

硫酸化川明参多糖的制备及其抗氧化活性

黄凯¹, 张舒婷¹, 轩华龙¹, 牟腊梅¹, 王心凌¹, 邱顺利¹, 唐华丽^{1,2*}, 陈林¹

(1. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404100)

(2. 渝东北特色生物资源开发利用工程中心, 重庆 404100)

摘要: 为提高川明参粗多糖 (*Chuanminshen violaceum* Polysaccharides, CVPs) 的生物活性, 通过超声辅助酶法提取川明参粗多糖, 采用浓硫酸法制备硫酸化川明参粗多糖 (Sulfated *Chuanminshen violaceum* Polysaccharides, S-CVPs), 利用 DEAE-52 及 Sephadex G-100 对硫酸化川明参粗多糖进行纯化, 通过傅里叶红外光谱观察到纯化后的硫酸化多糖在 $1\ 204\ \text{cm}^{-1}$ 、 $816\ \text{cm}^{-1}$ 处有硫酸基团的特征吸收, 并且在扫描电子显微镜下观察到硫酸化多糖出现了条纹状缝隙, 这样的结构更容易与水分子结合。HPGPC 和 HPLC 分析结果显示, 纯化的硫酸化川明参多糖组分 (Purified Sulfated *Chuanminshen violaceum* Polysaccharide Components, S-CVPs-I-G) 是一种分子量为 4.2 kDa 多糖聚合物, 其组成为葡萄糖 (Glc) 占 81.00%, 半乳糖 (Gal) 占 5.31%, 甘露糖 (Man) 占 4.54%, 以及半乳糖醛酸 (GalA) 占 3.52%。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, 结果显示, 各组分的抗氧化能力由高到低为 S-CVP-I-G>S-CVPs>CVPs。综上所述, 对 CVPs 进行硫酸化修饰可显著提升其体外抗氧化活性。此外, 通过分离纯化获得的高纯度多糖物质亦能有效增强其抗氧化能力。研究结果可为川明参的进一步开发利用提供依据。

关键词: 川明参粗多糖; 分离纯化; 硫酸化修饰; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2025)10-302-311

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.10.1057

Preparation of Sulfated *Chuanminshen violaceum* Polysaccharides and Their Antioxidant Activity

HUANG Kai¹, ZHANG Shuting¹, XUAN Hualong¹, MU Lamei¹, WANG Xinling¹,

QIU Shunli¹, TANG Huali^{1,2*}, CHEN Lin¹

(1. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

(2. Special Biological Resources Development and Utilization of Engineering Center of Northeast Chongqing, Chongqing 404100, China)

Abstract: To enhance the biological activity of *Chuanminshen violaceum* polysaccharides (CVPs), these polysaccharides were extracted using an ultrasonic-assisted enzymatic method and sulfated using the concentrated sulfuric acid method to produce sulfated CVPs (S-CVPs). The S-CVPs were then purified using DEAE-52 and Sephadex G-100 chromatography. Fourier-transform infrared spectroscopy revealed characteristic absorption bands of sulfate groups at $1\ 204$ and $816\ \text{cm}^{-1}$ in the purified S-CVPs. Scanning electron microscopy revealed striated gaps in the S-CVP structure, which could more readily bind water molecules. High-

引文格式:

黄凯,张舒婷,轩华龙,等.硫酸化川明参多糖的制备及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2025,41(10):302-311.

HUANG Kai, ZHANG Shuting, XUAN Hualong, et al. Preparation of sulfated *Chuanminshen violaceum* polysaccharides and their antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(10): 302-311.

收稿日期: 2024-07-22; 修回日期: 2024-09-25; 接受日期: 2024-09-26

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (CSTB2022NSCQ-MSX1661); 重庆市教委科研项目 (KJQN202201216); 重庆三峡学院研究生科研创新项目 (YJSKY24040)

作者简介: 黄凯 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物化学物与人体健康, E-mail: 2297863413@qq.com

通讯作者: 唐华丽 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物化学物与人体健康, E-mail: hualidfood@126.com

performance gel permeation chromatography and high-performance liquid chromatography analysis showed that the purified S-CVP fraction was a polysaccharide polymer with a molecular weight of 4.2 kDa, composed of 81.00% glucose, 5.31% galactose, 4.54% mannose, and 3.52% galacturonic acid. The *in vitro* antioxidant activity of the sulfated polysaccharides was assessed using DPPH, ABTS⁺, and OH radical scavenging assays. The antioxidant capacities of the fractions were ranked as follows: purified S-CVPs>S-CVPs>CVPs. In summary, sulfation of CVPs significantly enhances their *in vitro* antioxidant activity. Furthermore, the high-purity polysaccharides obtained through isolation and purification showed enhanced antioxidant capacity. These findings provide a basis for the further development and utilization of *C. violaceum*.

Key words: Chuanminshen violaceum polysaccharide; separation and purification; sulfation modification; antioxidant activity

川明参 (*Chuanminshen violaceum*) 又称沙参、明参、土明参、明沙参等, 属伞形科多年生草本植物, 主要在四川和湖北等地种植。川明参食用历史悠久, 常作为炖食或蒸食的药膳辅料, 作为药食同源的道地药材, 具有和中养胃、润肺止咳、健身养颜的功效, 因此川明参具有广阔的研究前景。据不完全统计, 川明参中的天然活性物质约有 200 余种, 主要有香豆素、萜类及多糖类化合物, 其中多糖含量 (wt.%) 达 20% 以上^[1]。作为主要活性物质之一的 CVPs, 具有免疫调节^[2]、抗氧化^[3]、调节肠道菌群及潜在的降血糖活性^[4]。目前研究表明, CVPs 虽有不同种类的生物活性, 但实际应用并不多, 这可能是由于天然的 CVPs 活性效果不突出的原因, 为了进一步拓宽川明参深加工市场, 需寻找合适的方法来提高其生物活性。

天然多糖领域, 有一些比较特殊的多糖, 如硫酸软骨素、甲壳素、壳聚糖等^[5], 这些多糖具有相对突出的生物活性, 而这些活性可能是因为多糖分子中含有特殊的基团 (如硫酸基团、氨基等), 因此通过化学修饰在天然多糖上引入新的基团成为了多糖领域的研究热点。研究表明, 部分天然多糖经过化学修饰后, 分子结构或空间构象发生改变, 使其具有比原多糖更高的生物活性。其中, 苗冰冰等^[6]对香菇柄多糖的硫酸化修饰研究中发现, 经过修饰的多糖具有更好的免疫调节功能。同时, Liu 等^[7]用硫酸化螺旋藻多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制研究说明, 通过硫酸化的螺旋藻多糖具有更好的降血糖功能, 曹磊等^[8]对圆苞车前子的硫酸化产物研究证明, 经过修饰的多糖具有更优异的抗氧化活性。因此, 在天然 CVPs 中引入硫酸基团成为提高川明参生物活性的一个研究方向。

