

海带多糖清除氧自由基的活性及机理

赵雪, 董诗竹, 孙丽萍, 李芳, 李八方*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

摘要: 通过比较不同分子量和化学组成的海带硫酸多糖和褐藻胶的清除氧自由基的活性, 探讨了海带多糖清除氧自由基活性的构效关系和作用机理。研究发现, 分子量为6~15 ku、糖醛酸含量20.4%的低硫组分F-A2清除自由基活性羟基自由基和超氧阴离子自由基活性高于大分子量的组分F-A和F-B, 而高硫低分子量组分清除氧自由基的活性非常低。酶降解得到的低分子量褐藻胶组分清除自由基活性随分子量的降低而升高, 明显高于其他硫酸多糖, 说明硫酸根对低分子量糖与自由基的反应有阻碍, 而多糖中糖醛酸含量越高, 清除自由基活性越好。大分子量的海带硫酸多糖经铜离子和 H_2O_2 反应产生的羟基自由基氧化降解以后, 直接可以得到两个比较集中的低分子量岩藻聚糖硫酸酯Fa2(分子量为7 ku)和Fa1(分子量为1 ku), 其化学组成和清除自由基活性的比较说明自由基首先降解糖醛酸含量高的硫酸糖片断, 甘露糖、半乳糖和葡萄糖形成的糖苷键很容易被自由基氧化降解, 而高硫高岩藻糖部分不易被自由基水解, 研究结果说明, 海带多糖的抗氧化活性不仅与分子量和硫酸根含量有关, 糖醛酸、岩藻糖含量和糖链上中性糖的组成对多糖的清除自由基活性都有影响。

关键词: 海带; 硫酸多糖; 褐藻胶; 氧自由基

中图分类号: Q 174; S 917

文献标识码: A

近几年关于氧自由基的生理功能和毒性的研究越来越引起人们的关注。氧自由基在动脉粥样硬化、血栓的形成、心肌缺血再灌注损伤、肝炎和糖尿病、白内障的形成和视网膜的损伤过程中起到重要作用。衰老的自由基理论认为, 衰老和衰老相关联的退化性疾病基本上可以归因于自由基对细胞成分和连接组织的有害进攻, 其中起作用的主要是质子化超氧阴离子和羟基自由基^[1]。因此具有自由基清除作用的抗氧化剂在防治氧自由基诱导的疾病方面具有应用价值。人工合成的抗氧化剂BHA、BHT、PG虽然清除自由基的效果很好, 但是长期服用对身体有害, 因此研究无毒、营养的天然抗氧化物具有重要的意义^[2]。

近几年来, 褐藻硫酸多糖因其独特的分子结构和生理活性, 尤其是提高免疫力、抗凝血、抗血栓、抗肿瘤、抗病毒方面的独特活性引起人们的广泛关注。研究发现, 鼠尾藻(*Sargassum*

thunbergii)^[4]、浒苔(*Enteromorpha prolifera*)^[5]、海带(*Laminaria japonica*)^[6-8]、坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)^[9-10]、孔石莼(*Uva pertusa*)^[11]和龙须菜^[12]中提取的海藻硫酸多糖具有一定的抗氧化作用, 但是不同海藻的硫酸多糖结构不同, 抗氧化活性及其规律各不相同。目前, 关于海藻多糖抗氧化活性的构效关系研究还很少, ZHANG等^[9-10]比较绿藻孔石莼中提取的分子量28.2~151.7 ku的硫酸多糖发现, 分子量越小其抗氧化活性越高, 而且硫酸化和苯甲基化的多糖和甲壳质的抗氧化活性更高。XUE等^[13]比较发现褐藻酸和甲壳质及其衍生物对AAPH自由基诱导的卵磷脂的过氧化有抑制作用。杨文鸽等^[12]比较龙须菜硫酸多糖及其自由基降解产物的抗氧化活性。但是, 以前研究的海藻硫酸多糖分子量大, 而硫酸多糖的化学组成和结构随海藻的种类和提取方法的不同而相差很大, 因此很难确定其抗氧化

收稿日期:2010-10-12

修回日期:2011-01-15

资助项目:国家自然科学基金项目(30800858);山东省自然科学基金项目(ZR2010CQ020)

