

低相对分子质量海藻多糖的分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究

朱阳东, 丁金铭, 于斋卓, 尹秋燕, 闫滨*

山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘要: 目的 从海藻中制备并分离纯化一种低相对分子质量海藻多糖 (LMSP), 初步分析其结构特征并研究其抗氧化、降血糖和抗肿瘤作用。方法 水提醇沉法制备海藻粗多糖, H_2O_2/V_C 法降解海藻多糖, 经 DEAE-52 阴离子交换色谱柱和葡聚糖凝胶 G-100 色谱柱分离纯化; 采用苯酚-硫酸法测定总糖含量, 间羟联苯法测定糖醛酸含量, $BaCl_2$ -明胶比浊法测定硫酸基含量, 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 高效凝胶渗透色谱测定相对分子质量, 进行红外光谱法分析, 高效液相色谱测定单糖组成, 气相色谱-质谱联用仪检测糖苷键类型, 扫描电镜分析形貌特征; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除率实验、羟自由基清除率实验、2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 自由基清除率实验检测 LMSP 抗氧化活性; α -淀粉酶抑制实验、 α -葡萄糖苷酶抑制实验检测 LMSP 降血糖活性; 检测 LMSP 对 A549、HeLa、Hep-G2 细胞的抗肿瘤活性。结果 LMSP 的重均相对分子质量为 4 635, 总糖质量分数为 (83.85 \pm 2.12)%, 糖醛酸的质量分数为 (29.73 \pm 3.57)%, 硫酸根质量分数为 (24.44 \pm 1.97)%, 蛋白质的质量分数为 (1.35 \pm 0.63)%, 主要由半乳糖、木糖和岩藻糖组成, 红外光谱及气相色谱-质谱联用对其结构分析推测, 该多糖可能是一种含吡喃糖苷的硫酸多糖, 主要含有 2-Rhap、T-Galp、3-Galp 和 4-Glcp 等片段, LMSP 在扫描电镜下呈现出带孔的网状结构, 堆叠紧密。LMSP 对 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和 ABTS 自由基清除率的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 1.35、0.61、1.31 $mg \cdot mL^{-1}$; 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 0.82、1.27 $mg \cdot mL^{-1}$; 对 A549、HeLa 和 Hep-G2 细胞的 IC_{50} 为 2.31、3.41、3.10 $mg \cdot mL^{-1}$, 且各指标的作用均强于海藻粗多糖。结论 H_2O_2/V_C 法降解制备得到均一的 LMSP, 具有良好的抗氧化、降血糖和抗肿瘤作用。

关键词: 海藻多糖; 低相对分子质量; H_2O_2/V_C 法降解; 分离纯化; 结构表征; 生物活性; 抗氧化; 降血糖; 抗肿瘤

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 12-2806-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.011

Isolation, purification, structure identification and biological activity of low relative molecular weight *Sargassum* polysaccharides

ZHU Yangdong, DING Jinming, YU Zhaizhuo, YIN Qiuyan, YAN Bin

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To isolate and purify a low molecular weight *Sargassum* polysaccharides (LMSP) from *Sargassum* of traditional Chinese medicine, and preliminarily analyze its structural characteristics and study its antioxidant, hypoglycemic and anti-tumor effects. **Methods** The seaweed polysaccharides were extracted by water extraction and ethanol precipitation, and then degraded by H_2O_2/V_C method. They were purified by DEAE-52 anion exchange column and Sephadex G-100 gel filtration column. The total sugar content was determined by phenol-sulfuric acid method, the sugarfarn acid content was determined by p-hydroxybenzaldehyde method, the sulfate content was determined by $BaCl_2$ -gelatin turbidimetry method, and the protein content was determined by Coomassie brilliant blue method. The relative molecular mass was determined by high-performance gel permeation chromatography, the infrared spectrum was analyzed, and the composition of monosaccharides was determined by high-performance liquid chromatography. The type of glycosidic bond was detected by gas chromatography-mass spectrometry. The morphological features were analyzed by scanning electron microscopy. The antioxidant activity of LMSP was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging rate experiment, hydroxyl radical scavenging rate experiment, and

收稿日期: 2024-06-25

基金项目: 国家科技部重点研发项目 (2016YFC0800908); 国家科技部重大研究专项 (2014ZX09509); 山东省重点研发项目 (2017CXGC1305)

第一作者: 朱阳东 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: d2245599132@163.com

*通信作者: 闫滨 (1971—), 男, 副教授, 研究方向为中药化学。E-mail: robinyan2002@163.com

2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging rate experiment. The hypoglycemic activity of LMSP was determined by α -amylase inhibition experiment and α -glucosidase inhibition experiment. The antitumor activity of LMSP against A549, HeLa, and Hep-G2 cells was determined. **Results** The relative molecular mass of LMSP is 4 635, with a total sugar content of (83.85±2.12)% and a sugar aldonic acid content of (29.73±3.57)%. The sulfate content is (24.44±1.97)%, the protein content is (1.35±0.63)%, and it is mainly composed of galactose, xylose, and fucose. Infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry were used to analyze its structure, and it was inferred that LMSP may be a pyransulfonic polysaccharide containing pyransulfonic glycosides, mainly containing 2-Rhap, T-Galp, 3-Galp, and 4-Glcp fragments. Under scanning electron microscope, LMSP presents a porous network structure, tightly stacked. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, and ABTS radical scavenging were 1.35, 0.61, and 1.31 mg·mL⁻¹, respectively. The IC₅₀ values for α -amylase and α -glucosidase inhibition were 0.82 and 1.27 mg·mL⁻¹, respectively. The IC₅₀ values for A549, HeLa, and Hep-G2 cell inhibition were 2.31, 3.41, and 3.10 mg·mL⁻¹, respectively, and the effects of all indicators were stronger than those of seaweed crude polysaccharides. **Conclusion** The LMSP prepared by the H₂O₂/V_C method is homogeneous and has good antioxidant, glucose-lowering, and anti-tumor effects.