因此, 本研究旨在通过对川明参粗多糖进行化学修饰, 特别是引入硫酸基团, 以提高其生物活性, 从而为川明参深加工和更广泛的应用提供科学依据。这不仅有助于挖掘川明参的潜在价值, 也为天然多糖的改性研究提供了新的思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂及仪器

1.1.1 实验材料

川明参购于重庆市万州区中药材批发市场, 经重庆三峡学院唐华丽教授鉴定为伞形科植物川明参的干燥根茎。

1.1.2 实验试剂

硫酸钾、葡萄糖、正丁醇、氯化钡、苯酚均为分析纯, 成都科隆化学品有限公司; 氯化钠、氢氧化钠、硫酸、三氯甲烷为分析纯, 重庆川东化工有限公司; 纤维素酶 (50 U/mg)、溴化钾、透析袋 (3 500 Da)、葡萄糖、半乳糖、甘露糖等单糖, 源叶科技有限公司; 葡聚糖 (1 kDa), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 右旋糖酐 (5~670 kDa), Sigma 公司; DEAE-52 纤维素、Sephadex G-100 葡聚糖凝胶, 索莱宝生物科技有限公司。

1.1.3 实验仪器

KQ-300B 超声清洗器, 昆山超声仪器有限公司; SP-576 紫外可见分光光度计, 上海菁华科技有限公司; FT-IR-8400S 傅里叶红外光谱仪, 日本岛津有限公司; TBD-2000 中压层析柱, 上海同田生物技术股份有限公司; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; DF-101S 集热式磁力加热搅拌器, 山东欧莱博仪器有限公司; 戴安 U3000 高效液相色谱仪, 美国 Thermo 公司; Waters 1515 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 CVPs的提取及纯化

参照课题组之前^[9]的提取方法对川明参粗多糖进行提取, 通过 Sevage 法除蛋白, 将除尽蛋白的样品浓缩后用三倍体积的无水乙醇进行醇沉过夜, 离心、收

集沉淀后溶解、透析、冻干,得到CVPs。以葡萄糖为标准品,用苯酚硫酸法对提取液中粗多糖含量(X)进行定量,根据公式(1)计算。

$$X = \frac{C \times V}{W} \times N \times 100\% \quad (1)$$

式中:

X—超声辅助酶水提醇沉法提取CVPs的得率%;

C—按标准曲线计算的多糖质量浓度, mg/mL;

V—多糖溶液体积, mL;

W—称取的川明参质量, g;

N—稀释倍数。

1.2.2 S-CVPs的制备

以李思雨^[10]的研究为基础,在实验方案上进行了部分改动,按比例(V/V)将30 mL浓硫酸和10 mL正丁醇加入到锥形瓶中,锥形瓶置于冰水浴的磁力搅拌器中,缓慢加入2.5 g硫酸铵,充分混匀之后加入2.0 g CVPs,反应1.5 h后,用4 mol/L的NaOH终止反应并调节pH为中性,旋蒸后将浓缩液转移到3 500 Da透析袋中透析48 h,收集透析液浓缩后冻干,即可得到S-CVPs。

1.2.3 硫酸化取代度的测定

1.2.3.1 标曲绘制

硫酸化取代度用氯化钡-明胶法进行测定^[11]。简而言之,吸取0.6 mg/mL硫酸钾标准储备液0、40、80、120、160、200 μL于试管中,用1 mol/L的HCl补齐至200 μL,加入0.3%三氯乙酸溶液3.8 mL和1 mL的氯化钡-明胶或明胶溶液,制得0、5、10、15、20、25 μg/mL系列标准液,在360 nm处测定吸光度,以标准液的吸光度作为纵坐标,硫酸根的质量浓度作为横坐标作图,得到标准曲线线性回归方程。

1.2.3.2 S-CVPs取代度测定

用1 mol/L的HCl将100 mg S-CVPs配置成质量浓度为10 mg/mL的样液,100 °C条件下水浴5 h,按1.2.3.1标准曲线硫酸基含量(wt.%)测定方法,取200 μL样液替代标准硫酸钾溶液在360 nm处测定吸光度。计算时将硫酸基含量代入下面公式进行计算。

$$W(S) = \frac{32 \times W(SO_4^{2-})}{96} \quad (2)$$

$$DS = \frac{1.62 \times W(S)}{32 - 1.02 \times W(S)} \quad (3)$$

式中:

$W(SO_4^{2-})$ ——硫酸基含量, wt.%;

$W(S)$ ——硫元素含量, %;

DS——取代度;

32、96、1.62、1.02—代表硫元素的原子量、硫酸基团

(-OSO₃H)的分子量、葡萄糖单元的分子量、校正后的硫元素质量分数。

1.2.4 S-CVPs的分离纯化

取一定量的S-CVPs(按1.2.2制备)溶于超纯水中,配制成质量浓度为20 mg/mL的样品溶液,10 000 r/min离心10 min,上清液用0.45 μm过滤器过滤,收集滤液备用。通过DEAE-52纤维柱(2.5×60 cm)进行层析,上样后,分别用0、0.1、0.3、0.5 mol/L的NaCl溶液进行洗脱,流速为1 mL/min,每管收集10 min,每个梯度收集40管。洗脱液用硫酸苯酚法^[9]在490 nm处测量吸光度,以吸光度为纵坐标,洗脱管数作横坐标作图。根据出峰位置收集洗脱液,经透析、冷冻干燥后得到初级纯化川明参多糖。分别标记为S-CVPs-1及S-CVPs-2。纯化多糖的得率(B)按公式(4)进行计算。

$$B = \frac{m_1}{m} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

B——多糖洗脱组分得率, %;

m——多糖进样质量, mg;

m_1 ——洗脱组分多糖的质量, mg。

称取适量的S-CVPs-1及S-CVPs-2,用超纯水配制成质量浓度为5 mg/mL的样品溶液,经离心、过滤后上样。在Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱(2.5×60 cm)上进行洗脱,流动相为超纯水,流速为1 mL/min,每管收集10 min,收集80管液体。洗脱液用硫酸苯酚法在490 nm处测量吸光度,以吸光度为纵坐标,洗脱管数作横坐标作图。根据出峰位置收集洗脱液,经透析、冷冻干燥后得到次级纯化组分,分别标记为S-CVPs-1-G和S-CVPs-2-G,纯化多糖的得率(W)按公式(3)进行计算。

