

不同取代度蕨麻硒多糖的制备、 表征及体外抗氧化活性

慕星星¹, 石继鹏¹, 王铖博¹, 赵 澜¹, 赵海红¹, 张 继^{1,2,*}

(1.西北师范大学生命科学学院, 甘肃兰州 730070;

2.甘肃省特色植物有效成分制品工程技术研究中心, 甘肃兰州 730070)

摘要: 硒多糖具有抗金属中毒、抗氧化、抗病毒等多种作用, 其结构与活性密切相关。本文以从我国传统藏药蕨麻中提取的蕨麻多糖为前体物, 通过单因素和响应面设计来优化工艺并调控条件制备出不同取代度的蕨麻硒多糖, 使用尺寸排除色谱-激光光散射联用仪、紫外光谱仪、红外光谱仪、热重分析仪、扫描电镜对产物结构进行表征, 最后评估了不同取代度蕨麻硒多糖的体外抗氧化活性。结果表明: 蕨麻硒多糖的最佳硒化时间为 134.84 min, 温度 78.39 °C, 催化剂量 49.37 mg, 投料比 PAP: H₂SeO₃ = 1: 0.81, 此条件下产物的硒含量可达到 8518.81 μg/g; 制备出的五种取代度的蕨麻硒多糖结构中均含有 Se=O 键和 Se-O 键, 即实现了蕨麻多糖的硒化; 取代度越高的蕨麻硒多糖的分子量越小、热稳定性越低、空间结构越松散, 蕨麻硒多糖对 O₂⁻·、·OH 和 DPPH· 的清除能力明显且随硒取代度的增加而增强。

关键词: 蕨麻硒多糖, 取代度, 制备, 表征, 活性

Preparation, Characterization and *in Vitro* Antioxidant Activity of Selenium *Potentilla anserina* L. Polysaccharide with Different Substitution Degrees

MU Xing-xing¹, SHI Ji-peng¹, WANG Cheng-bo¹, ZHAO Lan¹, ZHAO Hai-hong¹, ZHANG Ji^{1,2,*}

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;

2. Bioactive Products Engineering and Technology Research Center for Gansu, Distinctive Plants, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Selenium polysaccharide has multiple functions of anti-metal poisoning, anti-oxidation, anti-virus etc. Its activity is closely related to its structure. In this paper, the *Potentilla anserina* L. polysaccharide extracted from traditional Tibetan medicine potentilla was used as a precursor. Optimizing the preparation process and regulated the conditions by single factor and response surface design to prepare different substitution degrees of *Potentilla anserina* L. polysaccharides. The size exclusion chromatography-laser light scattering spectroscopy, UV spectrometer, infrared spectrometer, thermogravimetric analyzer, and scanning electron microscopy were used to characterize the structure of the product and evaluated the *in vitro* antioxidant activity of different substitution degrees of selenium *Potentilla anserina* L. polysaccharide in the end. The results showed that the optimum reaction time of selenium *Potentilla anserina* L. polysaccharide was 134.84 min, temperature 78.39 °C, catalyst 49.37 mg and wight ratio PAP: H₂SeO₃ = 1: 0.81. Under these conditions, the selenium contents of the product was 8518.81 μg/g. There existed Se=O and Se-O bonds in selenium *Potentilla anserina* L. polysaccharide with five degrees of substitution, meaning the selenization of the *Potentilla anserina* L. polysaccharide was successful. The higher degree of substitution of selenium *Potentilla anserina* L. polysaccharide, the smaller the molecular weight, the lower the thermal stability, and the looser the spatial structure. The selenium *Potentilla anserina* L. polysaccharide had significant scavenging ability to O₂⁻·, ·OH and DPPH·, and had positive correlation to the substitution degree of selenium.

Key words: selenium *Potentilla anserina* L. polysaccharide; degree of substitution; preparation; characterization; activity

中图分类号: TS 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2019)12-0191-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.031

引文格式: 慕星星, 石继鹏, 王铖博, 等. 不同取代度蕨麻硒多糖的制备、表征及体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 191-198.

收稿日期: 2018-10-26

作者简介: 慕星星(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 1651855927@qq.com。

* 通讯作者: 张继(1962-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 植物资源的开发与利用, E-mail: m17361631660@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51873175)。

元素硒(Se)有显著的抗肿瘤、抗氧化、提高免疫力等多种生理活性功能,但无机硒存在毒性大、吸收差、稳定性低等缺点,而有机硒化物因其能有效避免无机硒易引起中毒的缺点,受到医药、食品保健等诸多领域普遍关注^[1-2]。硒多糖作为有机硒化物的一种,由于天然资源紧缺、提取不方便等原因很少被开发利用,因此对植物多糖进行硒化修饰是解决该问题的有效途径。目前已成功合成了百合、南瓜、大蒜、灵芝等植物硒多糖^[3-4]。

蕨麻多糖(PAP)统藏药蕨麻中提取分离的天然高分子化合物,已有研究证实蕨麻多糖具有保护肝脏、抗氧化、增强免疫系统、保护心肌细胞、抗缺氧等方面等生理活性^[5-7],而蕨麻作为一种常用藏药及滋补佳品,一直以来常被用作壮阳通便的补药,甚至产区的居民的普通食品,蕨麻及其多糖的开发研究受到生产地域的位置及文化经济的限制,因此亟需提高蕨麻多糖的深加工与利用水平。