Key words: *Sargassum* polysaccharides; low relative molecular weight; H₂O₂/V_C degradation; isolation and purification; structural characterization; biological activity; antioxidant; hypoglycemic; anti-tumor

海藻为马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag 或羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 的干燥藻体,用于消痰、软坚散结、利水消肿,因其具有多样的药用价值和丰富的营养价值而广受关注^[1]。《中国药典》2020年版将海藻多糖的含量作为其质量控制的指标,近年来研究表明,海藻多糖是海藻中的主要活性成分,海藻多糖主要包括褐藻胶、褐藻多糖硫酸酯以及褐藻淀粉等,具有良好的抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、调节血糖、提高记忆力、抗衰老等多种生物活性^[2]。多糖的相对分子质量与其理化性质、生物活性密切相关,多糖一级结构中的糖单元的组成以及相邻糖苷键的连接方式决定多糖的活性,高级结构中支链的类型、聚合度及其在主链上的分布情况等决定了多糖活性的强弱^[3]。一般来说,相对分子质量越高的多糖水动力体积越大,黏度越高,溶解度越低,结构越复杂,这些特性不利于其在细胞膜上的被动扩散发挥生物活性。降低相对分子质量可以增加暴露的极性基团的数量,提高多糖的溶解度和渗透性,从而增强多糖的生物活性或产生新的活性^[4-7]。

海藻多糖的相对分子质量较大,在一定程度上影响了其生物学活性,为了获得较低相对分子质量的海藻多糖,需对海藻多糖进行降解^[8-9]。海藻多糖的降解方法包括物理、化学和生物降解法,这些方法能够将大相对分子质量海藻多糖转变成相对分子质量较小的海藻多糖,从而增强了它的溶解度,并且有效地增加了它的生物利用度及其适用范围^[10-11]。目前 H₂O₂/维生素 C(V_C)降解法已经被用于多糖的降解,H₂O₂/V_C氧化降解是一种可控性强、

无污染的获得低相对分子质量多糖的方法,该降解法利用了 O₂ 和 H₂O₂ 氧化还原反应产生的羟基自由基,羟基自由基是一种非常强的氧化剂,可以氧化断裂多糖间糖苷键,而低浓度 V_C 的加入可增加羟基自由基的数量,使多糖的降解速率明显提高^[12-14]。

本研究以海藻为原料,采用 H₂O₂/V_C 降解法制备低相对分子质量海藻多糖(low molecular weight *Sargassum* polysaccharides, LMSP),以期建立一种快速、有效、最大利用程度的 LMSP 的制备方法,并对降解前后的多糖进行了结构表征及生物活性研究,突出 LMSP 在生物活性方面的优势,为 LMSP 的应用研究提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂

海藻采购于浙江省洞头县,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为马尾藻科马尾藻属羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 的干燥藻体;D-半乳糖(批号 20160406,质量分数 >99%)、D-甘露糖(批号 20210506,质量分数 >99%)、苯酚(批号 20140916,质量分数 >99%)、浓硫酸(批号 20191018,质量分数 >99%)购自国药集团化学试剂北京有限公司;L-岩藻糖(批号 L1706060,质量分数 >98%)、L-鼠李糖(批号 D1813120,质量分数 >99%)、D-半乳糖醛酸(批号 A1823016,质量分数 >98%)、溴化钾(批号 A2416598,质量分数 >99%)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;V_C(批号 O11HS197212,质量分数 >99%)、 α -葡萄糖苷酶(批号 N09IS231474,3.37 U·mg⁻¹)购自源叶生物有限公司;过氧化氢(H₂O₂,批号 20230105,质量分数 >

30%)购自烟台远东精细化工有限公司;色谱纯乙腈、甲醇购自德国Merk公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

X-7紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;Mettler AE240电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SHB-III循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;1510酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;冷冻干燥机,济南普森仪器有限公司;Agilent 1260 infinity高效液相色谱仪、Agilent 7890A气质联用仪,美国安捷伦科技有限公司等仪器。

1.3 细胞

A549、Hela、Hep-G2细胞均为中国科学院细胞库购入。

2 方法与结果

2.1 LMSP的制备

2.1.1 海藻粗多糖的提取 海藻干燥粉碎后过40目筛,称取一定量海藻粉末90℃下石油醚脱脂2h,抽滤、干燥得到脱脂的海藻粉末。称取海藻粉末适量,1:15料液比加入去离子水,煎煮2次,滤过,合并2次滤液,浓缩至一定体积,浓缩液用三氯乙酸(TCA)法除去蛋白,加95%乙醇至药液乙醇终体积分数为50%进行醇沉,静置24h后,抽滤得到50%乙醇醇沉的粗多糖。

2.1.2 海藻多糖的大孔吸附树脂分离 称取适量大孔吸附树脂填料,加入纯水充分搅拌并浸泡填料,溶胀24h后填柱。取50%乙醇醇沉海藻多糖适量,料液比1:50加入去离子水溶解,上样至吸附至2/3柱高时停止上样,充分吸附0.5h,用去离子水洗脱至溶液无色时终止,收集水洗脱部位,浓缩、干燥。

2.1.3 海藻多糖的降解 采用 H_2O_2/V_0 降解法制备LMSP,将海藻多糖配制成1%的水溶液,加入30%的过氧化氢溶液使过氧化氢终体积分数为1.5%,调节pH值至4,在80℃加热条件下,降解120min,反应完后溶液迅速冷却至室温,中和至中性,相对分子质量1000的透析袋透析48h,透析后0.45 μ m滤过,溶液浓缩至一定体积,冻干、备用。

2.1.4 DEAE-52阴离子交换色谱柱分离 称取适量DEAE-52填料,加入纯水充分搅拌并浸泡填料,溶胀24h后填柱。将200mg海藻多糖加入至50mL纯水中,加热,充分搅拌溶解,过0.45 μ m微孔滤膜于色谱柱中上样,依次使用水及0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.5、2.0 mol·L⁻¹ NaCl溶液作为洗脱剂梯度

洗脱,每隔50mL收集洗脱液,采用苯酚-硫酸法在490nm波长处检测吸光度(A)值,将各个流动相下A值较高的部分合并,浓缩,冻干,备用。

LMSP经DEAE-52柱的洗脱曲线如图1所示。LMSP经不同离子强度的溶液洗脱后,共出现5个洗脱峰,分别编号为1、2、3、4、5,对应洗脱液分别为0.5、0.7、1.0、1.5、2.0 mol·L⁻¹ NaCl溶液,在0.5 mol·L⁻¹ NaCl溶液洗脱阶段出现了多糖含量相对较高的峰1,收集、浓缩各含糖峰位的组分。由于1部位含量最高,其他4个部位含量低,后续只采用了1部位进行研究。

