

不同方法修饰的海带多糖结构 及自由基清除能力比较

杨嘉欣^{1,2}, 黄显健¹, 黄良凤¹, 冯书珍^{1,2*}

(1. 广西科技大学医学部, 广西柳州 545006) (2. 广西科技大学理学院, 广西柳州 545006)

摘要: 为比较不同修饰方法对海带多糖的结构和自由基清除能力的影响, 分别采用羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化对海带多糖进行化学修饰, 综合运用紫外光谱、傅里叶变换红外光谱、刚果红实验、高碘酸氧化和自由基清除能力实验, 比较修饰前后海带多糖结构和 DPPH·、·OH、O₂^{·-}清除能力差异。结果显示, -OH 分别转化为 -COO、O-S 和 P-OH, 说明羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化修饰海带多糖成功, 且与修饰前相比, 修饰后三股螺旋结构均消失; 修饰前后糖苷键的键型存在显著差异: 海带多糖和磷酸化海带多糖糖苷键键型均为 (1→6)、(1→2、1→4)、(1→3), 摩尔比分别为 0.04:0.05:0.91、0.03:0.05:0.92, 而羧甲基化、硫酸酯化海带多糖糖苷键键型为 (1→2、1→4)、(1→3), 摩尔比分别为 0.02:0.98、0.10:0.90。羧甲基化和磷酸化海带多糖对 DPPH·、·OH、O₂^{·-}的清除率分别提高了 7.38%、12.17%、0.78% 和 9.12%、40.22%、14.52%, 硫酸酯化海带多糖对 DPPH·、O₂^{·-}的清除率分别提高了 24.48%、5.16%, 但削弱了对·OH的清除能力, 清除率降低 34.82%; 综合评价分析羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化海带多糖的自由基半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 2.53、4.03、1.66 mg/mL, 说明磷酸化修饰在改善海带多糖的自由基清除能力方面优于羧甲基化与硫酸酯化修饰。

关键词: 食用海藻; 海带多糖; 不同化学修饰; 自由基清除能力

文章编号: 1673-9078(2025)03-271-278

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0090

Comparison on the Structures and Free Radical Scavenging Abilities of the *Laminaria japonica* Polysaccharides Modified by Different Methods

YANG Jiixin^{1,2}, HUANG Xianjian¹, HUANG Liangfeng¹, FENG Shuzhen^{1,2*}

(1.College of Medicine, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

(2.College of Science, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: To compare the effects of different modification methods on the structures and free radical scavenging abilities of *Laminaria japonica* polysaccharides, carboxymethylation, sulfation and phosphorylation methods were used to

引文格式:

杨嘉欣,黄显健,黄良凤,等.不同方法修饰的海带多糖结构及自由基清除能力比较[J].现代食品科技,2025,41(3): 271-278.

YANG Jiixin, HUANG Xianjian, HUANG Liangfeng, et al. Comparison on the structures and free radical scavenging abilities of the *Laminaria japonica* polysaccharides modified by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 271-278.

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 广西科技计划项目(桂科 AD201590632023; GXNSFBA026053); 国家自然科学基金项目(32001208; 32460318); 广西产研计划项目(CYY-HT2023-JSJJ-0038); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202310594022)

作者简介: 杨嘉欣(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物统计, E-mail: 1535414789@qq.com

通讯作者: 冯书珍(1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: fengshuzhen@gxust.edu.cn

modify chemically *Laminaria japonica* polysaccharides. Ultraviolet spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, Congo red experiment, periodate oxidation and free radical scavenging ability experiments were used to compare the differences in the structure and DPPH·, ·OH and O₂^{·-} scavenging abilities of *Laminaria japonica* polysaccharides before and after modification. The results showed that -OH was transformed into -COO, O-S and P-OH, respectively, indicating that carboxymethylation, sulfation and phosphorylation of *Laminaria japonica* polysaccharides were successful in the modification of *Laminaria japonica* polysaccharides. Compared with the polysaccharide before modification, the three-strand helix structure disappeared after modification. There were significant differences in the bond types of glycosidic bonds before and after modification: the glycosidic bond types of the *Laminaria japonica* polysaccharides and the phosphorylated *Laminaria japonica* polysaccharides were (1→6), (1→2, 1→4), (1→3), with their molar ratios being 0.04:0.05:0.91 and 0.03:0.05:0.92, respectively. The glycosidic bond types of carboxymethylated *Laminaria japonica* polysaccharide and sulfated *Laminaria japonica* polysaccharide were (1→2, 1→4) and (1→3), with their molar ratios being 0.02:0.98 and 0.10:0.90, respectively. The scavenging rates of carboxymethylated *Laminaria japonica* polysaccharide and phosphorylated *Laminaria japonica* polysaccharide against DPPH·, ·OH and O₂^{·-} increased by 7.38%, 12.17% and 0.78%, and 9.12%, 40.22% and 14.52%, respectively. The scavenging rates of sulfated *Laminaria japonica* polysaccharides against DPPH· and O₂^{·-} increased by 24.48% and 5.16%, respectively, whilst the scavenging ability against ·OH was weakened, with the scavenging rate being reduced by 34.82%. The analysis of comprehensive scores revealed that the half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀ values) of the carboxymethylated, sulfated and phosphorylated *Laminaria japonica* polysaccharides were 2.53, 4.03 and 1.66 mg/mL, respectively, indicating that phosphorylation modification was superior to carboxymethylation modification and sulfation modification in improving the free radical scavenging ability of *Laminaria japonica* polysaccharide.