本实验以课题组前期分离纯化的蕨麻多糖为原料^[8],通过单因素和响应面设计来优化工艺,调控制备因素合成不同取代度的蕨麻硒多糖(SePAP),利用尺寸排除色谱-激光光散射联用法、紫外光谱、红外光谱、热重分析和扫描电镜等手段表征产物结构,并对其体外抗氧化活性进行初步研究,探讨不同取代度的硒化修饰对蕨麻多糖结构表征及活性功能的影响,为进一步研究 SePAP 作为抗氧化能力较强的保健食品奠定必要的实验基础,以促进蕨麻资源合理深加工,提高其利用效能。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蕨麻(*Potentilla anserine* L.) 产自甘肃甘南;亚硒酸、丙酮、硒标准液、盐酸羟胺、乙二胺四乙酸二钠、环己烷、溴化钾、DAN 试剂、邻苯三酚、苯酚、水杨酸等 购自兰州蕴源生物技术开发有限公司;固体超强酸 购自宁波苏博科能环保科技有限公司;所有药品或试剂 均为国产分析纯或优级纯。

旋转蒸发器 上海一恒科技有限公司;FD-8 真空冷冻干燥机 北京松原华兴科技发展有限公司;IRPrestige-21 傅里叶红外光谱仪 上海谱元仪器有限公司;UV-1601 紫外分光光度计 上海禹重实业有限公司;AFS-9760 原子荧光光度计 上海亚荣生化仪器厂;MARS6 全自动微波消解仪 北京莱伯泰科仪器有限公司;DE-6300 综合热分析仪 博元科技有限公司;JSM6390 LV 扫描电镜等 FEI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SePAP 的制备及工艺优化

1.2.1.1 SePAP 的合成 以实验室现有分离纯化后含糖量为 99.5% 的蕨麻多糖为原料^[8],将其在甲酰胺中充分溶解后,加入一定质量的硒化剂亚硒酸以调节出不同的投料比,再加入一定质量的固体超强酸作为催化剂,在 N₂ 保护的条件下设置一定的温度和一定的时间下进行硒化反应,反应结束后经离心(3000 r/min, 5 min)、丙酮洗涤至丙酮无色、透析 72 h 后冷冻干燥得到 SePAP。

1.2.1.2 单因素实验 根据上述合成方法,固定条件为反应温度 75 ℃、投料比(PAP: H₂SeO₃ = 1: 0.8)、催化剂量 40 mg,考察不同反应时间(20、40、60、120、300、480 min)对 SePAP 硒含量的影响;固定条件为反应时间 120 min、投料比(PAP: H₂SeO₃ = 1: 0.8)、催化剂量 40 mg,考察不同反应温度(35、45、55、65、75、85 ℃)对 SePAP 硒含量的影响;固定条件为反应时间 120 min、反应温度 75 ℃、催化剂量 40 mg,考察不同投料比(PAP: H₂SeO₃ = 1: 0.5、1: 0.6、1: 0.7、1: 0.8、1: 0.9、1: 1)对 SePAP 硒含量的影响;固定条件为反应时间 120 min、反应温度 75 ℃、投料比(PAP: H₂SeO₃ = 1: 0.8),考察不同催化剂量(10、20、30、40、50、60 mg)对 SePAP 硒含量的影响。

1.2.1.3 响应面设计实验 在单因素实验基础上,每个因素选取对 SePAP 硒含量影响较大的三个水平,以 SePAP 硒含量为响应值,设计四因子三水平的 Box-Behnken 中心组合实验,因素水平和编码见表 1,并利用 Design-Expert 8.05 软件进行数据分析。

表 1 响应面设计因素水平和编码

Table 1 Independent variables and their levels used in the response surface design

水平	因素			
	A 时间 (min)	B 温度 (℃)	C 投料比	D 催化剂量 (mg)
-1	60	65	1:0.7	40
0	120	70	1:0.8	50
1	180	85	1:0.9	60

1.2.2 不同取代度 SePAP 的制备 根据响应面设计结果分析,发现对取代度影响最大的因素为催化剂量,因此使用不同质量梯度的固体超强酸催化剂(10、20、30、40、50 mg),按照 1.2.1 的硒化方法来制备出五种不同取代度梯度的蕨麻硒多糖,记为 SePAP1-5。

1.2.3 不同取代度 SePAP 硒含量的测定 以荧光分光光度计法^[9],使用硒标准液,以硒的质量浓度为横坐标、荧光强度为纵坐标绘制标准曲线并建立回归方程: $Y = 85.01X + 3.4873$ ($R^2 = 0.997$)。将测定的荧光强度代入方程计算硒含量。

1.2.4 不同取代度 SePAP 的结构表征

1.2.4.1 分子量 使用尺寸排除色谱-激光光散射联用仪(SEC-LLS)测定 SePAP 的重均分子量(M_w)、数均分子量(M_n)及分子量分散系数(M_w/M_n)^[10]。

1.2.4.2 紫外光谱扫描 各称取 0.1 gPAP 和 SePAP,于 1000 W 功率下微波消解 20 min 后冷却定容至 25 mL,在 5 mL 消化液和 0.1 g/L 的 H₂SeO₃ 中分别加入加 8 mL 0.1 g/L 邻苯二胺溶液,置于阴暗处反应 50 min,各加入 10 mL 甲苯充分萃取后静置。取上层溶液以甲苯为参比,用石英比色皿在 200~800 nm 波长范围内扫描。