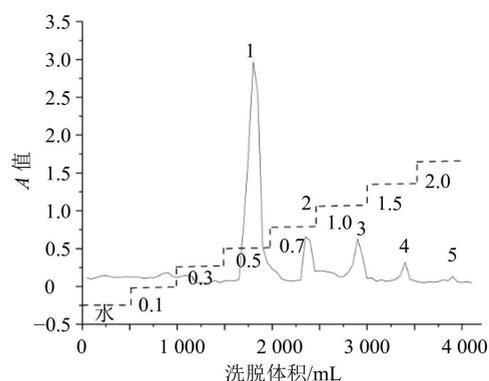


图1 DEAE-52阴离子交换色谱柱洗脱曲线

Fig. 1 DEAE-52 anion exchange chromatography column elution curve

2.1.5 葡聚糖凝胶G-100色谱柱纯化 称取适量葡聚糖凝胶G-100填料,加入纯水充分搅拌并浸泡填料,溶胀24h后填柱。将500mg海藻多糖加入至50mL纯水中,充分搅拌溶解,过0.45 μ m微孔滤膜于色谱柱中上样。使用纯水作为洗脱剂洗脱,每隔50mL收集洗脱液,采用苯酚-硫酸法在490nm波长处检测A值,将A值较高的部分合并,浓缩,冻干,备用。

经葡聚糖凝胶G-100凝胶色谱柱进一步纯化,结果如图2所示。1成分经过葡聚糖凝胶G-100凝胶色谱柱,利用水洗脱,分离得到了1个峰,合并该峰的洗脱液,浓缩冻干,所得LMSP为白色粉末状。

2.2 LMSP的结构表征

2.2.1 LMSP基本化学成分测定 以岩藻糖为标准,采用苯酚-硫酸法测定总糖含量;以D-半乳糖醛酸为标准,采用间羟联苯法测定糖醛酸含量;以硫酸钾为标准,采用BaCl₂-明胶比浊法测定硫酸基含量;以牛血清蛋白为标准,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

海藻经过预处理除杂、多糖提取、TCA法除蛋

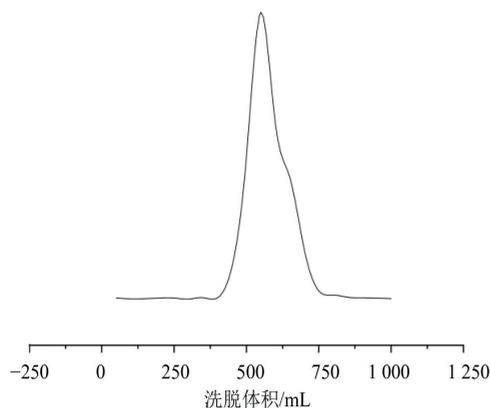


图2 葡聚糖凝胶G-100色谱柱洗脱曲线
Fig. 2 Elution curve of dextran gel G-100 column

白、 H_2O_2/V_C 降解、色谱柱分离纯化后,得到LMSP的总糖质量分数为 $(83.85 \pm 2.12)\%$,糖醛酸的质量分数为 $(29.73 \pm 3.57)\%$,硫酸根质量分数为 $(24.44 \pm 1.97)\%$,蛋白质的质量分数为 $(1.35 \pm 0.63)\%$ 。

2.2.2 LMSP相对分子质量的测定 将LMSP溶解在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ 水溶液(含 $0.02\% \text{ NaN}_3$)中,终质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,并通过孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的过滤器过滤后上机检测。采用凝胶排阻色谱柱Ohpak SB-805 HQ($300 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$)和Ohpak SB-803 HQ($300 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$)串联;柱温 $45 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量 $100 \mu\text{L}$;流动相: $0.02\% \text{ NaN}_3, 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3$;体积流量 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;等度洗脱 75 min 。凝胶排阻色谱柱根据物质的相对分子质量,大分子物质先出峰,小分子物质后出峰,物质相对分子质量的大小决定了其出峰时间。根据不同相对分子质量的标准物质制备标准曲线,从而由出峰时间计算相对分子质量。

如图3所示,LMSP的高效凝胶柱色谱图中有1个峰,表明其为均一的多糖组分,重均相对分子质量为 4635 ,多分散指数为 1.357 。结果表明, H_2O_2/V_C 反应可以降解LMSP,并且降低其相对分子质量。

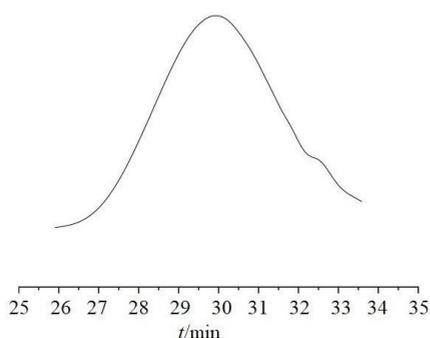


图3 LMSP相对分子质量分布
Fig. 3 Relative molecular weight distribution of LMSP

2.2.3 LMSP红外光谱分析

精密称取 1 mg LMSP与烘干至恒重的 100 mg KBr(溴化钾),将二者放于研钵中混合,充分研磨,使用压片机将其压成半透明薄片后,置于傅里叶红外光谱仪中,对其进行红外扫描,在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 波长处进行扫描,可得到LMSP的红外光谱。