Key words: edible seaweeds; *Laminaria japonica* polysaccharides; different chemical modifications; free radical scavenging activity

海带 (*Laminaria japonica*) 又名昆布, 是多年生药食同源大型食用藻, 富含氨基酸、维生素、微量元素等营养物质和多糖类物质^[1], 具有消肿、祛痰、治疗碘缺乏症等功效^[2]。海带多糖广泛存在于海带细胞中, 是其最主要的活性成分之一^[3], 具有多种生物活性, 如清除自由基、降血糖、抑菌、抗炎、抗癌等^[4], 其在研发功能性食品和辅助药物等方面具有良好的应用前景^[5]。但海带多糖属于高聚合度的天然生物大分子且黏性强, 不利于其生物活性的发挥^[6]。

研究表明, 多糖的生物活性与其空间结构、糖苷键类别、分子量和支链结构有关, 化学修饰能够通过改变多糖空间结构、取代基类型、位置和数量, 进而提高或抑制其生物活性^[7,8], 常用的化学修饰方法包括羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化等^[9], 但不同修饰方法对其生物活性的影响不一。付玉霞^[10]采用羧甲基化和硫酸酯化 2 种方法修饰红枣多糖, 修饰后的红枣多糖对 DPPH·、·OH 和 O₂^{·-} 的清除能力均提高, 但羧甲基化红枣多糖对 3 种自由基的清除能力最强。张遥遥等^[11]对黄精多糖进行羧甲基化和硫

酸化修饰, 羧甲基化黄精多糖对 DPPH·、·OH 的清除能力提高, 但对 ABTS^{·+} 的清除能力下降, 而硫酸化黄精多糖对 3 种自由基的清除能力均提高。杨建安等^[12]对油茶籽粕多糖进行羧甲基化、硫酸酯化及乙酰化修饰, 结果表明取代度较低时的硫酸酯化油茶籽粕多糖对 ·OH、O₂^{·-} 和 DPPH· 的清除能力提高, 而羧甲基化和乙酰化修饰会削弱油茶籽粕多糖对 O₂^{·-} 的清除能力。目前, 对于海带多糖的研究多集中在其生物活性的应用方面, 不同化学修饰对海带多糖的结构与生物活性变化的影响尚不明晰。

本研究通过羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化修饰制备海带多糖衍生物, 综合运用紫外光谱、傅里叶变换红外光谱、刚果红实验和高碘酸氧化实验研究修饰前后多糖结构变化, 并以自由基的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为指标, 评价海带多糖及其衍生物的自由基清除能力, 比较不同化学修饰方法对海带多糖的结构和自由基清除能力的影响, 以期遴选海带多糖化学修饰的有效途径, 为海带多糖在医药和功能性食品领域中的应用提供理论依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海带, 2022年采自广西北部湾海域(20°54'10"~21°40'30" N, 109°05'20"~109°11'35" E), 经大连海洋大学邢坤副教授鉴定; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼购自于Sigma公司; 氢氧化钠、氯乙酸、刚果红、邻苯三酚、水杨酸、异丙醇、硫酸亚铁、浓硫酸、正丁醇、硫酸铵、高碘酸钠、溴化钾等购自于国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯。

1.2 仪器与设备

S.HH.W21.600-S型恒温水浴箱, 上海跃进医疗器械有限公司; J500型精密电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; HX-10-50B型真空冷冻干燥机, 上海圣科仪器设备有限公司; N-1300D-WB型旋转蒸发器, 上海爱朗仪器有限公司; DF-II型集热型磁力搅拌器, 上海百典仪器设备有限公司; GL-20M型高速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; VECTOR-220型傅里叶红外光谱仪, 美国尼高利仪器有限公司; ENK-PRO型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; UV-2600型紫外可见分光光度计, 株式会社岛津制作所。

1.3 实验方法

1.3.1 海带多糖的制备

参照冯书珍等^[13]的方法。称取预处理后的海带20 g, 加1 000 mL蒸馏水, 70 °C水浴中超声40 min, 取上清液以5 000 r/min的转速离心10 min, 减压浓缩、醇沉, 静置24 h, 干燥得海带粗多糖。按1:0.5比例将粗多糖与中性蛋白酶在50 °C水浴条件酶解2 h, 沸水灭活5 min, 重复多次, 直至测定280 nm处无吸收峰, 超滤, 减压浓缩, 干燥即得海带多糖(*Laminaria japonica* Polysaccharides, LJP)。

1.3.2 海带多糖的化学修饰

1.3.2.1 羧甲基化修饰

参照田数等^[14]的方法。称取0.3 g LJP, 加入10 mL质量分数为15%的NaOH溶液, 室温下碱化1 h。加入2.63 g氯乙酸于反应液中, 搅拌1 h, 60 °C反应30 min。冷却后, 用冰乙酸调节溶液pH值至7.0, 透析2 d后冷冻干燥, 即得羧甲基化海带多糖(Carboxymethylated *Laminaria japonica* Polysaccharide, C-LJP)。

