

超声波提取的当归多糖化学修饰及其抗氧化活性研究

田苏阳¹, 郝长春^{1*}, 孙润广^{1*}, 梁涛², 王佳静¹

(1. 陕西师范大学, 物理学与信息技术学院, 西安 710062; 2. 陕西师范大学, 食品工程与营养科学学院, 西安 710062)

摘要: 采用超声波辅助法从当归中提取水溶性当归粗多糖 (ASP), 经过 4 种化学修饰分别得到硫酸化当归多糖 (S-ASP)、磷酸化当归多糖 (P-ASP)、乙酰化当归多糖 (Ac-ASP)、羧甲基化当归多糖 (C-ASP)。通过红外光谱对化学修饰前后 ASP 的结构进行表征, 并进行抗氧化活性和清除自由基能力的测定, 以获得一种抗氧化活性较强的当归多糖。结果显示: 经化学修饰后的 ASP 分别具有相应的特征吸收峰, 表明当归多糖的 4 种化学修饰均已成功; 经化学修饰的 4 种当归多糖总还原能力均弱于未修饰多糖, 且清除羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的能力无明显变化, 但清除 1,1-二苯基-2-苦苯肼 (DPPH \cdot) 自由基和抑制 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化反应的能力有所增强, 其中 P-ASP 清除超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 自由基的能力最强; Ac-ASP 抑制 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化反应的能力最强, 且均呈现出一定的量效关系。本实验结果为当归多糖的进一步研究与开发利用提供了一定的科学依据。

关键词: 当归多糖; 超声波提取; 化学修饰; 红外光谱; 抗氧化活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)04-0545-09

Study on Chemical Modification and Antioxidant Activity of *Angelica sinensis* Polysaccharide with Ultrasonic Extraction

TIAN Su-Yang¹, HAO Chang-Chun^{1*}, SUN Run-Guang^{1*}, LIANG Tao², WANG Jia-Jing¹

(1. College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Water soluble *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP) extracted from *Angelica sinensis* was obtained by ultrasonic extraction, and was chemically modified by sulfation, phosphorylation, acetylation and carboxymethylation. To obtain strong *Angelica sinensis* polysaccharide antioxidant activity, we used the infrared spectrum to characterize structure and study antioxidant activity. Results indicated that chemical modification of ASP had corresponding characteristic absorption peaks, namely the four kinds of chemical modification were successful. Different results were obtained by measuring antioxidant activity *in vitro* and the scavenging free radical capacity of the five kinds of polysaccharide. Total reducing power of the four modified polysaccharides was weaker than that of the unmodified ASP, and no obvious enhancement in scavenging hydroxyl radicals was observed in the modified polysaccharides, though the *in vitro* capacity of DPPH \cdot radical scavenging and inhibition of Fe^{2+} induced lipid peroxidation were enhanced. P-ASP was the strongest at scavenging the superoxide anion radical, Ac-ASP was the strongest at inhibiting Fe^{2+} induced lipid

收稿日期: 2015-01-17, 退修日期: 2015-02-17。

基金项目: 国家自然科学基金 (21402114); 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2012JQ1002); 中央高校基本科研业务费专项 (GK201402010)。

作者简介: 田苏阳 (1990-), 女, 硕士, 研究方向为天然产物化学 (E-mail: 695920484@qq.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: haochangchun@snnu.edu.cn)。

peroxidation, and they all showed a certain dose-effect relationship. The results of this study provide a scientific basis for the further study and development of *Angelica sinensis* polysaccharides.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide; Ultrasonic extraction; Chemical modification; Infrared spectroscopy; Antioxidant activity

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥根, 亦名干归、山蕲、白蕲、文无, 其味甘、辛、微苦, 性温, 归肝、心、脾经, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[1]。多糖是当归中的主要成分之一, 近年来对当归多糖药理学研究发现, 其对机体免疫系统发挥了多方面的调节作用^[2], 还对造血系统有促进作用^[2], 具有抗肿瘤^[3]、抗放射性损伤^[4]等作用。

传统的提取植物多糖的方法主要采用热水浸提法、酶提法、碱提法和酸提法等, 但这些提取方法都存在较多缺陷(如费时、耗能、成本高、收率低等)。近几年的研究表明, 超声波提取法作为一种过程强化手段是利用超声波的空化作用、机械作用、热效应等来增大物质分子的运动频率和速度, 从而提高目标成分浸出率^[5]。因此, 本文采用超声波提取法对当归多糖进行提取。

自由基是生物体内正常新陈代谢的中间产物, 是一类可以单独存在并具有高度氧化活性的、带有一个或几个不配对电子的分子或原子, 并对蛋白质、核酸、脂质等产生伤害, 从而导致机体损伤。而人体内外源性和内源性的高活性氧自由基对体内 DNA 和蛋白质等具有一定的破坏作用, 从而导致细胞死亡或组织损伤, 诱发肝硬化、动脉硬化、关节炎和癌症等疾病^[6]。研究表明, 小粒径负离子能够消减自由基, 减缓人体衰老, 增强人体免疫力^[7]。因此, 寻找一种抗氧化活性强的物质对人类健康至关重要。

本文采用超声波法提取当归多糖, 并对其进行 4 种化学修饰, 通过红外光谱检测其修饰效果, 再对化学修饰前后当归多糖进行体外抗氧化活性测定, 以判定当归多糖修饰前后的抗氧化活性的强弱及变化情况, 以期当归多糖的开发利用以及研究新型保健产品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 材料

