

李爽, 赵宏, 王宇亮, 等. 蒲公英多糖乙酰化修饰、体外抗氧化及抑菌作用研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 18–25. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040033

LI Shuang, ZHAO Hong, WANG Yuliang, et al. Antioxidant and Anti-bacteria Effects of Acetylated *Taraxacum mongolicum* Polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 18–25. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040033

· 研究与探讨 ·

蒲公英多糖乙酰化修饰、体外抗氧化及抑菌作用研究

李爽, 赵宏, 王宇亮, 沈宇, 刘佳蕾, 孙诗晴, 周子筠, 张宇*

(佳木斯大学药学院, 黑龙江省新药创制与药效毒理评价重点实验室, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要:目的: 以蒲公英多糖为原料, 使用乙酸酐法修饰得到乙酰化蒲公英多糖, 对其结构特征、体外抗氧化性以及抑菌效果进行研究。方法: 采用水提醇沉法等制备蒲公英纯化多糖, 选择乙酸酐法修饰得到乙酰化蒲公英多糖。利用红外光谱、扫描电镜、X-射线粉末衍射等测定蒲公英纯化多糖和乙酰化蒲公英多糖的结构特征。在此基础上, 应用体外化学模型法评估多糖对清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基和还原力的能力, 并对其通过纸片法进行抑菌试验。结果: 蒲公英纯化多糖的多糖含量为 68.75%, 红外光谱、扫描电镜、X-射线粉末衍射等结构表征证实乙酰化蒲公英多糖修饰成功, 而且化学结构修饰后的乙酰化多糖, 并未改变结构骨架。在浓度范围 0.1~2.0 mg/mL 内, 改性前后的蒲公英纯化多糖对 DPPH 自由基 IC_{50} 值分别为 5.393 ± 0.941 和 2.153 ± 0.093 mg/mL; 对超氧阴离子自由基 IC_{50} 值分别为 6.513 ± 0.500 和 2.092 ± 0.825 mg/mL; 对羟自由基 IC_{50} 值分别为 0.626 ± 0.034 和 0.322 ± 0.010 mg/mL; 对还原力最大吸光度值为 0.138 ± 0.019 和 0.239 ± 0.022 。随多糖浓度的递增, 经修饰后蒲公英纯化多糖的抗氧化活性逐渐增强。此外, 乙酰化蒲公英多糖抑菌能力强于蒲公英纯化多糖, 且随多糖浓度的增加抑菌能力也随之增大。结论: 蒲公英多糖经乙酰化修饰后, 可显著提高体外抗氧化性和抑菌效果。

关键词: 蒲公英多糖, 乙酰化, 结构表征, 抗氧化性, 抑菌作用

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)03-0018-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040033

本文网刊:



Antioxidant and Anti-bacteria Effects of Acetylated *Taraxacum mongolicum* Polysaccharide

LI Shuang, ZHAO Hong, WANG Yuliang, SHEN Yu, LIU Jiale, SUN Shiqing, ZHOU Zijun, ZHANG Yu*

(Key Laboratory of New Drug Discovery and Efficacy Toxicology Evaluation, Institute of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract: Objective: To prepare acetylated *Taraxacum mongolicum* polysaccharide from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz, and study its structural characteristics, antioxidant activity and antibacterial activity. Methods: The structure of the polysaccharide extracted by water extraction and then alcohol precipitation method was modified by acetic anhydride method to obtain its acetylated. Infraed spectroscopy, scanning electron microscope and X-ray powder diffraction were used to structural characteristics of the polysaccharide and its acetylated. On the basis, the antioxidant activities were evaluated by 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals, superoxide anion free radicals, hydroxyl free radicals and reducing power scavenging abilities using chemical model method, and the anti-bacteria tests was evaluated through the paper method *in vitro*. Results: The extraction yield of purified dandelion polysaccharide was 68.75%. Infraed spectroscopy,

收稿日期: 2021-04-06

基金项目: 黑龙江省自然科学基金青年项目 (QC2018119); 黑龙江省卫生健康委科研项目 (2018-493); 佳木斯市科技专项 (2016-07); 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目 (2017-KYYWF-0590); 中央支持地方高校改革发展基金 (2019zyzcd01); 佳木斯大学优秀学科团队项目 (JDXKTD-2019005)。

作者简介: 李爽 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物多糖提取分离纯化及结构鉴定, E-mail: Li_Shuang0717@163.com。

*** 通信作者:** 张宇 (1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然药物活性成分筛选及新药开发, E-mail: zhangyu@jmsu.edu.cn。

scanning electron microscope and X-ray powder diffraction of characterization confirmed the successful synthesis of acetylated. The basic structure framework of polysaccharide was not changed after being modified with acetylated. In the concentration range of 0.1~2.0 mg/mL, IC_{50} values were 5.393 ± 0.941 and 2.153 ± 0.093 mg/mL for pure polysaccharide and acetylated polysaccharides against 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) free radicals, respectively, 6.513 ± 0.500 and 2.092 ± 0.825 mg/mL against superoxide anion, respectively, 0.626 ± 0.034 and 0.322 ± 0.010 mg/mL against hydroxyl radical, respectively, and the maximum scanning rates were 0.138 ± 0.019 and 0.239 ± 0.022 reducing power, respectively. As the concentration increased, the antioxidant activity of acetylated polysaccharides increased gradually. In addition, the antibacterial activity of the acetylated polysaccharides was stronger than the unmodified polysaccharides, and the antibacterial activity with the increase of polysaccharide concentration. Conclusion: The structural stability of purified *Taraxacum mongolicum* polysaccharide was increased after being modified with acetylated, leading to a significant increase in the antioxidant activity and antibacterial *in vitro*.