LMSP的红外光谱如图4所示,LMSP在 3355.47 cm^{-1} 波数处产生较强宽峰为O—H强伸缩振动峰,在 2928.02 cm^{-1} 处的吸收峰为C—H伸缩振动峰,是岩藻糖中— CH_3 的吸收峰; 1035.40 cm^{-1} 附近处出现的较强的吸收峰为C—O—H变角振动引起的,以上3组吸收峰是糖类的特征峰,说明该物质是糖类物质。 1613.80 cm^{-1} 附近的较弱吸收峰对应羰基C=O的伸缩振动,同时表明结合水的存在, 1416.32 cm^{-1} 处的吸收峰是1个羧基的C—O的伸缩振动,这2处吸收峰表明含有糖醛酸组分。 1035.4 cm^{-1} 处的强烈吸收峰是由S=O的对称伸缩振动引起的, $818.45, 624.27 \text{ cm}^{-1}$ 处的特征吸收可能对应硫酸基团在轴向位置的弯曲振动,表明LMSP是1种硫酸多糖。 $800 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 区域的弱峰为C—O或糖苷键的伸缩振动、C—OH的弯曲振动,表明2个组分之间可能存在吡喃糖环。红外光谱分析表明LMSP具有多糖的特征吸收峰,是1种含吡喃糖苷的硫酸多糖。

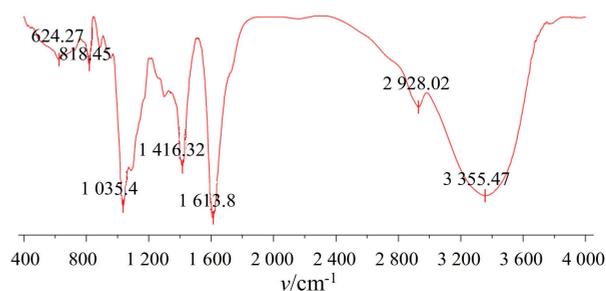


图4 LMSP的红外光谱
Fig. 4 Infrared spectrum of LMSP

2.3 LMSP单糖组成的测定^[15-17]

采用高效液相色谱进行单糖组成的测定,以岩藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖等为对照品。 10 mg LMSP样品加入 5 mL 三氟乙酸,在 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 下密封水解 2 h ,将水解液用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生处理,反相高效液相色谱法分析其单糖组成。色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),进样量 $10 \mu\text{L}$,检测器:紫外检测器,体积流量 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,检

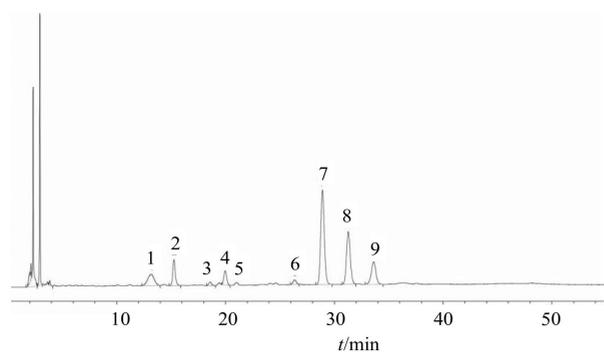
测波长 245 nm, 流动相: 17% 乙腈 + 83% 50 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.9) (A) - 40% 乙腈 + 60% 50 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.9) (B)。

单糖组成分析是多糖的结构表征及生物活性研究必不可少的部分, 对于多糖的质量控制也具有一定的意义。LMSP 的单糖组成分析结果见表 1 和图 5, 通过与单糖混合对照品和部分文献报道^[14-16]进

表 1 LMSP 的单糖组成及比例

Table 1 Monosaccharide composition and proportion of LMSP

单糖	物质的量比例/%
古罗糖醛酸	0.248
甘露糖醛酸	0.222
甘露糖	0.030
鼠李糖	0.133
葡萄糖醛酸	0.027
葡萄糖	0.047
半乳糖	1.140
木糖	0.671
岩藻糖	0.352



1-古罗糖醛酸; 2-甘露糖醛酸; 3-甘露糖; 4-鼠李糖; 5-葡萄糖醛酸; 6-葡萄糖; 7-半乳糖; 8-木糖; 9-岩藻糖。

1-guluronic acid; 2-mannuronic acid; 3-mannose; 4-rhamnose; 5-glucuronic acid; 6-glucose; 7-galactose; 8-xylose; 9-fucose.

图 5 LMSP 的单糖组成成分分析液相色谱图

Fig. 5 Analysis of monosaccharide composition of LMSP by liquid chromatography

行比较, 推测出该多糖主要由半乳糖、木糖和岩藻糖组成, 此外还含有一些古罗糖醛酸、甘露糖醛酸等单糖。结果表明, LMSP 是一种半乳糖木糖聚糖。

2.4 LMSP 连接方式的确定

采用 GC-MS 色谱进行糖苷键类型的测定。10 mg LMSP 经甲基化、酸水解和乙酰化后, 采用 Agilent 7890A 气质联用仪对海藻多糖进行糖苷键类型分析, 具体参数如下: 色谱柱: HP-5MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm, Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA); 载气: 高纯氦气; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 进样口温度 260 °C; 样品进样量 1 μL, 分流进样, 分流比 10:1。程序升温: 初始温度 80 °C, 10 °C·min⁻¹ 升温至 150 °C, 150 °C 保持 2 min, 再以 3 °C·min⁻¹ 升温至 220 °C, 220 °C 保持 5 min。离子源: EI 70 eV; 检测器: 质谱检测器 MSD; 扫描模式: 正离子全扫描; 质谱扫描范围 (m/z): 30~600。

LMSP 经还原、水解和衍生化, 得到部分甲基化的糖醇乙酰化衍生物, 其总离子流图见图 6。通过数据库比对和参考相关文献报道^[18-20], 推测糖苷键类型见表 2。LMSP 中糖苷键的组成可能包括 2-Rhap、T-Galp、3-Galp、4-Glcp、4-Manp 和 T-Fucp, 说明该多糖是含有糖醛酸的酸性多糖, 与单糖组成结果一致。在甲基化分析中, 木糖和古罗糖等未被检出, 可能与酸性多糖的溶解性及醛酸结构

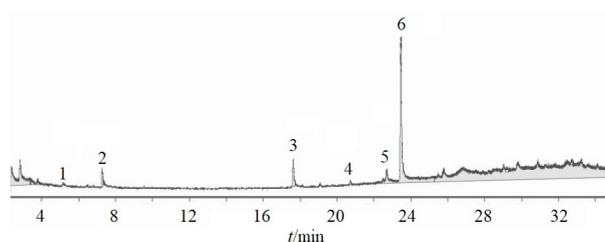


图 6 LMSP GC-MS 总离子流图

Fig. 6 LMSP GC-MS total ion chromatogram

表 2 LMSP 的甲基化分析结果

Table 2 Methylation analysis results of LMSP

峰号	甲基化糖	糖苷键连接方式	t _R /min
1	2-Rhap	1,2,5-tri-O-acetyl-6-deoxy-3,4-di-O-methyl rhamnitol	5.147
2	T-Galp	1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl galactitol	7.267
3	3-Galp	1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl galactitol	17.627
4	4-Glcp	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl glucitol	20.737
5	4-Manp	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl mannitol	22.692
6	T-Fucp	1,5-di-O-acetyl-6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl fucitol	23.463