通讯作者:李八方, Tel:0532-82031852, E-mail:bfli@ouc.edu.cn

活性的构效关系,也不易解释其抗氧化的机理。研究发现褐藻硫酸多糖的分子量、硫酸根含量、硫酸根取代位置、单糖种类和糖苷键类型对硫酸多糖的生理活性有很大的影响^[3],因此只有确定硫酸多糖抗氧化活性的构效关系,才能筛选出最好的天然抗氧化活性多糖。

我们前期制备了不同结构的海带硫酸多糖,并对海带硫酸多糖尤其是低聚糖的抗氧化活性进行了研究^[14-15]。本研究采用酸水解和自由基氧化降解法制备了不同分子量和化学组成的海带硫酸多糖和褐藻胶,通过比较其清除氧自由基的活性,研究了海带多糖清除自由基的活性的构效关系,并对海带硫酸多糖的自由基氧化降解产物的化学组成进行分析,探讨了海带多糖抗氧化活性的机理,以期开发高效的天然多糖抗氧化剂。

1 材料与方法

1.1 海带硫酸多糖的提取及分级纯化

海带硫酸多糖粗糖采用水提取和分级醇沉的方法制备^[16]。粗糖采用 Sepharose FF 阴离子交换柱(Amersham Pharmacia Biotech Co.)进行分级纯化,分别用水、1.0 mol/L NaCl 和 2.0 mol/L NaCl 进行洗脱,得到低硫组分 F-A (1.0 mol/L NaCl) 和高硫组分 F-B (2.0 mol/L NaCl)。

1.2 酸水解法制备低分子量海带酸多糖

将 F-A 和 F-B 分别溶解在 0.01 mol/L H₂SO₄ 配成 3% 溶液,80 °C 水解 1.5 h,水解液分别用截留分子量为 15 和 6 ku 的超滤膜(天津膜天膜公司科技有限公司)进行超滤。水解 F-A 组分水解得到 F-A1(分子量小于 6 ku)和 F-A2(分子量范围为 6~15 ku)。水解 F-B 水解得到 F-B1(分子量小于 6 ku)、F-B2(分子量范围为 6~15 ku),小于 6 ku 的部分用截留分子量为 100 的透析袋水透析脱盐,然后各组分浓缩冻干。

1.3 自由基氧化法制备低分子量海带硫酸多糖^[17]

取 4.50 g 海带硫酸多糖粗糖与 0.36 g Cu (AC)₂ · H₂O 一起溶于 67.5 mL 蒸馏水中,用水浴加热至 60 °C 后保持恒温。然后以 0.9 mL/min 的速度加入 4.5% H₂O₂ 进行降解反应,5 h 后停止加入 H₂O₂。加入 Chelex 100 螯合树脂除去残留的 Cu²⁺。降解液分别用截流分子量为 10 ku (天津膜天膜公司科技有限公司)和 2.5 ku (美国 GE 公司)的超滤膜超滤,分别得两个低分子量组

分 Fa2(分子量范围 2.5~10 ku)和 Fa1(分子量小于 2.5 ku)。小于 2.5 ku 的用截留分子量为 100 的透析袋水透析脱盐,然后各组分浓缩冻干。

1.4 酶解法制备低分子量褐藻胶

选用低粘度褐藻酸钠(青岛海藻化工厂生产),采用本实验室从锈凹螺(*Chlorostoma rustica*) (青岛海岸潮间带采集)中提取纯化的褐藻胶裂解酶对褐藻酸钠进行酶解,酶解液分别用截留分子量为 10、6 和 1 ku 的超滤膜进行超滤,分别得到 3 个低分子量褐藻胶组分是 A1(分子量小于 1 ku)、A2(分子量范围 1~6 ku)和 A3(分子量范围为 6~10 ku)。小于 1 ku 的用截留分子量为 100 的透析袋水透析脱盐,然后各组分浓缩冻干。

1.5 多糖对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的清除作用

采用连苯三酚-鲁米诺体系^[4]测定。

1.6 多糖对羟基自由基(·OH)清除作用

采用抗坏血酸-Cu²⁺-酵母悬浮液-鲁米诺-H₂O₂体系^[4]测定。

1.7 硫酸多糖的分子量及化学组成分析^[14]