1.2.4.3 红外光谱扫描 在玛瑙研钵中加入 PAP 和 SePAP 各 10 mg,混合干燥溴化钾,充分研磨压片,在波数 4000~400 cm⁻¹内进行红外光谱扫描,分析产物

的特征基团^[11]。

1.2.4.4 热重分析法 使用热分析仪,在氧化铝坩锅中装入3 mg 样品,升温速率10 °C/min,温度范围:50~800 °C,静态空气氛围下测定。

1.2.4.5 扫描电镜观察 将充分干燥的 SePAP 用离子溅射镀膜法制备电镜样品,调节加速电压5 kV,放大10~50 KX,置于扫描电镜的样品室中扫描分析^[12]。

1.2.5 不同取代度 SePAP 的活性研究

1.2.5.1 超氧阴离子自由基(O₂⁻·)清除率测定 以邻苯三酚自氧化法测定样品清除 O₂⁻·的能力^[13]:将样品 SePAP(1~5)用去离子水溶解配制成1 mg/mL 的 SePAP 溶液,取4 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.2),加入1.5 mL 超纯水,混匀,25 °C 水浴20 min,加入1 mL SePAP 溶液后迅速加入已于25 °C 预热过的3 mmol/L 邻苯三酚0.4 mL,摇匀,于420 nm 波长处每隔30 s 测定其吸光度。平行测定3次,根据式(1)计算:

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = (A - A_1) \times 100 / A \quad \text{式(1)}$$

式中:A 为未加样品的空白组吸光度;A₁ 为加入样品反应体系的吸光度。

1.2.5.2 羟自由基(·OH)清除率测定 以水杨酸法测定样品清除·OH 的能力^[14]:将样品 SePAP(1~5)用去离子水溶解配置成1 mg/mL 的 SePAP 溶液,以超纯水为空白,在试管中加入0.5 mL 5 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、SePAP 溶液和0.5 mL 5 mmol/L 的 H₂O₂,摇匀后静置10 min,再加入2 mL 10 mmol/L 水杨酸溶液摇匀,10 min 后于510 nm 波长处测定吸光度。根据式(2)计算:

$$\cdot OH \text{清除率}(\%) = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0 \quad \text{式(2)}$$

式中:A₁ 为未加样品的空白组吸光度;A₀ 为加入样品反应体系的吸光度。

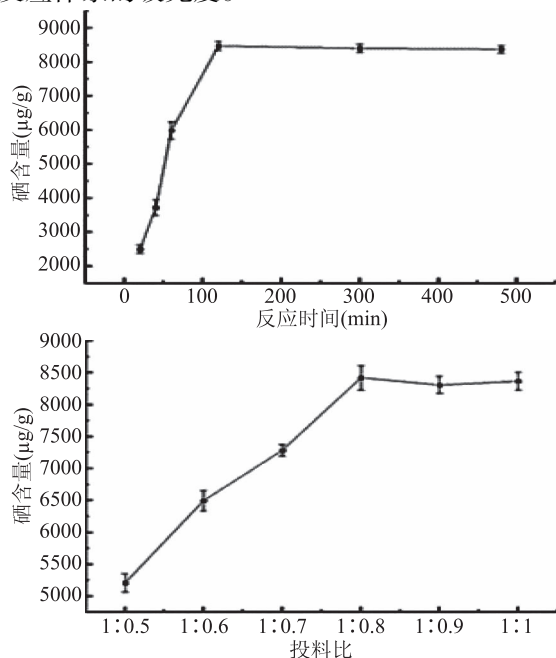


图1 单因素实验及结果

Fig.1 Single-factor experiment and results

1.2.5.3 DPPH·清除率测定 将样品 SePAP (1~5) 用去离子水溶解配置成1 mg/mL 的 SePAP 溶液,在2 mL SePAP 溶液中加入2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液,混匀后避光静置30 min,于517 nm 处测定吸光度 A_i,同时用无水乙醇代替 DPPH-乙醇溶液,测得吸光度 A_j,再测得2 mL DPPH-乙醇溶液和2 mL 无水乙醇混合液的吸光度 A₀。以无水乙醇为参比,根据式(3)计算:

$$DPPH \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

式(3)

式中:A₀ 为 DPPH-乙醇溶液 + 无水乙醇混合液吸光度;A_i 为 DPPH-乙醇溶液 + SePAP 溶液吸光度;A_j 为无水乙醇溶液 + SePAP 溶液吸光度。

1.3 数据处理

采用 Origin 8.0 软件进行作图, Design - Expert 8.05 软件进行响应面分析, SPSS 20.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 SePAP 的制备工艺优化

2.1.1 单因素实验结果 当反应时间小于120 min 时,随着反应时间延长,硒含量不断的增加,当超过120 min 时硒含量无明显变化,因此从节能考虑120 min 最佳;当温度低于75 °C 时,随着反应温度升高,硒含量持续增加,当超过75 °C 时硒含量开始下降,这是由于温度过高会损坏多糖的结构;当投料比小于1:0.8 时,随着投料比增加,硒含量稳定增加,当超过1:0.8 时硒含量无明显变化,说明此时 H₂SeO₃ 对于样品已趋于饱和;当催化剂量小于50 mg 时,随着催化剂的增加,硒含量不断增加,当超过50 mg 时硒含量不变,说明50 mg 最适宜。

