

# 酚酸结构对酚酸-g-聚甘露糖醛酸抗氧化性能的影响

唐裕芳, 杨雨欣, 艾世杰, 严 玥, 李玉芹\*, 周 蓉, 王 唯

(湘潭大学 化工学院, 湖南 湘潭 411105)

**摘要:** 海藻酸钠水解产物聚甘露糖醛酸 (PM) 的羧基与乙二胺 (EDA) 的一个氨基反应制得了中间体 PM-EDA, PM-EDA 分别与 8 种酚酸 (PA) 接枝共聚, 制得了 8 种接枝共聚物酚酸-g-聚甘露糖醛酸 (PA-g-PM)。对 PM-EDA 的制备条件进行了优化, 探究了 PA 结构对 PA-g-PM 抗氧化活性的影响。结果表明, 在  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA}) = 1 : 1.5$ ,  $n(\text{PM}) : n(\text{碳二亚胺}) : n(\text{N-羟基琥珀酰亚胺}) = 1 : 2 : 1$ , pH 8.0 条件下反应 24 h, 获得最高取代度 (17.27%) 的 PM-EDA。8 种 PA-g-PM 的接枝率在  $(4.171 \pm 0.16) \sim (8.880 \pm 0.32)$  mg 没食子酸/g 之间。UV-Vis、FTIR、XRD 表征证实酚酸已成功接枝到 PM 上。相比于 PM, 8 种 PA-g-PM 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基的清除率和对铁的还原力均显著提升。PA-g-PM 的抗氧化性能与其中的酚羟基个数呈正相关关系, 含有对位酚羟基的 PA-g-PM 的抗氧化性能优于含有邻位酚羟基的 PA-g-PM 的抗氧化性能, PA-g-PM 中的酚羟基被甲氧基取代后抗氧化性能减弱。

**关键词:** 海藻酸钠; 聚甘露糖醛酸; 酚酸; 抗氧化性能; 食品化学品

中图分类号: TS202.3; TQ658 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 06-1356-10

## Effect of phenolic acid structure on antioxidant activity of phenolic acid-g-polymanuronic acid

TANG Yufang, YANG Yuxin, AI Shijie, YAN Yue, LI Yuqin\*, ZHOU Rong, WANG Wei

(School of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, Hunan, China)

**Abstract:** Eight kinds of graft copolymers phenolic acid-g-polymanuronic acid (PA-g-PM) were prepared by graft copolymerization of eight phenolic acids (PA) and intermediate PM-EDA, which was synthesized from the reaction between the carboxy group of polymanuronic acid (PM), a hydrolysate of sodium alginate, and the amino group of ethylenediamine (EDA). The preparation conditions of PM-EDA were optimized, and the influence of PA structure on the antioxidant activities of PA-g-PM were investigated. The results showed that under the conditions of  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA}) = 1 : 1.5$ ,  $n(\text{PM}) : n(\text{carbodiimide}) : n(\text{N-hydroxysuccinimide}) = 1 : 2 : 1$ , pH 8.0, and reaction time of 24 h, PM-EDA with the highest substitution degree of 17.27% was obtained. Data from UV-Vis, FTIR and XRD analyses showed that phenolic acids were successfully graft onto PM, with grafting rates ranging from  $(4.171 \pm 0.16)$  to  $(8.880 \pm 0.32)$  mg gallic acid/g for the eight copolymers. Compared with PM, all eight PA-g-PM copolymers exhibited significantly enhanced 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging rate and iron reducing power. The antioxidant performance of PA-g-PM was positively correlated with the number of phenolic hydroxyl groups contained, with that of PA-g-PM possessing para-phenolic hydroxyl group superior to that of possessing ortho-phenolic hydroxyl group. Meanwhile, PA-g-PM with methoxy group in replacement of phenolic hydroxyl group showed weakened antioxidant activity.

**Key words:** sodium alginate; ploymannuronic acid; phenolic acid; antioxidation; food chemicals

收稿日期: 2022-09-04; 定用日期: 2023-01-06; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220827

基金项目: 湖南省教育厅重点项目 (20A472); 湖南省自然科学基金面上项目 (2021JJ30660); 湖南省大学生创新创业基金 (S202010530046); 湘潭大学 2021 年度大学生创新创业训练计划项目

作者简介: 唐裕芳 (1970—), 女, 副教授, E-mail: tyfchky@xtu.edu.cn. 联系人: 李玉芹 (1979—), 女, 教授, E-mail: yuqinli2004@xtu.edu.cn.