Key words: *Taraxacum mongolicum* polysaccharide; acetylated; structural characterization; antioxidant activity; antibacterial

蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz)作为一种多年生菊科草本植物,可称婆婆丁、奶汁草、华花郎等,性味苦、甘、寒,归肝、胃经,具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋之功效^[1]。蒲公英可生长在各种类型的土壤中,且在沙质土壤里生长能力最为茁壮^[2]。国家卫健委于 2002 年将蒲公英收录在药食同源目录中药品名单列表内^[3]。近年来研究发现,蒲公英富含有效活性成分如黄酮、香豆素、三萜、多糖等。其中,多糖类化合物作为蒲公英的主要有效成分之一,其具有良好的解热镇痛、抗菌消炎、保肝利胆、降血糖、抗肿瘤等多种药理功效^[4-10]。

多糖分子的改性修饰多指通过物理、化学、生物等改变多糖结构的手段。近年来许多报道表明,多糖的化学修饰相比于相应的天然多糖具有较好的生物活性^[11]。对多糖结构上的化学修饰多根据其结构上的活性基团(如羟基、羧基、氨基等)在化学反应下引入新的官能团(如硫酸衍生化、硒化、羧甲基化等)^[12]。对多糖进行乙酰化修饰是一种常见的改性方法。乙酰基取代多糖链上的羟基,改变多糖的分子结构与形态,改变多糖的溶解性,对多糖的生物活性产生影响^[13-17]。经研究表明,对马齿苋多糖通过对其引入乙酰官能团后,可增强其抗氧化活性;另外,在乙酰化修饰后的金针菇多糖的抑菌活性变化与浓度相关。目前文献关于蒲公英多糖的研究仅限于提取、纯化、结构解析等方面的研究^[18-19],在此基础上对其经化学反应得到的乙酰化蒲公英多糖结构、抗氧化性及抑菌能力等的研究未见报道。

因此,本文利用乙酸酐作为反应试剂,对蒲公英多糖纯化后进行乙酰化修饰,通过红外光谱、扫描电镜、X-射线粉末衍射等对蒲公英纯化多糖(Polysaccharides from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz, TMP)和乙酰化蒲公英多糖(Acetylated polysaccharides from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz, Ac-TMP)结构进行表征与分析,并评价其体外抗氧化性及抑菌性,为蒲公英多糖修饰乙酰化后效果进行研究和产品利用提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蒲公英干燥全草 批号为: 170801, 2019 年 9 月购自黑龙江省同仁堂大药房; 透析袋分子量截留为 3000 Da 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖、氯化乙酰胆碱、DPPH 美国 Sigma-Aldrich 公司; 苯酚、氢氧化钠、浓盐酸、盐酸羟胺、三氯化铁、三氯甲烷、正丁醇、浓硫酸、乙酸酐、铁氰化钾、三氯乙酸分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 金黄色葡萄球菌, 菌种编号: LWCC1002(CMCC(B)26003)、大肠杆菌, 菌种编号: LWCC1033(ATCC25922) 上海鲁微科技有限公司; 普通肉汤培养基、Mueller-Hinton 琼脂 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

FA2004 型电子天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; DL-5-B 低速多管离心机 上海安亭科学仪器厂; FDU-1200 冷冻干燥机 日本东京理化; RE-2000A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; Vortex-1/2 涡旋混合器 上海沪西分析仪器厂有限公司; 765 紫外可见分光光度计 上海仪电科学仪器股份有限公司; FTIR-650 傅里叶变换红外光谱仪 天津港东科技股份有限公司; Rigaku Mini Flex600 粉末衍射仪 日本理学公司; Phenom Pro X 扫描电镜 荷兰飞纳公司; LDZF-30L 立式高压蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 蒲公英多糖的提取 称取 1 kg 蒲公英干燥全草, 加入 2 L 的超净水, 浸泡 2 h 后, 在 90 ℃ 加热提取 3 次, 每次 2 h, 在减压浓缩条件下合并 3 次滤液, 与最终体积的 80% 乙醇放置 24 h, 以 4500 r/min 离心 10 min, 收集沉淀物, 在水中复溶沉淀物, 在 130 Pa、45 ℃ 真空干燥, 得到蒲公英粗多糖^[20]。

1.2.2 蒲公英多糖的脱蛋白与纯化 取蒲公英粗多糖溶于超净水中, 准备 10% 的多糖溶液, 将 Sevage 试剂(氯仿: 正丁醇=4:1)加入为 1/4 体积比的多糖溶液中, 在超声条件下完全振荡 30 min, 4500 r/min 离

心 10 min, 弃去下层蛋白, 保留上清液, 并透析(分子透过率为 3000 Da) 48 h, 过程重复 3~5 次。然后用 80% 乙醇沉淀除蛋白后的多糖, 4500 r/min 离心 10 min, 冷冻干燥后即得脱蛋白蒲公英多糖^[21]。

将得到已除去蛋白的蒲公英多糖溶解至超净水中配制成浓度为 4 mg/mL 溶液, 通过 AB-8 大孔树脂对多糖溶液进行脱色的氢键吸附作用, 使用超净水进行洗脱并调节流速为 1 mL/min, 收集流出液, 减压浓缩冷冻干燥, 得到蒲公英纯化多糖^[22]。

1.2.3 蒲公英纯化多糖的含量测定 精准称量 105 ℃ 干燥至恒重的 10 mg 葡萄糖标准品, 在 100 mL 容量瓶内加超净水溶解标准品并定容, 得到 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准品溶液。移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 标准品溶液置于具塞刻度试管中, 依次加入超净水, 使最终体积为 2.0 mL。分别向各浓度具塞刻度试管中精密移取量为 1 mL 的 5% 苯酚溶液并涡旋 1 min。再立刻移取 5 mL 浓硫酸混匀, 在 90 ℃ 水浴锅内 15 min 热浴, 取出冷却至 25 ℃。在 490 nm 波长下测量吸光度并绘制标曲, 得到回归方程 $y=19.673x+0.219$, $R^2=0.9996$ 。并配制浓度为 0.1 mg/mL 的 TMP 多糖溶液, 同上述操作测得吸光度值, 将结果代入回归方程计算出浓度和 TMP 的糖含量, 计算公式如下:

$$\text{糖含量}(\%) = \frac{x}{0.1} \times 100$$

式中: x 为通过回归方程计算出的浓度, mg/mL。

1.2.4 蒲公英多糖的乙酰化修饰 采用乙酸酐法制备^[23-24], 称取 0.5 g 干燥的 TMP 溶解在 30 mL 超净水, 超声充分振荡 5 min 直至获得均匀溶液。移取 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节反应液 pH 为 9.0, 在 30 ℃ 水浴条件下, 交替加入 2 mL 乙酸酐和 2 mol/L 氢氧化钠溶液, 消耗氢氧化钠溶液, 保证 2 mL 乙酸酐量用尽, 控制反应溶液 pH 维持在 7.0~9.0。维持 30 ℃ 水浴锅热浴反应 3 h, 反应溶液稳定在 pH8.0 以终止反应。在温度为 25 ℃ 条件下反应结束后, 用 0.5 mol/L 盐酸改变反应液 pH 为 7.0。在饮用水流水状态下透析(分子透过率为 3000 Da) 24 h, 然后在超净水流下透析 24 h, 通过减压浓缩反应液, 在冷冻干燥条件下, 得到乙酰化蒲公英多糖。

1.2.5 乙酰基取代度的测定

1.2.5.1 绘制标准曲线 采用羟胺比色法^[25]检测, 配制 0.001 mol/L 的乙酸钠溶液, 称取 0.0182 g 氯化乙酰胆碱标准品, 将标准品溶解于乙酸钠溶液中使之成为标准溶液, 精密移取氯化乙酰胆碱标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于具塞刻度试管中, 补水至 2 mL。向试管内先移取 2 mL 临用现配的碱性羟胺溶液, 在涡旋混匀 10 s, 于 25 ℃ 条件下放置 4 min, 再移取 4 mol/L 盐酸溶液 1 mL 和 0.37 mol/L 三氯化铁-盐酸溶液 1 mL, 完全反应后, 在 540 nm 波长下测量吸光度, 绘制标准曲线。计算

横坐标为氯化乙酰胆碱标准溶液得到的不同浓度乙酰基与纵坐标为其吸光度值回归方程 $y=0.206x+0.0221$, $R^2=0.9989$ 。

1.2.5.2 取代度的计算 精密称取干燥的乙酰化蒲公英多糖溶解在超净水中得到 0.5 mg/mL 乙酰化蒲公英多糖溶液, 同 1.2.5.1 步骤的操作方法进行实验。代入标曲得到乙酰化蒲公英多糖的乙酰基质量 M_1 , 按照下述公式计算到乙酰化蒲公英多糖的乙酰基取代度。

$$\text{乙酰基百分含量}(W, \%) = \frac{M_1}{M_2} \times 100$$

$$\text{取代度}(DS) = \frac{162 \times W}{4300 - (43 - 1) \times W}$$

式中: M_1 为乙酰化蒲公英多糖中乙酰基的质量, mg; M_2 为乙酰化蒲公英多糖的质量, mg; 162 为多糖中葡萄糖的相对分子质量; 43 为乙酰基的相对分子质量; 1 为氢原子的相对分子质量。

1.2.6 蒲公英纯化多糖及乙酰化多糖结构表征测定

1.2.6.1 红外光谱(FI-IR)分析 精密称取 TMP 与 Ac-TMP 各 2 mg, 与干燥溴化钾粉末以 1:50 的比例混匀, 通过研磨与压片的过程, 采用傅里叶变换红外光谱仪经红外光谱扫描, 确定扫描范围在 4000~400 cm^{-1} 之间。

1.2.6.2 扫描电镜(SEM)分析 称取适量干燥 TMP 和 Ac-TMP 样品, 分别于载物台上粘贴导电胶, 涂一层导电的金属薄膜, 将其导电过的样品放置于离子溅射仪内, 实验在 15 kV 加速电压下扫描电子显微镜下进行, 观察, 并拍照记录以供分析多糖样品表面特征。

1.2.6.3 X-射线粉末衍射(XRD)分析 将干燥 TMP 和 Ac-TMP 样品分别均匀分布在样品板上, 并充分压实在载玻片后, 置放于 X-射线粉末衍射仪中, 使石墨单色化高强度具有 $\text{Cu-K}\alpha$ 辐射光线下, RS 为 0.3 mm, 测量角度为 2θ , 测量范围在 $5^\circ \sim 50^\circ$, 扫描速度为 $5^\circ/\text{min}$ 。

1.2.7 体外抗氧化测定

1.2.7.1 DPPH 自由基清除活性的测定 参考文献^[26]报道加以修改, 称取 1 mg DPPH 溶解在 10 mL 无水乙醇中, 移取浓度为 0.1 mg/mL 临用现配的 DPPH-无水乙醇溶液 2 mL。分别精密转移 TMP 与 Ac-TMP 溶液(不同浓度 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) 2 mL 置于具塞刻度试管中, 在涡旋混合器混匀 20 s, 在室温阴暗处静置反应 5 min, 于 517 nm 处波长测定吸光度。分别使用超净水调零, 以抗坏血酸溶液作为阳性组对照, 以 DPPH 溶液作为空白组对照。按照下述公式进行计算 DPPH 自由基清除活性。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 空白组对照溶液的吸光度值; A_1 样品

的吸光度值。

1.2.7.2 超氧阴离子自由基清除活性的测定 采用邻苯三酚自氧法^[27]加以修改,精密移取 TMP 与 Ac-TMP 溶液(不同浓度 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) 2 mL,在具塞刻度试管中加入 3 mL Tris-HCl 溶液(0.05 mmol/L, pH=8.2),涡旋混合 10 s,在 25 ℃ 水浴锅中维持 10 min,同时迅速加入已预热过 200 μL 的 15 mmol/L 邻苯三酚溶液,室温反应 4 min。在 320 nm 波长下测量吸光度。使用超净水调零,Tris-HCl 溶液作为空白组对比和抗坏血酸溶液作为阳性组对比。按照下述公式计算超氧阴离子自由基清除活性。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0 - A_2} \times 100$$