1.2.5 理化指标测定

采用苯酚硫酸法、考马斯亮蓝法^[2]、硫酸咔唑法^[3]及氯化钡-明胶法分别对CVPs及洗脱组分的总糖、蛋白质及取代度进行测量。

1.2.6 傅里叶红外光谱分析

称取1.0 mg CVPs、S-CVPs及S-CVPs-1-G分别与100 mg KBr在红外灯下研磨均匀,压片后在4 000~400 cm⁻¹范围内进行红外光谱扫描^[9]。

1.2.7 紫外光谱分析

将CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G配制成质量浓度为0.1 mg/mL的多糖溶液,在200~400 nm处进行扫描^[10]。

1.2.8 扫描电镜分析

取一定量干燥的CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G固定

于样品架上,溅射喷金后使用扫描电子显微镜在 15 kV 加速电压下观察多糖表面特征和微观结构。

1.2.9 HPLC和HPGPC分析

1.2.9.1 HPLC 分析

按文献方法^[12]制备 PMP 衍生化多糖,备用。分析条件: ThermoU3000 液相色谱系统,色谱柱为 ZORBAX EclipseXDB-C18,流动相为乙腈:磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钾 12 g/L, 2 mol/L NaOH 调整 pH 值至 6.8)等度洗脱,乙腈和磷酸盐缓冲液的体积比为 17:83,流量为 0.8 mL/min,柱温 30 °C,检测波长 250 nm,进样量 10 μL。

1.2.9.2 HPGPC 分析

采用 HPGPC 法对分子量进行测定^[13],使用高效凝胶渗透色谱串联柱进行检测测试条件为色谱柱:聚合物基质水溶性 SEC(GFC)色谱柱(8×300 mm)3 根串联;流动相:0.05 mol/L NaCl 溶液;流速为 0.65 mL/min;柱温为 40 °C;进样量为 30 μL。

1.2.10 抗氧化活性测定

参照 Zhang 等^[14]的方法将 CVPs、S-CVPs 及 S-CVPs-1-G 配置成质量浓度为 0.5、1、2、3、4 mg/mL 的溶液,备用。

1.2.10.1 DPPH 自由基清除率

DPPH 自由基清除率参照 Luan 等^[15]的方法,取各多糖溶液与 DPPH 自由基醇溶液各 1 mL,混匀,避光反应 30 min,测定 517 nm 处的吸光度。以抗坏血酸为阳性对照,结果根据公式(5)计算:

$$R_1 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

R_1 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——样品组吸光度值;

A_2 ——蒸馏水代替 DPPH;

A_0 ——蒸馏水代替样品吸光度值。

1.2.10.2 ABTS⁺ 自由基清除率

参照 Yuan 等^[16]的方法,取各多糖溶液 0.2 mL 与 1.8 mL ABTS⁺ 自由基溶液混匀,避光反应 30 min,测定 734 nm 处的吸光度。以抗坏血酸为阳性对照,结果根据公式(6)计算:

$$R_2 = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (6)$$

式中:

R_2 ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_1 ——样品组吸光度值;

A_2 ——蒸馏水代替 ABTS 吸光度值;

A_0 ——蒸馏水代替样品吸光度值。

1.2.10.3 OH 自由基清除率

取 1 mL 各多糖溶液,依次加入 9 mmol/L 硫酸亚铁、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液和 3% 质量分数的 H₂O₂ 溶液各 1 mL,混匀后在 40 °C 下反应 1 h,测定溶液在 510 nm 处的吸光度,以抗坏血酸为阳性对照,结果根据公式(7)计算:

$$R_3 = (1 - \frac{A_1 - A_0}{A_2}) \times 100\% \quad (7)$$

式中:

R_3 ——OH 自由基清除率, %;

A_1 ——样品组吸光度值;

A_2 ——蒸馏水代替样品吸光度值;

A_0 ——蒸馏水不加 H₂O₂ 吸光度值。

1.2.10.4 总还原力

参照 Luan 等^[15]的方法并略有修改,取 1 mL 各多糖溶液,依次加入 1.25 mL 磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 值 6.6),1.25 mL 1% 质量分数的 K₃Fe(CN)₆ 溶液后混匀,50 °C 水浴 20 min,加入 1.25 mL 10% 的 CHCl₃COOH 溶液,充分混匀,吸取 1.25 mL 混合液,依次加入 1.25 mL 蒸馏水,0.25 mL 10 wt.% 的 FeCl₃ 溶液,以蒸馏水作空白,在 700 nm 处测定吸光度,以抗坏血酸为阳性对照。

1.2.11 数据统计与分析

采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(ANOVA)及组间差异性比较;OMNIC 8.0 软件对傅里叶红外光谱数据整理;Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 S-CVPs的取代度

由超声辅助酶法提取 CVPs,以葡萄糖为标准品,通过硫酸苯酚法测得标准曲线方程为 $y=0.5982x-0.0125$, $R^2=0.9972$,计算 CVPs 提取率(wt.%)为 14.32%。

2.2 S-CVPs的分离纯化

由图 1 可知, S-CVPs 经 DEAE-52 阴离子交换柱洗脱后,仅有两个主要成分,分别标记为 S-CVPs-1 和 S-CVPs-2,其中 S-CVPs-1 为超纯水洗脱的组分,属中性多糖, S-CVPs-2 为 0.1 mol/L NaCl 洗脱的组分,属酸性多糖^[17]。收集每个单一组分,透析、冻干后回收。S-CVPs-1 和 S-CVPs-2 的得率质量分数分别为 17.99% 和 9.41%, S-CVPs-1 的峰形对称性及均一性强于 S-CVPs-2,同时, S-CVPs-1 的 DPPH 清除率及总还原力也强于 S-CVPs-2。

将分离的组分 S-CVPs-1 和 S-CVPs-2 用葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-100 进行洗脱, 收集组分并分别标记为 S-CVPs-1-G 和 S-CVPs-2-G, 结果如图 2 所示, 两者流出图, 峰形尖锐且单一, 这表明 S-CVPs-1-G 和 S-CVPs-2-G 纯化效果良好, 其得率分别为 50.3% 和 38.75%。