1.3.2.2 硫酸酯化修饰

参照姚秋萍等^[15]的方法, 称取7.5 mL浓硫酸和2.5 mL正丁醇置于干燥的三颈瓶中, 加入0.13 g硫酸铵, 搅拌, 冷却至0 °C后, 加入0.5 g LJP, 在0 °C和10 °C分别反应30 min, 调节pH值至7.0, 透析, 离心, 取上清液冷冻干燥, 即得硫酸酯化海带多糖(Sulfate *Laminaria japonica* Polysaccharides, S-LJP)。

1.3.2.3 磷酸化修饰

参照Xia等^[16]的方法。称取1 g LJP溶于250 mL 0.01 mol/L的NaOH溶液中, 加入5 g NaCl、10 mg三氯氧磷, 55 °C下反应1 h后, 冷却至室温调节pH值至7.0, 向反应液中加入其体积3倍的体积分数为95%的乙醇溶液, 静置沉淀12 h, 离心保留沉淀, 将沉淀溶于蒸馏水, 透析48 h, 浓缩, 冷冻干燥得磷酸化海带多糖(Phosphorylated *Laminaria japonica* Polysaccharides, P-LJP)。

1.3.3 海带多糖及其衍生物的结构表征

1.3.3.1 紫外光谱分析

分别配制1 mg/mL的LJP和C-LJP、S-LJP和P-LJP溶液, 置于比色皿中, 在190~400 nm范围内, 用紫外分光光度计进行扫描。

1.3.3.2 傅里叶变换红外光谱分析

称取LJP、C-LJP、S-LJP和P-LJP分别与溴化钾粉末按照1:50的比例混合、压片, 对压片进行红外光谱扫描, 记录在4 000~500 cm⁻¹范围内的光谱。

1.3.3.3 刚果红实验

参照Guo等^[17]的方法稍作修改。分别配制1 mL 1 mg/mL的LJP、C-LJP、S-LJP和P-LJP溶液于试管中, 加入1 mL 50 mmol/L的刚果红溶液, 依次加入不同浓度的NaOH溶液(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L), 摇匀, 室温反应30 min, 用酶标仪扫描400~600 nm范围内各NaOH浓度下的最大吸收波长, 以去离子水作空白对照。

1.3.3.4 高碘酸氧化实验

参照巩晓佩等^[18]的方法稍作修改。分别称取15 mg LJP、C-LJP、S-LJP和P-LJP与15 mL 30 mmol/L的NaIO₄标准液混匀。每隔6 h取0.1 mL稀释至25 mL, 在223 nm处测定吸光值, 待其恒定时, 根据标准曲线 $y=10.948x+0.0177$ ($R^2=0.999$), 计算高碘酸的用量。取2 mL氧化产物, 以酚酞为指示剂, 用0.01 mol/L的NaOH进行滴定, 记录NaOH的消耗量, 计算甲酸的生成量。

1.3.4 自由基清除能力测定

参照 Ma 等^[19]的方法。分别测定 LJP、C-LJP、S-LJP 和 P-LJP 对 DPPH·、·OH 和 O₂·⁻ 的清除能力，并计算 IC₅₀ 值。反应中各多糖的质量浓度均为 0.3、0.5、1.0、3.0、5.0 mg/mL，以相同浓度的维生素 C (Vc) 代替多糖样品作为阳性对照，按式 (1) 计算清除率，按式 (2) 计算 IC₅₀ 值。

$$C_1 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A}) \times 100\% \quad (1)$$

$$C_2 = X_1 - I \times (P - \frac{3 - P_1 - P_2}{4}) \quad (2)$$

式中：

C₁——清除率，%；

A₁——样品组的吸光值；

A₂——对照组的吸光值；

A——空白组的吸光值；

C₂——lg (IC₅₀ 值)；

X₁——lg (多糖的最大浓度值)；

I——lg (多糖的最大浓度/相临浓度)；

P——各浓度下的自由基清除率之和，%；

P₁——最大清除率，%；

P₂——最小清除率，%。

1.4 数据分析

采用 Microsoft Excel 2022 对数据进行整理，计算 LJP 及其衍生物对自由基的半数抑制浓度 IC₅₀，数据结果以 $\bar{x} \pm \sigma \sqrt{n}$ 表示、Origin Pro 8.0 绘图，为综合考虑各修饰方法对 LJP 自由基清除能力的影响，避免对数据的主观推断，运用 SPSS 软件通过 CRITIC 客观赋权法确定各类自由基权重并计算综合得分，对 LJP 及其衍生物的自由基清除能力进行比较分析^[20]。具体如下：

假设原始指标数据矩阵如下：

$$X_i = \begin{pmatrix} x_{i1} & \cdots & x_{ip} \\ M & O & M \\ x_{ni} & L & x_{np} \end{pmatrix} \quad (3)$$

第 j 类自由基的变异性：

$$\begin{cases} \bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ij} \\ S_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n-1}} \end{cases} \quad (4)$$