当归(*Angelica sinensis*)购于西安欣桥中药材批发市场, 由陕西师范大学生命科学院植物学家肖亚萍教授鉴定。将当归根于 50℃ 烘干、粉碎, 过 60 目筛, 密封, 备用。

1.1.2 试剂

95%乙醇、无水乙醇、无水吡啶、氯磺酸、二甲基甲酰胺、氢氧化钠、氯化钠、三氯氧磷、乙酸酐、氯乙酸、异丙醇、盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、Tris、焦性没食子酸、邻二氮菲、硫酸亚铁、双氧水、1,1-二苯基-2-苦苯肼(DPPH·)自由基、硫代巴比妥酸、双蒸水、抗坏血酸(Vc)等, 均为分析纯。

1.1.3 仪器

高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司); HPX-9162 数显电热培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); JY98-IIIDN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); FD-1A 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器公司); Tensor 27 红外光谱仪(德国布鲁克); TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 当归粗多糖的提取

取烘干、粉碎的当归根进行超声、脱脂。脱脂条件: 料液比为 1:10, 95%乙醇; 超声波条件: 功率 400 W, 超声 10 s, 间歇 15 s, 总超声时间 30 min, 重复 3 次; 烘干。

取适量脱脂当归, 以 1:40 的料液质量体积比加入双蒸水, 搅拌使其混合均匀, 置于超声波细胞

粉碎机中提取当归粗多糖(超声提取条件同超声脱脂条件)。实验步骤: 4℃ 4000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 沉淀复溶, 重复提取 3 次, 混合 3 次提取液, 真空减压浓缩。浓缩液加入 4 倍体积的 95% 乙醇, 4℃ 静置 12 ~ 24 h 进行醇沉, 再离心 20 min 去上清液, 沉淀用少量双蒸水溶解, 装入透析袋流水透析 3 d, 离心, 取上清液进行冷冻干燥, 即得到灰色鳞片状超声波提取的当归粗多糖(ASP)。

1.2.2 当归多糖的化学修饰

(1) 硫酸化修饰

参照文献[8]的方法并略作改进制备磺化试剂。将带有冷凝管、滴液漏斗和搅拌装置的三口烧瓶固定放置于冰水浴中, 先加入 4.5 mL 无水吡啶, 开启搅拌装置, 再向滴液漏斗中加入 1.5 mL 氯磺酸(控制滴液速度, 约在 30 min 内滴加完成), 当瓶中出现淡黄色固体时, 即得到磺化试剂, 撤去冰水浴, 等待加样。

制备硫酸化多糖: 准确称取 0.1 g 当归多糖混悬于 5 mL 二甲基甲酰胺中, 超声处理 20 min 使其分散均匀, 然后缓慢加入到磺化试剂中并移至沸水浴反应 1 h, 待反应结束后向反应液中加入 7.5 mL 冰水, 持续搅拌并用 2.5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至中性, 再加入 3 倍体积的无水乙醇, 静置 12 ~ 24 h 析出沉淀, 离心去上清液, 沉淀复溶, 流水透析 3 d, 离心, 取上清液进行冷冻干燥, 即得到硫酸化当归多糖(S-ASP)。

(2) 磷酸化修饰

参照文献[9]的方法并略作改进。准确称取 0.1 g 当归多糖溶于 25 mL NaOH 溶液(pH 12)中, 先加入 0.5 g NaCl, 再加入 1.0 g 三氯氧磷, 于 55℃ 加热搅拌反应 1 h, 反应结束后冷却至室温, 持续搅拌并用 2.0 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至中性, 再加入 3 倍体积的无水乙醇, 静置 12 ~ 24 h 析出沉淀, 离心去上清液, 沉淀复溶, 流水透析 3 d, 离心, 取上清液进行冷冻干燥, 即得到磷酸化当归多糖(P-ASP)。

(3) 乙酰化修饰

参照文献[10]的方法并略作改进。准确称取 0.1 g 当归多糖混悬于 5 mL 二甲基甲酰胺中, 沸

水浴中加热搅拌 2 h 使其混合均匀, 再加入 0.17 g 乙酸酐于沸水浴中反应 2 h, 待反应结束后冷却至室温并加入 3 倍体积的无水乙醇, 静置 12 ~ 24 h 析出沉淀, 离心去上清液, 沉淀复溶, 流水透析 3 d, 离心, 取上清液进行冷冻干燥, 即得到乙酰化当归多糖(Ac-ASP)。

(4) 羧甲基化修饰

参照文献[11]的方法并略作改进。准确称取 0.1 g 当归多糖溶于 9 mL 20% NaOH 溶液中, 磁力搅拌 1 h 使其充分溶解, 加入 1.5 mL 4.0 mol/L 氯乙酸溶液(异丙醇配制), 于 55℃ 加热搅拌反应 5 h, 待反应结束后冷却至室温, 并用 2.0 mol/L HCl 溶液调节 pH 值至中性, 流水透析 3 d, 离心, 取上清液进行冷冻干燥, 即得到羧甲基化当归多糖(C-ASP)。