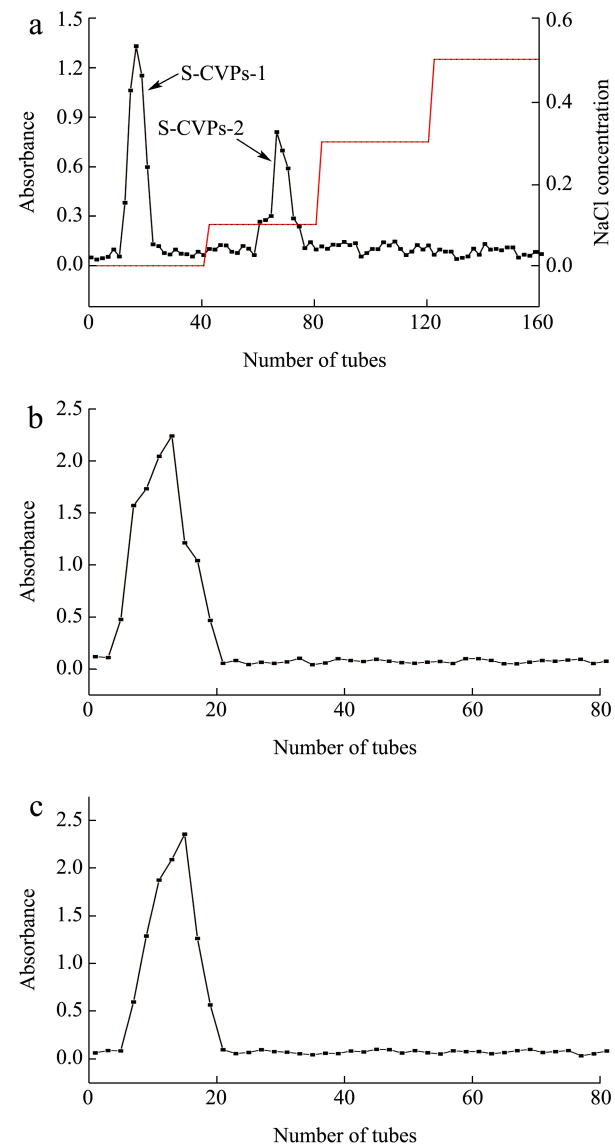


图 1 DEAE-52 阴离子交换柱洗脱图及 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶洗脱图

Fig.1 DEAE-52 anion-exchange columns elution plot and Sephadex G-100 dextran gel elution plot

表 1 S-CVPs-1和S-CVPs-2组分得率及抗氧化活性对比分析

Table 1 Comparative analysis of the yield and antioxidant activity of S-CVPs-1 and S-CVPs-2 components

洗脱组分	得率/(wt.%)	DPPH 清除率/%	总还原力
S-CVPs-1	17.99 ± 0.81 ^a	64.35 ± 1.84 ^a	0.98 ± 0.04 ^a
S-CVPs-2	9.41 ± 0.61 ^b	52.72 ± 2.91 ^b	0.61 ± 0.03 ^b

注: 表格中数据表示方式为 (平均值 ± 标准误差), 字母表示同列数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.3 理化指标测定

按 1.2.5 的方法测定理化指标, 其中标准曲线 R^2 均大于 0.99, 其中考马斯亮蓝法、硫酸咔唑法及氯化钼-明胶法回归方程分别为 $y=0.639\ 7x-0.023\ 2$ 、 $y=0.009\ 2x+0.032\ 4$ 、 $y=0.037x+0.137$ 。结果如表 2 所示, 其中总糖在硫酸化修饰后出现了下降, 由 85.76% 下降到了 72.33%, 这可能是由于部分多糖碳化所致^[18], 同时, 蛋白质含量有所提升, 可能是由于其他组分降低, 蛋白质相对占比上升^[8], 除此之外, S-CVPs-1-G 糖醛酸含量略高于 CVPs。

表 2 CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G和S-CVPs-2-G 组分化学成分对比

Table 2 Chemical composition comparison of CVPs, S-CVPs, S-CVPs-1-G, and S-CVPs-2-G components

组分	总糖/ (wt.%)	蛋白质/ (wt.%)	糖醛酸/ (wt.%)	取代度
CVPs	85.76 ± 2.36 ^c	5.25 ± 0.78 ^b	1.49 ± 0.35 ^{a, b}	—
S-CVPs	72.33 ± 1.56 ^d	6.19 ± 0.98 ^a	2.15 ± 0.45 ^a	0.58 ± 0.06 ^a
S-CVPs-1-G	93.92 ± 2.54 ^a	—	1.98 ± 0.43 ^a	0.40 ± 0.04 ^b
S-CVPs-2-G	90.23 ± 1.96 ^b	—	1.23 ± 0.25 ^b	0.22 ± 0.02 ^c

注: 表格中数据表示方式为 (平均值 ± 标准误差), 文中字母表示同列数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$; “—” 表示低于方法检测限。

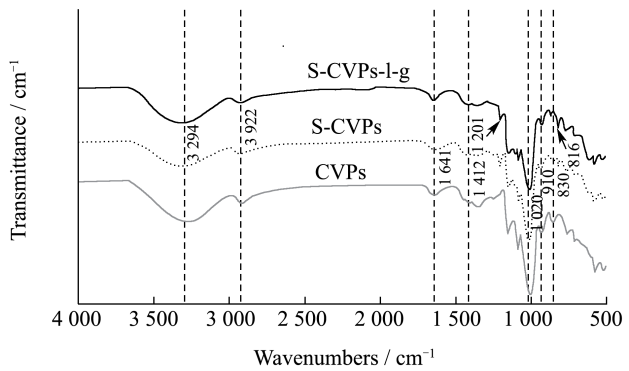


图 2 FT-IR 光谱图

Fig.2 FT-IR spectra

2.4 红外光谱分析

根据图 2 可知, 硫酸化后的多糖不仅含有原多糖的官能团, 修饰成功后, 部分特征官能团随之发生了改变。图中 1 020~1 200、2 922 和 3 294 cm^{-1} 出的吸收峰为多糖的特征吸收峰^[19,20], 1 020 ~1 200 cm^{-1} 处的吸收峰是由吡喃糖环所致, CVPs、S-CVPs-1-G 与 S-CVPs 的特征吸收峰高度相似, 这表明三种多糖间具有相同的官能团, 3 294 cm^{-1} 处代表 O-H 的伸缩振动, 表明两者之间存在分子键和分子内氢键, 同时, S-CVPs-1-G

