

连翘多糖纳米硒的制备及体外抗氧化和降血糖能力

姚琳琳¹, 任蕊蕊¹, 李菁岚¹, 孙建瑞^{1,2*}, 王大红^{1,2*}

(1. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 河南省食品微生物工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

摘要: 利用水提醇沉法从连翘中提取了连翘多糖 (FP), 经硝酸-亚硒酸钠法制备了连翘多糖纳米硒 (FP-SeNPs), 采用 UV-Vis、FTIR、XRD 和 SEM 对其进行了表征。采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (\bullet DPPH)、羟基自由基 (\bullet OH)、2,2-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基 (\bullet ABTS⁺) 清除实验考察了 FP-SeNPs 的体外抗氧化能力。采用 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性抑制实验考察了 FP-SeNPs 的体外降血糖能力。结果表明, FP-SeNPs 中硒含量为 908 mg/kg, 其形成了颗粒状分布的表面结构, 改变了多糖的表面形态, 但未破坏多糖的基本结构。FP-SeNPs 的 UV-Vis 吸收光谱在 270 nm 处出现新峰, 其 XRD 谱图在 $2\theta=20^\circ\sim 30^\circ$ 内出现一个弥散峰, 表明 FP 和 SeNPs 之间存在相互作用, 形成了 FP-SeNPs 复合物。FP-SeNPs 对 \bullet DPPH、 \bullet OH 和 \bullet ABTS⁺ 的清除能力和对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的活性抑制能力均呈浓度依赖性, 质量浓度为 1.6 g/L 的 FP-SeNPs 溶液对 \bullet DPPH、 \bullet OH 和 \bullet ABTS⁺ 的清除率分别为 91.98%、56.81% 和 87.44%, 对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的活性抑制率分别为 55.61% 和 72.73%, 显著高于 FP 的自由基清除能力和酶活性抑制能力 ($P<0.05$)。

关键词: 连翘; 多糖; 纳米硒; 表征; 抗氧化活性; 降血糖活性; 中药现代化技术

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 10-2216-07

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Preparation, characterization, antioxidant and hypoglycemic ability of polysaccharide nano-selenium from *Forsythia suspensa* in vitro

YAO Linlin¹, REN Ruirui¹, LI Jinglan¹, SUN Jianrui^{1,2*}, WANG Dahong^{1,2*}

(1. College of Food & Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; 2. Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Luoyang 471023, Henan, China)

Abstract: *Forsythia suspensa* polysaccharide (FP) was extracted from dried *Forsythia suspensa* via water extraction and alcohol precipitation. FP nano-selenium (FP-SENPS) was then prepared through nitric acid-sodium selenite method, and characterized by UV-Vis, FTIR, XRD, and SEM. The FP-SENPS sample was then analyzed by scavenging of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radicals (\bullet DPPH), hydroxyl free radicals (\bullet OH) and 2,2-diazo-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid) free radicals (\bullet ABTS⁺) for their *in vitro* anti-oxidation performance, while by α -amylase and α -glucosidase inhibition assay for their hypoglycemic capacity. The results showed that FP-SeNPs had a selenium content of 908 mg/kg, which formed a surface structure with granular distribution changing the surface morphology of polysaccharide but not destroying the basic structure of polysaccharide. A new UV-Vis adsorption peak for FP-SeNPs was generated at around 270 nm, and a diffuse peak was observed in XRD pattern between 20° and 30° , indicating interaction between FP and SeNPs, and the FP-SeNPs complex. The scavenging ability of FP-SeNPs on \bullet DPPH, \bullet OH, and \bullet ABTS⁺ and the inhibitory ability on α -amylase α -glucosidase were

收稿日期: 2023-11-24; 定用日期: 2024-01-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20231007

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401672); 河南省青年人才托举工程项目 (2021HYTP027); 河南省科技攻关项目 (232102110134)

作者简介: 姚琳琳 (1998—), 男, 硕士生, E-mail: linlinyao1121@163.com. 联系人: 孙建瑞 (1987—), 男, 副教授, E-mail: dasheng@haust.edu.cn; 王大红 (1980—), 男, 教授, E-mail: wangdahong2003@163.com.

concentration-dependent. The scavenging rates of FP-SeNPs solution with a mass concentration of 1.6 g/L on \bullet DPPH, \bullet OH, and \bullet ABTS⁺ were 91.98%, 56.81%, and 87.44%, and the inhibitory rates on α -amylase and α -glucosidase were 55.61% and 72.73%, respectively, significantly higher than those of FP ($P < 0.05$).