海藻酸钠在医药和食品行业已被广泛应用<sup>[1]</sup>, 但由于海藻酸钠高浓度时的低溶解性和高黏度使其应用受到一定限制<sup>[1]</sup>。研究发现, 海藻酸钠水解后所得低相对分子质量水解物能保护益生菌免受胃酸的损伤<sup>[2]</sup>、促进双歧杆菌繁殖<sup>[3]</sup>和植物根生长<sup>[4]</sup>、减缓非生物胁迫引起的损伤<sup>[5]</sup>、抑制果蔬采后衰老和延长果蔬保藏时间<sup>[6]</sup>, 且清除自由基的性能增强<sup>[7]</sup>。这些功能的发挥可能与海藻酸钠低相对分子质量水解物的化学结构、相对分子质量大小和甘露糖醛酸(M)/古罗糖醛酸(G)的物质的量比有关<sup>[1]</sup>。海藻酸钠水解后其空间结构发生变化, 许多活性位点暴露出来, 从而更容易发挥海藻酸钠低相对分子质量水解物的功能和活性<sup>[8]</sup>。虽然海藻酸钠水解后所得低相对分子质量水解物的上述功能和活性提高, 但提高程度有限, 或未有显著提升。如 FALKEBORG 等<sup>[7]</sup>发现, 相比未水解海藻酸钠, 水解后所得低相对分子质量水解物清除自由基性能提高, 但水解物所用质量浓度较大, 达到 1~50 g/L, 且对铁的还原力仍然较弱<sup>[6]</sup>。

海藻酸钠水解后羟基和羧基官能团充分暴露出来, 这使得在羟基和羧基上引入抗氧化性能更强的官能团来增强海藻酸钠水解物的抗氧化性能成为可能。而被引入官能团的结构和抗氧化性能是决定海藻酸钠水解物抗氧化性能是否增强的关键因素。酚酸由于携带了能提供氢原子使氧化链终止的酚羟基而具有较强抗氧化性能。目前, 有研究表明, 通过壳聚糖分子上的氨基与酚酸羧基反应引入抗氧化性能较强的酚羟基能大幅度提升壳聚糖的抗氧化性能<sup>[9]</sup>。而鲜见针对海藻酸钠及其低相对分子质量水解物接枝酚酸提升海藻酸钠及其海藻酸钠水解物抗氧化性能的报道。HUANG 等<sup>[10]</sup>通过海藻酸钠的

羧基与多巴胺的氨基反应来增强海藻酸钠的杀虫活性。说明海藻酸钠的低相对分子质量水解物的羧基与氨基反应是可行的。WEN 等<sup>[11]</sup>通过海藻酸钠羧基与乙二胺(EDA)的一个氨基反应制得海藻酸钠基吸附材料, 说明海藻酸钠的低相对分子质量水解物的羧基与 EDA 的一个氨基反应且残留一个端氨基是可行的。

基于此, 本研究拟通过海藻酸钠水解物聚甘露糖醛酸(PM)的羧基与 EDA 的一个氨基反应, 获得残留一个端氨基的 PM-EDA 中间体, 再通过 PM-EDA 的端氨基与酚酸(PA)的羧基反应, 制得 PM 与酚酸的接枝共聚物 PA-g-PM, 并评价 PA-g-PM 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、羟基自由基的清除率和铁还原力, 探讨酚酸结构对 PA-g-PM 抗氧化性能的影响。以期寻找一种能大幅度提升海藻酸钠及其水解物抗氧化性能的方法, 为海藻酸钠高值资源化和应用于食品、化妆品、医药等行业奠定理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

实验中所用到的海藻酸钠和其他试剂均购自上海麦克林生化科技股份有限公司, 均为分析纯。

UV-2450 型紫外-可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; Nicolet 380 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国尼高力公司; DGH-9123A 真空冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; D/MAX-2500 X 射线多晶粉末衍射仪, 日本理学公司。

### 1.2 实验方法

实验路线如下所示:



#### 1.2.1 PM 的制备

PM 的制备参照文献<sup>[12]</sup>方法, 但稍作修改, 详细步骤如下: 将 20.00 g 海藻酸钠加入到 1000 mL 蒸馏水中, 充分溶胀 24 h 得到海藻酸钠凝胶溶液。向上述凝胶溶液中缓慢滴加 41.67 mL 质量分数 36% 浓盐酸, 持续搅拌至凝胶溶液完全转变为凝胶块, 然后于 100 °C 水浴中水解 8 h (随时补充蒸馏水至溶液原有体积) 后, 离心 (4000 r/min) 10 min, 所得沉淀于 -55 °C 冷冻干燥 48 h 后获得 19.01 g 白色粉末, 即为藻酸钠水解物粗品。

上述所得白色粉末用 200 mL 质量分数 6% NaHCO<sub>3</sub> 溶液溶解, 然后用 0.3 mol/L 稀盐酸调节溶液 pH 至 2.85, 待白色絮状沉淀完全形成, 离心

(4000 r/min) 10 min, 然后用移液枪将上清液移入干净的 1 L 烧杯中。

用 0.1 mol/L NaOH 溶液将上清液的 pH 调节至 7.0~8.0, 再缓慢加入 600 mL 体积分数 95% 乙醇溶液, 并持续搅拌, 获得大量白色絮状沉淀, 将其放入 4 °C 冰箱中静置 12 h 后, 离心 (4000 r/min, 10 min), 收集所得沉淀放于烧杯中, 再次加入 600 mL 无水乙醇, 搅拌混匀后离心 (4000 r/min, 10 min), 所得沉淀于 50 °C 烘箱中干燥 48 h。干燥后的沉淀物再用 200 mL 质量分数 6% NaHCO<sub>3</sub> 溶液溶解, 用 0.3 mol/L 稀盐酸将溶液 pH 调节至 2.85, 离心 (4000 r/min, 10 min), 上清液移至烧杯中, 重复上述上清液处理步骤 2 次, 得到的沉淀于 50 °C

烘箱中干燥 48 h, 得到 7.62 g PM。

### 1.2.2 PM-EDA 中间体的合成

PM-EDA 的制备参考文献<sup>[10]</sup>, 但稍有修改, 具体步骤为: 将 0.30 g (约 0.0015 mol) PM 加入到装有 50 mL 蒸馏水的三口烧瓶中, 搅拌溶解, 接着按  $n(\text{PM}) : n [ 1-(3\text{-二甲氨基丙基})\text{-3-乙基碳二亚胺}(\text{EDC}) ] : n [ N\text{-羟基琥珀酰亚胺}(\text{NHS}) ] = 1 : 1 : 1, 1 : 2 : 1, 1 : 2 : 2, 1 : 4 : 2, 1 : 5 : 2$  向烧瓶中分别加入 EDC 和 NHS, 搅拌 10 min 后, 按 PM 中  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA}) = 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2, 1 : 2.5, 1 : 3$  向反应体系中逐滴加入 EDA, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节体系 pH 至 6.0、7.0、7.5、8.0、9.0, 在室温下连续搅拌反应 8、12、18、24、36 h, 以取代度为指标优化中间体 PM-EDA 的制备条件。反应物于大量的无水乙醇中沉降, 过滤, 获得的白色滤渣用无水乙醇洗涤 2~3 次。将洗净的滤渣复溶于 50 mL 蒸馏水中透析 (截留相对分子质量为 3500) 48 h, 最后将透析袋中溶液于 -55 °C 冷冻干燥 48 h, 得到中间体 PM-EDA。

利用反式酸碱滴定法<sup>[13]</sup>测定聚合物中相应的游离羧酸基团, 以此换算海藻酸钠的取代度: 称取 0.10 g PM-EDA 溶于 100 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中, 加入几滴酚酞作指示剂, 用 0.3 mol/L 的 HCl 反滴定。取代度 (DS) 根据式 (1) 计算:

$$\text{DS}/\% = [1 - (0.01 - 0.3 \times V_1) / (0.01 - 0.3 V_2)] \times 100 \quad (1)$$