1.2.3 当归多糖的红外光谱(IR)表征

将制备的 ASP、S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP 和适量溴化钾(KBr)粉末置于 50℃ 烘箱中烘干 2 h, 去除水分, 避免影响扫描图谱。分别取适量烘干的 5 种当归多糖与 KBr 粉末以 1:100 混合, 充分研磨后压片, 在 4000 ~ 400 cm⁻¹ 范围内进行傅里叶变换红外光谱扫描。

1.2.4 当归多糖总还原力的测定方法

参照文献[12]的方法并略作改进。取 1 mL 浓度分别为 25、50、100、200、400、800 μg/mL 的 5 种多糖溶液(ASP、S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP)和 Vc 溶液于 10 mL 试管中, 分别加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)和 1.5 mL 铁氰化钾溶液(0.3% W/V), 于 50℃ 恒温水浴反应 30 min, 待反应结束后快速冷却, 加入 1 mL 三氯乙酸(10% W/V), 持续搅拌使其混合均匀, 离心(4000 r/min, 10 min), 取 2 mL 上清液, 加入 0.5 mL 三氯化铁溶液(0.3% W/V)并用 2 mL 蒸馏水稀释, 混合均匀后在 700 nm 波长处测定溶液的吸光值。每个浓度梯度分别设置 3 个平行组, 取其平均值。以 Vc 为阳性对照组。A₇₀₀ 值越大, 说明当归多糖的还原能力越强。

1.2.5 体外清除超氧阴离子(O₂⁻)自由基的测定方法

采用邻苯三酚自氧化法^[13]并略作改进。取

0.4 mL 浓度分别为 25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 种多糖溶液 (ASP、S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP) 和 Vc 溶液, 加入到 4.5 mL 25℃ 恒温水浴 20 min 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.2) 中, 再加入 0.1 mL 水浴保温的邻苯三酚溶液, 快速震荡混匀后于 25℃ 水浴反应 4 min, 立即加入 2 滴 HCl 溶液 (10 mol/L) 使反应终止, 于 325 nm 波长处测定溶液的吸光值。每个浓度梯度分别设置 3 个平行组, 取其平均值。以 Vc 为阳性对照组, 阴性对照组以等量双蒸水代替多糖样液, 空白组为 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液和 0.5 mL 双蒸水组成。

超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 自由基的清除率 = $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。其中, A_0 为阴性对照组在 325 nm 处的吸光值, A_1 为多糖样液在 325 nm 处的吸光值。

1.2.6 体外清除羟基 ($\cdot\text{OH}$) 自由基的测定方法

采用邻二氮菲-金属亚铁离子-双氧水体体系法^[14]并略作改进。取数个 10 mL 试管依次加入 1.5 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH 7.4)、1.5 mL 邻二氮菲溶液 (1.0 mmol/L)、1.0 mL 双氧水 (0.01% W/V)、1.0 mL 硫酸亚铁溶液 (1.5 mmol/L)、双蒸水, 取 1.0 mL 浓度分别为 25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 种多糖溶液 (ASP、S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP) 和 Vc 溶液分别加入到上述试管中, 震荡混匀后将所有试管于 37℃ 恒温水浴反应 1 h, 于 510 nm 波长处测定溶液的吸光值。每个浓度梯度分别设置 3 个平行组, 取其平均值。以 Vc 为阳性对照组, 损伤组以等量双蒸水代替多糖样液, 未损伤组以等量双蒸水代替多糖样液和 H_2O_2 , 空白组为 1.5 mL 磷酸盐缓冲液和 4.5 mL 双蒸水组成。

羟基 ($\cdot\text{OH}$) 自由基的清除率 = $(A_0 - A_1)/(A_2 - A_1) \times 100\%$ 。其中, A_0 为多糖样液在 510 nm 处的吸光值, A_1 为损伤组在 510 nm 处的吸光值, A_2 为未损伤组在 510 nm 处的吸光值。

1.2.7 体外清除 1,1-二苯基-2-苦苯肼 (DPPH \cdot) 自由基的测定方法^[15-17]

取数个 10 mL 试管分别加入 1.0 mL DPPH \cdot 溶液 (50% 乙醇配制, 0.1 mmol/L), 再分别加

入 0.5 mL 浓度分别为 25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 种多糖溶液 (ASP、S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP) 和 Vc 溶液, 震荡混合均匀后于 30℃ 下避光静置 30 min, 于 517 nm 波长处测定溶液的吸光值。每个浓度梯度分别设置 3 个平行组, 取其平均值。以 Vc 为阳性对照组, 阴性对照组以等量 95% 乙醇代替多糖样液, 空白组以等量 95% 乙醇代替多糖样液和 DPPH \cdot 溶液。

DPPH \cdot 的清除率 = $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。其中, A_1 为多糖样液在 517 nm 处的吸光值, A_0 为对照组在 517 nm 处的吸光值。

1.2.8 体外抑制 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化反应方法^[18,19]