Key words: *Forsythia suspensa*; polysaccharides; nano-selenium; characterization; antioxidant activity; hypoglycemic activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

连翘为木犀科连翘属植物连翘 (*Forsythia suspensa*) 的干燥果实^[1], 连翘气微香, 性微寒, 味苦, 有清热解暑、疏散风热、消肿散结等功效^[2]。现代药理学研究发现, 连翘有抗菌消炎^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤、抗病毒、降血糖等功用^[5]。多糖是一种大分子物质, 在生物体内发挥着重要的生物学功能^[6-8], 具有抗病毒^[9]、抗炎、抗氧化^[10-11]、抗衰老、抗疲劳、降血糖^[12]等功效。吕建平^[13]从连翘粗多糖中分离纯化出两个多糖组分 FLP-1 和 FLP-2, 发现连翘粗多糖、FLP-1 和 FLP-2 均具有一定的抗氧化能力, 且清除自由基和还原能力都随着多糖含量的增加而逐渐增强。

硒 (Se) 是人体必需的一种微量元素, 对维持正常的机体生命活动至关重要, 在抗氧化、降血糖、抗肿瘤、提高免疫力等方面发挥着非常重要的作用。硒缺乏会引起人体的多种疾病, 硒摄入过多会导致硒中毒。然而, 人体自身无法合成硒, 只能从食物中摄取。与食物中的亚硒酸钠、硒酸钠等无机硒相比, 有机硒可显著降低硒易引起中毒的风险。

零价态纳米硒 (SeNPs) 是新型食品功能因子, 具有毒性低、比表面积大、容易被生物吸收等特点^[14]。但 SeNPs 极其不稳定, 容易聚集而降低其生物活性或转化为具有晶体结构的灰色单质硒。多糖由于含有大量的羟基、氨基、硫酸基和羧基等基团, 可为硒原子簇的生长提供有利的微环境, 能够吸附和包裹硒原子, 控制 SeNPs 的团聚和生长^[15], 因此, 多糖是制备 SeNPs 较理想的修饰剂和稳定剂。同时, 多糖具有可修饰位点较多、生物活性多样、生物相容性较好的特点, 能使多糖 SeNPs 具有更强的抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗炎、降血糖^[16]等生物活性。WANG 等^[17]发现, 刺梨多糖 SeNPs 对过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的 INS-1 细胞凋亡具有更好的细胞保护和凋亡抑制活性, 能有效阻断 INS-1 细胞内活性氧 (ROS) 的过度产生以及线粒体损伤。王甜^[18]用化学还原法制备羊栖菜多糖 SeNPs, 发现其对 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 损伤的 PC12 细胞具有显著的保护作用, 增强了细胞的抗氧化能力。谭晓燕^[19]发现, 五味子多糖 SeNPs 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠肠道炎症损伤可通过修复肠道屏障、抗炎来减轻小鼠肠道炎症损伤, 其治疗作用优于五味子多糖。GAO 等^[20]发现, 小檗多糖 SeNPs 能够提高 H_2O_2 诱导的细胞损伤模型的细胞活力、谷胱甘肽过氧化物

酶 (GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 等酶活性, 并降低丙二醛含量、肝器官指数、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 等肝功能指数, 缓解四氯化碳 (CCl_4) 诱导的小鼠损伤模型中一氧化氮 (NO)、IL-1 β 和 TNF- α 等促炎因子, 从而起到保肝的作用。

本文拟采用水提醇沉法提取连翘多糖 (FP), 并将其作为 SeNPs 的修饰剂和稳定剂, 采用硝酸-亚硒酸钠法制备连翘多糖纳米硒 (FP-SeNPs), 通过 UV-Vis、FTIR、XRD 和 SEM 对 FP-SeNPs 进行结构表征, 并测定其体外抗氧化和降血糖活性。以期对连翘和纳米硒的开发利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

干燥连翘, 产自山东; 无水乙醇、硝酸 (质量分数 65%~68%)、三氯乙酸、硫酸 (质量分数 95%~98%), AR, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 亚硒酸钠 (Na_2SeO_3)、抗坏血酸 (V_C)、 $BaCl_2$ 、 H_2O_2 、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐 (ABTS), AR, 天津市德恩化学试剂有限公司; KBr、水杨酸、硫酸亚铁、磷酸二氢钠, AR, 洛阳昊华化学试剂有限公司; 二硝基水杨酸 (DNS) 试剂, AR, 飞净生物科技有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS), AR, 上海申启生物科技有限公司; 对硝基苯- α -D-葡萄糖吡喃苷 (PNPG)、阿卡波糖, AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 实验用水为蒸馏水, 自制。

RE-52 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; UV-2600 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis), 日本 Shimadzu 公司; VECTOR 33 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR)、D8 ADVANCE 型 X 射线衍射仪 (XRD), 德国 Bruker 公司; Multiscan FC 型酶标仪、TM3030Plus 型台式扫描电子显微镜 (SEM), 日本 Hitachi 公司; LGJ-10D 型真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; Multiwave PRO 型微波消解仪, 奥地利 Anton Paar 公司; Optima 8000DV 型电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP), 美国 PerkinElmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 FP 的提取

参考文献[21]的方法提取多糖, 具体步骤为:

取干燥连翘,经机械粉碎(200目)后,按照料液比(g:mL)1:20添加蒸馏水,在水浴锅中80℃恒温3h,以4000 r/min离心10 min,取上清液,使用旋转蒸发器将其浓缩至体积1/4,加入4倍体积的无水乙醇,于4℃静置24 h;然后,将混合液于4000 r/min离心10 min,取沉淀,加入适量蒸馏水将沉淀复溶,向溶液中加入三氯乙酸使其质量浓度为50 g/L,放置摇床上振荡20 min,静置过夜;再次将混合液于4000 r/min离心10 min,取上清液,加入4倍体积的无水乙醇,于4℃静置24 h;最后,将混合液于4000 r/min离心10 min后取沉淀,于-60℃下真空冷冻干燥24 h后,即得海绵状的FP。