式中: A_0 为空白对照溶液的吸光度值; A_1 为样品的吸光度值; A_2 为 Tris-HCl 液吸光度值。

1.2.7.3 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性的测定 根据文献^[28]的方法,精密吸取 TMP 与 Ac-TMP 溶液(不同浓度 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) 2 mL,先移取 2 mL 0.6 mmol/L 硫酸亚铁溶液,再加 2 mL 0.6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液和 2 mL 0.6 mmol/L 过氧化氢溶液于具塞刻度试管中,为保证混合均匀选用涡旋 20 s,37 ℃ 反应 35 min,在 510 nm 波长下测量吸光度。使用超净水调零,抗坏血酸溶液作为阳性组对比。按照下述公式计算羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性。

$$\text{羟自由基清除率(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 空白对照溶液的吸光度值; A_1 样品的吸光度值。

1.2.7.4 还原力实验 参考文献^[29]方法加以修改,精密移取 TMP 与 Ac-TMP 溶液(不同浓度 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) 1.5 mL,先加入磷酸溶液(0.2 mol/L, pH=6.0) 1.5 mL,再加入 1% 铁氰化钾 1.5 mL,在 50 ℃ 水浴加入保持 30 min,取出冷却至室温后,加入 10% 三氯乙酸 1.5 mL,涡旋混匀 10 s,放置 3 min 后,移取 2 mL 0.1% 三氯化铁溶液,充分反应 10 min,在 700 nm 处波长测定吸光度。

1.2.8 抑菌实验 采用滤纸片药敏实验法^[30],打孔器制备直径在 6 mm 的圆形无菌滤纸片,在高压灭菌(125 ℃, 30 min)条件下处理,放置于超净操作台备用。在紫外光照射下,将滤纸片浸于多糖浓度分别为 25、50、100、200 mg/mL 的 TMP 与 Ac-TMP 溶液中及空白对照的生理盐水溶液中。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在活化条件下,分别于琼脂固体培养基上使用无菌三角挂铲涂布,放置 5 min 后,在无菌条件下将多糖滤纸片取 2~3 张附着于固体培养基表面,同时设置 3 个平行试验组,在调节至 37 ℃ 的恒温培养箱将其放入,设置时间 12 h,取出附着多糖样

品的固体培养基并利用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3 数据处理

上述实验所得数据用 Origin Pro 2021 处理作图,使用 SPSS 进行试验数据相对标准偏差,并进行差异的显著性分析, $P < 0.05$ 表示为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 蒲公英纯化多糖的含量测定及乙酰化蒲公英多糖取代度测定

经大孔树脂 AB-8 洗脱后得到蒲公英纯化多糖,多糖含量测定结果为 68.75%。通过计算得到经修饰后的蒲公英多糖乙酰基取代度为 0.227。

2.2 蒲公英纯化多糖及乙酰化多糖结构表征

2.2.1 FT-IR 结果分析 由图 1 可知,乙酰化修饰前的蒲公英多糖均具有多糖成分红外特征吸收峰,峰形呈强且宽的分子内或分子间氢键显现的 O-H 伸缩振动峰在 3409 cm^{-1} 附近出现;基团为甲基($-\text{CH}_3$)、次甲基($-\text{CH}_2-$)C-H 伸缩振动峰的峰形较强在 2940 cm^{-1} 附近出现;官能团为甲基($-\text{CH}_3$)、次甲基($-\text{CH}_2-$)的 C-H 变形振动峰在 1417 cm^{-1} 处出现;1095 cm^{-1} 附近处存在吡喃环吸收峰。乙酰化修饰后的蒲公英多糖在 1103 cm^{-1} 处有酯基($-\text{COOR}$)较强的 C-O 单键伸缩振动峰;官能团为酯基($-\text{COOR}$)的 C=O 双键伸缩振动峰在 1569 cm^{-1} 处存在,为较强峰形,说明蒲公英纯化多糖引入乙酰基官能团成功。

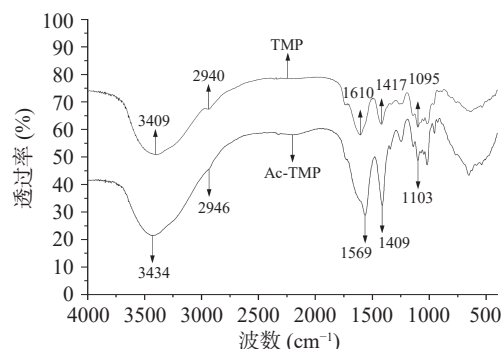


图 1 TMP 和 Ac-TMP 红外光谱图

Fig.1 IR spectra of TMP and Ac-TMP

2.2.2 SEM 结果分析 由图 2 显示,从表面状态观察得到,蒲公英纯化多糖表面粗糙,附着纹裂清晰,排列不规律、大小不均一,存在较大间隙;乙酰化修饰后,Ac-TMP 呈片状,附着裂纹平滑,排列严密紧实、大小较为均一,中间间隙较小。由于 TMP 属于

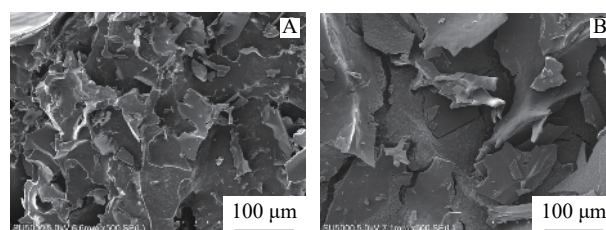


图 2 TMP(A)和 Ac-TMP(B)扫描电镜图

Fig.2 SEM of TMP(A) and Ac-TMP(B)

高分子碳水化合物,结构上是通过氢键交联糖苷键结合的糖链^[31],在通过乙酰化修饰后,极有可能造成糖苷键上的氢键断裂,被酯基取代,导致糖链间的氢键密度变大,增加表面光滑度,则说明 TMP 在结构修饰后可形成乙酰化结构的复合物。