由鸡蛋卵黄和磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 以 1:25 配制卵黄悬液, 磁力搅拌使之混合均匀, 取 0.2 mL 卵黄悬液于 10 mL 试管中, 加入 0.1 mL 浓度分别为 25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 种多糖溶液 (ASP、S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP) 和 Vc 溶液, 震荡混合均匀后加入 0.2 mL 硫酸亚铁溶液 (25 mmol/L), 再加入适量的磷酸盐缓冲液补足至 2.0 mL, 于 37℃ 恒温下震荡反应 15 min, 取出后加入 0.5 mL 三氟乙酸, 离心 (4000 r/min, 10 min), 取 2.0 mL 上清液加入 1.0 mL 硫代巴比妥酸 (1.0%), 加塞后于沸水浴反应 15 min, 待反应结束后冷却至室温, 于 532 nm 波长处测定溶液的吸光值。每个浓度梯度分别设置 3 个平行组, 取其平均值。以 Vc 为阳性对照组, 阴性对照组以等量双蒸水代替多糖样液, 空白组为 2.0 mL 磷酸盐缓冲液和 1.0 mL 硫代巴比妥酸组成。

脂质过氧化反应的抑制率 = $(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。其中, A_1 为多糖样液在 532 nm 处的吸光值, A_0 为对照组在 532 nm 处的吸光值。

2 结果与分析

2.1 当归多糖的红外光谱 (IR) 分析

对 ASP 红外光谱的分析结果显示 (图 1), 红外光谱的波长扫描范围为 4000 ~ 400 cm^{-1} 。其中, 基团在 3674.98 cm^{-1} 波长处的吸收峰 (3800 ~ 2500 cm^{-1} 范围内) 为 O-H ($\cdot\text{OH}$ 官能团) 的伸缩

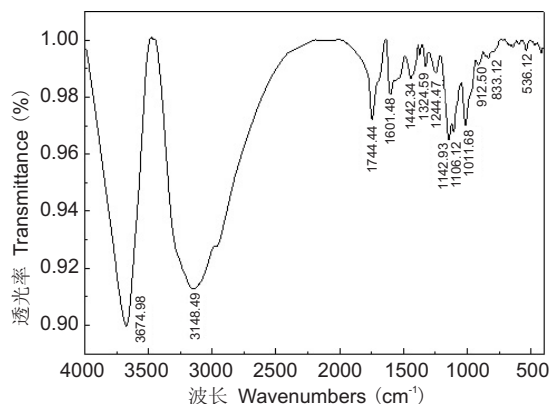


图1 ASP 红外光谱图
Fig. 1 IR spectrum of ASP

振动吸收峰; 在 3148.49 cm^{-1} 波长处 ($3300 \sim 2700\text{ cm}^{-1}$ 范围内) 为 C-H ($-\text{CH}^2$ -官能团) 的伸缩振动吸收峰; 在 1744.44 cm^{-1} 波长处为 C=O ($-\text{COOH}$ 或 $-\text{CHO}$ 官能团) 的伸缩振动吸收峰; 在 1601.48 cm^{-1} 波长处为 C-C 的伸缩振动吸收峰; 在 1442.34 cm^{-1} 波长处为 ($-\text{COOH}$) C-O 的弯曲振动吸收峰; 在 1324.59 cm^{-1} 波长处为 C-N 的伸缩振动吸收峰; 1244.47 、 1142.93 、 1106.12 、 1011.68 cm^{-1} 波长都处于 $1300 \sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 波长范围内, 为 C-O 的伸缩振动吸收峰; 912.50 cm^{-1} 波长处为 D 葡萄糖异构体的反对称环振动吸收峰^[20]; 833.12 cm^{-1} 波长处 ($855 \sim 833\text{ cm}^{-1}$ 范围内) 为 α -D-Glucose 的伸缩振动吸收峰^[21]; 536.12 cm^{-1} 波长处 ($600 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围内) 为吡喃环的特征吸收峰。

对 ASP 和 S-ASP 的红外光谱分析结果可见 (图 2), S-ASP 图谱在 1244.61 cm^{-1} 波长处有 S=O

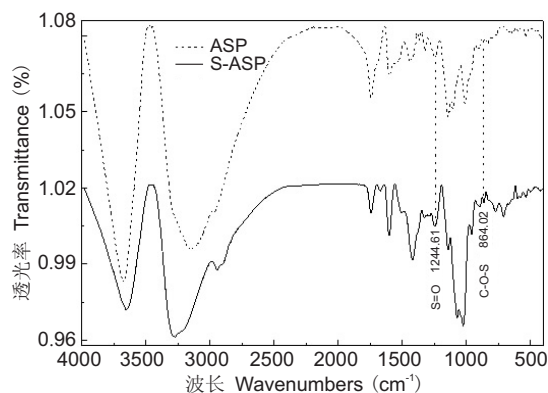


图2 ASP 和 S-ASP 红外光谱图
Fig. 2 IR spectrum of ASP and S-ASP

伸缩振动吸收峰, 864.02 cm^{-1} 波长处 ($950 \sim 800\text{ cm}^{-1}$ 范围内) 为 C-O-S 伸缩振动吸收峰, 表明残基被硫酸根基团取代, 即 ASP 的硫酸化修饰成功。

对 ASP 和 P-ASP 的红外光谱分析结果可见 (图 3), P-ASP 图谱在 1288.97 cm^{-1} 波长处有 P=O 伸缩振动吸收峰, 1077.25 cm^{-1} 波长处 ($1100 \sim 980\text{ cm}^{-1}$ 范围内) 为 P-O-C 的伸缩振动吸收峰, 表明残基被磷酸根基团取代, 即 ASP 的磷酸化修饰成功。