1.2.2 FP-SeNPs的制备

参考文献[22]的方法制备,具体步骤为:取400 mg的FP,加入体积分数为0.5%的硝酸水溶液40 mL,搅拌溶解后,再加入400 mg的 Na_2SeO_3 和400 mg的 BaCl_2 ,搅拌使之溶解得到溶液,置于75℃的水浴锅中反应7 h;然后,将反应液冷却至室温后,使用浓度为1 mol/L的NaOH溶液调节pH至中性;最后,向混合液中加入400 mg的 Na_2SO_4 使 BaCl_2 沉淀,于3500 r/min离心10 min,取上清液,在截留相对分子质量3500的透析袋中透析72 h,透析过程中每3 h换一次水,直至透析液中加入 V_C 不显红色为止,将透析液在-60℃冷冻干燥24 h后,即得海绵状的FP-SeNPs,将上述多糖替换为蒸馏水制备得到SeNPs。

1.3 测试与表征

1.3.1 硒含量测定

参考文献[23]的方法,采用电感耦合等离子体发射光谱法测定FP-SeNPs的硒含量。准确称量100 mg的FP-SeNPs样品置于消化管中,加入5 mL硝酸和1 mL的 H_2O_2 振荡混合均匀,然后在微波消解仪中消解,设置功率为800 W,从初始温度25℃以20℃/min的升温速率升至120℃,并保持1 min,将温度以10℃/min加热至150℃并保持5 min,以10℃/min加热至200℃并保持10 min,然后以10℃/min降低至55℃并停止运行。消解和冷却后,将消化液转移到加有少许玻璃珠的锥形瓶中,并在电热板上加热,直到几乎变干。加入2.5 mL盐酸(6 mol/L),加热至溶液澄清无色,并伴有白烟。冷却后,将其转移到5 mL容量瓶中,加入1.5 mL铁氰化钾溶液(质量浓度100 g/L),用蒸馏水定容至5 mL,并混合均匀,测定其电感耦合等离子体发射光谱。采用公式(1)计算样品的硒含量(X)。

$$X = (\rho - \rho_0) V f / m \quad (1)$$

式中: X 为样品的硒含量,mg/kg; ρ 、 ρ_0 分别为样

品和空白对照(蒸馏水)中的硒元素质量浓度,mg/L; V 为样品消化液定样体积,L; f 为样品稀释倍数(25倍); m 为样品质量,kg。

1.3.2 UV-Vis光谱测定

参考文献[24]的方法,分别称取FP和FP-SeNPs,加蒸馏水配制质量浓度为1 g/L的溶液,采用UV-Vis分光光度法在200~400 nm范围内扫描,波长间隔为5 nm。

1.3.3 FTIR测定

参考文献[24]的方法。分别称取FP和FP-SeNPs与经干燥的KBr粉末以质量比1:100混合,玛瑙研钵中研磨均匀,压片,以KBr为本底在4000~500 cm^{-1} 波数范围内进行检测。

1.3.4 XRD测定

取适量样品于玻璃载样片上,压碎压实,置于载物台上,Cu K_α 辐射,管电压40 kV,管电流30 mA,扫描范围5°~60°,扫描速率4(°)/min。

1.3.5 SEM测定

参考文献[25]的方法。精确称取FP和FP-SeNPs各2 mg,置于碳导电介质板上喷金,然后将样品置于SEM下室温扫描,观察比较FP硒化前后的表面结构。

1.4 体外抗氧化活性的测定

1.4.1 •DPPH清除率的测定

参考文献[26]的方法。取200 μL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 g/L)的FP和FP-SeNPs溶液,加入200 μL 的DPPH无水乙醇溶液(0.2 mmol/L),混合均匀,室温下避光反应30 min,然后用酶标仪测定样品组在517 nm处的吸光度。无水乙醇为对照组,蒸馏水为空白组, V_C 为阳性对照,根据公式(2)计算•DPPH清除率(%)。

$$\text{自由基清除率}/\% = [1 - (A_{\text{样}} - A_{\text{对}}) / A_{\text{空}}] \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{对}}$ 、 $A_{\text{空}}$ 分别为样品组、对照组、空白组的吸光度。

1.4.2 •OH清除率的测定

参考文献[27]的方法。取200 μL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 g/L)的FP和FP-SeNPs溶液与200 μL 硫酸亚铁溶液(9 mmol/L)、200 μL 水杨酸乙醇溶液(9 mmol/L)、200 μL H_2O_2 溶液(9 mmol/L),混合均匀,于37℃水浴30 min。静置20 min后,取200 μL 混合溶液,用酶标仪在510 nm处测定其吸光度。将样品替换为蒸馏水作为空白组,200 μL 样品溶液、400 μL 蒸馏水和200 μL 无水乙醇的混合溶液为对照组, V_C 为阳性对照,采用公式(2)计算•OH清除率(%)。