与 S-CVPs 在 $3\,294\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰有变窄变弱的情况,可能是硫酸基团取代了部分 O-H 的位置,使得 O-H 的伸缩振动程度减弱^[21],这是硫酸化多糖取代成功的典型标志之一,除此之外,修饰后的 $1\,204$ 、 816 cm^{-1} 分别对应硫酸基团 S=O 的不对称拉伸振动及 C-O-S 的振动吸收峰,因此可推断 S-CVPs-1-G 与 S-CVPs 硫酸化修饰成功。 850 cm^{-1} 和 930 cm^{-1} 处的吸收峰表明川明参多糖既有 α -糖苷键,又有 β -糖苷键^[1],且硫酸化修饰不会影响原多糖的糖苷键构型。

2.5 紫外光谱分析

图 3 为 CVPs、S-CVPs 及 S-CVPs-1-G 的紫外光谱扫描图,可以看出 CVPs 和 S-CVPs 在 260 nm 和 280 nm 处曲线有少量突起,这表明川明参粗多糖及硫酸化后的粗多糖均存在少量蛋白质,而通过纯化后, S-CVPs-1-G 在 260 nm 和 280 nm 的吸收峰明显减小,且图谱趋于平缓,这表明,通过分离柱之后,蛋白质及核酸等小分子已经基本去除。

2.6 SEM分析

图 4 为 CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G 的电子显微镜扫描图,可见三个多糖样品的微观结构存在显著差异, CVPs 存在纤维丝状结构,而硫酸化修饰的多糖不

存在相似结构,对比三者 300、500、1 000 放大倍数下的外貌特征,可以看出 CVPs (图 4a) 外貌呈片带状,而 S-CVPs (图 4d)、S-CVPs-1-G (图 4g) 呈不规则的片状,且片状结构更小,这可能是由于硫酸化强烈的酸性条件破坏了多糖的结构导致^[22]。500 倍放大倍数下,可以看到 S-CVPs 中含有部分球状多糖 (图 4e),这可能是来自于 CVPs 分子末端的球状颗粒 (图 4b),而纯化之后,该部分多糖颗粒并未出现,可能在分离纯化过程中去除。在 1 000 倍放大倍数下可见 S-CVPs-1-G (图 4m) 表面具有条纹状缝隙,这样的形态特征会使多糖具有更大的表面积,可与更多的水分子相结合,因此推断 S-CVPs-1-G 具有更高的溶解性^[23]。

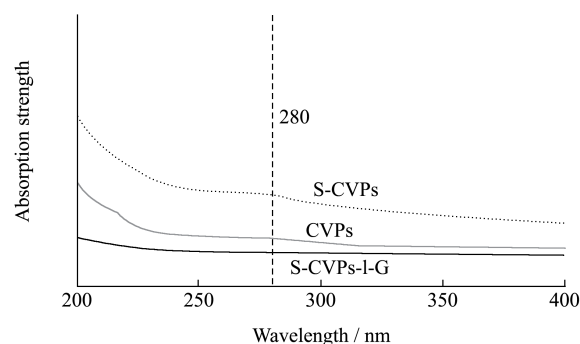


图 3 UV 光谱图

Fig.3 UV spectra

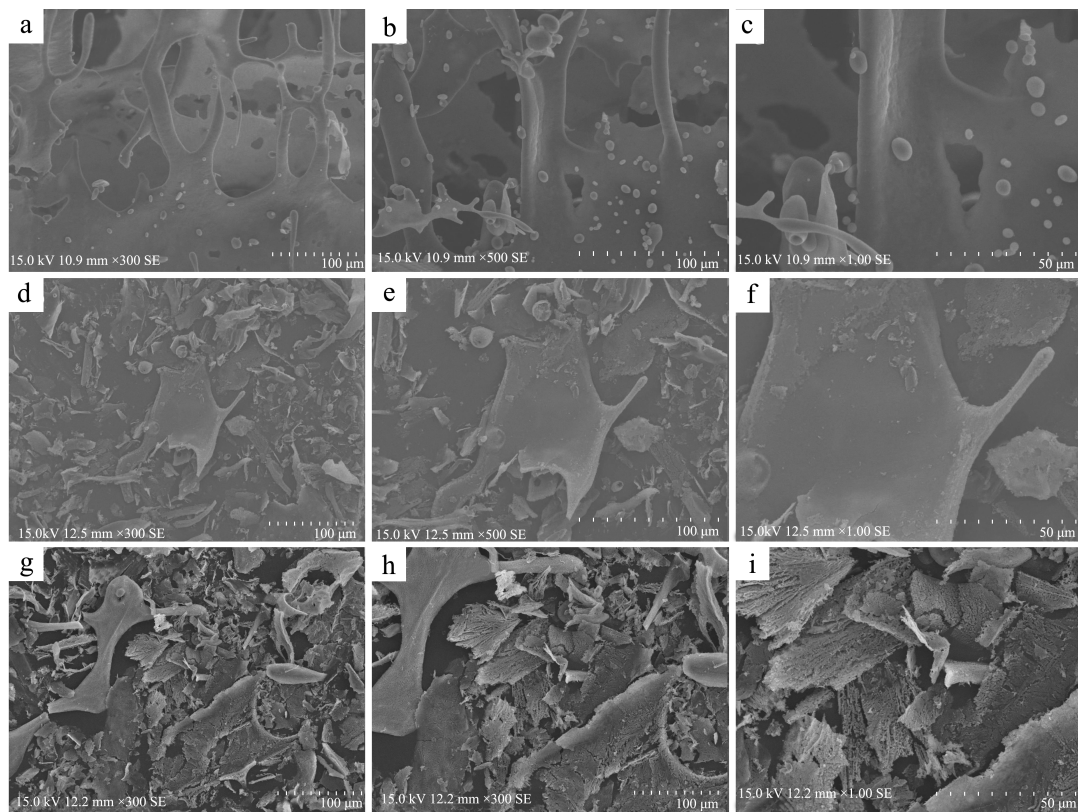


图 4 CVPs、S-CVPs 和 S-CVPs-1-G 的电镜扫描结构图

Fig.4 Electron microscope scanning structure of CVPs, S-CVPs and S-CVPs-1-G

注: a、d、g 为 300 倍放大倍数下的外貌形态, b、e、h 为 500 倍放大倍数下的外貌形态, c、f、i 为 1 000 倍放大倍数下的外貌形态。

表 3 S-CVPs-1-G单糖组成表							
Table 3 S-CVPs-1-G table of monosaccharide composition							
单糖	检测结果的质量浓度/(μg/mL)						
	Man	GlcN	Rha	GlcA	GalA	Glc	Gal
质量浓度	28.16	6.78	16.12	11.98	21.80	501.97	32.92