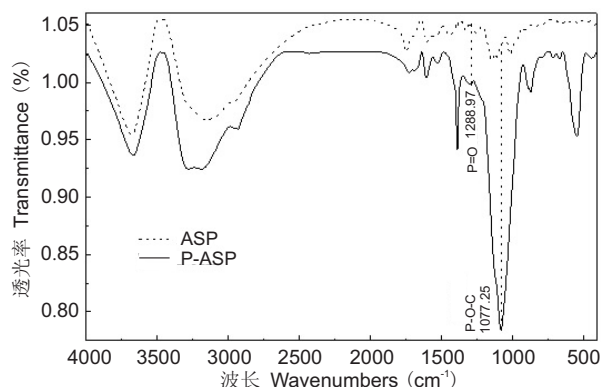


图3 ASP 和 P-ASP 红外光谱图
Fig. 3 IR spectrum of ASP and P-ASP

对 ASP 和 Ac-ASP 的红外光谱分析结果可见 (图 4), Ac-ASP 图谱在 1743.84 cm^{-1} 波长处有 C=O 伸缩振动吸收峰, 1249.78 cm^{-1} 波长处为 C-O 的伸缩振动吸收峰, 表明残基被乙酰基团取代, 即 ASP 的乙酰化修饰成功。

对 ASP 和 C-ASP 的红外光谱分析结果可见 (图 5), C-ASP 图谱在 1605.73 cm^{-1} 波长处 ($1640 \sim$

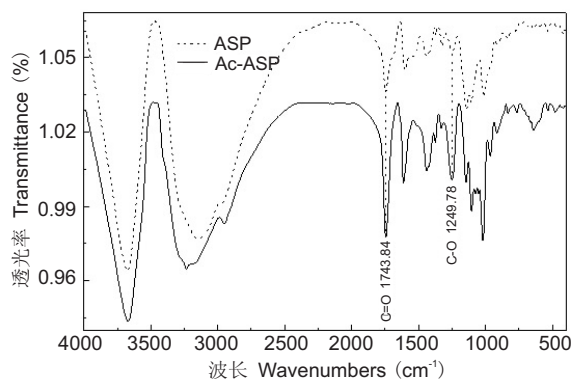


图4 ASP 和 Ac-ASP 红外光谱图
Fig. 4 IR spectrum of ASP and Ac-ASP

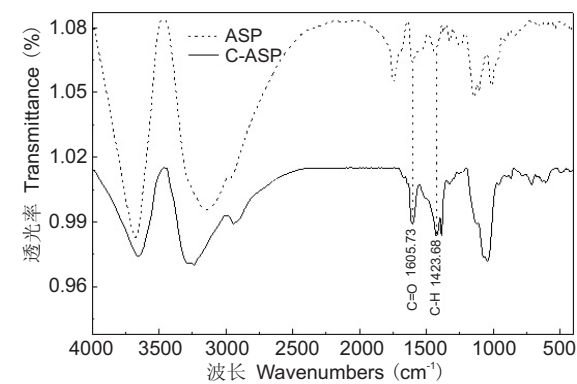


图 5 ASP 和 C-ASP 红外光谱图
Fig. 5 IR spectrum of ASP and C-ASP

1600 cm⁻¹ 范围内) 为 C = O 伸缩振动吸收峰, 1423.68 cm⁻¹ 波长处于 1430 ~ 1400 cm⁻¹ 范围内, 其峰值变大, 说明此峰是 C-H 变角振动吸收峰, 表明残基被羧甲基团取代, 即 ASP 的羧甲基化修饰成功。

2.2 当归多糖的总还原力分析

还原能力是抗氧化物质提供电子能力的重要指标, 抗氧化物质通过提供电子可将自由基变成稳定的分子, 从而失去活性。众多研究证实抗氧化活性与还原力密切相关^[22], 一般情况下, 还原能力越强, 其抗氧化能力也越强, 样液反应后在 700 nm 波长处的吸光值大小能直接反映其抗氧化活性的强弱。

对 ASP 和经化学修饰后的 4 种多糖 (S-ASP、P-ASP、Ac-ASP、C-ASP) 总还原力的分析结果可看出 (图 6), 5 种当归多糖都具有一定的还原能力,

并且随着多糖浓度的增加还原能力也增强, 呈现出较好的量效关系, 但经过化学修饰后, 多糖的还原能力不但无明显增强反而变弱, 可能是由于当归多糖的活性位点恰好被修饰基团所取代, 从而使还原能力变弱。其中, ASP 的还原能力高于 S-ASP、P-ASP、Ac-ASP 和 C-ASP; 在最高浓度 800 μg/mL 处, 4 种化学修饰后的多糖还原能力依次为 Ac-ASP > C-ASP > P-ASP > S-ASP; 5 种多糖的还原能力与 Vc 阳性对照组相比差别不大, 表明此 5 种多糖的还原能力较强。