2.1.2 回归方程拟合及方差分析 根据单因素实验结果,设计表1 因素水平表,以 SePAP 硒含量为响应值,采用四因子三水平的响应面分析法进行设计并

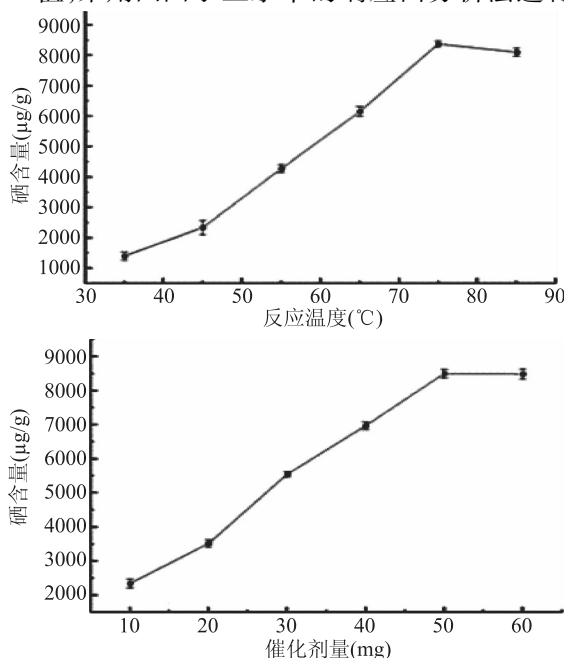


表2 响应面试验及结果

Table 2 Response surface design and results

实验号	A	B	C	D	SePAP 硒含量 ($\mu\text{g/g}$)	实验号	A	B	C	D	SePAP 硒含量 ($\mu\text{g/g}$)
1	0	0	0	0	8428	16	-1	0	-1	0	6757
2	1	0	0	1	7397	17	0	0	0	0	8408
3	0	0	1	1	7018	18	1	-1	0	0	6645
4	0	-1	1	0	6485	19	0	1	-1	0	7378
5	0	-1	-1	0	7368	20	0	1	0	-1	7724
6	-1	0	0	1	7785	21	0	-1	0	-1	7189
7	0	0	1	-1	7885	22	1	1	0	0	8045
8	0	0	0	0	8418	23	-1	1	0	0	7105
9	0	0	0	0	8502	24	0	0	-1	-1	6602
10	1	0	1	0	7456	25	0	-1	0	1	7459
11	1	0	0	-1	7745	26	-1	0	0	-1	6689
12	-1	-1	0	0	7023	27	0	1	1	0	7689
13	0	1	0	1	7636	28	0	0	0	0	8247
14	1	0	-1	0	7589	29	-1	0	1	0	7312
15	0	0	-1	1	7925						

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis table

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	9607993	14	686285.2	25.65	<0.0001	**
A	405536.3	1	405536.3	15.16	0.0016	**
B	967872	1	967872	36.18	<0.0001	**
C	4256.333	1	4256.333	0.16	0.6960	
D	160083	1	160083	5.98	0.0283	*
AB	434281	1	434281	16.23	0.0012	**
AC	118336	1	118336	4.42	0.0540	
AD	521284	1	521284	19.49	0.0006	**
BC	356409	1	356409	13.32	0.0026	**
BD	32041	1	32041	1.2	0.2923	
CD	1199025	1	1199025	44.82	<0.0001	**
A ²	2423259	1	2423259	90.58	<0.0001	**
B ²	2230983	1	2230983	83.39	<0.0001	**
C ²	2507232	1	2507232	93.72	<0.0001	**
D ²	1160438	1	1160438	43.38	<0.0001	**
残差	374536.9	14	26752.63			
失拟合	346573.7	10	34657.37	4.96	0.0683	
纯误差	27963.2	4	6990.8			
总离差	9982530	28				

注: * $p < 0.05$ 表示差异显著, ** $p < 0.01$ 表示差异极显著。

进行实验,得到实验结果(见表2),对结果进行响应面分析,得到二次回归方程 SePAP 硒含量 $Y = 8450.60 + 183.83A + 284.00B + 18.83C + 115.50D + 329.50AB - 172.00AC - 361.00AD + 298.50BC - 89.50BD - 547.50CD - 611.22A^2 - 586.47B^2 - 621.72C^2 - 422.97D^2$, 并确定最佳工艺条件为: 当时间 134.84 min, 温度 78.39 $^{\circ}\text{C}$, 投料比(PAP: $\text{H}_2\text{SeO}_3 = 1:0.81$), 催化剂量 49.37 mg 时, SePAP 硒含量最高, 理论预测值为 8518.81 $\mu\text{g/g}$ 。

方差分析表明(见表3), F 值为 25.65, p 远小于

0.01, 说明所建立的二次方程模型是成立的, 有统计学意义。失拟合项方差分析表明, F 值为 4.96, p 大于 0.05 ($p = 0.0683$), 说明模型合理。模型中 A、B、AB、AD、BC、CD、A²、B²、C²、D² 对 SePAP 硒含量影响在 0.01 水平显著, D 对 SePAP 硒含量影响在 0.05 水平显著, 模型决定系数 $R^2 = 0.962$, 调整决定系数 $R_{adj}^2 = 0.924$, 说明响应值的变化 92.0% 来源于所选因素, 模型拟合良好; 变异系数 $CV\% = 2.17\%$, 变异小说明模型的可信度高, 实验数据合理, 可重复性较好; 信噪比 $15.06 > 4$, 说明该模型具有足够高的精确度, 能