1.4.3 •ABTS⁺清除率的测定

将浓度为 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液和 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液按体积比 1:1 混合均匀, 避光放置 12 h 后, 加蒸馏水稀释, 使混合溶液在 734 nm 的吸光度为 0.70 ± 0.02 。取 200 μ L 不同质量浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 g/L) 的样品溶液与 200 μ L 稀释后的 •ABTS⁺ 溶液混合均匀, 室温避光反应 6 min, 用酶标仪测定样品在 734 nm 处的吸光度。将样品替换为蒸馏水为空白组, 用过硫酸钾溶液代替 •ABTS⁺ 溶液测得吸光度作为对照组, V_C 为阳性对照, 根据公式 (2) 计算 •ABTS⁺ 清除率 (%)。

1.5 体外降血糖活性测定

1.5.1 α -淀粉酶活性抑制率的测定

参考文献[28]的方法。将 20 μ L 不同质量浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 g/L) 的 FP 和 FP-SeNPs 溶液与 10 μ L 的 α -淀粉酶溶液 (1 U/mL) 混合均匀, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。加入 500 μ L 质量分数 1% 淀粉溶液混匀, 静置 10 min, 加入 600 μ L 的 DNS 试剂, 沸水浴 15 min, 取 200 μ L 上清液用酶标仪测定其在 540 nm 处的吸光度。用蒸馏水代替样品溶液作为空白组, 用蒸馏水代替 α -淀粉酶溶液作为对照组, 以阿卡波糖作为阳性对照, 根据公式 (3) 计算 α -淀粉酶活性抑制率 (%)。

$$\text{抑制率}/\% = (A_{\text{空}} - A_{\text{样}} + A_{\text{对}}) / A_{\text{空}} \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{对}}$ 、 $A_{\text{空}}$ 分别为样品组、对照组、空白组的吸光度。

1.5.2 α -葡萄糖苷酶活性抑制率的测定

参考文献[28]的方法。将 20 μ L 不同质量浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 g/L) 的样品溶液与 40 μ L α -葡萄糖苷酶溶液 (0.2 U/mL) 混合均匀, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后, 加入 50 μ L 的 PBS (0.2 mol/L, pH=6.9)、40 μ L 的 PNPG 溶液 (0.251 g/L), 于 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后, 加入 140 μ L 的 Na_2CO_3 溶液 (2 mol/L) 终止反应, 取 200 μ L 用酶标仪测定其在 405 nm 下的吸光度。用蒸馏水代替上述多糖溶液作为空白组, 用蒸馏水代替上述 α -葡萄糖苷酶溶液作为对照组, 以阿卡波糖作为阳性对照, 根据公式 (3) 计算 α -葡萄糖苷酶活性抑制率 (%)。

2 结果与讨论

2.1 FP-SeNPs 的理化性质

FP 的提取率为 1.56%, 经硒化处理后 FP-SeNPs 表面疏松多孔, 颜色为黄褐色, 可溶于水。FP-SeNPs 的硒含量为 908 mg/kg。

2.2 UV-Vis 光谱分析

图 1 为 FP 和 FP-SeNPs 的 UV-Vis 吸收光谱。

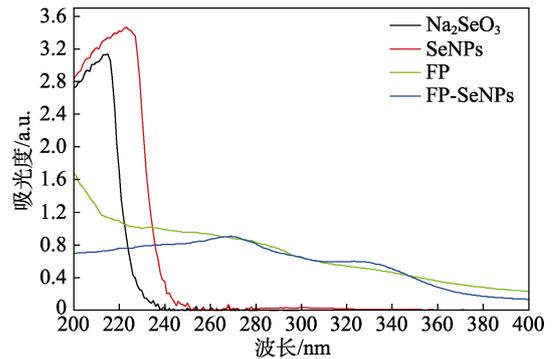


图 1 FP 和 FP-SeNPs 的 UV-Vis 吸收光谱
Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of FP and FP-SeNPs

从图 1 可以看出, FP 在 200~400 nm 范围内没有明显吸收峰, 吸光度随着波长的增加呈下降的趋势, 这与多糖的一般特征是一致的^[29]; 而且 FP 在 260 和 280 nm 处均无吸收峰, 表明 FP 中不存在蛋白质和核酸等成分。与 FP 相比, FP-SeNPs 在 200~400 nm 范围内具有较宽的吸收带, 其中 270 nm 左右处的紫外吸收峰最强, 与文献[17]中的多糖 SeNPs 吸收峰相似。更重要的是, FP-SeNPs 表现出与纯前体 (Na_2SeO_3) 和 SeNPs 完全不同的峰形。原因可能是 FP 和 SeNPs 之间存在相互作用, 并形成了 FP-SeNPs 复合物。WANG 等^[17]研究发现, 经亚硒酸盐/ V_C 化学还原法制备的刺梨多糖纳米硒 (RP3-SeNPs) 在 278 nm 处有吸收峰, 推测 SeNPs 与刺梨多糖 (RTFP-3) 相互作用形成了复合物。

2.3 FTIR 分析

图 2 为 FP 和 FP-SeNPs 的 FTIR 谱图。

从图 2 可以看出, FP 在 3440、2930、1751、1018 cm^{-1} 等多处出现典型的多糖特征吸收峰; 3440 cm^{-1} 处宽且强的吸收峰为 O—H 的伸缩振动; 2930 cm^{-1} 较弱的吸收峰为 C—H 的伸缩振动; 1751 cm^{-1} 处的吸收峰表明该多糖含有 C=O 官能团; 1018 cm^{-1} 处的吸收峰是 C—O 的拉伸振动引起的。FP-SeNPs 在 2351 cm^{-1} 附近的吸收峰与 SeNPs 在 2358 cm^{-1} 附近的吸收峰类似, 而 FP 在此处无吸收峰, 表明合成的 FP-SeNPs 中有 SeNPs 的存在。