2.3 当归多糖体外清除超氧阴离子 (O₂⁻) 自由基能力的分析

从当归多糖体外清除超氧阴离子 (O₂⁻) 自由基能力的测定结果可见 (图 7), 5 种多糖都具有一定的清除 O₂⁻ 能力, 并且随着多糖浓度的增加清除能力也增强, 并呈现出一定的量效关系。在最高浓度 800 μg/mL 处, P-ASP 的清除能力最强, 其次依次为 S-ASP、C-ASP、ASP 和 Ac-ASP, 清除率依次为 34.12%、28.42%、23.77%、21.37% 和 19.12%; 在最低浓度 25 μg/mL 处的清除能力由强到弱依次为 P-ASP、S-ASP、C-ASP、Ac-ASP 和 ASP; 在浓度为 50 μg/mL 处 Ac-ASP 的清除能力最弱。5 种多糖清除 O₂⁻ 能力均低于阳性对照 Vc, 经化学修饰后的多糖 (除乙酰化 Ac-ASP 外) 清除能力均高于未修饰多糖, 且 P-ASP 的清除能力最强, 这可能与多糖的水溶性和电负性相关。

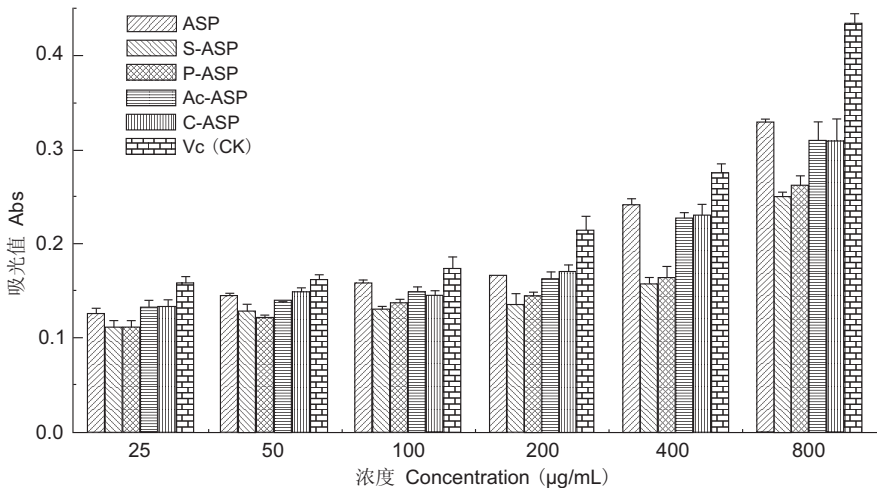


图 6 当归多糖的总还原力
Fig. 6 Total reducing power results of *Angelica sinensis* polysaccharides

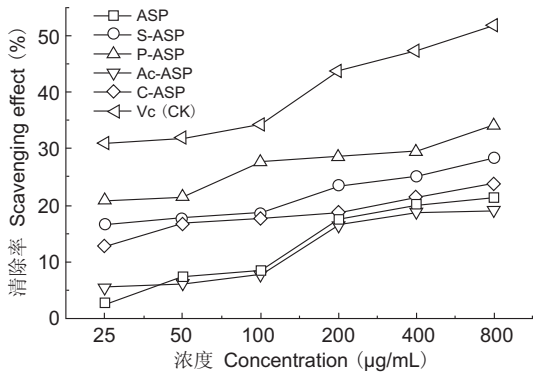


图 7 当归多糖体外清除超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)自由基的能力

Fig. 7 Scavenging superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) *in vitro* results of *Angelica sinensis* polysaccharides

2.4 当归多糖体外清除羟基($\cdot OH$)自由基能力的分析

从当归多糖体外清除羟基($\cdot OH$)自由基能力的测定结果可见(图 8), 5 种多糖随着浓度的增加清除 $\cdot OH$ 的能力也增强, 并呈现出一定的量效关系。其中, 当多糖浓度为 25 $\mu g/mL$ 时 P-ASP 的清除能力最强; 当多糖浓度为 100 $\mu g/mL$ 时 S-ASP 的清除能力最强, 其次依次为 ASP、Ac-ASP、P-ASP 和 C-ASP; 当多糖浓度高于 200 $\mu g/mL$ 时 ASP 的清除能力最强; 当多糖在最高浓度(800 $\mu g/mL$) 时清除能力由强到弱依次为 ASP、S-ASP、Ac-ASP、P-ASP 和 C-ASP, 清除率依次为 63.57%、29.89%、25.32%、25.19% 和 22.19%。5 种多糖清除 $\cdot OH$ 的能力均低于阳性对照 Vc, 经化学修饰后的当归多糖在浓度高于 200 $\mu g/mL$ 时清除能力

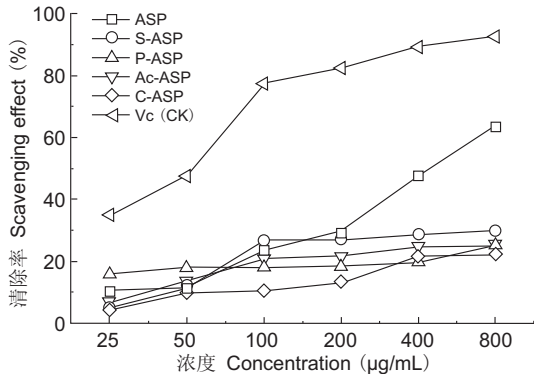


图 8 当归多糖体外清除羟基($\cdot OH$)自由基的能力

Fig. 8 Scavenging hydroxyl radical ($\cdot OH$) *in vitro* results of *Angelica sinensis* polysaccharides

均低于未修饰的当归多糖, 表明当归多糖在低浓度下虽具有一定的清除 $\cdot OH$ 能力, 但是, 由于反应机理的原因修饰后的当归多糖随浓度的增大清除 $\cdot OH$ 的能力无明显增强。