分子量采用高效体积排阻色谱法(HPSEC)测定。高分子组分 F-A 和 F-B 选用 TSK G4000PWXL 色谱柱(日本 TOSOH)分析。分子量低于 15 ku 的低分子量组分采用 TSK G3000PWXL 色谱柱(日本 TOSOH)分析。

硫酸根含量测定采用硫酸钡-明胶法。中性糖组成测定采用糖醇乙酸酯衍生物气相色谱法。糖醛酸含量测定采用咔唑比色法。

2 结果与分析

2.1 海带硫酸多糖及酸水解产物清除自由基活性的比较

采用 Q-Sepharose FF 离子交换柱对海带硫酸多糖粗糖进行分级纯化,可以得到两种大分子量海带硫酸多糖 F-A 和 F-B。比较发现 F-B 的硫酸根含量达 33.5%,是 F-A 组分的 2 倍。但是 F-B 的糖醛酸含量比 F-A 低(表 1)。中性糖的组成中,海带的硫酸多糖主要以岩藻糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成。采用酸水解大分子海带硫酸多糖,得到的低分子量组分的化学组成与原糖相似,只有高硫组分 F-B 在酸水解过程中脱硫的现象比较严重,因此得到的低分子量组分的硫酸根比原糖低。采用液相色谱分析其分子量发现酸水解得到的低分子量组分分布系数大于 2,说明组分不集中,分子量分布比较宽。

表 1 海带硫酸多糖 F-A 和 F-B 及其酸水解产物的化学性质的比较
Tab.1 The chemical composition of F-A, F-B and their acid hydrolysates

组分 fraction	硫酸根含量(%) sulfate ester	糖醛酸含量(%) glucuronic acid	中性糖组成(%) neutral sugar composition			
			岩藻糖* fucose	半乳糖* galactose	甘露糖* mannose	葡萄糖* glucose
F-A	16.5	21.8	52.9	7.7	9.1	17.8
F-A1	15.8	20.1	50.4	10.8	10.5	14.8
F-A2	16.2	20.4	51.4	8.5	11.4	17.5
F-B	33.5	8.9	62.5	24.5	3.8	6.2
F-B1	28.7	7.8	59.2	26.1	-	3.5
F-B2	30.5	8.9	61.5	25.5	2.4	5.4

注: * 以气相色谱的结果计算,气相色谱中所有峰的总面积为 100%。

Notes: * calculated from gas chromatography, taking total area of peak as 100%.

海带硫酸多糖对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除活性 图 1 和图 2 分别表示 F-A 和 F-B 及其酸水解得到的低分子量组分对 $O_2^{\cdot-}$ 的化学发光产生抑制作用,肌肽是一种常见的自由基清除剂,用于作对照。研究发现,两种大分子量海带硫酸多糖 F-A 和 F-B 对 $O_2^{\cdot-}$ 具有一定的清除作用, IC_{50} 分别为 0.43 和 0.53 mg/mL,活性与肌肽相近(0.54 mg/mL)。F-B 的硫酸根含量是 F-A 的 2 倍, F-B 的糖醛酸含量比 F-A 略低,其清除超氧阴离子的活性比 F-A 低。由图 1 可以看出,将 F-A 酸水解以后,得到的 F-A2 组分(分子量 6 ~ 15 ku)的清除活性明显高于 F-A 和肌肽, IC_{50} 是 0.26 mg/mL。大分子的高硫组分 F-B 水解后产生的低分子量高硫组分 F-B1 和 F-B2 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用明显下降,在 0.75 mg/mL 时抑制率只有 28.8% 和 40.6%,明显低于相同分子量的低硫组分 F-A1 和 F-A2(图 2)。说明硫酸根和糖醛酸的含量对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用影响很大,低硫高糖醛酸组分对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除活性更好一些。

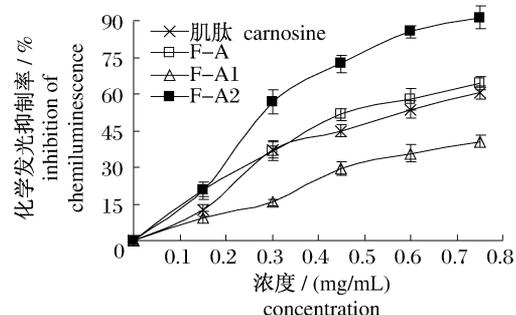


图 1 F-A 及其酸水解得到的低分子量组分对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除活性

Fig.1 The scavenging activities of F-A and its acid hydrolysates on superoxide anion