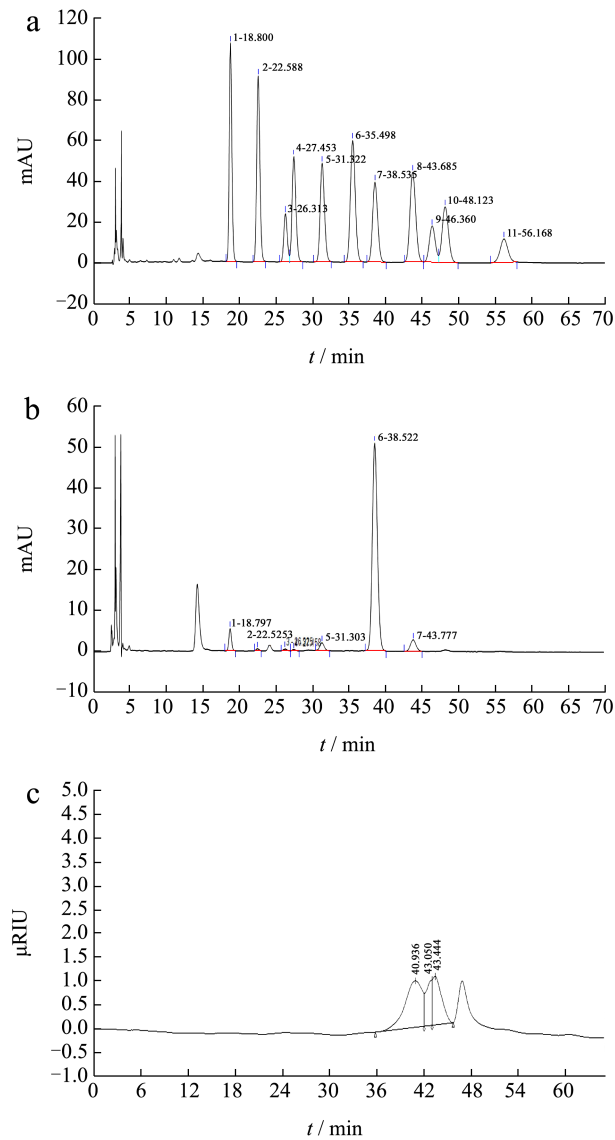


图 5 标准品流出图 (a) 及 S-CVPs-1-G 的单糖组成 (b) 和分子量 (c)

Fig.5 Standard product elution profile (a) and the monosaccharide composition (b) and molecular weight (c) of S-CVPs-1-G

2.7 单糖组成及分子量

采用 HPLC 对 S-CVPs-1-G 的单糖组成进行分析, 外标法定量。各单糖组成含量如表 3 和图 5b 所示, 葡萄糖含量最高, S-CVPs-1-G 主要成分为葡萄糖 (Glc) 占 81.00%、半乳糖 (Gal) 占 5.31% 及甘露糖 (Man) 占 4.54%。除此之外, 通过 HPGPC 对分子量进行测

定, 结果如图 5c 所示, S-CVPs-1-G 是一种分子量为 4.2 kDa 的多糖聚合物^[24], 可能是反应体系中的强烈酸性使糖链断裂^[25,26], 将 S-CVPs-1-G 分裂成分子量不均一的两个的聚合物, 在巩晓佩^[24]的研究中, 原多糖在不同比例硫酸化试剂处理下也产生了不同分子量的吸收峰。

2.8 抗氧化活性

自由基作为代谢产物, 在生物体系中一般处于动态平衡, 由于其化学性质极其活跃, 会从临近的细胞掠夺电子, 从而损伤机体的组织和细胞, 导致细胞衰老或凋亡。同时, 研究表明自由基还与多种慢性疾病有关, 包括动脉粥样硬化、风湿病、癌症等^[27,28]。因此, 采用 ABTS 阳离子自由基清除率、DPPH 自由基清除率、OH 清除率、总还原力对 CVPs 的体外抗氧化活性进行考察。

表 4 CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G 及 Vc 的抗氧化活性 IC₅₀ 值

Table 4 The antioxidant activity IC₅₀ values of CVPs, S-CVPs, S-CVPs-1-G, and Vc

组分	质量浓度/(mg/mL)		
	DPPH 自由基清除率 IC ₅₀	ABTS ⁺ 自由基清除率 IC ₅₀	OH 自由基清除率 IC ₅₀
S-CVPs-1-G	1.08 ± 0.08 ^b	1.11 ± 0.01 ^b	0.68 ± 0.02 ^b
CVPs	6.38 ± 0.40 ^d	1.48 ± 0.02 ^d	1.37 ± 0.20 ^d
S-CVPs	5.24 ± 0.41 ^c	1.29 ± 0.01 ^c	0.90 ± 0.05 ^c
Vc	0.00 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.03 ^a	0 ^a

注: 表格中数据表示方式为 (平均值 ± 标准误差), 文中字母表示同列数据之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

2.8.1 DPPH 自由基清除率

DPPH 是一种以氮为中心的自由基, 它能够被提供氢原子的抗氧化剂迅速还原。因此, DPPH 常作为一种既有效又灵敏的抗氧化检测手段, 用于评估天然化合物的抗氧化能力。通过图 6 可以看出, 当多糖质量浓度由 0.5 mg/mL 增加到 4 mg/mL 时, CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G 及 Vc 对 DPPH 自由基的清除率随之增加, 清除率分别达到了 45.12%、50.7%、82.83% 和 98.50%, 其中 S-CVPs 与 CVPs 相比, 清除率提升了 5.6%, 各多糖组分中, S-CVPs-1-G 的清除效果最佳, 仅次于 Vc 的效果。S-CVPs、S-CVPs-1-G 及 Vc 对 DPPH 自由基清除能力的 IC₅₀ 如表 4 所示, 分别为 6.38、5.24、1.08 以及 0.01 mg/mL, 从 IC₅₀ 上也能看出纯化组分 S-CVPs-1-G 的效果显著优于 CVPs 和 S-CVPs, 这表明提高 S-CVPs-1-G 纯度有助于提高其抗氧化活性^[29]。