式中: 0.01 为 NaOH 的物质的量, mol; 0.3 为 HCl 的浓度, mol/L;  $V_1$  为滴定 PM-EDA 所消耗的 HCl 的体积, L;  $V_2$  为滴定 PM 所消耗的盐酸体积, L。

### 1.2.3 PA-g-PM 的制备

PA-g-PM 的制备方法参照壳聚糖接枝酚酸的方法<sup>[14]</sup>进行, 步骤如下: 向装有 20 mL 蒸馏水的圆底烧瓶中加入 0.12 g 取代度最高的 PM-EDA, 溶解后, 加入 0.14 g 1-羟基苯并三唑 (HOBt), 然后将圆底烧瓶置于 25 °C 油浴锅中连续搅拌至溶液澄清, 分别向溶液中加入 0.17 g 没食子酸 (GA), 待 GA 溶解后, 逐滴加入无水乙醇溶解的 EDC (0.19 g EDC 溶于 2.0 mL 无水乙醇中), 在 25 °C 下反应 24 h 后, 所得溶液于大量无水乙醇中沉降, 过滤, 获得的白色滤渣用无水乙醇洗涤 2~3 次。所得沉淀物复溶于 50 mL 蒸馏水后置于截留相对分子质量为 3500 的透析袋中透析 48 h, 透析袋中溶液于 -55 °C 冷冻干燥 48 h 得到最终产物 GA-g-PM。

0.15 g 原儿茶酸 (PrA)、0.15 g 龙胆酸 (GtA)、0.15 g 焦儿茶酸 (PyA)、0.20 g 丁香酸 (SyA)、0.17 g 香草酸 (VA)、0.17 g 异香草酸 (IsA)、0.14 g 水杨酸 (SA) 分别替代 0.17 g GA 参与上述反应, 其他步骤与上述方法相同, 分别制得 PrA-g-PM、GtA-g-

PM、PyA-g-PM、SyA-g-PM、VA-g-PM、IsA-g-PM、SA-g-PM。

PA-g-PM 接枝率采用 Folin-Ciocalteu 方法测定<sup>[15]</sup>。具体步骤如下: 准确称取 0.01 g PA-g-PM 加入到 20 mL 蒸馏水中搅拌直到完全溶解。将 1.0 mL 已稀释好的 Folin-Ciocalteu 试剂 (主要成分磷钨钼酸) 与 0.5 mL 样品溶液混和均匀后, 于 30 °C 暗处反应 5 min, 接着加入 2.0 mL 饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液继续反应 1.0 h, 分光光度法测定该混合溶液在 747 nm 波长下的吸光度。将 0.10 g/L 的 GA 溶液稀释成不同浓度梯度, 横坐标为 GA 质量浓度 (g/L), 纵坐标为吸光度, 标准曲线的拟合方程为  $y = 0.14267 + 31.36061x$ ,  $R^2 = 0.9979$ 。通过拟合方程计算得到 PA-g-PM 中酚酸的接枝率, 聚合物中酚酸的接枝率以每克接枝共聚物中 GA 的毫克数表示 (mg GA/g)。以蒸馏水作空白, 用作分光光度计的调零校准。

### 1.3 表征

UV-Vis: 样品配制成适当浓度溶液, 采用紫外-可见分光光度计扫描 200~500 nm 波长范围内的图谱。

FTIR: 取少量样品分别与干燥的溴化钾研磨, 混合均匀, 然后将混合粉末压制成 1 mm 的薄片, 采用傅里叶变换红外光谱仪扫描 4000~400  $\text{cm}^{-1}$  范围内的图谱。

XRD: 样品平铺在 XRD 样品池。采用 X 射线多晶粉末衍射仪进行 XRD 扫描。设置条件为: 辐射源铜靶, 电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描范围  $2\theta = 5^\circ \sim 70^\circ$ , 扫描步长  $0.02^\circ$ , 扫描速率  $5^\circ/\text{min}$ 。

### 1.4 抗氧化活性测定

PA-g-PM 和  $V_C$  均配制成 0.5 g/L 的样品溶液。DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除率以及铁还原力测定参考文献<sup>[16-17]</sup>, 但稍作修改, 具体步骤如下。每个样品做 3 组平行, 结果取平均值。