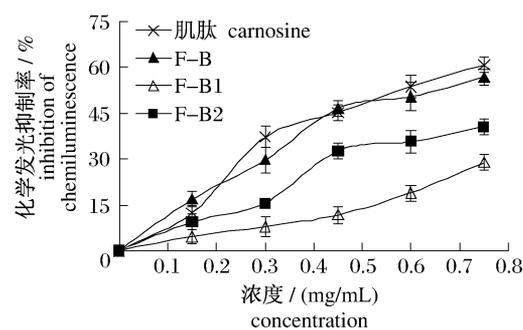


图 2 F-B 及其酸水解得到的低分子量组分对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除活性

Fig.2 The scavenging activities of F-B and its acid hydrolysates on superoxide anion

海带硫酸多糖对羟基自由基($\cdot OH$)的清除活性 图 3 和图 4 表示 F-A 和 F-B 及其酸水解得到的低分子量组分对 $\cdot OH$ 的清除作用。比较发现, F-A 清除 $\cdot OH$ 的活性比 F-B 高一些, IC_{50} 分别为 0.60 和 0.85 mg/mL,但是两者清除 $\cdot OH$ 的活性均明显低于肌肽(IC_{50} 为 0.1 mg/mL)。由图 3 可以看出,低硫组分 F-A 经酸水解得到的低分子量的 F-A1、F-A2 对 $\cdot OH$ 有一定的清除活性,尤其是分子量 6 ~ 15 ku 左右的组分 F-A2 (IC_{50} 为 0.3 mg/mL)的清除活性明显高于 F-A (IC_{50} 为 0.60 mg/mL)和 F-A1 (IC_{50} 为 0.92 mg/mL)。由图 4 发现, F-B 水解后产生的低分子量组分 F-B1 和 F-B2 对 $\cdot OH$ 的清除作用明显下降,在 1.25 mg/mL 时抑制率只有 7.9% 和 26.5%,明显低于相同分子量的低硫组分 F-A1 和 F-A2。说明硫酸根和糖醛酸的含量对 $\cdot OH$ 的清除作用影响很大,低硫高糖醛酸组分对 $\cdot OH$ 的清除活性更好一些。

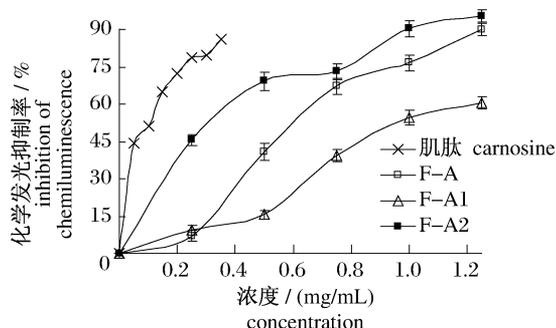


图3 F-A 及其酸水解得到的低分子量组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性

Fig. 3 The scavenging activities of F-A and its acid hydrolysates on hydroxyl radical

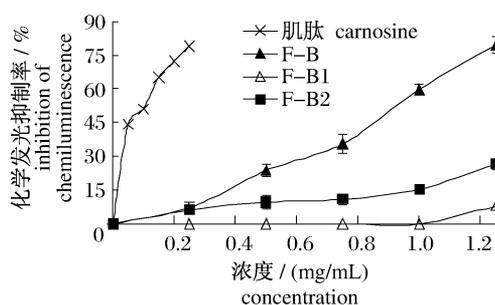


图4 F-B 及其酸水解得到的低分子量组分对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性

Fig. 4 The scavenging activities of F-B and its acid hydrolysates on hydroxyl radical