2.2.3 XRD 结果分析 由图 3 可知,修饰前后的多糖结构在 XRD 图谱基本相同,仅在峰强上略显不同,说明对其结构修饰后,并未破坏多糖结构的基本骨架,XRD 显示结果与 FT-IR 显示结果差别不大。TMP 整个衍射图谱出现一个峰,样品在入射角处出现少量的晶体衍射峰,TMP 在 2θ 范围为 $17.86^\circ \sim 26.40^\circ$ 入射时出现微量晶体衍射峰外,几乎为无定型区。同样的,Ac-TMP 在衍射图上也出现一个峰,在 2θ 范围为 $18.36^\circ \sim 27.64^\circ$ 入射时出现少量的晶体衍射峰,为无定型特征。总的来说,TMP 与 Ac-TMP 未呈现较大的晶体构造趋势,仅为微量结晶形态,属无定型粉末结构。

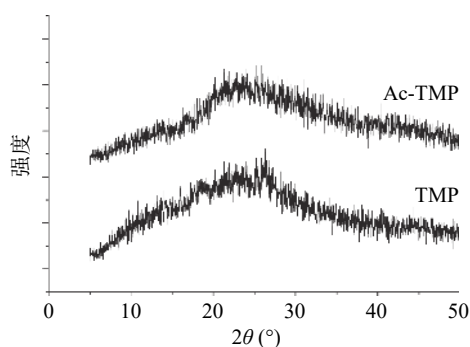


图 3 TMP 和 AC-TMP 的 X-射线粉末衍射图
Fig.3 XRD patterns of TMP and Ac-TMP

2.3 体外抗氧化测定

2.3.1 DPPH 自由基清除活性的测定结果 由图 4 可知,在 $0.1 \sim 2.0$ mg/mL 的质量浓度之间,抗坏血酸对 DPPH 自由基清除效果最佳,Ac-TMP 对 DPPH 自由基清除相对于 TMP 清除效果显著 ($P < 0.05$)。两者的清除率随质量浓度的增加呈量效关系,质量浓度在 2 mg/mL 时,TMP 和 Ac-TMP 清除率分别为 $44.64\% \pm 1.71\%$ 和 $55.41\% \pm 1.72\%$,其 IC_{50} 值分别为 5.393 ± 0.941 和 2.153 ± 0.093 mg/mL。由此表明,

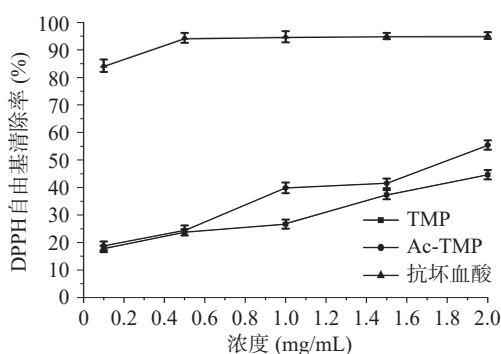


图 4 TMP 和 Ac-TMP 对 DPPH 自由基清除作用
Fig.4 Scavenging effects of TMP and Ac-TMP on DPPH free radicals

乙酰基团的引入对 DPPH 自由基清除力能有显著性 ($P < 0.05$) 的增强作用。

2.3.2 超氧阴离子自由基清除活性的测定结果 由图 5 可知,各浓度抗坏血酸对超氧阴离子自由基清除率较高,不同浓度的 TMP 和 Ac-TMP 均具有清除超氧阴离子自由基的作用。总的来说,随着多糖浓度的递增,超氧阴离子自由基的去除率有明显的升高趋势。此外,Ac-TMP 清除超氧阴离子自由基的能力明显优于 TMP,在浓度为 2 mg/mL 时,Ac-TMP 对超氧阴离子自由基清除率可达 $55.45\% \pm 1.55\%$,其 IC_{50} 值为 2.092 ± 0.825 mg/mL。

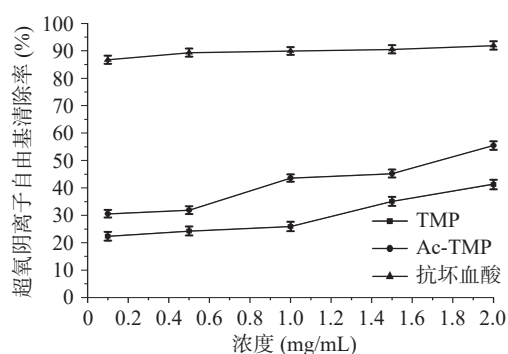


图 5 TMP 和 Ac-TMP 对超氧阴离子自由基清除作用
Fig.5 Scavenging effects of TMP and Ac-TMP on superoxide anion radicals

2.3.3 羟自由基($\cdot OH$)清除活性的测定结果 由图 6 结果表明,Ac-TMP 和 TMP 对羟自由基清除活性相当,两者均表现出较强的清除能力,前者略高于后者;抗坏血酸对羟自由基的清除率明显优于 Ac-TMP 和 TMP。当质量浓度为 2.0 mg/mL 时,Ac-TMP 和 TMP 的清除率分别为 $82.76\% \pm 1.63\%$ 、 $69.69\% \pm 1.74\%$ 。抗坏血酸的 IC_{50} 值为 0.005 ± 0.017 mg/mL,TMP 和 Ac-TMP 的 IC_{50} 值分别为 0.626 ± 0.034 和 0.322 ± 0.010 mg/mL。说明对羟自由基的作用强弱顺序为抗坏血酸、Ac-TMP、TMP。