第 i 类和第 j 类自由基的相关系数：

$$r_{ij} = \frac{\text{cov}(x_i, x_j)}{\sigma_{x_i} \sigma_{x_j}} \quad (5)$$

第 j 类自由基的冲突性：

$$R_j = \sum_{i=1}^p (1 - r_{ij}) \quad (6)$$

第 j 类自由基的信息量：

$$C_j = S_j \times R_j \quad (7)$$

第 j 类自由基的权重为：

$$w_j = \frac{C_j}{\sum_{j=1}^p C_j} \quad (8)$$

最后，得出 LJP 及其衍生物对自由基的半数抑制浓度 IC₅₀ 综合得分为：

$$S_i = \sum_{j=1}^p w_j \times x_{ij} \quad (9)$$

2 结果与分析

2.1 海带多糖及其衍生物的结构表征

2.1.1 紫外光谱分析

如图 1 所示，LJP 及其衍生物在 260 nm 和 280 nm 处均无最大吸收峰，表明其基本不含核酸和蛋白质成分。

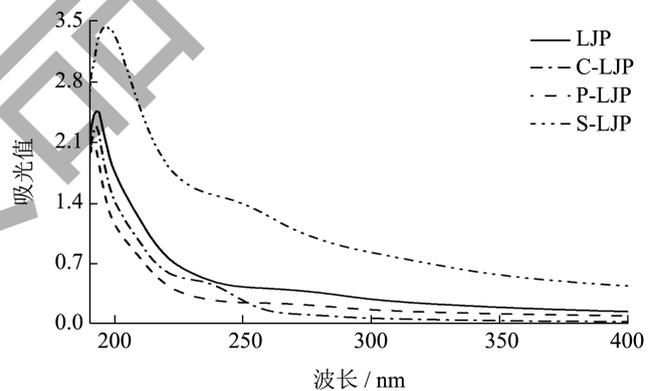


图 1 紫外光谱图

Fig.1 Ultraviolet spectrogram

2.1.2 傅里叶红外光谱分析

结合图 2 与表 1 可知，LJP 及其衍生物在 3 800~3 200 cm⁻¹ 的吸收峰是 O-H 的伸缩振动，在 3 000~2 800 cm⁻¹ 和 1 450~1 400 cm⁻¹ 的吸收峰是糖类 C-H 的伸缩振动和变角振动，以上均为多糖类物质的特征峰^[21]。LJP、S-LJP 和 P-LJP 在 1 643、1 644 cm⁻¹ 和 1 637 cm⁻¹ 处的吸收峰是糖醛酸中酯或羧基的 C=O 伸缩振动^[22]。LJP、C-LJP 和 S-LJP 在 1 017、1 084 cm⁻¹ 和 1 151 cm⁻¹ 处的吸收峰是 C-O-H 和 C-O-C 结构产生振动吸收引起的^[23]，表明 LJP、C-LJP 和 S-LJP 中可能存在吡喃糖^[24]。LJP 在 1 570 cm⁻¹ 处的吸收峰是对称 C-O 拉伸振动引起的^[25]，与 LJP 相比，C-LJP 在 1 600 cm⁻¹ 和

1 513 cm^{-1} 处出现新的吸收峰, 分别为 C-LJP 分子中 -COO- 的非对称和对称伸缩振动吸收峰, 表明多糖羧甲基化修饰成功^[26]。S-LJP 在 1 229 cm^{-1} 处的吸收峰是 S=O 伸缩振动吸收峰, 840 cm^{-1} 处的吸收峰是 C-O-S 的伸缩振动, 两处均为硫酸酯键的特征吸收峰, 表明硫酸酯化多糖修饰成功^[27]。P-LJP 在 1 245 cm^{-1} 处出现新的特征峰是 P=O 键的不对称伸缩振动, 1 124 cm^{-1} 处的吸收峰是 P-OH 的伸缩振动, 895 cm^{-1} 处出现 P-O-C 键的吸收峰, 表明有磷酸基团的接入, 多糖磷酸化修饰成功^[28]。

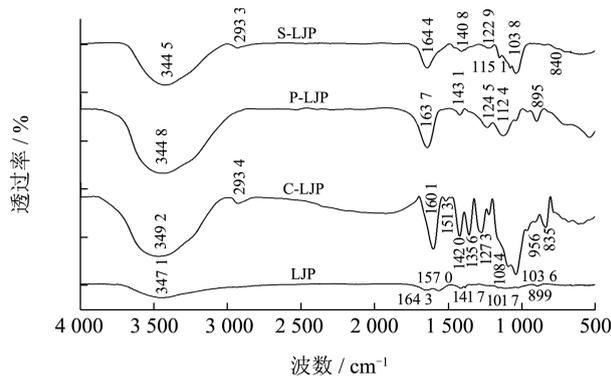


图 2 傅里叶变换红外光谱图

Fig.2 Fourier transform infrared spectrum

2.1.3 刚果红实验

如图 3 所示, 随着 NaOH 浓度的增加, LJP 与刚果红形成络合物的最大吸收波长发生明显红

移, 表明 LJP 具有三股螺旋结构; 当 NaOH 浓度超过 0.4 mol/L 时, 最大吸收波长急剧下降, 这可能是由于高浓度的 NaOH 使多糖结构发生变化, 由三股螺旋结构转变为无规则线团^[29]。C-LJP、S-LJP 和 P-LJP 与刚果红形成的络合物的最大吸收波长未表现出红移和急剧下降趋势, 故 LJP 的衍生物不具有三股螺旋结构, 说明不同方法修饰海带多糖均能够改变其空间结构, 这与张力妮^[30]对麦冬多糖的研究结果类似, 但修饰前后结构变化不一, 麦冬多糖中不存在三股螺旋结构, 而羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化麦冬多糖中存在三股螺旋结构。