DPPH 自由基清除率: 配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液。实验组: 分别移取 25、50、100、200、400  $\mu\text{L}$  样品溶液于 2 mL 离心管中, 加入蒸馏水配成总体积为 500  $\mu\text{L}$  的溶液, 然后再向每支离心管中分别加入 500  $\mu\text{L}$  的 DPPH 甲醇溶液, 摇匀。用 500  $\mu\text{L}$  甲醇代替实验组中的 DPPH 甲醇溶液作阴性对照组。500  $\mu\text{L}$  蒸馏水代替实验组中样品溶液作空白组。各离心管中溶液混合均匀后, 室温避光静置 30 min, 然后采用紫外-可见分光光度计测定 517 nm 波长处的吸光度。根据式 (2) 计算 DPPH 自由基的清除率。

羟基自由基的清除率: 配制 9 mmol/L 的水杨酸乙醇溶液、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  水溶液和  $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液。实验组: 分别移取 37.5、75、150、300、600  $\mu\text{L}$  样品

溶液于 2 mL 离心管中,加入蒸馏水配成总体积为 600  $\mu\text{L}$  的溶液,然后再向每支离心管中分别加入 300  $\mu\text{L}$  的  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  溶液和 300  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,各离心管摇晃 10 min,再向每管中加入 300  $\mu\text{L}$  水杨酸乙醇溶液。300  $\mu\text{L}$  蒸馏水代替实验组中的 300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液作阴性对照组。600  $\mu\text{L}$  蒸馏水代替实验组中样品溶液作空白组。最后各离心管于 37  $^\circ\text{C}$  水浴反应 30 min,再避光冷却至室温,采用紫外-可见分光光度计测定 510 nm 处的吸光度。根据式(2)计算羟基自由基清除率。

超氧阴离子自由基清除率:(1)配制 0.016 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液、0.55 mmol/L 的还原性辅酶 I (NADH) Tris-HCl 溶液、0.3 mmol/L 的硝基四氮唑蓝 (NBT) Tris-HCl 溶液、0.06 mmol/L 的吩嗪硫酸甲酯 (PMS) Tris-HCl 溶液。(2)实验组:分别量取 25、50、100、200、400  $\mu\text{L}$  样品溶液于 2 mL 离心管中,再分别加入不同体积的 Tris-HCl 缓冲溶液配成总体积为 700  $\mu\text{L}$  的溶液,然后依次向每管中加入 NADH 溶液、NBT 溶液、PMS 溶液各 100  $\mu\text{L}$ 。100  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲溶液替代实验组中的 100  $\mu\text{L}$  NBT 溶液作阴性对照,700  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲溶液加入 NADH 溶液、NBT 溶液、PMS 溶液各 100  $\mu\text{L}$  作空白组。各离心管中溶液摇匀后,避光静置 5 min,然后采用紫外-可见分光光度计测定 560 nm 波长处的吸光度。根据式(2)计算超氧阴离子自由基清除率。

自由基清除率/%=100 $\times$ [ $A_0-(A-B)$ ]/ $A_0$  (2)  
式中: $A_0$  为空白组的吸光度; $A$  为实验组的吸光度; $B$  为阴性对照组的吸光度。

铁还原力测定:(1)配制 pH 6.8 的 PBS 缓冲溶液、0.03 mmol/L 铁氰化钾溶液、0.006 mmol/L 三氯化铁 ( $\text{FeCl}_3$ ) 溶液、0.6 mmol/L 三氯乙酸 (TCA) 溶液。(2)实验组:量取 25、50、100、200、300  $\mu\text{L}$  样品溶液于 2 mL 离心管中,加入蒸馏水配成总体积为 300  $\mu\text{L}$  的溶液,再加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲溶液、300  $\mu\text{L}$  铁氰化钾溶液。以 300  $\mu\text{L}$  蒸馏水代替实验组的样品溶液为空白对照。离心管中溶液混匀后于 50  $^\circ\text{C}$  水浴加热 20 min 后,迅速冰水浴冷却至室温,再向离心管中加入 300  $\mu\text{L}$  的 TCA 溶液,混匀,3500 r/min 离心 10 min,移取上清液 500  $\mu\text{L}$  于 2 mL 离心管中,加入 500  $\mu\text{L}$  蒸馏水和 100  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$  溶液,摇匀后静置 10 min,采用紫外-可见分光光度计测定离心管中溶液在 700 nm 波长处的吸光度。整个操作过程均需在避光条件下进行。根据式(3)计算铁还原力。

$$\text{铁还原力} = A_1 - A_0 \quad (3)$$

式中: $A_0$  为空白组的吸光度; $A_1$  为实验组的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PM-EDA 的合成