位置难确定导致甲基化处理过程中发生降解或甲基脱落有关,末端糖残基占比较少,其余糖残基占比较大,表明该多糖是具有多分枝复杂的酸性多糖。

2.5 LMSP形貌特征的分析

采用扫描电镜分析对LMSP形貌特征进行分析,取适量LMSP黏于样品台上,置于离子溅射仪中进行喷金处理,在扫描电镜下观察。工作条件:加

速电压 30 kV;放大倍数:500、1 000、2 000、5 000。

如图7所示,LMSP在扫描电镜下呈现出带孔的网状结构,堆叠紧密,说明其分子间及分子链间相互作用较强,另有少量棒状结构,排布不规律,规整性不强,可能为无定型结构,此外也能看出多糖具有一定的空间结构。

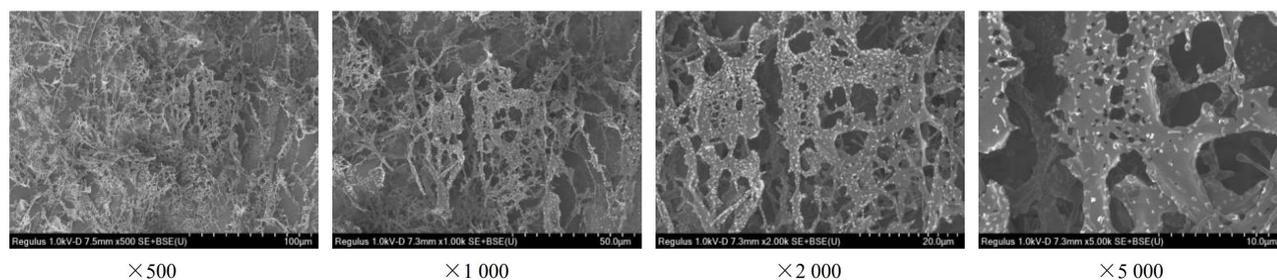


图7 LMSP扫描电镜图

Fig. 7 Scanning electron microscopy image of LMSP

2.6 抗氧化活性

2.6.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率的测定

分别取2 mL海藻粗多糖(“2.1.1”项制备)溶液、LMSP溶液(5、4、3、2、1 mg·mL⁻¹)与2 mL DPPH-乙醇溶液(0.1 mmol·L⁻¹)充分混匀,37 °C避光反应30 min,平行3次,在515 nm波长下测定溶液A值,以相同浓度V_c作阳性对照,对照组不加药,计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

2.6.2 羟自由基清除率的测定

分别在1 mL海藻粗多糖溶液、LMSP溶液(5、4、3、2、1 mg·mL⁻¹)中加入1 mL 6 mmol·L⁻¹ FeSO₄溶液、1 mL 6 mmol·L⁻¹ 水杨酸-乙醇溶液和1 mL 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂溶液,摇匀后37 °C避光反应60 min,平行3次,在536 nm波长下测定溶液A值,以相同浓度V_c作阳性对照,对照组不加药,空白组不加H₂O₂和药,计算羟基自由基清除率。

$$\text{羟基自由基清除率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{对照}})$$

2.6.3 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除率的测定

配制7 mmol·L⁻¹ ABTS溶液、2.45 mmol·L⁻¹ 过硫酸钾溶液,等体积混匀后室温避光反应12 h以上,取适量混合液与无水乙醇混合稀释,使其在波长734 nm处的A值为0.70±0.02,即得到ABTS工作液。取质量浓度分别为5、4、3、2、1 mg·mL⁻¹的海藻粗多糖溶液、LMSP溶液1 mL加入4 mL ABTS工作液,均匀混合后,室温避光反应10 min,平行3次,在405 nm处检测其A值,以相同质量浓度V_c为阳性对照,对

照组不加药,计算ABTS自由基清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

如图8所示,2种海藻多糖的抗氧化能力与其质量浓度成正比,LMSP对DPPH自由基清除率、羟基自由基清除率和ABTS自由基清除率的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为1.35、0.61、1.31 mg·mL⁻¹,并且在相同的浓度下,LMSP的3种自由基清除能力比未降解的粗多糖显著增强,可能是其活性基团更加暴露的原因^[21-22]。随着浓度不断增大,LMSP与V_c的自由基清除能力逐渐接近,这种关系在清除羟基自由基与ABTS自由基较为显著,但是LMSP对DPPH自由基清除能力不强,可能是因为DPPH使用醇溶液为溶剂,在实验过程中多糖沉淀所导致的。

2.7 降血糖活性

2.7.1 α-淀粉酶抑制实验

1 mL不同质量浓度海藻粗多糖、LMSP溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg·mL⁻¹)与1 mL α-淀粉酶溶液(2 U·mL⁻¹)混匀,于37 °C下反应10 min,反应结束后加入1 mL的1%可溶性淀粉溶液37 °C下反应5 min,反应结束后加入1 mL DNS显色剂溶液,混合均匀后于沸水中加热5 min,冷却至室温,以相同质量浓度阿卡波糖为阳性对照,对照组不加药,空白组不加药和α-淀粉酶。采用PBS缓冲溶液(0.1 mol·L⁻¹, pH 6.8)稀释至合适倍数后室温下静置30 min,平行3次,于540 nm处测定A值。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.7.2 α-葡萄糖苷酶抑制实验