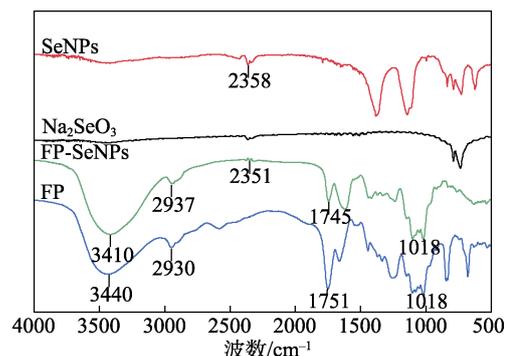


图 2 FP 和 FP-SeNPs 的 FTIR 谱图
Fig. 2 FTIR spectra of FP and FP-SeNPs

虽然 FP-SeNPs 的部分特征峰出现了红移或蓝移, 但依然存在多糖的特征吸收峰, 这表明硒化过程中 FP 的主要结构没有被破坏, 而峰形的变化可能是由 FP 的 O—H 和 C—O 与 SeNPs 表面的相互作用引起的^[30]。

2.4 XRD 分析

图 3 为 FP 和 FP-SeNPs 的 XRD 谱图。

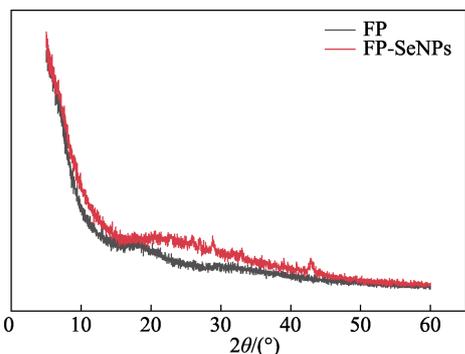


图 3 FP 和 FP-SeNPs 的 XRD 谱图
Fig. 3 XRD patterns of FP and FP-SeNPs

从图 3 可以看出, FP 在 $2\theta=5^\circ\sim 60^\circ$ 范围内没有明显的衍射峰, 表明 FP 中可结晶的多糖较少, 结晶性较差, 为无定形物; FP-SeNPs 表现出与 FP 相似的宽衍射峰, 表明 FP-SeNPs 基体中的硒没有转变为晶相, 而是继续处于无定形状态。值得注意的是, FP-SeNPs 在 $2\theta=20^\circ\sim 30^\circ$ 范围内出现一个弥散峰, 可能是因为硒化修饰在某种程度上使其中的部分多糖呈现了微晶态^[31]。

2.5 SEM 分析

图 4 为 FP 和 FP-SeNPs 的 SEM 图。

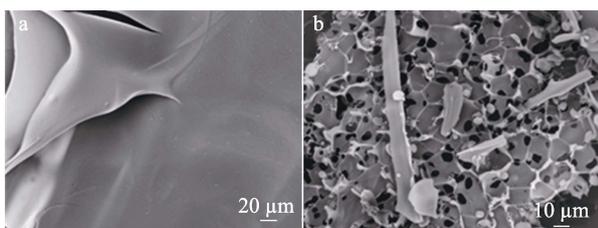


图 4 FP (a) 和 FP-SeNPs (b) 的 SEM 图
Fig. 4 SEM images of FP (a) and FP-SeNPs (b)

从图 4 可以看出, FP 的表面相对平整、光滑 (图 4a), 而 FP-SeNPs 形成了颗粒状分布的表面结构, 表面相对粗糙、凹凸不平 (图 4b)。这可能是由于, 硒原子和 FP 结合并积累改变了多糖的表面形态造成的。

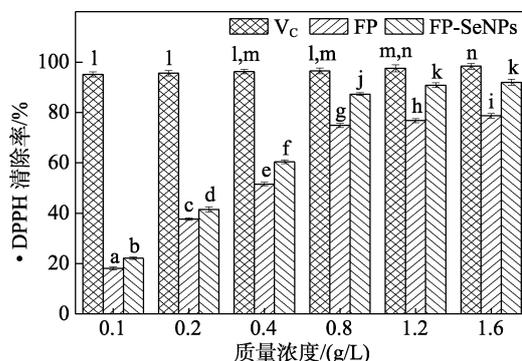
2.6 体外抗氧化活性分析

2.6.1 •DPPH 清除能力

图 5 为 FP 和 FP-SeNPs 对 •DPPH 的清除率结果。

从图 5 可以看出, 在 0.1~1.6 g/L 质量浓度范围内, FP 和 FP-SeNPs 对 •DPPH 有较强的清除能力, •DPPH

清除率和 FP 或 FP-SeNPs 的质量浓度呈线性关系; 当质量浓度为 1.6 g/L 时, FP 和 FP-SeNPs 对 •DPPH 的清除率均达到最高, 分别为 78.64% 和 91.98%。