在活化剂 EDC/NHS 作用下,EDA 取代了 PM 分子中羧基官能团上的羟基<sup>[10,18]</sup>,生成端基有氨基的酰胺化合物 PM-EDA。PM-EDA 的合成示意图见图 1a。

在 PM-EDA 合成反应中,反应物比例、活化剂比例、pH、反应时间会影响 PM-EDA 的取代度。因此,本文对这 4 个影响 PM-EDA 合成的因素进行了优化,结果见图 2。

图 2A 显示了固定 PM (0.30 g)、EDC (1.44 g) 和 NHS (0.36 g) 的添加量,在 pH 7.5 反应 24 h,反应物比例 [ $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})$ ] 对产物 PM-EDA 取代度的影响。由图 2A 可知,当  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})$  由 1 : 1 减小到 1 : 1.5 时,PM-EDA 的取代度呈现显著上升趋势,在  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA}) = 1 : 1.5$  时取代度最高,为 9.25%;当  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})$  由 1 : 1.5 减小到 1 : 2 时,PM-EDA 取代度呈显著下降趋势,继续减小  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})$ ,PM-EDA 的取代度无显著变化。这可能是因为 EDA 比例增大使反应体系的 pH 增大,不适合 PM-EDA 生成。TAN 等<sup>[19]</sup>在利用 EDC/NHS 催化  $\alpha$ -硫辛酸的羧基与壳聚糖的氨基反应也获得与本研究类似的结果。因此,本研究选择合成 PM-EDA 的最佳  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})$  为 1 : 1.5。

图 2B 显示了固定 PM (0.30 g), EDC (1.44 g) 和 NHS (0.36 g) 添加量,在  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})$  为 1 : 1.5、pH 7.5 时,反应时间对 PM-EDA 取代度的影响。由图 2B 可知,当反应时间在 8~24 h 时,PM-EDA 取代度由 2.66% 增加到 9.84%,继续延长反应时间至 36 h 时,PM-EDA 的取代度不再增加反而稍有下降,由反应 24 h 时的 9.84% 逐渐下降到 9.31%,但不显著 ( $p > 0.05$ )。这可能是因为反应 24 h 后,PM 中的羧基基本已与 EDA 反应,并达到一个动态平衡。因此,本研究选择合成 PM-EDA 的最佳反应时间为 24 h。

图 2C 显示了固定 PM (0.30 g),在  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA}) = 1 : 1.5$ , pH 7.5 下反应 24 h,不同活化剂比例 [ $n(\text{PM}) : n(\text{EDC}) : n(\text{NHS})$ ] 对 PM-EDA 取代度的影响。由图 2C 可知,当  $n(\text{PM}) : n(\text{EDC}) : n(\text{NHS})$  由 1 : 1 : 1 变到 1 : 2 : 1 时,PM-EDA 的取代度由 7.99% 增加到 12.63%,达到最大。然后随着活化剂比例的变化,PM-EDA 取代度呈下降趋势。在此催化反应体系中,首先 PM 的羧基与 EDC 反应生成 *O*-酰基异脲,但 *O*-酰基异脲在水溶液中很容易被水解,而 NHS 能使 *O*-酰基异脲转化成有胺活性的 NHS 酯,最后与 EDA 上氨基反应生成 PM-EDA。活化剂比例可能影响由 EDC 介导的偶联反应。因此,本研究选择合成 PM-EDA 的活化剂比例  $n(\text{PM}) : n(\text{EDC}) : n(\text{NHS}) = 1 : 2 : 1$ 。