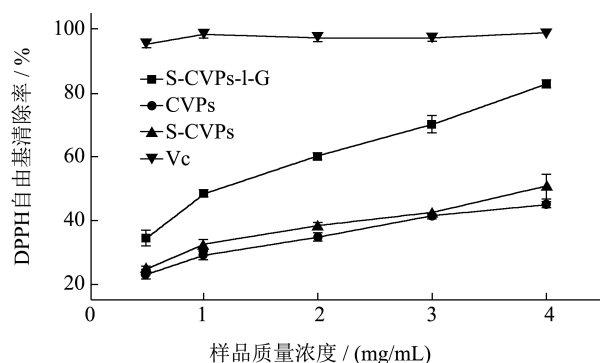
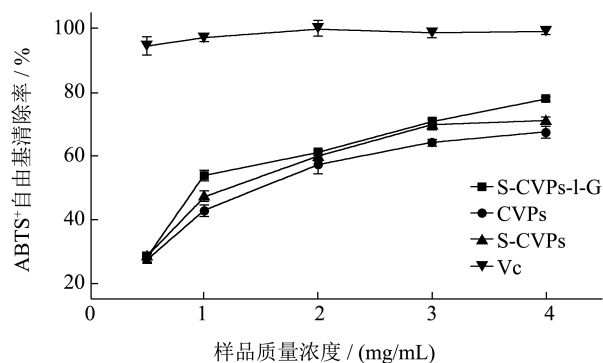


图6 CVPs、S-CVPs和S-CVPs-1-G的DPPH清除率

Fig.6 DPPH clearance of CVPs, S-CVPs and S-CVPs-1-G

2.8.2 ABTS⁺自由基清除率

通过图7可以看出CVPs、S-CVPs及S-CVPs-1-G对ABTS⁺自由基的清除能力随着质量浓度的增加而升高,在0.5~4 mg/mL范围内,呈现出浓度依赖性。在4 mg/mL时,CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G及Vc对ABTS⁺自由基的清除率分别为67.37%、71.08%、77.32%和98.99%,同时,在表4中可知,CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G及Vc对ABTS⁺自由基的清除率的IC₅₀分别为1.48、1.29、1.11以及0.04 mg/mL。结果表明CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G对ABTS⁺自由基均有抑制作用,并且CVPs与Lin等^[30]的清除效果较为接近。S-CVPs的清除效果有所提升,这可能是由于硫酸化后单糖组成变化有关^[31],相较于S-CVPs,纯化后S-CVPs-1-G的ABTS⁺自由基的清除率降低了0.17,这说明高活性的S-CVPs-1-G被富集起来。

图7 CVPs、S-CVPs和S-CVPs-1-G的ABTS⁺清除率Fig.7 ABTS⁺ clearance of CVPs, S-CVPs and S-CVPs-1-G

2.8.3 OH自由基清除率

OH自由基是一种极其活跃的自由基,在体内堆积易导致细胞损伤或死亡。因此,以OH自由基清除率评价多糖是否具有抗氧化作用具有积极意义。通过图8可知,在0.5~4 mg/mL质量浓度范围内,CVPs、S-CVPs及S-CVPs-1-G对OH自由基的清除能力逐渐

升高,在4 mg/mL时,CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G及Vc对OH自由基的清除率59.15%、68.0%、74.02%和99.07%。同时,在表4中可知,CVPs、S-CVPs、S-CVPs-1-G及Vc对OH自由基的清除率的IC₅₀分别为0.90、1.37、0.68以及0.01 mg/mL。各组分的都具有良好的清除OH自由基的效果,其中S-CVPs的效果优于CVPs,S-CVPs-1-G的效果最佳。

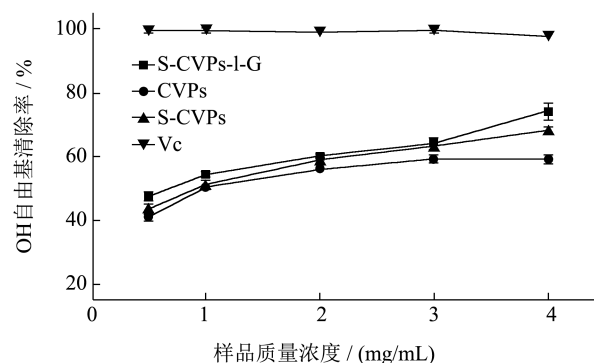


图8 CVPs、S-CVPs和S-CVPs-1-G的OH清除率

Fig.8 OH clearance of CVPs, S-CVPs and S-CVPs-1-G

2.8.4 总还原力

总还原力是评价物质抗氧化能力的重要指标,结果如图8所示,CVPs、S-CVPs及S-CVPs-1-G均具有一定的还原力,并且还原力随着质量浓度的升高而增加。4 mg/mL质量浓度的还原力大小由高到低为S-CVPs-1-G > S-CVPs > CVPs,结果表明硫酸化后的多糖抗氧化活性效果更好,可能与硫酸化后的川明参粗多糖中的硫酸根有关^[32],同时,这也说明纯化后的修饰多糖活性更好。

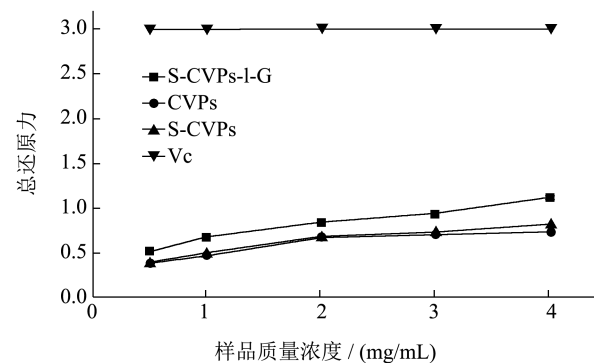


图9 CVPs、S-CVPs和S-CVPs-1-G的总还原力

Fig.9 Total reducing power of CVPs, S-CVPs and S-CVPs-1-G

3 结论

本研究通过浓硫酸法成功制备了S-CVPs,采用柱层析法将其分离为两个组分,S-CVPs-1和S-CVPs-2。研究结果表明,S-CVPs-1在得率和抗氧化能力方面均

优于 S-CVPs-2, 这为后续的深入研究奠定了基础。通过对 S-CVPs-1 的进一步纯化和红外光谱分析, 验证了硫酸化修饰的成功, 这也证实了采用浓硫酸法修饰 CVPs 是切实可行的。