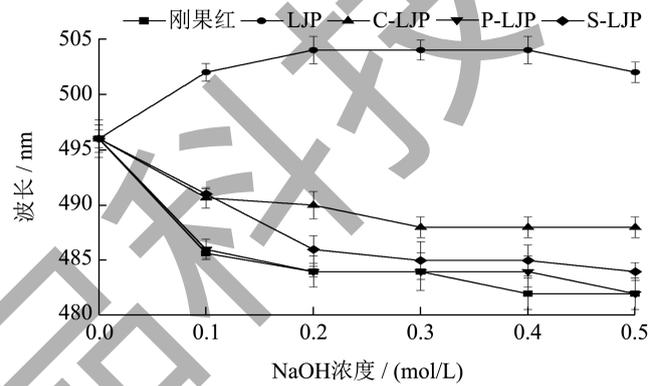


图 3 LJP 及其衍生物在不同 NaOH 浓度下最大吸收波长变化

Fig.3 The maximum absorption wavelength changes of LJP and its derivatives under different NaOH concentrations

表 1 LJP及其衍生物官能团的红外光谱分析

Table 1 Infrared spectroscopy analysis of functional groups of LJP and its derivatives

官能团	振动方式	吸收峰/(cm^{-1})				结构推断
		LJP	C-LJP	S-LJP	P-LJP	
-OH	O-H 伸缩振动	3 471	3 492	3 445	3 448	多糖的特征吸收峰
-CH ₂	C-H 伸缩振动、变角振动	—、1 417	2 934、1 420	2 933、1 408	—、1 431	
C=O	C=O 伸缩振动	1 643	—	1 644	1 637	可能存在糖醛酸
C-O-H C-O-C	C-O-H 和 C-O-C 结构产生 振动吸收	1 017	1 084	1 151	—	可能存在吡喃糖
-COOH	-COO- 的非对称和对称伸缩 振动吸收峰	—	1 601、1 513	—	—	羧甲基化的特征吸收峰
S=O	S=O 伸缩振动吸收	—	—	1 229	—	硫酸酯键的特征吸收峰
-O-SO ₃	C-O-S 伸缩振动	—	—	840	—	
P=O	P=O 键不对称伸缩振动	—	—	—	1 245	磷酸化的特征吸收峰
P-OH	P-OH 伸缩振动	—	—	—	1 124	
P-O-C	P-O-C 的特征吸收峰	—	—	—	895	

注: 表中“—”表示无相应吸收峰。

2.1.4 高碘酸氧化实验

高碘酸氧化反应结果如表 2 所示。LJP 消耗 1.65 mmol 高碘酸产生 0.38 mmol 甲酸，P-LJP 消耗 1.36 mmol 高碘酸产生 0.25 mmol 甲酸，反应中均有甲酸产生，表明 LJP 和 P-LJP 中存在 (1→6) 糖苷键，且高碘酸用量大于产生甲酸量的 2 倍，说明 LJP 和 P-LJP 中存在 (1→2、1→4) 糖苷键，只消耗高碘酸而不产生甲酸，可能存在 (1→3) 糖苷键，既不消耗高碘酸也不产生甲酸，LJP 和 P-LJP 糖苷键的摩尔比分别为 0.04:0.05:0.91、0.03:0.05:0.92。C-LJP 和 S-LJP 只消耗高碘酸不产生甲酸，说明存在 (1→2、1→4) 糖苷键，推测可能存在 (1→3) 糖苷键，C-LJP 和 S-LJP 糖苷键的摩尔比分别为 0.02:0.98、0.1:0.9，不同化学修饰均能改变海带多糖的糖苷键类型，但影响不一，这与巩晓佩等^[18]的研究结果不同，硫酸酯化修饰不改变红枣多糖的糖苷键类型，修饰前后红枣多糖的糖苷键类型均为 (1→6)、(1→2、1→4)、(1→3)。

表 2 高碘酸氧化结果分析

组别	反应时间/h	高碘酸总消耗量/ mmol	甲酸生成量/ mmol
LJP	30	1.65	0.38
C-LJP	30	0.42	0
S-LJP	24	1.78	0
P-LJP	30	1.36	0.25