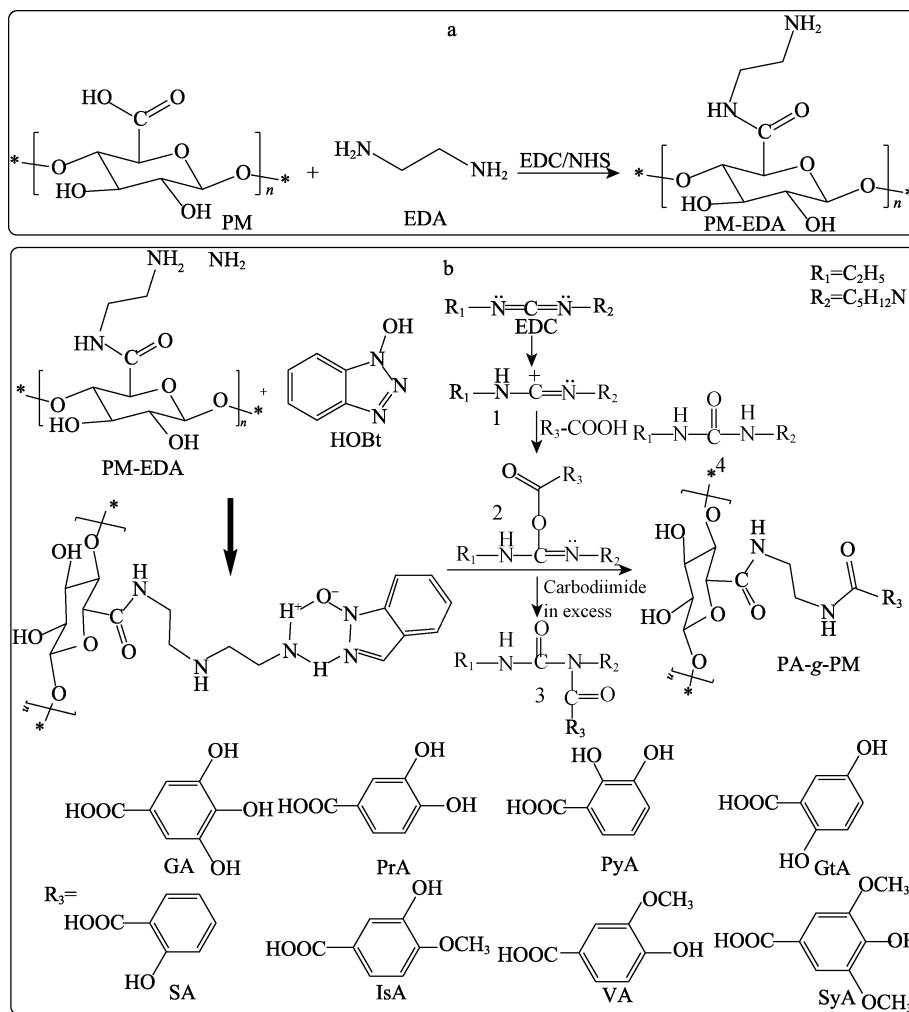


图 1 PM-EDA (a) 和 PA-g-PM (b) 的合成示意图  
Fig. 1 Synthesis schematic diagram of PM-EDA (a) and PA-g-PM (b)