2.2 低分子量褐藻胶清除自由基活性研究

图5和图6为褐藻胶酶解产物A1、A2和A3对 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力。比较发现,低分子量褐藻胶的清除 $\text{O}_2^- \cdot$ 活性随分子量的降低而升高。低分子量褐藻胶A1(分子量小于1 ku)、A2(分子量1~6 ku)对 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基的清除活性最高,IC₅₀为8和18 $\mu\text{g}/\text{mL}$,活性都高于Vc(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、肌肽和硫酸多糖。分子量6 ku以上的大分子的活性最低,与肌肽的活性相近(图5)。低分子量褐藻胶A1、A2和A3对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性与 $\text{O}_2^- \cdot$ 的规律相似(图6),分子量小于1和1~6 ku的低分子量褐藻胶活性最高,IC₅₀分别为10和26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。低分子量褐藻胶清除 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 活性均高于硫酸多糖,说明糖醛酸在抗氧化方面活性要高于硫酸多糖。

2.3 海带硫酸多糖自由基降解产物的化学组成及清除氧自由基的活性

实验发现铜离子和过氧化氢反应产生的羟基

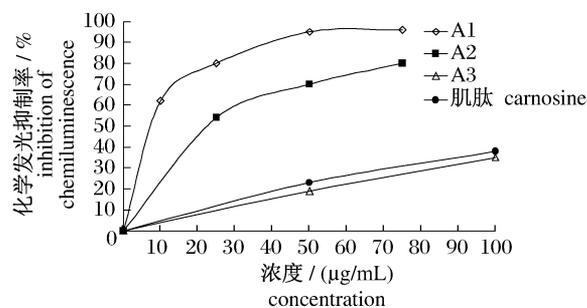


图5 褐藻胶酶解产物对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除活性

Fig. 5 The scavenging activities of enzymatic hydrolysates of alginate on superoxide anion

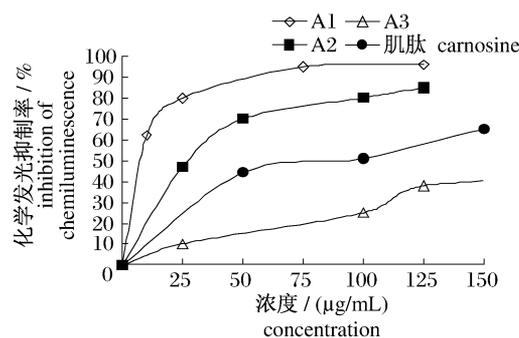


图6 褐藻胶酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性

Fig. 6 The scavenging activities of enzymatic hydrolysates of alginate on hydroxyl radical

自由基可以有效地降解大分子硫酸多糖。高效液相色谱分析确定Fa1和Fa2的峰值分子量分别为1和7 ku,而且两个组分的分布系数分别为1.1和1.7,组分非常集中(图7)。表2为4.5% H_2O_2 降解海带硫酸多糖粗糖得到的低分子量组分Fa1和Fa2化学组成的比较,发现峰值分子量为7 ku的组分Fa2的硫酸根和岩藻糖含量达到35.5%和65.2%,大大高于海带硫酸多糖粗糖(25%)和酸水解得到的低分子量组分,说明自由基氧化降解海带硫酸多糖可以得到高硫高岩藻糖的低分子量硫酸多糖,而且为主要降解产物。自由基降解产物中单糖含量很低,峰值分子量为1 ku的组分Fa1的硫酸根含量只有17.8%,说明Fa1为自由基氧化降解的小片段产物。粗糖的糖醛酸含量为22.1%,而经自由基氧化降解,各组分的糖醛酸含量均明显下降,尤其是分子量1 ku的组分的糖醛酸含量极低,说明在降解过程中糖醛酸被自由基氧化降解。中性糖组成的比较发现,海带硫酸多糖粗糖经自由基水解以后,各组分的中性糖含量相差很大,尤其是岩藻糖的含量明显上

升,显著高于原糖,尤其是分子量 7 ku 的组分的岩藻糖含量达到 65.2%。比较发现,自由基降解得到的低分子量的岩藻聚糖硫酸酯的硫酸根越高,岩藻糖含量就越高,说明自由基降解海带硫酸多糖有一定的选择性。