图中不同小写字母代表差异性显著 ($P<0.05$), 下同
图 5 FP 和 FP-SeNPs 对 •DPPH 的清除率
Fig. 5 Scavenging rates of FP and FP-SeNPs on •DPPH

在测试质量浓度范围内, FP-SeNPs 对 •DPPH 的清除能力显著高于 FP ($P<0.05$)。结果表明, 硒化处理能显著增强 FP 清除 •DPPH 的能力。

2.6.2 •OH 清除能力

•OH 是一种在人体中具有较高反应活性的自由基, 给人体带来的氧化损伤严重, 因此, 对 •OH 清除能力的高低是检测和评价体外抗氧化活性能力的非常重要的指标之一。图 6 为 FP 和 FP-SeNPs 对 •OH 的清除率结果。

从图 6 可以看出, 在 0.1~1.6 g/L 质量浓度范围内, FP 和 FP-SeNPs 对 •OH 有一定的清除能力, •OH 清除率和 FP 或 FP-SeNPs 的质量浓度呈线性关系; 当质量浓度为 1.6 g/L 时, FP 和 FP-SeNPs 对 •OH 的清除率均达到最高, 分别为 45.32% 和 56.81%。在测试质量浓度范围内, FP-SeNPs 对 •OH 的清除能力显著高于 FP ($P<0.05$)。结果表明, 硒化处理能显著增强 FP 清除 •OH 的能力。

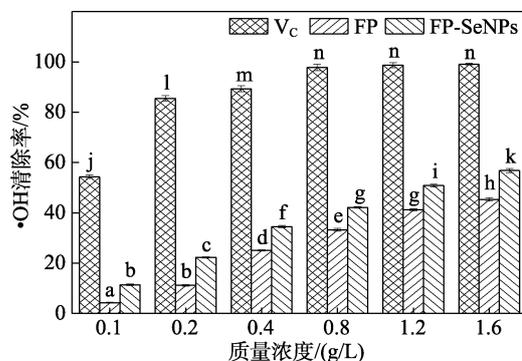


图 6 FP 和 FP-SeNPs 对 •OH 的清除率
Fig. 6 Scavenging rates of FP and FP-SeNPs on •OH

2.6.3 •ABTS⁺清除能力

ABTS 可与过硫酸钾反应生成蓝绿色 •ABTS⁺, 抗氧化剂成分将与 •ABTS⁺ 反应使体系褪色, 从而反

映该物质的抗氧化能力^[32]。图 7 为 FP 和 FP-SeNPs 对 \bullet ABTS⁺的清除率结果。

从图 7 可以看出, 在 0.1~1.6 g/L 质量浓度范围内, FP 和 FP-SeNPs 对 \bullet ABTS⁺有较强的清除能力, \bullet ABTS⁺清除率和 FP 或 FP-SeNPs 的质量浓度呈线性关系; 当质量浓度为 1.6 g/L 时, FP 和 FP-SeNPs 对 \bullet ABTS⁺的最高清除率分别为 69.74% 和 87.44%。在测试质量浓度范围内, FP-SeNPs 对 \bullet ABTS⁺的清除能力显著高于 FP ($P < 0.05$)。结果表明, 硒化处理能显著增强 FP 清除 \bullet ABTS⁺的能力。

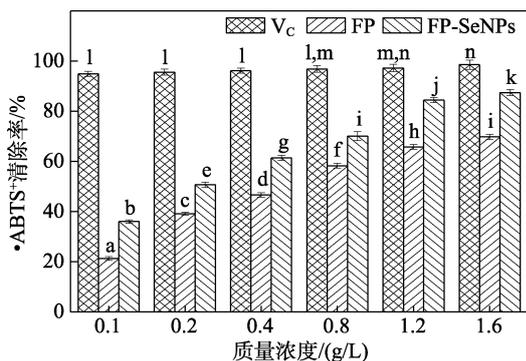


图 7 FP 和 FP-SeNPs 对 \bullet ABTS⁺的清除率

Fig. 7 Scavenging rates of FP and FP-SeNPs on \bullet ABTS⁺

综合 FP 和 FP-SeNPs 的 \bullet DPPH、 \bullet OH 和 \bullet ABTS⁺的清除实验结果, 硒化改性是提高 FP 抗氧化活性的有效方法。制备的 FP-SeNPs 中的硒基可以激活异构碳的氢原子, 从而提高对 3 种自由基的清除能力^[33]。此外, 硒至少是 25 种硒蛋白和酶催化位点的关键组分, 可诱导产生多种抗氧化酶, 如 GSH-Px 和 SOD 等, 可以清除体内自由基, 保护细胞免受氧化损伤^[34]。因此, FP-SeNPs 可能会增加硒依赖性抗氧化酶活性, 进一步在体内显示出较强的抗氧化活性。

2.7 体外降血糖活性分析

2.7.1 α -淀粉酶活性的抑制能力

α -淀粉酶可以催化碳水化合物的 α -1,4-糖苷键水解生成少量葡萄糖, 导致进食后血糖升高。酶抑制剂可以抑制 α -淀粉酶活性, 从而减缓碳水化合物水解为葡萄糖, 发挥降血糖活性^[26]。图 8 为 FP 和 FP-SeNPs 对 α -淀粉酶的活性抑制率结果。