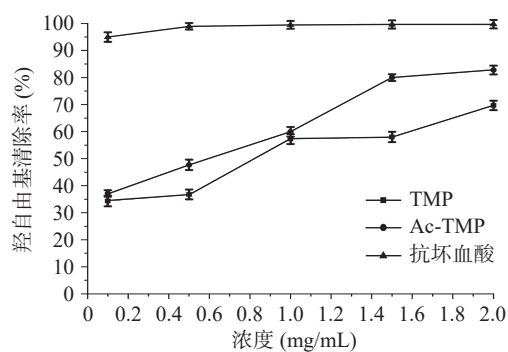


图 6 TMP 和 Ac-TMP 羟自由基清除作用
Fig.6 Scavenging effects of TMP and Ac-TMP on hydroxyl radicals

2.3.4 还原力测定结果 由图 7 可知,TMP 与 AC-TMP 均具有还原能力,在质量浓度 $0.1 \sim 2.0$ mg/mL 之间,还原力均呈显著的量效关系。TMP 还原力与

Ac-TMP 相比存在显著性($P<0.05$)差异,在最大浓度为 2.0 mg/mL 时,其还原力分别为 0.138 ± 0.019 和 0.239 ± 0.022 。

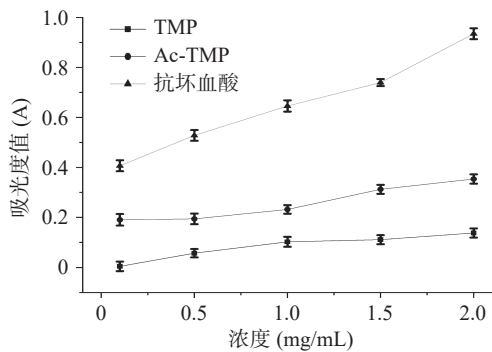


图 7 TMP 和 Ac-TMP 还原性作用
Fig.7 Ferric reducing power effects of TMP and Ac-TMP

2.4 抑菌试验结果

结合图 8 和表 1 结果显示,除修饰前后多糖浓度为 25 mg/mL 组别,其余各组对金黄色葡萄球菌 TMP 相对于 Ac-TMP 的抑菌圈直径具有差异性;TMP 与 Ac-TMP 对大肠杆菌的抑菌圈直径表现出显著性($P<0.05$)差异。不仅如此,在浓度为 50 mg/mL 时,TMP 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 6.5 mm 呈不敏

感,Ac-TMP 抑菌直径为 8.0 mm 呈低度敏感;TMP 对于大肠杆菌的抑菌圈直径为 7.3 mm 呈低度敏感,Ac-TMP 抑菌圈直径为 10.6 mm 呈中度敏感。在浓度达到 200 mg/mL 时,TMP 和 Ac-TMP 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 7.8 和 10.2 mm;对于大肠杆菌的抑菌圈直径值分别为 9.6 和 13.0 mm。结合结果观察可知,随浓度的增加乙酰化蒲公英多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制效果均优于蒲公英纯化多糖,且抑菌强度随之增加。

实验表明,大多数多糖均具有一定的抗氧化活性和抑菌活性。经乙酰化改性前后的多糖,抗氧化性能和抑菌性能比较未修饰前发生明显变化,修饰前后多糖抑菌性均高于空白对照的生理盐水,修饰后的多糖抑菌效果较修饰前的多糖有所提高。在体外抗氧化性能比较中,乙酰化修饰前后多糖均低于阳性对照的抗坏血酸对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基的清除率,抗坏血酸的还原能力相较乙酰化改性前后多糖吸光度值变化较强,修饰后的多糖对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基的清除率及还原性的表现均高于修饰前多糖。巩丽虹等^[33]在对药材防风进行乙酰化修饰后,对其修饰前后多糖进行抗氧化实验,得到经修饰后的防风多糖抗氧化活

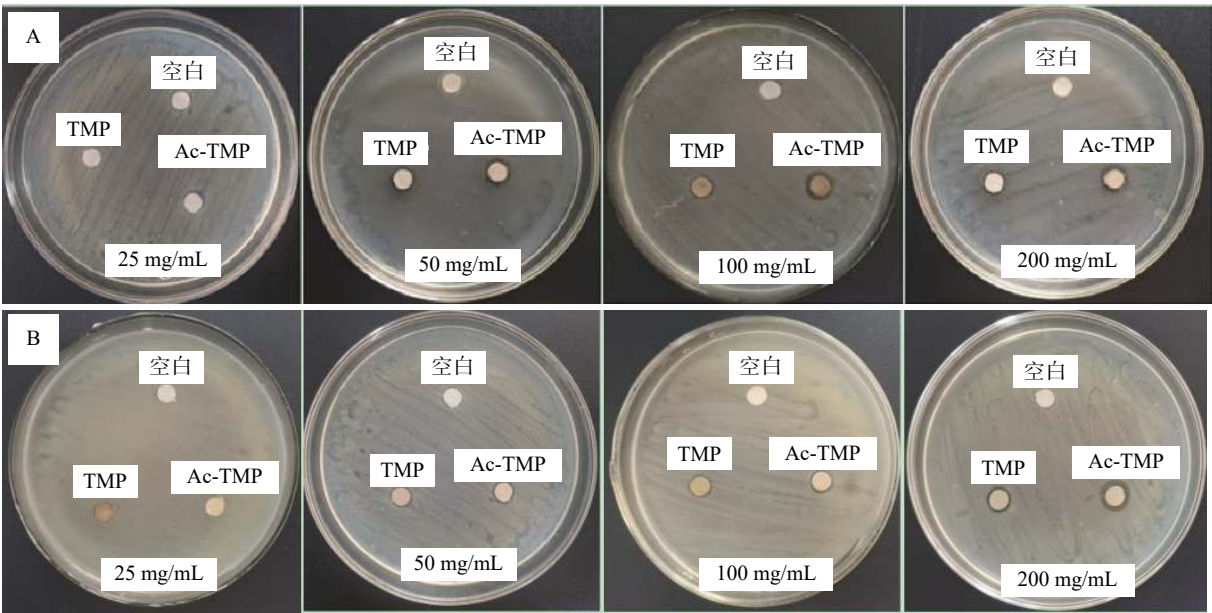


图 8 TMP 和 Ac-TMP 对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)抑制结果
Fig.8 Inhibitory effect of the TMP and Ac-TMP on *Escherichia coil* (A)and *Staphylococcus aureus*(B)