2.5 当归多糖体外清除 1,1-二苯基-2-苦苯肼(DPPH \cdot)自由基能力的分析

从当归多糖体外清除 DPPH \cdot 自由基能力的测定结果可见(图 9), 5 种多糖随着浓度的增加清除 DPPH \cdot 自由基的能力也增强, 并呈现出一定的量效关系。其中, 当多糖浓度在 25 ~ 200 $\mu g/mL$ 时 P-ASP 的清除能力最强; 多糖浓度在 25 ~ 100 $\mu g/mL$ 时 C-ASP 的清除能力最弱; 当多糖浓度高于 100 $\mu g/mL$ 时 ASP 的清除能力最弱且增加缓慢, 而化学修饰后的当归多糖和阳性对照 Vc 清除 DPPH \cdot 自由基的能力有明显增强, 表明对 DPPH \cdot 自由基的清除能力有一定的基团和剂量要求。在最高浓度 800 $\mu g/mL$ 时, 5 种当归多糖清除 DPPH \cdot 自由基的能力由强到弱依次为 Ac-ASP、C-ASP、S-ASP、P-ASP 和 ASP, 清除率依次为 31.91%、30.18%、24.37%、21.85% 和 15.09%。5 种当归多糖的清除能力均低于阳性对照 Vc, 经化学修饰后的多糖在浓度高于 100 $\mu g/mL$ 时清除能力均高于未修饰多糖。

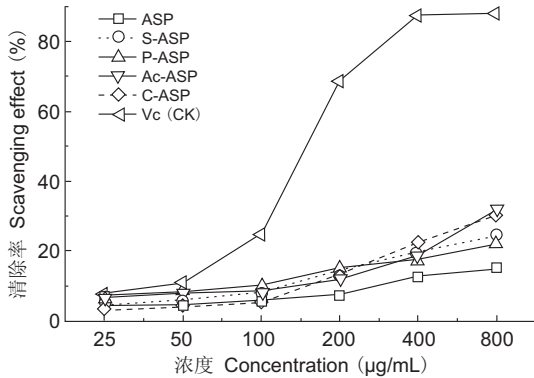


图 9 当归多糖体外清除 DPPH \cdot 自由基的能力

Fig. 9 Scavenging DPPH \cdot radical *in vitro* results of *Angelica sinensis* polysaccharides

2.6 当归多糖体外抑制 Fe²⁺诱发的脂质过氧化反应能力的分析

从测定结果可看出(图 10), 5 种多糖随着浓度的增加抑制 Fe²⁺ 诱发的脂质过氧化反应的能力也增强, 并呈现出一定的量效关系。其中, Ac-ASP

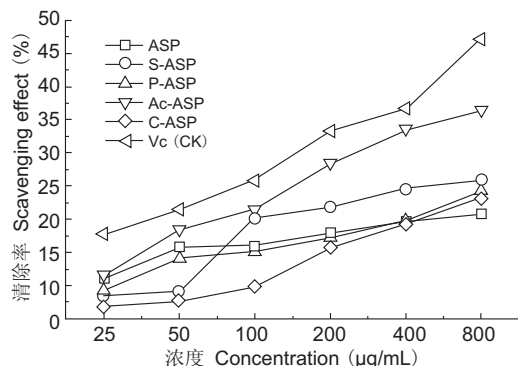


图10 当归多糖体外抑制 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化反应的能力

Fig. 10 Inhibition of Fe^{2+} induced lipid peroxidation *in vitro* results of *Angelica sinensis* polysaccharides

的抑制能力最强,当多糖浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 和50 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制能力由强到弱依次为Ac-ASP、ASP、P-ASP、S-ASP和C-ASP;当多糖浓度在50 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 时S-ASP的抑制能力增加最快;在多糖浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 和200 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制能力依次为Ac-ASP、S-ASP、ASP、P-ASP和C-ASP;在最大浓度800 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制能力由强到弱依次为Ac-ASP、S-ASP、P-ASP、C-ASP和ASP,清除率依次为36.45%、25.89%、24.30%、23.18%和20.85%。5种当归多糖的清除能力均低于阳性对照Vc,经化学修饰后的多糖在浓度为800 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制能力均高于未修饰多糖。

3 讨论

经化学修饰后的当归多糖(除乙酰化外)对超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)自由基的清除能力均高于未修饰多糖。水溶性物质分子中通常含有极性基团如-OH、-COOH等或不太长的碳链,而多糖具有电负性,同时包含水溶性基团,因此这可能与多糖的水溶性和电负性相关。未经修饰的当归多糖随着浓度的增大,清除羟基($\cdot\text{OH}$)自由基能力迅速增加。而经化学修饰后的多糖增长平缓,且当浓度大于200 $\mu\text{g/mL}$ 时,未经修饰的多糖清除能力均高于修饰多糖,表明当归多糖的某种活性位点由于修饰而被取代,使之不随浓度变化而变化。未经修饰的当归多糖随着浓度的增大,清除DPPH \cdot 自由基能力缓慢增加,而经化学修饰后的多糖在浓度大于100 $\mu\text{g/mL}$ 时,清除DPPH \cdot 自由基的能力有明显