注：LJP：海带多糖，C-LJP：羧甲基化海带多糖，S-LJP：硫酸酯化海带多糖，P-LJP：磷酸化海带多糖。下同。

2.2 自由基清除能力测定

2.2.1 对DPPH·的清除能力

LJP 及其衍生物均具有一定的 DPPH· 清除能力 (图 4)，修饰后 3 种多糖的 IC₅₀ 值均小于 LJP 的 IC₅₀ 值 (表 3)，说明不同方法修饰 LJP 后对 DPPH· 的清除能力均显著高于修饰前。当多糖质量浓度为 5 mg/mL 时，LJP、C-LJP、S-LJP 和 P-LJP 对 DPPH· 的清除率分别为 65.10%、72.48%、89.58%、74.22%，IC₅₀ 值分别为 1.69、1.32、1.03、1.18 mg/mL。与 LJP 相比，C-LJP、S-LJP 和 P-LJP 的清除率分别提高了 7.38%、24.48%、9.12%。田苏阳^[31]的研究结果表明，羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化修饰均显著提高当归多糖对 DPPH· 的清除能力，清除率分别提高了 15.09%、9.28%、6.76%。其中，S-LJP 对

DPPH· 的清除能力最强，P-LJP 对 DPPH· 的清除能力略高于 C-LJP 的清除能力，表明化学修饰能够显著提高 LJP 对 DPPH· 的清除能力，推测这是由于引入羧甲基基团、硫酸基团和磷酸基团改变了 LJP 的三股螺旋结构，使多糖糖链中更多羟基暴露，多糖的水溶性增强，从而对 DPPH· 的清除能力提高^[32]。

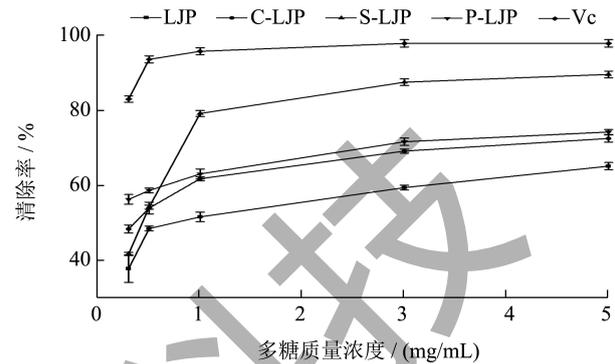


图 4 LJP 及其衍生物对 DPPH· 的清除能力

Fig.4 DPPH· scavenging ability of LJP and its derivatives

2.2.2 对·OH的清除能力

由图 5 可知，LJP 及其衍生物对 ·OH 均有一定的清除能力，且清除率与多糖质量浓度呈正比。在 0~3 mg/mL 范围内，P-LJP 的清除率急剧上升，3 mg/mL 时清除率达到最大值 99.32%，相较于 LJP 提高了 40.22%。当质量浓度为 5 mg/mL 时，C-LJP、S-LJP 和 LJP 对 ·OH 的清除率分别为 71.27%、24.28%、59.10%，C-LJP 较 LJP 的清除率提高了 12.17%，而 S-LJP 较 LJP 的清除率降低了 34.82%。羧甲基化、磷酸化修饰均能显著提升 LJP 对 ·OH 的清除能力，可能与单糖分子链上的羟基引入新的基团有关^[33]；但硫酸酯化修饰削弱了海带多糖对 ·OH 的清除能力，与李瑶等^[34]研究表明硫酸酯化显著提升紫菜多糖对 ·OH 的清除能力不同，说明硫酸酯化修饰对不同食用海藻多糖生物活性的影响存在差异。

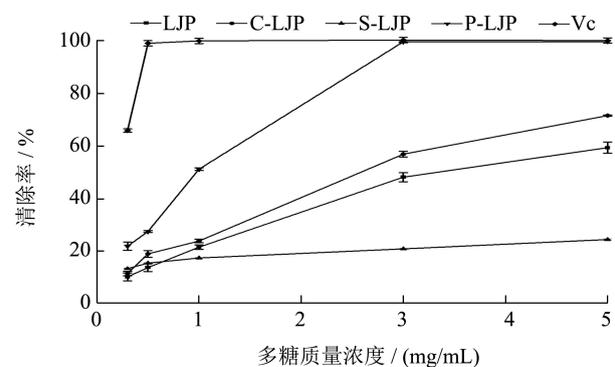


图 5 LJP 及其衍生物对 ·OH 的清除能力

Fig.5 ·OH scavenging ability of LJP and its derivatives

2.2.3 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力

如图6所示, LJP及其衍生物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率随多糖质量浓度的增加而升高。当质量浓度为5 mg/mL时, LJP、C-LJP、S-LJP和P-LJP对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率分别为20.48%、21.26%、25.64%、35%, IC_{50} 值分别为5.02、4.73、4.18、4.05 mg/mL(表3)。修饰后多糖的 IC_{50} 值均显著小于修饰前($P < 0.05$), 表明不同方法修饰均能够显著提高LJP对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力。陈放^[35]对苦瓜多糖的研究结果表明, 当质量浓度较低时(0~1.6 mg/mL), 羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化修饰能够提高苦瓜多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力, 当质量浓度为1 mg/mL时, 清除率分别提高了3.9%、16.5%、12.5%, 推测可能是由于化学修饰向多糖糖链中引入羧甲基基团、硫酸基团和磷酸基团等供电子基, 使多糖碳链上的电子密度增大, 从而提高了其对自由基的清除能力^[36]。