从图 8 可以看出, 在 0.1~1.6 g/L 质量浓度范围内, FP 和 FP-SeNPs 对 α -淀粉酶活性有一定的抑制能力, α -淀粉酶活性抑制率和 FP 或 FP-SeNPs 的质量浓度呈线性关系; 当质量浓度与 1.6 g/L 时, FP 和 FP-SeNPs 对 α -淀粉酶的活性抑制率均达到最高, 分别为 46.29% 和 55.61%。在测试质量浓度范围内, FP-SeNPs 对 α -淀粉酶活性的抑制能力明显强于 FP ($P < 0.05$)。结果表明, 硒化处理能显著增强 FP 抑制 α -淀粉酶活性的能力。

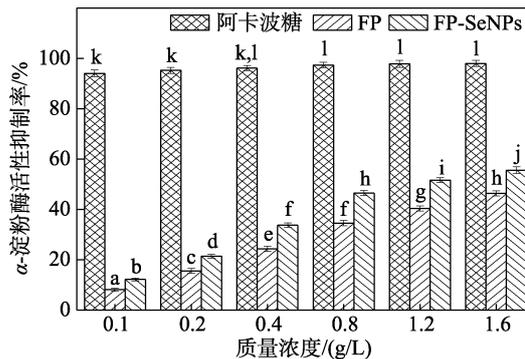


图 8 FP 和 FP-SeNPs 对 α -淀粉酶的活性抑制率

Fig. 8 Inhibition rates of FP and FP-SeNPs on α -amylase activity

2.7.2 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力

α -葡萄糖苷酶可以破坏碳水化合物的糖苷键生成葡萄糖, 使血糖升高, α -葡萄糖苷酶抑制剂可以延缓此过程, 从而降低血糖^[35]。图 9 为 FP 和 FP-SeNPs 对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制率结果。

从图 9 可以看出, 在 0.1~1.6 g/L 质量浓度范围内, FP 和 FP-SeNPs 对 α -葡萄糖苷酶活性有较强的抑制能力, α -葡萄糖苷酶活性抑制率和 FP 或 FP-SeNPs 的质量浓度呈线性关系; 当质量浓度为 1.6 g/L 时, FP 和 FP-SeNPs 对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制率均达到最高, 分别为 59.64% 和 72.73%。在测试质量浓度范围内, FP-SeNPs 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力明显强于 FP ($P < 0.05$)。结果表明, 硒化处理能显著增强 FP 抑制 α -葡萄糖苷酶活性的能力。

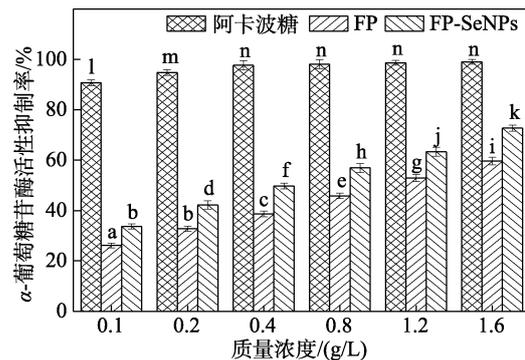


图 9 FP 和 FP-SeNPs 对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制率

Fig. 9 Inhibition rates of FP and FP-SeNPs on α -glucosidase activity

综合 FP 和 FP-SeNPs 的体外降血糖活性结果, 硒化改性是提高 FP 体外降血糖活性的有效方法。糖尿病的特点是体内氧化和抗氧化状态受到干扰, 导致 ROS 的产生, 进而导致细胞凋亡和肾损伤, 进一步导致并发症的出现^[36]。而抗氧化酶 (SOD、CAT 和 GSH-Px) 可以清除自由基, 增强抗氧化防御系统对体内氧化应激的反应。如 2.6 节所述, FP-SeNPs

可诱导产生多种重要的抗氧化酶, 通过清除体内自由基保护细胞免受氧化损伤, 进而产生降血糖效果。

3 结论

本文从干燥连翘中提取 FP, 并采用硝酸-亚硒酸钠法制备了 FP-SeNPs, 其中硒含量为 908 mg/kg。

(1) FP-SeNPs 形成了颗粒状分布的表面结构, 改变了多糖的表面形态, 但未破坏多糖的基本结构; FP-SeNPs 的 UV-Vis 吸收光谱中在 270 nm 左右处出现新峰, XRD 谱图中在 $2\theta=20^\circ\sim 30^\circ$ 范围内出现一个弥散峰, 表明 FP 和 SeNPs 之间存在相互作用, 形成了 FP-SeNPs 复合物。

(2) FP-SeNPs 对 $\cdot\text{DPPH}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{ABTS}^+$ 的清除能力均呈浓度依赖性, 质量浓度 1.6 g/L 的 FP-SeNPs 溶液对上述 3 种自由基的清除率分别为 91.98%、56.81% 和 87.44%, 且显著高于 FP 的自由基清除能力 ($P<0.05$), 说明硒化改性能显著提高 FP 的抗氧化活性。