图 8 为海带硫酸多糖粗糖及其自由基氧化降解产物对 $O_2^- \cdot$ 化学发光抑制作用的比较。粗糖经过自由基降解得到的峰值分子量为 7 ku 的高硫高岩藻糖组分 Fa2 几乎丧失了清除 $O_2^- \cdot$ 的活性,而分子量 1 ku 的组分 Fa1 清除 $O_2^- \cdot$ 的活性与粗糖非常相近, IC_{50} 为 0.55 mg/mL。说明经自由基降解后得到的高硫高岩藻糖组分已经很难被自由基氧化降解,因此不具有清除自由基的活性。

经抗坏血酸 - Cu^{2+} - 酵母悬浮液 - 鲁米诺 - H_2O_2 体系实验发现,大分子的岩藻聚糖硫酸酯经 Cu^{2+} - H_2O_2 体系产生的自由基降解以后,得到的岩藻聚糖组分 Fa1 和 Fa2 均没有清除 $\cdot OH$ 的活性。说明岩藻聚糖硫酸酯清除 $\cdot OH$ 自由基的

机理可能是通过糖与自由基反应消耗自由基,而糖自身降解。

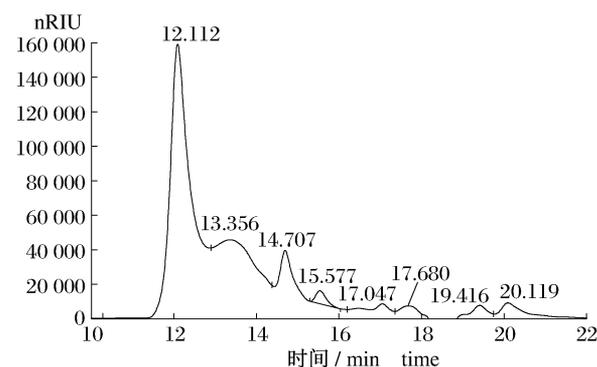


图 7 海带硫酸多糖粗糖采用自由基降解后小于 10 ku 的部分的高效液相色谱分析

Fig. 7 HPLC analysis of sulfated polysaccharides with molecular weight below 10 ku obtained by radical process degradation of crude sulfated polysaccharide from *L. japonica*

表 2 采用自由基氧化降解海带硫酸多糖得到的低分子量组分 Fa1 和 Fa2 的化学组成的比较
Tab. 2 The chemical composition of Fa1 and Fa2 obtained by radical process degradation

组分 fraction	硫酸根含量 sulfate ester	糖醛酸含量 glucuronic acid	中性糖含量 neutral sugar composition			
			岩藻糖* fucose	半乳糖* galactose	甘露糖* mannose	葡萄糖* glucose
粗糖 crude fraction	22.9	22.1				
Fa1	17.8	3.95	50.4	13.1	24.8	6.4
Fa2	35.5	8.15	65.2	26.2	3.8	1.5

注: * 以气相色谱的结果计算,气相色谱中所有的峰的总面积为 100%。

Notes: * calculated from gas chromatography, taking total area of peak as 100%.

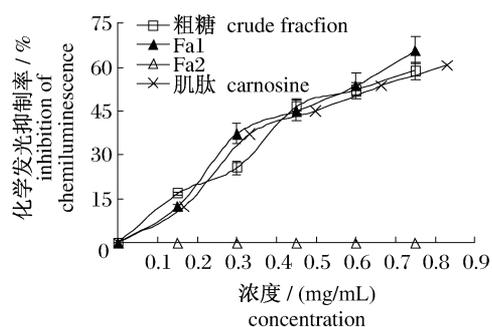


图 8 海带硫酸多糖粗糖及自由基氧化降解得到的组分 Fa1 和 Fa2 对超氧阴离子的清除活性

Fig. 8 The scavenging activities on superoxide anion of crude sulfated polysaccharides and Fa1 and Fa2 by radical process degradation