表 1 TMP 和 Ac-TMP 抑菌结果
Table 1 Bacteria results of TMP and Ac-TMP

所选菌种	多糖溶液							
	多糖溶液(25 mg/mL)		多糖溶液(50 mg/mL)		多糖溶液(100 mg/mL)		多糖溶液(200 mg/mL)	
	TMP	Ac-TMP	TMP	Ac-TMP	TMP	Ac-TMP	TMP	Ac-TMP
大肠杆菌	—	6.2 mm	7.3 mm	10.6 mm	8.4 mm	11.9 mm	9.6 mm	13.0 mm
金黄色葡萄球菌	—	—	6.5 mm	8.0 mm	6.9 mm	9.8 mm	7.8 mm	10.2 mm

注: 数据为抑菌实验三次平均值, 符号“—”表示为抑菌圈直径小于6.0 mm; 根据判抑菌圈直径判定抑菌程度标准^[32]: >20 mm为极度敏感、15~20 mm为高度敏感、11~14 mm为中度敏感、7~10 mm为低度敏感、<7 mm为不敏感。

性提高,与实验结果一致。可能由于多糖的抗氧化活性来源于糖链上的游离羟基,在乙酰化结构修饰后使糖链的空间位阻发生变化,暴露出更多的羟基,可以结合更多的自由基,从而提高抗氧化性。李晓丽^[34]在对牡丹籽提取物进行结构修饰,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用进行研究,得到经修饰后的多糖对细菌菌株具有有效的抑制作用,与实验结果一致。可能由于多糖的糖链结构对细菌的细胞膜产生破坏作用,可使细胞内容物渗透压升高代谢紊乱细菌死亡,在结构修饰后多糖的糖链结构会将乙酰基交联在游离基团上,增加多糖的脂溶性,可以更快的穿透细胞膜从而导致细菌死亡。

3 结论

本实验以药食同源的蒲公英全草为原料,通过水提醇沉法等方式得到TMP的多糖含量为68.75%,采用乙酸酐为乙酰化试剂,对TMP进行乙酰化的改性修饰,得到取代度为0.227的Ac-TMP。经红外光谱、扫描电镜和X-射线粉末衍射等表征证实乙酰化蒲公英多糖修饰成功,并证明化学结构修饰得到的乙酰化多糖,并未改变结构骨架,对其进行体外抗氧化实验表明,经乙酰化改性后的蒲公英多糖相较于蒲公英纯化多糖更加能够清除DPPH自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基和还原能力。此外,乙酰化蒲公英多糖抑菌能力强于蒲公英纯化多糖,且随多糖浓度的增加抑菌效果递增,显现出经乙酰化改性过的蒲公英多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用影响更大。综上所述,TMP经化学修饰引入乙酰基官能团,可提高结构稳定性、抗氧化性和抑菌能力。

有研究发现,通过乙酰化修饰多糖进行改性不仅对多糖结构的分子量、单糖组成、结构形态产生影响,而且对多糖的抗氧化、降血糖、抗肿瘤、抗衰老、提升免疫力等作用增大。针对本实验中的抗氧化性和抑菌能力结构修饰改性后的多糖相较于一般多糖能力增强,分析原因可能为未改性前的多糖结构呈团聚形态,在乙酰化修饰后呈现舒展状态,增加了结构中羟基对乙酰化基团的结合能力。故为研究蒲公英多糖的结构活性关系提供了新的研究方向,为蒲公英多糖的化学改性修饰、抗氧化性和抑菌作用提供了重要的参考。

参考文献

- [1] 于伯健. 蒲公英的营养与药用价值及开发和利用[J]. 林区教学, 2007(10): 124-125. [YU B J. Nutritional and medicinal value of dandelion and development and utilization[J]. Teach Forestry Region, 2007(10): 124-125.]
- [2] 易思荣, 黄亚. 蒲公英属植物的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2002, 6(2): 108-111. [YI S R, HUANG Y. A survey of studies on the genus *Taraxacum mongolicum*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2002, 6(2): 108-111.]
- [3] 付晨青, 何立威, 王秀萍. 药食同源蒲公英的开发应用研究现状与展望[J]. 陕西农业科学, 2021, 67(5): 86-88. [FU C Q, HE L W, WANG X P. Research status and prospect of development

and application of medicinal and edible dandelion[J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 67(5): 86-88.]

- [4] LI F, FENG K L, YANG J C, et al. Polysaccharides from dandelion (*Taraxacum mongolicum*) leaves: Insights into innovative drying techniques on their structural characteristics and biological activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 167(15): 995-1005.

- [5] BERNADETTE L, BEATA O. Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products-history and present[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 59(10): 40-48.

- [6] 刘炜焄, 陈帅, 刘磊, 等. 蒲公英多糖的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 214-219. [LIU W X, CHEN S, LIU L, et al. Research progress on dandelion polysaccharides[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(10): 214-219.]

- [7] NIU H, FAN J W, WANG G P, et al. Anti-tumor effect of polysaccharides isolated from *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz on MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Trop J Pharm Res*, 2017, 16(1): 83-89.

- [8] DING A G, WEN X H. Dandelion root extract protects NCM460 colonic cells and relieves experimental mouse colitis[J]. *J Nat Med*, 2018, 72(4): 857-866.

- [9] YU M, JI Y B, QI Z, et al. Anti-tumor activity of sulfated polysaccharides from *Sargassum fusiforme*[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25(4): 464-468.

- [10] DENG Y, LI M, CHEN L X, et al. Chemical character and immunomodulatory activity of acetylated polysaccharides from *Dendrobium devonianum*[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 180: 238-245.

- [11] LIU J, LUO J G, YE H, et al. Preparation antioxidant and antitumor activities *in vitro* of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50: 767-772.