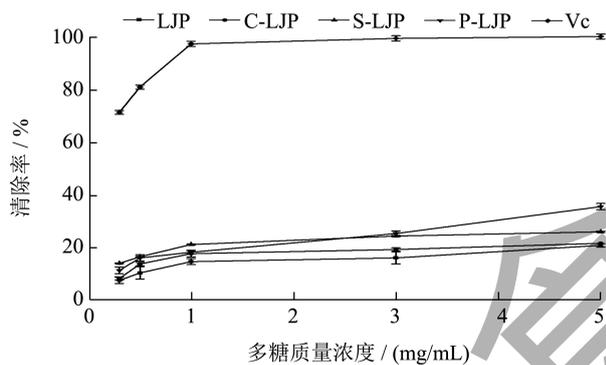


图6 LJP及其衍生物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力

Fig.6 $O_2^{\cdot-}$ scavenging ability of LJP and its derivatives

2.2.4 LJP及其衍生物自由基清除能力的综合得分

通过CRITIC法, 计算LJP及其衍生物对3种自由基的半数抑制质量浓度 IC_{50} 综合得分。由表3可知, LJP、C-LJP、S-LJP和P-LJP的 IC_{50} 综合得分分别为3.46、2.53、4.03、1.66 mg/mL。与LJP相比, C-LJP和P-LJP的 IC_{50} 综合得分显著降低, 而S-LJP的 IC_{50} 综合得分显著提高, 表明羧甲基化和磷酸化修饰能够显著提高LJP的自由基清除能力, 而硫酸化修饰削弱了LJP的自由基清除能力。其中, P-LJP的自由基清除能力最强, 推测可能是由于自由基清除能力与金属离子的转化有关^[37], 磷酸基团具有较高的亲核性可以与金属离子螯合, 故磷酸化修饰在提高LJP自由基清除能力上优于其他化学修饰方法^[35]。

表3 LJP及其衍生物对DPPH·、·OH、 $O_2^{\cdot-}$ 的半数抑制质量浓度 IC_{50} 及其综合得分

Table 3 IC_{50} and comprehensive score of LJP and its derivatives on DPPH·, ·OH, and $O_2^{\cdot-}$

多糖	IC_{50} /(mg/mL)			IC_{50} 综合得分
	DPPH·	·OH	$O_2^{\cdot-}$	
LJP	1.69 ± 0.05 ^a	3.43 ± 0.27 ^a	5.02 ± 0.10 ^a	3.46 ± 0.18 ^a
C-LJP	1.32 ± 0.03 ^b	2.32 ± 0.07 ^b	4.73 ± 0.00 ^b	2.53 ± 0.05 ^b
S-LJP	1.03 ± 0.00 ^c	4.39 ± 0.00 ^c	4.18 ± 0.00 ^c	4.03 ± 0.00 ^c
P-LJP	1.18 ± 0.02 ^d	1.32 ± 0.09 ^d	4.05 ± 0.07 ^d	1.66 ± 0.06 ^d

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异($P < 0.05$)。

3 结论

以海带多糖为原料, 通过羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化修饰得到三种多糖衍生物。傅里叶红外光谱分析表明海带多糖羧甲基化、硫酸酯化和磷酸化修饰成功, 刚果红实验显示海带多糖具有三股螺旋结构, 修饰后的三种多糖均不存在三股螺旋结构, 高碘酸氧化实验结果表明修饰前后海带多糖的糖苷键键型和摩尔比均发生变化。综合评价海带多糖及其衍生物的自由基半数抑制质量浓度 IC_{50} 得分分别为3.46、2.53、4.03、1.66 mg/mL, 表示磷酸化多糖的自由基清除能力最强, 羧甲基化多糖的自由基清除能力次之, 硫酸酯化多糖的自由基清除能力弱于海带多糖, 磷酸化修饰是提高海带多糖自由基清除能力的有效途径。采用Smith降解法、甲基化反应、电子显微镜、核磁共振等方法进行糖苷键的精准连接方式及多糖的高级结构解析, 建立较为完善的构效关系, 将是后续海带多糖进一步开发利用的方向和重点。

参考文献

- [1] 谢瑾, 林宗毅, 王智荣, 等. 海带多糖酶法降解及其产物生物活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(20): 23-27.
- [2] 杜彬, 冯金秀, 金文刚. 海带多糖结构解析以及生物活性研究进展[J]. 中国海洋药物, 2020, 39(1): 50-59.
- [3] 张涵, 殷澳, 张会佳, 等. 昆布多糖的复合酶法提取工艺优化及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 197-206.
- [4] XU N, YU P, ZHANG H, et al. Effects of *Laminaria japonica* polysaccharide and coumaric acid on pasting, rheological,