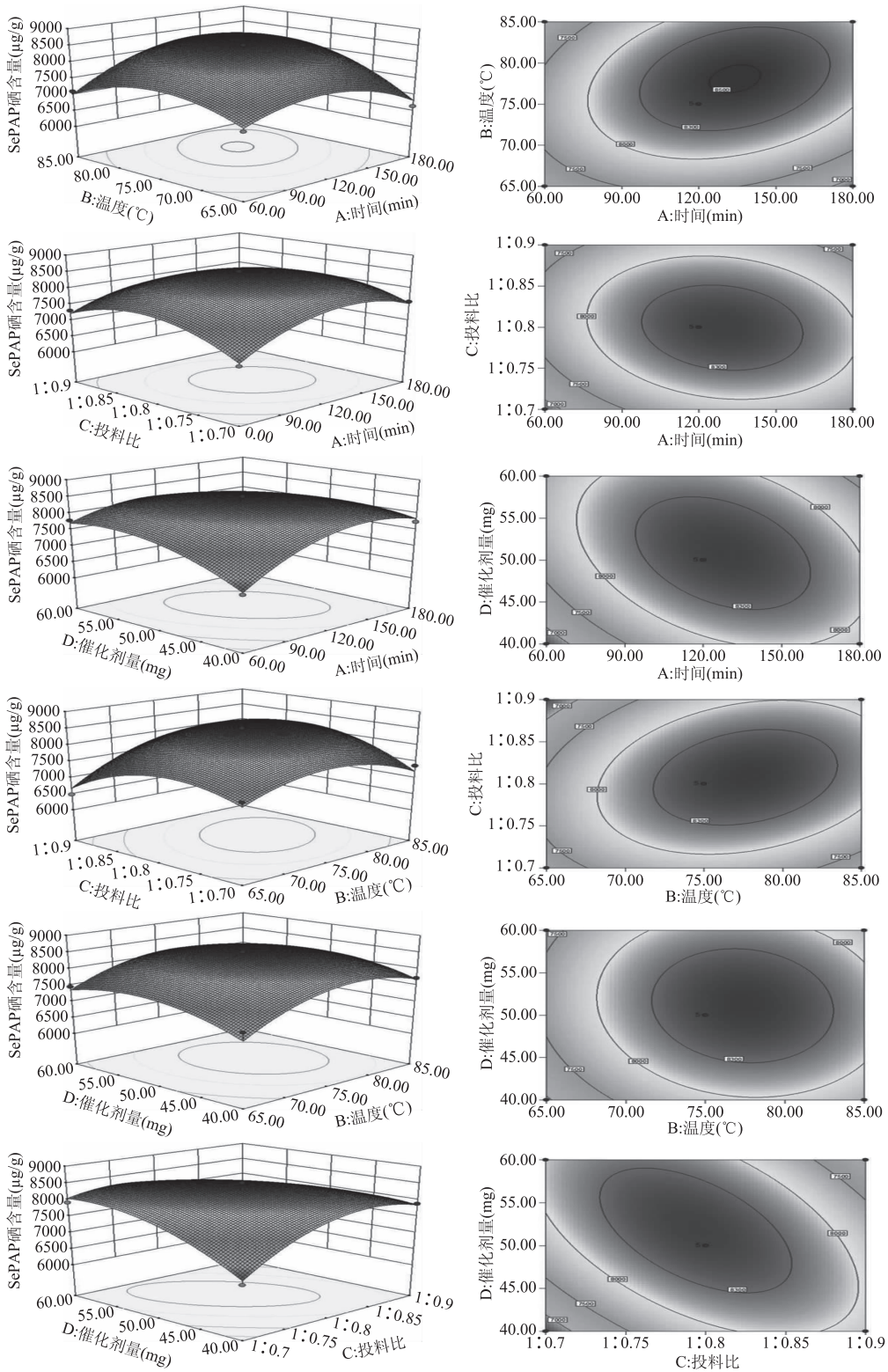


图2 两因素的交互作用对蕨麻多糖硒含量的响应面图和等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots showing the interactive effects of two factors on the selenium content of SePAP

准确地反映实验结果^[15]。

2.1.3 响应面图分析 图2中响应面图显示,随着各因素的增加,SePAP 硒含量逐渐增加,当达到一定值时 SePAP 硒含量逐渐减;等高线图显示,AB、AD、BC 和 CD 作用的等高线呈椭圆形,说明两因素之间存在显著交互作用,AC 和 BD 作用的等高线近似圆形,说明一个因素在另一个因素的不同水平对 SePAP 硒含

量的影响过程差异不明显。

2.1.4 响应面试验的验证 为了验证蕨麻硒多糖制备模型方程的合理性和可靠性,在理论最佳条件下进行验证实验,重复三次,SePAP 的硒含量平均值为 $(8572 \pm 136) \mu\text{g/g}$,实验值与模型预测值 $(8518.81 \mu\text{g/g})$ 的差值仅占预测值的 0.69%,可见该模型优化出的条件参数可靠有效。

表4 SePAP 硒含量
Table 4 Selenium content of SePAP

样品	Se-PAP1	Se-PAP2	Se-PAP3	Se-PAP4	Se-PAP5
硒含量($\mu\text{g/g}$)	2761	4278	5990	7890	8375

2.2 不同取代度 SePAP 的硒含量

随着使用的固体超强酸催化剂质量的增加,制备出的 SePAP(SePAP1-5)的硒含量也逐渐增高,依次为 2761、4278、5990、7890 和 8375 $\mu\text{g/g}$,说明催化剂含量是影响 SePAP 硒取代度的关键性因素。