- [12] 梁少茹, 肖霄, 肖斌. 绿茶多糖的乙酰化修饰及清除自由基、NO₂⁻活性的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(11): 85-99. [LIANG S R, XIAO X, XIAO B. Study on acetylated modification and scavenging effect on free radicals, NO₂⁻ of green tea polysaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(11): 85-99.]

- [13] 邵珠颖, 吴艳丽, 张宇, 等. 桦褐孔菌多糖的乙酰化修饰及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 73-77. [SHAO Z L, WU Y L, ZHANG Y, et al. Acetylated modification and antioxidant activity of polysaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(9): 73-77.]

- [14] 贾红倩, 刘晔, 颜军, 等. 杏鲍菇多糖的分离纯化、乙酰化修饰及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 39-44. [JIA H Q, LIU W, YAN J, et al. Isolation and purification, acetylation modification and antioxidant activity of polysaccharides of *Pleurotus eryngii* Quel[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(3): 39-44.]

- [15] ZHAO M, HAN Y, LI J G, et al. Structural characterization and antioxidant activity of acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide(Ac-CPP_{0.1})[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 171(28): 112-122.

- [16] CHEN H L, TAN H L, YANG J, et al. Inhibitory effect of

polysaccharide of *Sargassum weizhouense* on PCV2 induced inflammation in mice by suppressing histone acetylation[J]. *Biomedicine and Macromolecules*, 2019, 112(7): 108741.

[17] YANG Y X, CHEN J L, LEI L, et al. Acetylation of polysaccharide from *Morchella angusticeps* peck enhances its immune activation and anti-inflammatory activities in macrophage RAW264.7 cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 125(6): 38–45.

[18] 肖潮勇, 张宇, 王宇亮. 蒲公英总多糖的提取、纯化及其体外抗炎活性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(6): 25–28.

[XIAO C Y, ZHANG Y, WANG Y L. Extraction and purification of total polysaccharides in *Taraxaci Herba* and its anti-inflammatory activity[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2016, 22(6): 25–28.]

[19] GUO H J, ZHANG W D, JIANG Y, et al. Physicochemical, structural, and biological properties of polysaccharides from dandelion[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 1–14.

[20] REN F, WU K, YANG Y, et al. Dandelion polysaccharide exerts anti-angiogenesis effect on hepatocellular carcinoma by regulating VEGF/HIF-1 α expression[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 460.

[21] 侯京玲, 周霄楠, 赵兴华. 几种蒲公英成分的提取及体外抑菌效果试验[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(12): 53–55. [HOU J L, ZHOU X N, ZHAO X H. Research on antibacterial activity of different *Herba Taraxaci* extracts *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(12): 53–55.]

[22] 郭慧静, 张伟达, 陈国刚. 蒲公英多糖脱色脱蛋白方法及其降血糖活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(3): 24–28.

[GUO H J, ZHANG W D, CHEN G G. Decoloration and deproteinization of polysaccharides from dandelion and its hypoglycemic activity[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(3): 24–28.]

[23] CHEN Y, ZHANG H, WANG Y X, et al. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities[J]. *Food Chemistry*, 2014, 156: 279–288.

[24] 李瑾, 张婷婷, 蒲定涛, 等. 乙酸酐法合成乙酰化熟地黄多糖工业及其对抗氧化活性的影响[J/OL]. *中国中药杂志*: 1–9 [2021-03-28]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20210310.302>.

[LI J, ZHANG T T, PU D T, et al. Acetylation derivatives synthesis and antioxidant active of polysaccharides from *Rehmannia glutinosa* Libosch[J/OL]. *China Journal of Chinese Materia Medica*: 1–9 [2021-03-28]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20210310.302>.]

[25] WANG X M, ZHANG Z S, WU Y, et al. Synthesized

sulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Gracilariopsis lemaneiformis* and their potential antioxidant and immunological activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 124(1): 568–572.

[26] HUA J, ZHANG X F, WANG Z J, et al. Preparation, characterization and antioxidant activities of acetylated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* leaves[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 31(7): 1–18.

[27] 张曼, 张宇, 徐少博, 等. 平贝母多糖铁配合物的合成、结构特征及抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2019, 12(7): 36–42. [ZHANG M, ZHANG Y, XU S B, et al. Preparation, structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharide-iron complex from *Fritillaria ussuriensis*[J]. *Food Science*, 2019, 12(7): 36–42.]

[28] ZHANG M, ZHAO H, SHEN Y, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity evaluation *in vitro* of *Fritillaria ussuriensis* polysaccharide-zinc complex[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 7(1): 462–474.

[29] CHEN S H, HUANG H L, HUANG G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140(1): 1047–1053.

[30] WANG S N, YAO J Y, ZHOU B, et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative *in vivo* and its antibacterial mechanism *in vitro*[J]. *Research Paper*, 2018, 81(1): 68–78.

[31] 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.

[QIN L H, CAO J B, YI W S. A new method for scanning electron microscope samples of polysaccharides distilled from green tea and the observation of ultrafine structure of them with atomic force microscope[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2009, 28(2): 162–167.]

[32] 李凡, 徐志凯. 医学微生物学(第九版)[M]. 人民卫生出版社, 2018. [LI F, XU Z K. Medical microbiology(The ninth edition)[M]. People's Medical Publishing House, 2018.]

[33] 巩丽虹, 徐红纳, 刘嘉祺, 等. 防风多糖 USPS 乙酰化修饰及其抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2019, 40(10): 200–203. [GONG L H, XU H N, LIU J Q, et al. Acetylation modification and antioxidant activity of a polysaccharide USPS from *Radix saposhnikoviae*[J]. *Food Industry*, 2019, 40(10): 200–203.]

[34] 李晓丽. 牡丹籽粕多糖的化学修饰及其抗氧化和抑菌能力的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019. [LI X L. Chemical modifications of polysaccharides extracted from peony seed dreg and their antioxidant and antibacterial activity *in vitro*[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.]