- retrogradation and structural properties of corn starch [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 263(P2): 130343.
- [5] 李文婧,张晨,李大鹏.化学修饰对多糖结构与生物活性影响的研究进展[J].*食品研究与开发*,2021,42(2):205-213.
- [6] 姚骏,张弘,郭森,等.海带的生物活性及系列产品开发研究进展[J].*食品研究与开发*,2018,39(8):198-202.
- [7] CAO Y Y, JI Y H, LIAO A M, et al. Effects of sulfated, phosphorylated and carboxymethylated modifications on the antioxidant activities *in-vitro* of polysaccharides sequentially extracted from *Amana edulis* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 887-896.
- [8] LIU T B, REN Q Q, WANG S, et al. Chemical modification of polysaccharides: a review of synthetic approaches, biological activity and the structure activity relationship [J]. *Molecules*, 2023, 28(16): 60-73.
- [9] XU Y, WU Y J, SUN P L, et al. Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 970-977.
- [10] 符玉霞.红枣多糖硫酸酯化、羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[D].石河子:石河子大学,2023.
- [11] 张遥遥,张梦,胡悦,等.黄精多糖的提纯、硫酸化和羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[J].*食品工业科技*,2019, 40(21):45-51.
- [12] 杨建安,张超,文焱炳,等.油茶籽粕多糖不同分子修饰产物的抗氧化活性[J].*中国油脂*,2022,47(10):143-148.
- [13] 冯书珍,卢宇凤,刘南英,等.海藻多糖的单糖组成对体外抗氧化活性的影响[J].*天然产物研究与开发*,2019, 31(1):116-121,169.
- [14] 田数,邢雨晴,李力群,等.裙带菜多糖的提取、羧甲基化修饰及抗氧化活性研究[J].*食品安全质量检测学报*, 2023,14(6):279-284.
- [15] 姚秋萍,李阳,邓健.硫酸酯化修饰的油菜花粉多糖的抗氧化活性[J].*食品科学*.2015,36(13):65-68.
- [16] XIA S L, ZHAI Y C, WANG X, et al. Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184: 946-954.
- [17] GUO Y, CONG S, ZHAO J, et al. The combination between cations and sulfated polysaccharide from abalone gonad (*Haliotis discus hannai* Ino) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 188: 54 -59.
- [18] 巩晓佩,张建,郭筱兵,等.硫酸化修饰对红枣多糖结构及抗氧化活性的影响[J].*食品与机械*,2022,38(4):29-34,120.
- [19] MA Y L, ZHU D Y, THAKUR K, et al. Antioxidant and antibacterial evaluation of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 92-101.
- [20] 刘融融,焦连庆,张婷,等.基于CRITIC法优化大叶冬青瞬时高温灭菌工艺[J].*中国农业科技导报*,2023,25(12):205-215.
- [21] 魏鑫悦,陈克保,关统伟.攀枝花黑松露多糖的抗氧化和降血糖活性[J].*现代食品科技*,2022,38(3):1-7.
- [22] SUN L J, MENG Y H, SUN J J, et al. Characterization, antioxidant activities and hepatoprotective effects of polysaccharides from pre-pressing separation *Fuji* apple peel [J]. *Cyta-Journal of Food*, 2017, 15(2): 307-319.
- [23] LIN X M, LIU K S, YIN S. A novel pectic polysaccharide of jujube pomace: structural analysis and intracellular antioxidant activities [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(2): 127.
- [24] 李灿,张慧慧,刘会平,等.裙带菜多糖羧甲基化修饰及降血糖活性[J].*食品研究与开发*,2024,45(6):60-68.
- [25] 符玉霞,郭欣,魏亚博,等.红枣多糖羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[J].*食品工业科技*,2022,43(17):104-113.
- [26] 马永强,张一鹏,王鑫,等.黄精多糖羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[J].*中国食品添加剂*,2023,34(6):38-47.
- [27] 符玉霞,郭欣,魏亚博,等.红枣多糖的硫酸酯化修饰及其结构特性的研究[J].*食品工业*,2022,43(8):33-38.
- [28] LI X L, TU X F, Thakur K, et al. Effects of different chemical modifications on the antioxidant activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 675-685.
- [29] LIU Y T, YOU Y X, LI Y W, et al. Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 355-362.
- [30] 张力妮.麦冬多糖的修饰、抗氧化活性以及结构的研究[D].西安:陕西师范大学,2014.
- [31] 田苏阳.当归多糖的提取、化学修饰、抗氧化活性及其结构的研究[D].西安:陕西师范大学,2016.
- [32] 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):84-91,110.
- [33] 罗昭勇,姜艳,余晓历,等.石斛多糖的结构特征、生物活性、构效关系及产品开发展进[J].*食品工业科技*,2024, 45(15):429-442.
- [34] 李瑶,熊欣琪,徐畅,等.紫菜多糖硫酸化修饰及生物活性分析[J].*食品工业科技*,2024,45(1):192-198.
- [35] 陈放.苦瓜多糖及其衍生物的制备和抗氧化活性研究[D].重庆:重庆师范大学,2021.
- [36] 张力妮,张静,孙润广,等.麦冬多糖的修饰及其抗氧化活性与空间结构的研究[J].*食品与生物技术学报*,2014, 33(1):27-33.
- [37] LI J J, HU X Z, LI X P, et al. Effects of acetylation on the emulsifying properties of *Artemisia sphaerocephala* Krasch. polysaccharide [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 144: 531-540.