将1.5 mL不同质

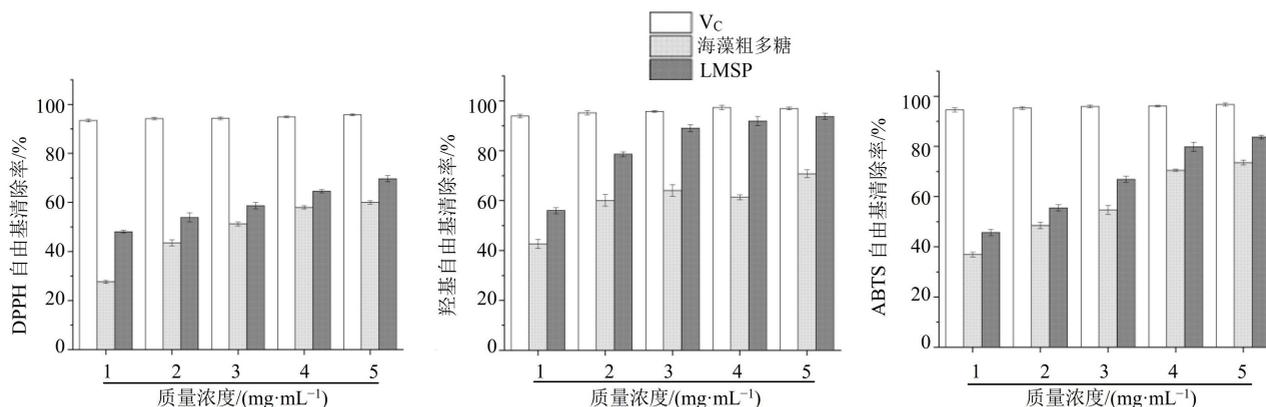


图 8 LMSP 抗氧化实验
Fig. 8 Antioxidant experiment of LMSP

量浓度海藻粗多糖、LMSP 溶液 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg·mL⁻¹) 与 0.5 mL α-葡萄糖苷酶 (0.5 U·mL⁻¹) 混合, 在 37 °C 下孵育 10 min, 孵育完成后加入 0.5 mL 1 mmol·L⁻¹ 对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷, 并在 37 °C 下再孵育 20 min, 最终加入 5 mL 1 mol·L⁻¹ 碳酸钠溶液终止反应, 平行 3 次, 检测 405 nm 处 A 值。对照组不加药, 空白组不加对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷和药。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

生物活性化合物抑制 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的活性可以发挥降血糖作用, α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶直接参与淀粉及糖原的代谢途径, 能够水解葡萄糖苷键生成葡萄糖、麦芽糖等低分子糖类, 抑制酶的活性可以有效减缓葡萄糖生成的速度、减少和延缓小肠对葡萄糖的吸收, 从而有效降低血糖^[23]。α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制率结果如图 9 所示, 随着浓度的增加, LMSP 对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制率呈浓度相关性增长, 其 IC₅₀

分别为 0.82、1.27 mg·mL⁻¹, 并且要高于海藻粗多糖的降血糖效果, 与临床药物阿卡波糖相比, LMSP 展现的 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制活性并不强, 但是还是具有一定降低血糖的作用。LMSP 抑制血糖升高的机制可能是与 α-淀粉酶形成复合物并且通过静电作用来减少 α-淀粉酶的有效含量, 降低淀粉酶解后的葡萄糖水平。LMSP 活性部位暴露, 表面积增大, 结合的酶分子的数量增多, 阻碍其与底物接触反应, 从而提高酶的抑制率, 因此较海藻粗多糖效果更好^[24]。

2.8 抗肿瘤活性

A549、HeLa、Hep-G2 细胞每孔 1 × 10⁴ 个接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μL 10% DMEM 稀释的不同质量浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg·mL⁻¹) 的海藻粗多糖、LMSP, 对照组不加药, 平行 3 个复孔。37 °C 孵育 48 h, 弃上清, 加 PBS 洗涤, 每孔加入 100 μL 10% CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 酶标仪测 450 nm 处的 A 值, 计算海藻多糖的肿瘤抑制率。

$$\text{肿瘤细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

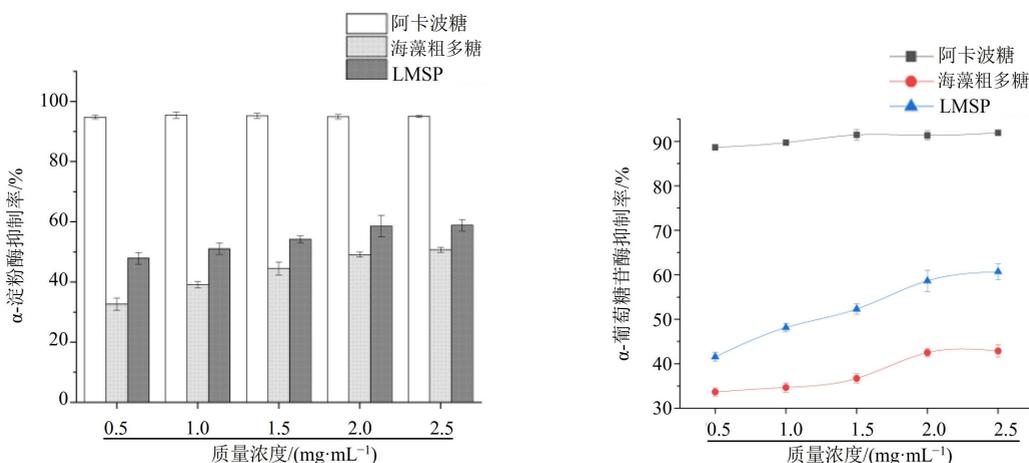


图 9 LMSP 降血糖实验
Fig. 9 LMSP blood glucose lowering experiment

如图10所示,不同浓度的LMSP对3种癌细胞均有增殖抑制的效果,并且呈现浓度相关性,LMSP对A549、HeLa、Hep-G2的 IC_{50} 为2.31、3.41、3.10 $mg \cdot mL^{-1}$,各浓度的抑制率均高于50%醇沉的

海藻粗多糖。其抗肿瘤效果好的原因可能是LMSP溶解度更好,较小的相对分子质量也可以使其更多的进入细胞,阻滞细胞复制阶段,抑制肿瘤细胞的增殖来发挥抗肿瘤效果^[25-26]。