2.3 不同取代度 SePAP 的表征

2.3.1 不同取代度 SePAP 的分子量 由表 5 所示,样品的 M_w 、 M_n 随硒含量的增加而降低。这是由于制备过程中 SePAP1 到 SePAP5 使用的催化剂固体超强酸越多,反应环境酸性越大,而多糖在酸性环境中更容易水解所致^[16]。

表5 不同取代度 SePAP 的分子量

Table 5 Molecular weight and distribution of SePAP with different substitution degrees

样品	$M_w \times 10^4$ (g/mol)	$M_n \times 10^4$ (g/mol)	M_w/M_n
Se-PAP1	18.63	6.9	2.7
Se-PAP2	15.7	5.87	2.67
Se-PAP3	13.82	5.56	2.48
Se-PAP4	10.7	5.04	2.12
Se-PAP5	9.29	4.28	2.17

2.3.2 紫外-红外光谱 如图 3 所示,在 200~800 nm 波长范围内对 PAP, SePAP 溶液进行扫描,发现 SePAP 在 288 和 335 nm 波长处出现两个峰,其中 288 nm 波长处吸收峰是 Se-O 键的吸收峰,334 nm 波长处的吸收峰是 Se=O 特征吸收峰,这与文献[17]报道中的 Se=O 特征吸收峰相吻合。与 PAP 的光谱相比,说明蕨麻多糖硒化成功。

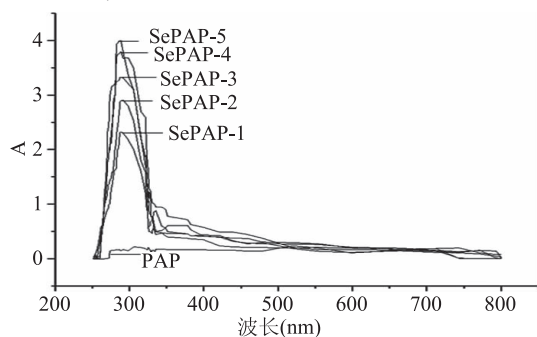


图3 PAP、SePAP 的紫外光谱

Fig.3 UV absorption spectra of PAP and SePAP

由图 4 可知,蕨麻多糖红外光谱具有典型的多糖特征吸收峰(3420.21、2931.84、1386.17、1152.33、1025.72、830.6、726.32 cm^{-1})。3420.21 cm^{-1} 处宽峰是 O-H 的伸缩振动峰,2931.84 cm^{-1} 处为 C-H 伸缩振动吸收峰,1386.17 cm^{-1} 吸收峰是 O-H 弯曲振动,1152.33 cm^{-1} 吸收峰是 C-H 弯曲振动,1025.72 cm^{-1} 处为吡喃环伸缩振动特征峰,830.6 cm^{-1} 处是吡喃环中

C-H 变角振动峰,726.32 cm^{-1} 处是吡喃环中 C-O-C 振动吸收峰^[18]。

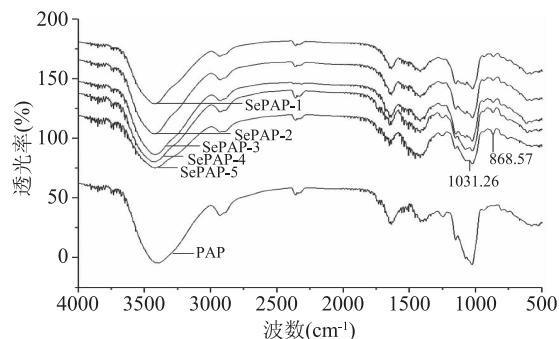


图4 蕨麻多糖、SePAP 的红外光谱

Fig.4 IR spectra of PAP and SePAP

与蕨麻多糖相比,SePAP 红外光谱中多糖的一些特征吸收峰依然明显,说明硒化对蕨麻多糖的主要结构没有大的改变。只是在一些官能团特征峰的峰形、吸收波长出现了一定的红移。O-H 伸缩振动峰和弯曲振动峰明显减小,这说明硒化发生在羟基位置;并且在 868 cm^{-1} 附近出现了是 Se=O 伸缩振动吸收峰,1031 cm^{-1} 附近的出现了 SeO_3^{2-} 的 O-Se-O 对称伸缩振动吸收峰^[19-20],证明透析后的 SePAP 中无游离的亚硒酸根,而是相互结合形成化学键,其分子中存在亚硒酸基团。