从扫描电镜的观察结果来看, 硫酸化修饰导致了多糖微观结构的变化, 从而改善了其水溶性。这一点对于多糖的生物利用度提升具有重要意义。此外, HPGPC 和 HPLC 分析结果表明, S-CVPs-1-G 由多种单糖组成, 其分子量为 4.2 Da, 这种结构特征可能为其生物活性提供了有利条件。抗氧化能力的测试结果显示, 硫酸化修饰显著提高了 CVPs 在清除 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基及总还原力方面的表现。特别是在 4 mg/mL 质量浓度下, 纯化后的 S-CVPs-1-G 表现出最佳的抗氧化效果, 分别达到了 82.83%、77.32%、74.02% 和 1.12。这进一步证实了硫酸化处理和组分纯化对提高 CVPs 生物活性的有效性。

尽管本研究初步确定了硫酸化修饰有助于提高 CVPs 的生物活性, 且组分纯度的提升也能增强其活性, 但具体的增强机制仍需进一步探索。未来的研究可以集中在深入探讨硫酸化程度与抗氧化能力之间的关系和研究不同组分的相互作用对整体生物活性的影响两个方面。综上所述, 本研究的结果为阐明硫酸化川明参粗多糖增强抗氧化机制提供了理论基础, 同时也为开发川明参功能性食品提供了技术支持。这将进一步推动川明参的开发利用, 促进其在保健食品和药物领域的应用。

参考文献

- [1] 高涛,唐华丽,罗振宇,等.川明参粗多糖初级结构解析及其体外抗氧化活性[J].中国食品学报,2021,8:275-282.
- [2] LIN S, LI H Y, YUAN Q, et al. Structural characterization, antioxidant activity, and immunomodulatory activity of non-starch polysaccharides from *Chuanminshen violaceum* collected from different regions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 902-912.
- [3] GAO T, LIU S, LUO H Y, et al. Purification, structural identification, antioxidant activity, and inhibitory effects on digestive enzymes of α -glucan from *Chuanminshen violaceum* [J]. Journal of Functional Foods, 2023, 104: 105536.
- [4] 林上.不同产地川明参根、叶酚类物质及多糖分析及其生物活性评价[D].雅安:四川农业大学,2019.
- [5] WANG W, XUE C, MAO X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4532-4546.
- [6] 苗冰冰,孙玉姣,薛原野,等.香菇柄多糖的提取及其硫酸化产物的免疫调节活性比较[J].现代食品科技,2024,6:1-12.
- [7] LIU J M, ZHU X C, SUN L Q, et al. Characterization and anti-diabetic evaluation of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 95: 105-155.
- [8] 曹磊,刘伟,王俊龙,等.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[J].天然产物研究与开发,2024,1:26-36.
- [9] 高涛,罗振宇,罗黄洋,等.川明参多糖的超声辅助酶法提取及其体外抗氧化活性[J].食品研究与开发,2020,23:86-92.
- [10] 李思雨.小球藻多糖提取纯化及其改性研究[D].南宁:广西民族大学,2022.
- [11] WANG Z J, XIE J H, SHEN M Y, et al. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 74: 147-157.
- [12] YE S Y, GAO Y, HU X Y, et al. Research progress and future development potential of *Flammulina velutipes* polysaccharides in the preparation process, structure analysis, biology, and pharmacology: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267(1): 131467.
- [13] 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.
- [14] ZHANG Y, LIU Y H, NI G Y, et al. Sulfated modification, basic characterization, antioxidant and anticoagulant potentials of polysaccharide from *Sagittaria trifolia* [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2023, 16(7): 104-112.
- [15] LUAN F, LI Q, TAN W Q, et al. The evaluation of antioxidant and antifungal properties of 6-amino-6-deoxychitosan *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 595-603.
- [16] YUAN B, HAN J N, CHENG Y L, et al. Identification and characterization of antioxidant and immune-stimulatory polysaccharides in flaxseed hull [J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126266.
- [17] XIAO H, CHEN C, LI Q, et al. Physicochemical characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of selenized polysaccharides from *Sargassum pallidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 308-315.
- [18] 雷铮宇.小球藻胞外多糖的分离纯化及其抗氧化和抗炎活性研究[D].湘潭:湘潭大学,2020.
- [19] 高涛.川明参多糖的结构解析及对消化酶活性的影响[D].万州:重庆三峡学院,2021.
- [20] LEE H G, HYUN J M, JAYAWARDHANA H H A C K, et al. Enzyme-assisted hydrolyzation, chemical characterization, and lipid-lowering activity of crude sulfated polysaccharides from *Sargassum coreanum* [J]. Journal of Functional Foods, 2023, 107: 105627.
- [21] ALUTA U P, ADMOLA Z, ADEROLU, et al. Olajide, Chemical characterization of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Centroceras clavulatum* and their *in vitro* immunostimulatory and antioxidant properties [J]. Food Hydrocolloids for Health, 2023, 3: 100135.
- [22] XIAO H, FU X, CAO C L, et al. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 407-414.
- [23] 李奇.冬笋多糖结构表征及其改善细胞炎症和结肠炎的作用[D].南昌:南昌大学,2022.

- [24] 巩晓佩. 硫酸化修饰红枣多糖的结构表征及生物活性的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2021.
- [25] CHEN B J, QIAO Y J, YU G, et al. Sulfation, characterization, antibacterial activity, and action mechanism of rice bran polysaccharides [J]. Food Bioscience, 2024, 59: 103953.
- [26] CHEN Z H, LIU Y X, WANG D, et al. Preparation, chemical structure and α -glucosidase inhibitory activity of sulfated polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 98: 105289.
- [27] GUO Q P, LI F N, DUAN Y H, et al. Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond [J]. Science China Life Sciences, 2020, 63(6): 866-874.
- [28] ZHANG Y L, LI Q, CHENG J W, et al. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent for the extraction of polysaccharides from *Indocalamus tessellatus* leaves and their biological studies [J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2022, 30: 100855.
- [29] FENG H B, FAN J, BO H Q, et al. Selenylation modification can enhance immune enhancing activity of *Chuanminshen violaceum* polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 302-311.
- [30] LIN S, LI H Y, WANG Z Y, et al. Analysis of methanolic extracts and crude polysaccharides from the leaves of *Chuanminshen violaceum* and their antioxidant activities [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2019, 8(8): E266.
- [31] 杜月. 软枣猕猴桃蜂花粉多糖的提取纯化、结构表征及抗糖尿病活性研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2022.
- [32] FENG H B, FAN J, QIU H, et al. *Chuanminshen violaceum* polysaccharides improve the immune responses of foot-and-mouth disease vaccine in mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 78: 405-416.