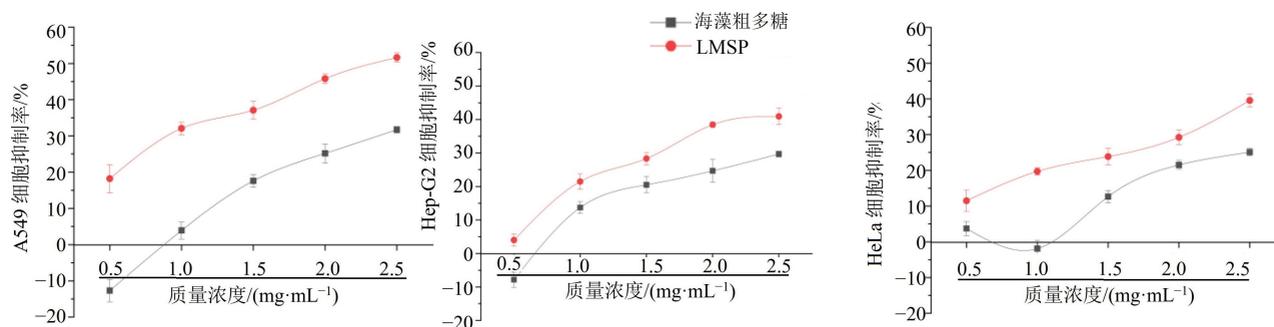


图10 LMSP抗肿瘤实验

Fig. 10 LMSP anti-tumor experiment

3 讨论

植物体内存在的 V_C 可以还原 O_2 产生 H_2O_2 ,并与植物体内的金属离子和产生的 H_2O_2 发生芬顿反应,产生羟基自由基,从而降解多糖,促进植物的生长和发育^[27]。本实验采用 H_2O_2/V_C 法模拟了这个过程,其他方法如酶法、酸水解法在降解中存在不足,例如酶法对多糖链中糖苷键的断裂具有很高的特异性,无法用于产业化开发,酸水解需要较高的浓度或较长的反应时间,导致糖单元结构的改变,破坏必要的生物活性基团等,而 H_2O_2/V_C 法降解多糖的过程中不易带进杂质,能获得高纯度的多糖降解产物,并且对多糖活性官能团的破坏更小,所以针对利用 H_2O_2/V_C 法降解多糖获取的降解产物的研发前景非常广阔^[28-30]。

本研究以中药海藻药材为原料,通过水提醇沉法制备海藻多糖,利用 H_2O_2/V_C 法对海藻多糖进行降解、DEAE-52离子交换色谱柱与葡聚糖凝胶G-100凝胶色谱柱分离,得到了重均相对分子质量为4 635的LMSP。并通过高效液相色谱、红外光谱、气相色谱-质谱联用和参考相关文献等方式,对该多糖结构进行初步分析,推测该多糖是一种含吡喃糖苷的硫酸多糖,可能主要含有2-Rhap、T-Galp、3-Galp和4-Glcp等片段,并且该多糖具有更好的抗氧化、降血糖、抗肿瘤能力。相比未降解前的海藻粗多糖,LMSP的活性得到了更好的增强作用^[31],LMSP对DPPH自由基清除率、羟基自由基清除率和ABTS自由基清除率的 IC_{50} 为1.35、0.61、1.31 $mg \cdot mL^{-1}$;对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为0.82、1.27 $mg \cdot mL^{-1}$;对A549、HeLa和Hep-G2

的 IC_{50} 为2.31、3.41、3.10 $mg \cdot mL^{-1}$ 。这与目前其他低相对分子质量多糖具有更好的抗氧化、抗炎等活性研究一致,并且生物活性的提升与降解后的相对分子质量降低有关,还可能是特定的相对分子质量区间、活性基团、多糖的结构等综合作用的结果^[32-34]。

本研究为海藻多糖的开发利用及多糖的降解提供实验依据,为更好的开发海藻资源、深入研究其构效关系奠定基础。但由于多糖结构较为复杂,后续将继续开展更深入的体内体外活性研究,系统地阐明LMSP的构效关系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020: 308-309. Pharmacopocia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 308-309.
- [2] Fernando I P S, Dias M K H M, Madusanka D M D, et al. Step gradient alcohol precipitation for the purification of low molecular weight fucoidan from *Sargassum siliquastrum* and its UVB protective effects [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 163: 26-35.
- [3] Li J H, Wang L, Yang K, et al. Structure characteristics of low molecular weight pectic polysaccharide and its anti-aging capability by modulating the intestinal homeostasis [J]. Carbohydr Polym, 2023, 303: 120467.
- [4] Zhou A D, Cheng H Y, Liu H H, et al. Neuroprotection of low-molecular-weight galactan obtained from *Cantharellus cibarius* Fr. against Alzheimer's disease [J]. Carbohydr Polym, 2023, 316: 121033.