增强,且均高于未修饰多糖,表明当归多糖对DPPH \cdot 自由基的清除能力与多糖的基团和剂量有一定量效关系,这与安静^[23]认为当归多糖呈剂量依赖性地清除DPPH \cdot 自由基的结果一致。本研究5种当归多糖对 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化反应都有一定的抑制作用,而且乙酰化修饰多糖的抑制作用最强。周鹏等^[24]认为多糖中乙酰基对多糖活性有影响,因为它能改变多糖分子的定向性,从而改变多糖的物理性质,乙酰基的引入最终导致多糖羟基基团的暴露,增加其在水中的溶解性。本实验对当归粗多糖进行4种化学修饰,结果表明其抗氧化活性各异,这可能是由于当归粗多糖中含有结合蛋白、糖肽等所致,还有待今后进一步的深入研究。

4 结论

(1)用超声波提取当归多糖,并通过硫酸化、磷酸化、羧甲基化和乙酰化修饰,经傅里叶变换红外光谱仪(IR)检测,各修饰多糖均存在相应的特征吸收峰,表明当归多糖的4种化学修饰均已成功。

(2)通过对化学修饰前后当归多糖5种抗氧化活性的测定表明,修饰后的多糖总还原能力和清除羟基($\cdot\text{OH}$)自由基的能力无明显增强,但清除超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)自由基(除乙酰化外)、DPPH \cdot 自由基和抑制 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化反应的能力均显著增强,且呈现出一定的量效关系,表明化学修饰后的当归多糖具有一定的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 韦玮,龚苏晓,张铁军,胡静. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2009,32(2):130-134.
- [3] Ming LJ, Ke Z, Qing SH, Chun LX, Peng S. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(3):713-722.
- [4] Lee SE, Oh H, Yang JA, Jo SK, Byun MW, Yee ST, Kim SH. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions: si-wu-tang

- and si-jun-zi-tang[J]. *Am J Chin Med*, 1999, 27(3-4): 387-396.
- [5] 王小梅, 孙润广. 超声对麦冬多糖体外活性影响的研究[J]. *声学技术*, 2012, 31(4): 103-106.
- [6] 张化朋, 张静, 南征, 孙润广, 张鹏, 刘阿娟, 梁涛. 杏鲍菇多糖 WPP2 的结构表征及抗肿瘤活性[J]. *高等学校化学学报*, 2013, 34(10): 2327-2333.
- [7] Hu WC, Yu LL, Wang MH. Antioxidant and anti-proliferative properties of water extract from *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. Leaves[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49: 799-806.
- [8] 杨淑娟, 胡元亮, 郭利伟, 赵晓娜, 范云鹏, 俞涛. 正交试验优选党参多糖的硫酸化工艺研究[J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1091-1094.
- [9] Muhammad K, Hussin F, Man YC, Ghazali HM, Kennedy JF. Effect of pH on phosphorylation of sago starch[J]. *Carbohydr Polym*, 2000, 42(1): 85-90.
- [10] 黄丹菲, 聂少平, 江乐明, 谢明勇. 乙酰化大粒车前子多糖的制备及其活性研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(22): 1-4.
- [11] 张力妮, 张静, 孙润广, 王小梅, 梁涛. 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.
- [12] 张泽庆, 张静, 张宏艳, 孙明礼, 柳红. 硫酸酯化防风多糖的制备及其抗氧化作用研究[J]. *中草药*, 2009, 40(8): 1208-1211.
- [13] 张璟, 欧仕益, 张宁. 麦麸酶解产品清除自由基的体外实验研究[J]. *营养学报*, 2005, 27(1): 25-29.
- [14] 柳红, 张静. 不同南瓜多糖体外清除羟基自由基作用的研究[J]. *武汉植物学研究*, 2007, 25(4): 356-359.
- [15] Koleva I I, Beek TAV, Linssen JPH, Groot AD, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods[J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13: 8-17.
- [16] Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity[J]. *Life Sci*, 2003, 73: 167-179.
- [17] Wang YF, Huang SR, Shao SH, Qian LS, Xu P. Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α -amylase *in vitro*[J]. *Ind Crops Prod*, 2012, 37: 520-526.
- [18] 张尔贤, 方黎, 张捷, 俞丽君, 肖湘. 菊花提取物的抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2000, 21(7): 6-9.
- [19] 张尔贤, 俞丽君, 周意琳, 肖湘. Fe^{2+} 诱发脂蛋白 PUFA 过氧化体系及对若干天然产物抗氧化作用的评价[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1996, 28(2): 218-222.
- [20] Barker SA, Bourne EJ, Stacey M, Whiffen DH. Infra-red spectra of carbohydrates. Part I. Some derivatives of D-glucopyranose[J]. *J Am Chem Soc*, 1954(4670): 171-176.
- [21] Yang LQ, Zhang LM. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources[J]. *Carbohydrate Polym*, 2009, 76(3): 349-361.
- [22] 阎娥, 刘建利, 原江锋, 张志琪. 蚕豆壳中原花青素的提取及抗氧化性研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(2): 65-67.
- [23] 安静. 当归提取物中不同组分配伍的协同抗炎、抗氧化作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014: 6.
- [24] 周鹏, 谢明勇, 傅博强. 多糖的结构研究[J]. *南昌大学学报: 理科版*, 2001, 25(2): 197-204.

(责任编辑: 张平)