2.3.3 热重分析 由图 5 可知,SePAP(1~5)的 TG 谱形状相似,第一个失重峰是失去吸附水,当 120 $^{\circ}\text{C}$

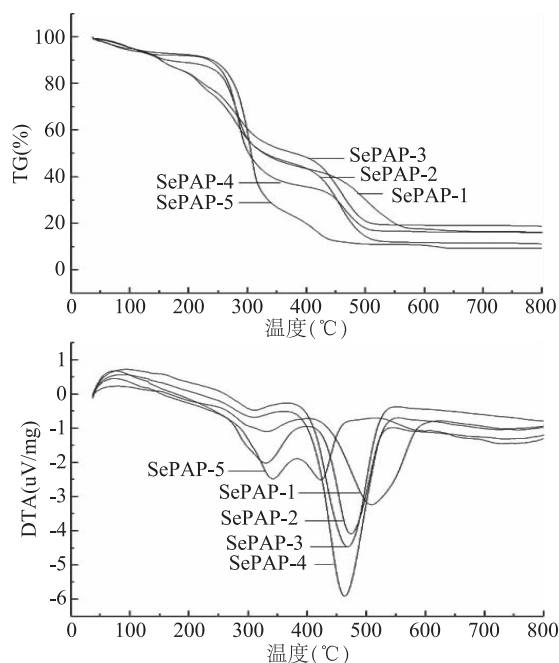


图5 不同取代度 SePAP 的热重分析

Fig.5 Thermal analysis of SePAP with different substitution degrees

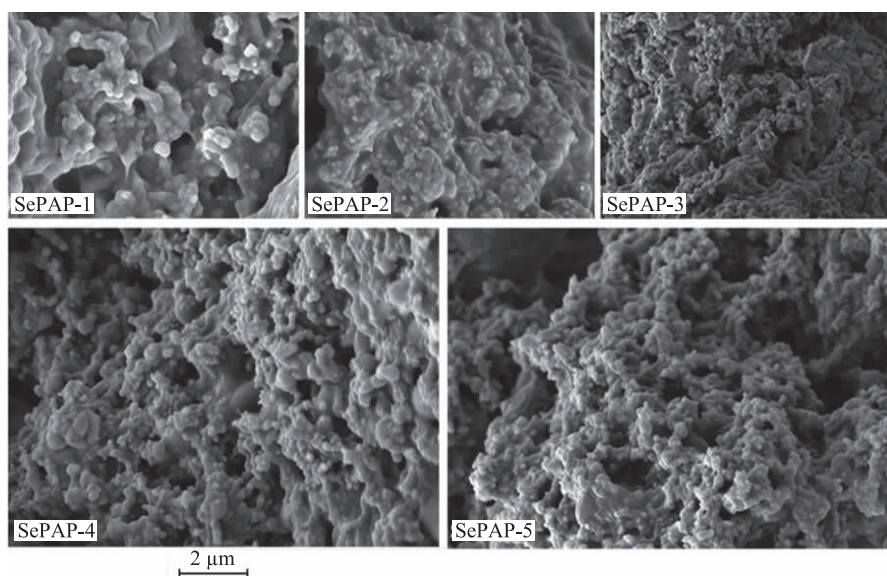


图6 不同取代度 SePAP 的扫描电镜图(×11.60k)

Fig.6 SEM pictures of SePAP with different substitution degrees(×11.60k)

时,失重量约为10%,因为尽管SePAP在制备后经过了冷冻干燥处理,但是仍会吸附一部分水份;320~430℃间,SePAP(1~5)出现第二个失重峰,失重量约达到了50%,此时SePAP自身发生剧烈的分解反应;600℃以后,失重趋势减缓,基本达到恒质量;从DTA图可以看出,整个失重过程都是放热反应,伴随着硒含量的上升,SePAP开始分解的温度越来越低,说明硒取代度越高的蕨麻多糖的热稳定性越低,可能因为C-O键结合牢固,不易裂解,当多糖的羟基被亚硒酸化后,C-O键的电子云向亚硒酸基团转移,增强了Se=O键结合强度,削弱了C-O键的结合力,使亚硒酸基团成为容易失去的基团^[21-22]。失去亚硒酸基团引起了多糖的系列分解反应,从而加快SePAP的裂解。

2.3.4 扫描电镜 如图6扫描电镜图所示,SePAP呈不规则的疏松孔隙状,表面凸凹不平呈颗粒附着状,并带有孔洞,可能是由于许多分子或分子集团聚集黏结所致,说明多糖分子间相互存在排斥力,分子间吸引力较为弱小^[23];而随着取代度的增加,颗粒越小结构越松散,这也与其分子量大小的表征相吻合。

2.4 不同取代度的SePAP对O₂⁻·、·OH和DPPH·的清除作用

由图7可知,不同取代度的SePAP对O₂⁻·、·OH和DPPH·都有清除作用,清除能力随着取代度的增加而增强,当SePAP的硒含量从5990 μg/g增加到7890 μg/g时,对O₂⁻·的清除率从28.64%增加到32.45%,对·OH的清除率从60.33%增加到65.8%,对DPPH·的清除率从42.61%增加到64.51%。对O₂⁻·和·OH的清除能力提高幅度相对平缓,对DPPH·自由基的清除能力提高幅度比较高。