- [5] Tian W L, Song X L, Wang F S, et al. Study on the preparation and biological activities of low molecular weight squid ink polysaccharide from *Sepiella maindroni* [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 237: 124040.
- [6] 周雪艳, 常贺, 苟海芹, 等. 分子量影响多糖生物活性的研究进展 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(1): 124-132.
Zhou X Y, Chang H, Gou H Q, et al. Advances in research of molecular weight affecting the bioactivities of polysaccharides [J]. J Henan Univ Technol Nat Sci Ed, 2024, 45(1): 124-132.
- [7] Lee Q C, Han X J, Zheng M F, et al. Preparation of low molecular weight polysaccharides from *Tremella fuciformis* by ultrasonic-assisted H₂O₂-vc method: Structural characteristics, *in vivo* antioxidant activity and stress resistance [J]. Ultrason Sonochem, 2023, 99: 106555.
- [8] Choi J I, Kim H J. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity [J]. Carbohydr Polym, 2013, 97(2): 358-362.
- [9] 高玥, 许倩楠, 蔡明刚, 等. 海洋来源药食同源品开发利用研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(17): 5455-5464.
Gao Y, Xu Q N, Cai M G, et al. Development and utilization of marine-derived medicine and food homologous products [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(17): 5455-5464.
- [10] Li J H, Li S, Zheng Y F, et al. Fast preparation of rhamnogalacturonan I enriched low molecular weight pectic polysaccharide by ultrasonically accelerated metal-free Fenton reaction [J]. Food Hydrocoll, 2019, 95: 551-561.
- [11] 李文青, 祝孙婷, 李圣洁, 等. 羊栖菜多糖及辅助超声降解对高脂斑马鱼的降血脂作用 [J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(5): 156-163.
Li W Q, Zhu S T, Li S J, et al. Hypolipidemic effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide and ultrasonic-assisted degradation on hyperlipidemic zebrafish [J]. J Food Sci Biotechnol, 2024, 43(5): 156-163.
- [12] Wan C, Jiang H, Tang MT, et al. Purification, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by hydrogen peroxide/ascorbic acid-assisted extraction [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 223(Pt A): 490-499.
- [13] Ma C L, Bai J W, Shao C T, et al. Degradation of blue honeysuckle polysaccharides, structural characteristics and antiglycation and hypoglycemic activities of degraded products [J]. Food Res Int, 2021, 143: 110281.
- [14] 杜国丰, 尹梦琪, 梁飞龙, 等. 微波辅助 H₂O₂/V_C 降解制备低分子量浒苔多糖的研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 37-44.
Du G F, Yin M Q, Liang F L, et al. Preparation of low-molecular-weight *Enteromorpha* polysaccharides by microwave-assisted degradation with H₂O₂/V_C [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(12): 37-44.
- [15] 张洁, 张巧铃, 卢凤来, 等. 罗汉果根多糖的分离纯化及免疫活性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1100-1109.
Zhang J, Zhang Q L, Lu F L, et al. Isolation, purification and immunomodulatory activity of polysaccharides from roots of *Siraitia grosuenorii* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(4): 1100-1109.
- [16] 李溢真, 于志洋, 田欣, 等. 海蒿子多糖的结构组分及生物活性研究 [J]. 海洋科学, 2020, 44(11): 10-18.
Li Y Z, Yu Z Y, Tian X, et al. Physicochemical properties and immunomodulatory activities of crude polysaccharides isolated from *Sargassum pallidum* [J]. Mar Sci, 2020, 44(11): 10-18.
- [17] 张波, 苑艳丽, 李玉彤, 等. 昆布多糖通过调节巨噬细胞极化延缓肺纤维化研究 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5619-5628.
Zhang B, Yuan Y L, Li Y T, et al. *Ecklonia kurome* polysaccharides delays pulmonary fibrosis by regulating macrophages polarization [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(17): 5619-5628.
- [18] Chan M K, Yu Y, Wulamu S, et al. Structural analysis of water-soluble polysaccharides isolated from *Panax notoginseng* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155: 376-385.
- [19] Yang W J, Cai Y, Yin R H, et al. Structural analysis and anticoagulant activities of two sulfated polysaccharides from the sea cucumber *Holothuria coluber* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 115: 1055-1062.
- [20] Hu J H, Yao W Z, Chang S Y, et al. Structural characterization and anti-photoaging activity of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* [J]. Food Res Int, 2022, 157: 111267.
- [21] Duan G L, Yu X B. Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia* [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 137: 1112-1120.
- [22] 阙斐, 陶文靖, 冯文婕. 低分子量褐藻多糖的制备及其活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 226-232.
Que F, Tao W J, Feng W J. Preparation and biological activities of low molecular weight brown algae [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(2): 226-232.
- [23] Zeng A Q, Yang R J, Yu S H, et al. A novel hypoglycemic agent: Polysaccharides from laver (*Porphyra* spp.) [J]. Food Funct, 2020, 11(10): 9048-9056.
- [24] 王尧, 李福蕊, 罗源, 等. 超声波辅助 H₂O₂-VC 降解人参

- 多糖对其结构特征与生物活性的影响 [J]. 食品科学, 2023, 44(19): 82-90.
- Wang Y, Li F R, Luo Y, et al. Effect of ultrasonic assisted hydrogen peroxide-vitamin C degradation of ginseng polysaccharide on its structural characteristics and biological activities [J]. Food Sci, 2023, 44(19): 82-90.
- [25] Li J H, Li S, Wu L M, et al. Ultrasound-assisted fast preparation of low molecular weight fucosylated chondroitin sulfate with antitumor activity [J]. Carbohydr Polym, 2019, 209: 82-91.
- [26] 孙冲, 姚昱锟, 方婷, 等. 海洋寡糖制备工艺及生物活性的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 446-453.
- Sun C, Yao Y K, Fang T, et al. Research progress on preparation process and biological activity of marine oligosaccharides [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(18): 446-453.
- [27] Zou M Y, Nie S P, Yin J Y, et al. Ascorbic acid induced degradation of polysaccharide from natural products: A review [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 151: 483-491.
- [28] Sun H H, Gao L, Xue C H, et al. Marine-polysaccharide degrading enzymes: Status and prospects [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2020, 19(6): 2767-2796.
- [29] Zheng Y T, Li Y P, Yang Y Y, et al. Recent advances in bioutilization of marine macroalgae carbohydrates: Degradation, metabolism, and fermentation [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(5): 1438-1453.
- [30] Saravana P S, Cho Y N, Patil M P, et al. Hydrothermal degradation of seaweed polysaccharide: Characterization and biological activities [J]. Food Chem, 2018, 268: 179-187.
- [31] Chang S Y, Chen X Y, Chen Y F, et al. UV/H₂O₂-degraded polysaccharides from *Sargassum fusiforme*: Purification, structural properties, and anti-inflammatory activity [J]. Mar Drugs, 2023, 21(11): 561.
- [32] Geun Lee H, Jayawardena T U, Liyanage N M, et al. Antioxidant potential of low molecular weight fucoidans from *Sargassum autumnale* against H₂O₂-induced oxidative stress *in vitro* and in zebrafish models based on molecular weight changes [J]. Food Chem, 2022, 384: 132591.
- [33] Yao W Z, Liu M Y, Chen X Y, et al. Effects of UV/H₂O₂ degradation and step gradient ethanol precipitation on *Sargassum fusiforme* polysaccharides: Physicochemical characterization and protective effects against intestinal epithelial injury [J]. Food Res Int, 2022, 155: 111093.
- [34] Ma W P, Li H H, Liu M, et al. Effects of simulated digestion *in vitro* on the structure and macrophages activation of fucoidan from *Sargassum fusiforme* [J]. Carbohydr Polym, 2021, 272: 118484.

[责任编辑 兰新新]