。

3 结论

3.1 本文以 POP 为原料,采用乙酸酐法对 POP 进行乙酰化修饰,同时以取代度为指标,进行单一因素实验,实验结果表明 POP 乙酰化修饰的最佳工艺条件是反应时间为 2.78 h,反应温度为 51.90 °C,料液比为 1:28.15 g/mL。在此优化条件下,Ac-POP 的乙酰基取代度最大为 0.60。红外光谱进一步证明了乙酰化修饰成功。

3.2 抗氧化结果表明在 0.05~5.0 mg/mL 浓度范围内,修饰前后的马齿苋多糖对 DPPH 自由基、·OH 和 O₂⁻ 均有一定的清除作用。在此范围内,修饰前后 POP 对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 69.73% 和 64.54%;对羟基自由基的最大清除率分别为 43.48% 和 25.04%;对 O₂⁻ 的最大清除率分别为 78.86% 和 79.16%。且随着浓度的增加,乙酰化马齿苋多糖的抗氧化活性逐渐增大趋势。

3.3 Ac-POP 的抗氧化活性与乙酰基取代度有关,取代度越大,抗氧化能力越强。由红外光谱可以看出乙酰化修饰之后不仅增加了乙酰基,原有的多糖基团振幅增强,还出现了集团的改变,可能是因为热水高温处理引起了多糖的空间结构改变,进而导致了抗氧化

活性的改变。本研究为马齿苋多糖的化学修饰以及抗氧化的研究提供了重要参考。

参考文献

- [1] Rahimi V B, Ajam F, Rakhshandeh H, et al. A pharmacological review on *Portulaca oleracea* L.: Focusing on anti-inflammatory, anti-oxidant, immuno-modulatory and antitumor activities [J]. Weed Science 2019, 22(1): 7-15
- [2] D'Andrea R M, Andreo C S, Lara M V. Deciphering the mechanisms involved in *Portulaca oleracea* (C₄) response to drought: metabolic changes including crassulacean acid-like metabolism induction and reversal upon re-watering [J]. Physiologia Plantarum, 2014, 152(3): 414-430
- [3] Li Y, Yao L, Wu G, et al. Antioxidant activities of novel small-molecule polysaccharide fractions purified from *Portulaca oleracea* L. [J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(6): 2045-2052
- [4] Uddin M K, Juraimi A S, Hossain M S, et al. Purslane weed (*Portulaca oleracea*): A prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes [J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 951019
- [5] Zhao R, Zhang T, Zhao H, et al. Effects of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides on phenotypic and functional maturation of murine bone marrow derived dendritic cells [J]. Nutrition and Cancer, 2015, 67(6): 987-993
- [6] Zhou Y, Xin H, Rahman K, et al. *Portulaca oleracea* L.: A review of phytochemistry and pharmacological effects [J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 925631
- [7] Meng Y, Ying Z, Xiang Z, et al. The anti-inflammation and pharmacokinetics of a novel alkaloid from *Portulaca oleracea* L. [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2016, 68(3): 397-405
- [8] Rahdari P, Hoseini S M, Tavakoli S. The studying effect of drought stress on germination, proline, sugar, lipid, protein and chlorophyll content in Purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves [J]. Journal of Medicinal Plant Research, 2012, 6(9): 1539-1547
- [9] Wang P, Sun H, Liu D, et al. Protective effect of a phenolic extract containing indoline amides from *Portulaca oleracea* against cognitive impairment in senescent mice induced by large dose of D-galactose/NaNO₂ [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 203: 252-259
- [10] Wang W, Dong L, Jia L, et al. Ethanol extract of *Portulaca oleracea* L. protects against hypoxia-induced neuro damage through modulating endogenous erythropoietin expression [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(4): 385-391
- [11] Dehghan F, Soori R, Gholami K, et al. Purslane (*Portulaca oleracea*) seed consumption and aerobic training improves biomarkers associated with atherosclerosis in women with type 2 diabetes (T2D) [J]. Scientition Reports, 2016, 6(1): 37819
- [12] Lee A, Kim J, Lee Y, et al. Anti-TNF- α activity of *Portulaca oleracea* in vascular endothelial cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(5): 5628-5644
- [13] Bai Y, Zang X, Ma J, et al. Anti-diabetic effect of *Portulaca oleracea* L. polysaccharide and its mechanism in diabetic rats [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1201
- [14] Guo G, Yue L, Fan S, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of purslane seed oil [J]. Journal of Hypertension: Open Access, 2016, 5(2): 218
- [15] Li C, Meng Y, Ying Z, et al. Correction to three novel alkaloids from *Portulaca oleracea* L. and their anti-inflammatory effects [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65 (4): 993-994
- [16] Zhao R, Zhang T, Ma B L, et al. Antitumor activity of *Portulaca oleracea* L. polysaccharide on HeLa cells through inducing TLR4/NF- κ B signaling [J]. Nutrition and Cancer, 2017, 69(1): 131-139
- [17] 房芳,柳春燕,陈靠山,等. 多糖乙酰化修饰的最新研究进展 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(2): 42-47
FANG Fang, LIU Chun-yan, CHEN Kao-shan, et al. Latest research progress on acetylation modification of polysaccharides [J]. Journal of August 1 Agricultural Reclamation University, Heilongjiang, 2017, 29(2): 42-47
- [18] 胡庆娟,吴光杰,牛庆川,等. 响应面法优化木瓜蛋白酶法脱马齿苋多糖蛋白工艺 [J]. 食品科学, 2018, 39(20): 246-252
HU Qing-juan, WU Guang-jie, NIU Qing-chuan, et al. Optimization of papain-catalyzed deproteinization of polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. by response surface methodology [J]. Food Science, 2018, 39 (20): 246-252
- [19] 贾红倩,刘嵬,颜军,等. 杏鲍菇多糖的分离纯化、乙酰化修饰及其抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 39-44
JIA Hong-qian, LIU Xie, YAN Jun, et al. Isolation and purification, acetylation modification and antioxidant activity of polysaccharides of *Pleurotus eryngii* Quel [J]. Food Industry Technology, 2018, 39(3): 39-44

(下转第 110 页)