3 结论

本研究通过单因素和响应面设计探究SePAP的最佳制备工艺为:时间134.84 min、温度78.39℃、投

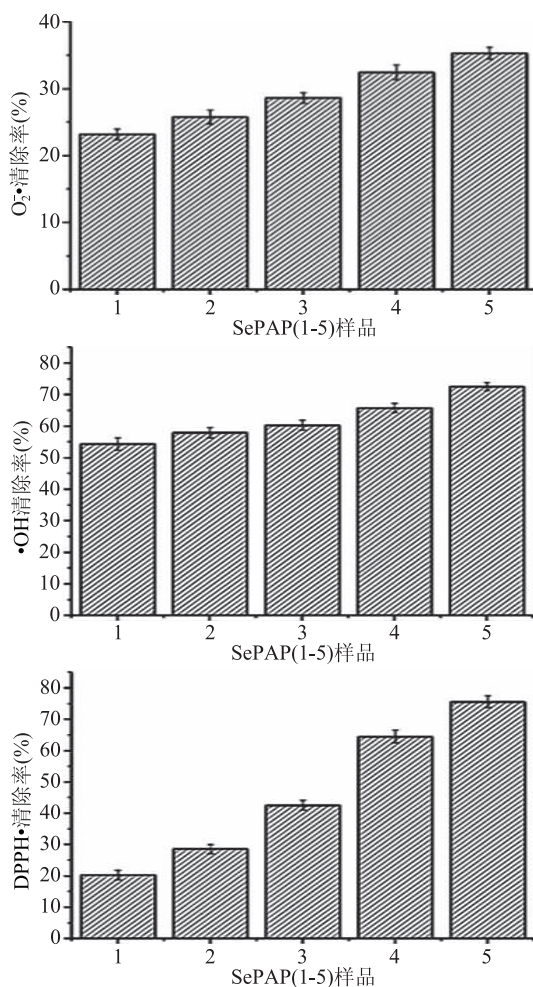


图7 不同取代度SePAP对O₂⁻·、·OH和DPPH·的清除能力比较

Fig.7 Scavenging capacity of SePAP with different substitution degrees against O₂⁻·, ·OH and DPPH free radical

料比(PAP:H₂SeO₃=1:0.81)、催化剂量49.37 mg;再调节条件合成不同取代度的SePAP,并对其结构进行

系列表征,发现取代度越高的 SePAP 的分子量越小、热稳定性越低、空间结构越松散,体外抗氧化实验表明,SePAP 对 O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 DPPH \cdot 的清除能力显著并随着硒取代度增加而增强。本研究说明将硒和蕨麻多糖有机结合制备的 SePAP 是更安全、稳定的抗氧化剂。为开发 SePAP 作为抗氧化的保健食品奠定理论基础,同时促进西北特色蕨麻资源的深加工利用。

参考文献

- [1] 陈历程,张勇.微量元素硒的研究现状及其食品强化[J].食品科学,2002,23(10):134-137.
- [2] 梁欢,黄进,王丽,等.药用植物硒多糖的研究进展[J].中国中药杂志,2018(15).
- [3] Surhio M M, Wang Y, Xu P, et al. Antihyperlipidemic and hepatoprotective properties of selenium modified polysaccharide from *Lachnum* sp [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99.
- [4] Ferreira I C, Heleno S A, Reis F S, et al. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities[J]. Phytochemistry, 2015, 114:38-55.
- [5] 魏慧.蕨麻多糖对镉致免疫抑制小鼠的免疫调节机理研究[D].兰州:兰州大学,2016.
- [6] 葛肖健,张永亮,师超峰,等.蕨麻多糖对缺氧损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用及机制[J].山东医药,2017,57(5):8-11.
- [7] 闵光涛,冯颖,闵光宁,等.蕨麻提取物保护小鼠四氯化碳急性肝损伤的作用机制[J].兰州大学学报(医学版),2012,38(1):49-52.
- [8] Zhao B, Zhang J, Yao J, et al. Selenylation modification can enhance antioxidant activity of *Potentilla anserine* L. polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58(2):320-328.
- [9] 柴刚,魏洪敏,王俊杰,等.原子荧光法测定花椰菜、青花菜中的硒含量[J].农产品质量与安全,2018(1):80-83.
- [10] Ding W, Zhou J, Zeng Y, et al. Preparation of oxidized sodium alginate with different molecular weights and its application for crosslinking collagen fiber [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157:1650-1656.
- [11] 封燕,贡小辉,韦德群,等.金蝉花多糖的抗氧化活性及结构分析[J].食品科学,2016,37(12):19-24.
- [12] 秦利鸿,曹建波,易伟松.绿茶多糖的扫描电镜制样新方法及其原子力显微镜观察[J].电子显微学报,2009,28(2):162-167.
- [13] 陈晋明,冯翠萍.白灵菇多糖抗氧化活性研究[J].食品科技,2015,40(2):239-242.
- [14] 贾之慎,郭建敏.比色法测定 Fenton 法产生的羟基自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(2):184-186.
- [15] 宋佳敏,王鸿飞,孙滕,等.响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J].食品科学,2018,39(4):275-281.
- [16] 白婕,郭凯,沈银梅.Box-Behnken 响应面法优化富硒平菇柄多糖提取工艺研究[J].经济林研究,2017,35(2):121-126.
- [17] 陈兵兵,王振斌.葛根多糖的基本理化特性研究[J].食品研究与开发,2016,37(15):10-13.
- [18] Wang D, Sun S Q, Wu W Z, et al. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis*, and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice [J]. Carbohydr Polym, 2014, 105(1):127-134.
- [19] 王占一,戴博,张立华,等.石榴皮多糖硒酸酯制备工艺参数优化及其结构分析[J].食品科学,2016,37(10):40-46.
- [20] 葛明明,胡北,孙丽娜,等.硒化蒲公英多糖的制备工艺及硒含量测定的研究[J].食品工业科技,2014,35(8):276-280.
- [21] 赵玉苹.海藻硒多糖的合成及生物活性研究[D].广州:暨南大学,2006.
- [22] 高义霞,袁毅君,周向军,等.罗望子多糖硒酸酯的制备及表征[J].药物分析杂志,2012(7):1222-1226.
- [23] 李璐,钟耀广,刘长江.香菇多糖的纯化及电镜分析[J].山西农业科学,2010,38(3):6-9.

**本刊所付稿酬中已包含数字出版
(包括镜像、光盘、网络、移动终端机
其他新型服务方式)应付的稿酬。**