3 讨论

采用离子交换制备了两种大分子海带硫酸多

糖,发现虽然组分 F-B 的硫酸根含量比 F-A 高了近一倍,但是两者清除自由基的活性相差不多。因为大分子硫酸多糖的单糖组成复杂,糖组分不均一,还含有糖醛酸,因此很难确定其清除自由基的构效关系和作用机理。本研究采用酸水解的方法将不同硫酸根的组分进行水解,制备不同分子量和硫酸根含量的低分子量海带硫酸多糖,通过比较大分子硫酸多糖及其酸水解降解产物的清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的抗氧化活性发现,低硫组分经酸水解得到的分子量为 6 ~ 15 ku 的 F-A 2 的抗氧化活性高于大分子量的组分 F-A 和 F-B,说明低分子量硫酸多糖的抗氧化活性优于大分子量组分。比较相同分子量的低分子量硫酸多糖的活性发现,低分子量的硫酸多糖硫酸根升高,清除自由基活性显著下降,硫酸根含量对低分子量硫酸多糖的抗氧化活性影响很大,硫酸根

对低分子量的硫酸多糖清除自由基活性有很大的阻碍。

褐藻胶是由古罗糖醛酸和甘露糖醛酸组成,本研究发​​现经酶水解后得到的低分子量褐藻胶清除自由基的活性明显高于相同分子量的海带硫酸多糖,而且褐藻胶的分子量越低,活性越好,说明糖醛酸容易被氧自由基氧化降解,从而清除自由基。此结果与硫酸多糖的活性研究结果一致^[16],比较发现硫酸多糖中低硫组分的糖醛酸含量较高,其清除自由基的活性也高。说明分子量、硫酸根含量和糖醛酸含量对多糖清除自由基活性有很大的影响。

为了探讨海带多糖清除自由基活性的机理,我们采用铜离子与过氧化氢反应生成的羟基自由基对海带硫酸多糖粗糖直接进行氧化降解,发现其降解产物的分子量分布和化学组成与酸水解产物完全不同。采用自由基氧化降解海带硫酸多糖粗糖可以得到两个较纯的低分子量组分,其中分子量 1 ku 的组分的硫酸根含量较低,而分子量为 7 ku 的岩藻聚糖硫酸酯的硫酸根含量和岩藻糖含量 35.5% 和 65.2%,大大高于原糖和酸水解产物,此结果与 NARDELLA 等^[17]的研究结果很相似,采用醋酸纤维素膜电泳研究了大分子泡叶藻岩藻聚糖硫酸酯组分 F-2(分子量 100 ku)和自由基氧化后的产物(分子量 7.8 ku)的不同,发现 F-2 有低硫高糖醛酸带和高硫高岩藻糖带。在 Cu-H₂O₂(9%)产生的自由基氧化降解后,低硫高糖醛酸的片段电泳上消失了,而富含岩藻糖和硫酸根的部分的含量变化很少^[12]。因此我们推断自由基降解海带硫酸多糖过程中低硫富含糖醛酸的部分极易被自由基降解,而富含岩藻糖和硫酸根的部分不易被降解,可以得到高硫高岩藻糖含量的低分子量片段,而且产物中糖醛酸含量很低。

研究自由基降解产物的清除自由基活性发现,高硫高岩藻糖含量的低分子量片段不能再被自由基氧化,因此清除自由基的活性很低,丧失抗氧化活性。但是自由基降解得到的分子量 1 ku 的降解片段仍然具有一定的清除超氧阴离子自由基的活性,从化学组成来看其几乎不含有糖醛酸,硫酸根含量较低,而甘露糖和半乳糖含量高,说明自由基很容易将甘露糖、半乳糖和葡萄糖形成的糖苷键氧化切断,从而将三种糖从糖链上降解下来,而对岩藻糖形成的糖苷键氧化作用很小。

实验结果表明海带多糖的抗氧化活性不仅与分子量和硫酸根含量有关,糖醛酸含量、岩藻糖含量以及中性糖的组成对多糖的抗氧化活性都有影响。我们推断自由基与海带多糖反应的机理可能是氧自由基先将糖链上的糖醛酸部分氧化降解,然后再将糖链上甘露糖、半乳糖和葡萄糖形成的糖苷键切断,从而将海带硫酸多糖降解,而硫酸多糖中高硫高岩藻糖的部分不易被氧自由基氧化,因此不易被降解和脱硫。

参考文献:

- [1] 方允中,李文杰. 自由基与酶—基础理论机其在生物学和医学中的应用[M]. 北京:科学出版社,1999:177-180.
- [2] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1999:26-32.
- [3] 郑军,杨红,王英,等. 褐藻糖胶抗血栓研究进展[J]. 中国海洋药物,2002,2:53-59.
- [4] 张尔贤,俞君丽. 鼠尾藻多糖清除自由基作用的研究 II:Uvc 鼠尾藻对多糖抗氧化作用的影响[J]. 中国海洋药物杂志,1997,63(3):1-4.
- [5] 周惠萍,蒋巡天,王叔如,等. 浒苔多糖的降血脂及其对 SOD 活力和 LPO 含量的影响[J]. 生物化学,1995,2:161-164.
- [6] 田晓华,丛建波,等. 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学 ESR 研究[J]. 营养学报,1997,19(1):32-37.
- [7] 李兆杰,薛长湖,林洪. 岩藻聚糖硫酸酯降血脂和抗氧化作用的研究[J]. 营养学报,1999,21(3):280-284.
- [8] 张全斌,于鹏展,周革非,等. 海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性研究[J]. 中草药,2003,34(9):824-826.
- [9] ZHANG Q B, YU P Z, LI Z E, et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis* [J]. Journal of Applied Phycology,2003,15:305-310
- [10] ZHANG Q B, LI N, LIU X G, et al. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its *in vivo* antioxidant activity [J]. Carbohydrates Research,2004,339:105-111
- [11] QI H M, ZHAO T T, ZHANG Q B, et al. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2005,17:527-534
- [12] 杨文鹤,谢果凰,徐大伦,等. 龙须菜多糖的降解及

- 其降解产物的抗氧化活性[J]. 水产学报,2009,33(2):342-346.
- [13] XUE C H, YU G L, TAKASHI H, *et al.* Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1998, 62(2):206-209
- [14] XUE C H, Fang Y, Lin H, *et al.* Chemical characters and antioxidant properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 13:1-5.
- [15] ZHAO X, XUE C H, LI Z J, *et al.* The antioxidant and hepatoprotective activity of low molecular fucoidan from *Laminaria japonica* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16(2):1-5
- [16] NISHITO T, Yokoyoma G, Dobashi K, *et al.* Isolation, Purification and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities[J]. *Carbohydrates Research*, 1989, 186:119-129.
- [17] NARDELLA, CHAUBET F, BOISSON-VIDAL C, *et al.* Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J]. *Carbohydrates Research*, 1996, 289:201-208.

The scavenging activities and mechanism on oxygen free radicals of polysaccharides from *Laminaria japonica*

ZHAO Xue, DONG Shi-zhu, SUN Li-ping, LI Fang, LI Ba-fang*

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The molecular weights, chemical compositions and scavenging activities on oxygen free radicals of various sulfated polysaccharides and alginate from *Laminaria japonica* were compared to make clear the structure-activity relationship and mechanism of antioxidant activities of polysaccharides on oxygen free radicals. The results showed that low sulfated fraction F-A2, with a peak-molecular weight (Mp) of 6 – 15 ku exhibited a very strong antioxidant activity on superoxide and hydroxyl radicals, however, the highly sulfated fractions with Mp below 15 ku had very low antioxidant activity. The low molecular weight alginate especially fraction with molecular weight below 1 ku obtained by enzymatic hydrolysis had higher scavenging activity than sulfated polysaccharides from *L. japonica*. These results indicated sulfate group of low molecular weight sulfated polysaccharide seems a dimensional block for the reaction with oxygen radicals, while glucuronic acid content contributes much to the scavenging activities of polysaccharides on oxygen free radicals. The chemical properties and scavenging activities of sulfated polysaccharide fractions Fa1 (Mp 8 ku) and Fa2 (1 ku) obtained by hydroxyl radical process degradation of crude sulfated polysaccharide showed that hydroxyl radical process mainly degraded the ascopyllan-like species rich in glucuronic acid, mannose and glucose, while fraction rich in sulfated L-fucose remained unchanged. These results suggest that antioxidant activity of sulfated polysaccharides is apparently related not only to molecular weight and sulfated ester content, as previously determined, but also to the glucuronic acid, fucose contents and neutral sugars in polysaccharides chain.

Key words: *Laminaria japonica*; sulfated polysaccharides; alginate; oxygen free radical

Corresponding author: LI Ba-fang. E-mail: bfli@ouc.edu.cn