(3) FP-SeNPs 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性抑制率均呈浓度依赖性, 质量浓度 1.6 g/L 的 FP-SeNPs 溶液对上述两种酶的活性抑制率分别达 55.61% 和 72.73%, 且显著高于 FP 的酶抑制能力 ($P<0.05$), 说明硒化改性能显著提高 FP 的降血糖活性。

本文可以为连翘和富硒功能食品的开发提供参考。

参考文献:

- [1] YUAN W J, ZHANG S P, HE Z Y, *et al.* Comparative transcriptome analyses identify genes involved into the biosynthesis of forsythidin and forsythoside A in *Forsythia suspensa*[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2022, 22(5): 731-741.
- [2] WENG D, ZHA S H, ZHU Y, *et al.* Effect of particle size on the physicochemical and antioxidant properties of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl leaf powders[J]. *Powder Technology*, 2022, 410: e117866.
- [3] GUO J, TANG J K, WANG B F, *et al.* Phillygenin from *Forsythia suspensa* leaves exhibits analgesic potential and anti-inflammatory activity in carrageenan-induced paw edema in mice[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(12): e14460.
- [4] HEYDARIAN M, JOOYANDEH H, NASEHI B, *et al.* Characterization of *Hypericum perforatum* polysaccharides with antioxidant and antimicrobial activities: Optimization based statistical modeling[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104: 287-293.
- [5] LIU J, LIN L Y, JIA Z, *et al.* Antibacterial potential of *Forsythia suspensa* polysaccharide against resistant *Enterobacter cloacae* with SHV-12 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(15): 8763-8771.
- [6] ZHOU S Y, HUANG G L. Preparation, structure and activity of polysaccharide phosphate esters[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 144: e112332.
- [7] YU Y, SHEN M Y, SONG Q Q, *et al.* Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 183: 91-101.
- [8] JIN M, SHI J L, ZHU W Z, *et al.* Polysaccharide-based biomaterials in tissue engineering: A review[J]. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2021, 27(6): 604-626.
- [9] NAI J J, ZHANG C, SHAO H L, *et al.* Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 183: 2337-2353.
- [10] CHENG H, HUANG G L. Extraction, characterisation and antioxidant activity of *Allium sativum* polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 415-419.
- [11] CHEN F, HUANG G L, YANG Z Y, *et al.* Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 673-680.
- [12] FAN Y, ZHOU X, HUANG G. Preparation, structure, and properties of tea polysaccharide[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2022, 99(1): 75-82.
- [13] LYU J P (吕建平). Study on extraction, isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharide from *Forsythia suspensa* leaves[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University (陕西师范大学), 2014.
- [14] XIA B L, XU S, LI J B, *et al.* Preparation and process optimization of tea polysaccharide-nano-selenium[J]. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2021, 781(5): e052036.
- [15] ZHONG Z L (钟泽梁), HONG B H (洪碧红), XIAO M T (肖美添), *et al.* Preparation, functions and food application of polysaccharide-selenium nanoparticles: A review[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(19): 308-319.
- [16] HU S Q, HU W C, LI Y R, *et al.* Construction and structure-activity mechanism of polysaccharide nano-selenium carrier[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 236: e116052.
- [17] WANG L, LI C, HUANG Q, *et al.* Biofunctionalization of selenium nanoparticles with a polysaccharide from *Rosa roxburghii* fruit and their protective effect against H_2O_2 -induced apoptosis in INS-1 cells[J]. *Food & Function*, 2019, 10(2): 539-553.
- [18] WANG T (王甜). Preparation of *Sargassum fusiforme* polysaccharide nano-selenium and its protective effect on cell model of Parkinson's disease[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2023.
- [19] TAN X Y (谭晓燕). Preparation of *Schisandra chinensis* polysaccharide selenium nanoparticles and its protective effect on intestinal inflammatory injury[D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2023.
- [20] GAO F, LIU H M, HAN H, *et al.* Ameliorative effect of *Berberidis radix* polysaccharide selenium nanoparticles against carbon tetrachloride induced oxidative stress and inflammation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: e1058480.
- [21] CHEN Y (陈越), SONG Z K (宋振康), ZHANG H Y (张海悦). Study on optimization of response surface for the removal of protein from polysaccharide of *Solanum nigrum* fruit by chloroacetic acid method[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2020, 46(24): 198-203.
- [22] WANG L B (王丽波), GAO J Y (高婧宇), LI T F (李腾飞), *et al.* Preparation, structural characterization and probiotics proliferation-promoting activity of selenized dandelion polysaccharide[J]. *Food Science (食品科学)*, 2021, 42(7): 169-175.
- [23] LIAN Y P, ZHU M M, YANG B, *et al.* Characterization of a novel polysaccharide from *Red ginseng* and its ameliorative effect on oxidative stress injury in myocardial ischemia[J]. *Chinese Medicine*, 2022, 17(1): e111.
- [24] ZHAO Y Y (赵圆圆). Study on extraction, purification, structure characterization and lipid-lowering activity of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* fruit body[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology (陕西科技大学), 2021.
- [25] LI Q, ZHANG C. A study of antioxidant activity about seleno-polysaccharide of *Cordyceps militaris* from different areas of China[J]. *Advanced Materials Research*, 2013(807/808/809): 1984-1987.
- [26] WANG C X (王春霞). Study on extraction and hypoglycemic activity of coix seed polysaccharide[D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2022.