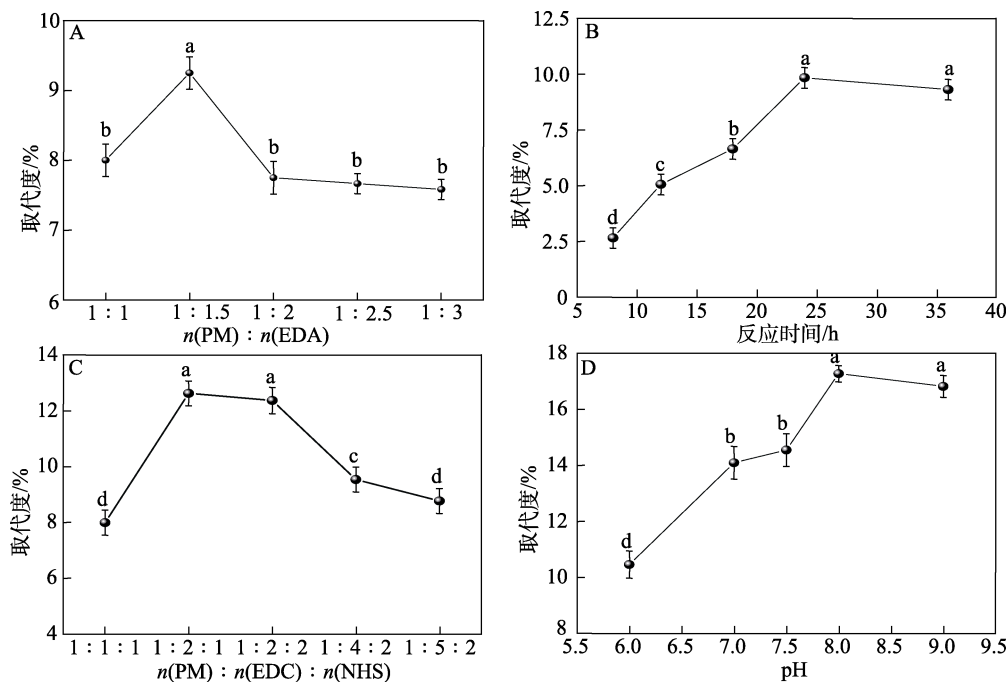


图 2 反应物物质的量比 (A)、反应时间 (B)、活化剂比例 (C)、反应 pH (D) 对 PM-EDA 取代度的影响  
Fig. 2 Effects of molar ratio of reactants (A), reaction time (B), activator ratio (C), and reaction pH (D) on degree of substitution of PM-EDA

图 2D 显示了固定 PM (0.30 g), 在  $n(\text{PM}) : n(\text{EDA})=1 : 1.5$ ,  $n(\text{PM}) : n(\text{EDC}) : n(\text{NHS})=1 : 2 : 1$  条件下反应 24 h, 反应体系 pH 对产物 PM-EDA 取代度的影响。

由图 2D 可知, 当体系 pH 在 6.0~8.0 的范围内时, PM-EDA 的取代度由 10.46% 增加到 17.27%, 继续增加 pH 至 9.0, PM-EDA 的取代度随着 pH 的增加而下降。这可能是由于碱性较强的环境不适合 PM-EDA 的合成。图 2A 结论表明, 反应物中 EDA 过量到一定程度不利于 PM-EDA 合成, 这可能也是由于 EDA 过量到一定程度使反应体系的碱性较强而不适合 PM-EDA 的合成。因此, 本研究选择合成 PM-EDA 的最佳 pH 为 8.0。

## 2.2 PA-g-PM 的合成

1.2.2 节中合成的 PM-EDA 拥有端氨基 (见图 1a), 具有与带羧基基团的酚酸接枝共聚的潜力。羟基苯并三唑 (HOBt) 是一种有机物, 不溶于水, 但其羟基可与 PM-EDA 中的氨基形成较强的氢键<sup>[20]</sup>, 因此, HOBt 加到 PM-EDA 的水溶液中, 形成透明的 PM-EDA 和 HOBt 的混合液, 使 PM-EDA 能在水相中高效地与酚酸接枝共聚生成 PA-g-PM, 并避免副产物的形成。PA-g-PM 可行的合成示意图见图 1b。其中, 活化剂 EDC 被共存于碳化二亚胺共轭试剂中的盐酸质子化形成正碳离子 (1), 并进一步与酚酸中羧基反应形成酰基异脲 (2)。为了防止 EDC 水解生成尿素 (4), EDC 配制成乙醇溶液加入到反应体系中。反应体系中的 HOBt 与 EDC 结合还可防止因 EDC 过量生成副产物 *N*-酰基脲 (3), 从而提高 PM-EDA 与酚酸的反应速率<sup>[21]</sup>。由于空间位阻, 酚酸与 PM 的 C-2 和 C-3 的羟基形成酯键的反应可以忽略。未反应的 HOBt 和副产物尿素 (4) 通过水相透析除去。

PA-g-PM 接枝率测定: 共聚物接枝率是通过测定共聚物中酚酸含量计算得出。在碱性溶液中, 福林酚溶液中的钨钼酸将酚酸氧化, 自身被还原 ( $\text{W}^{6+}$  还原成  $\text{W}^{5+}$ ), 溶液由紫色变为蓝色, 且酚酸含量越高颜色越深<sup>[22]</sup>。表 1 为合成的 8 种 PA-g-PM 的接枝率。由表 1 可知, 8 种 PA-g-PM 的接枝率在  $(4.171 \pm 0.16) \sim (8.880 \pm 0.32)$  mg GA/g 之间。

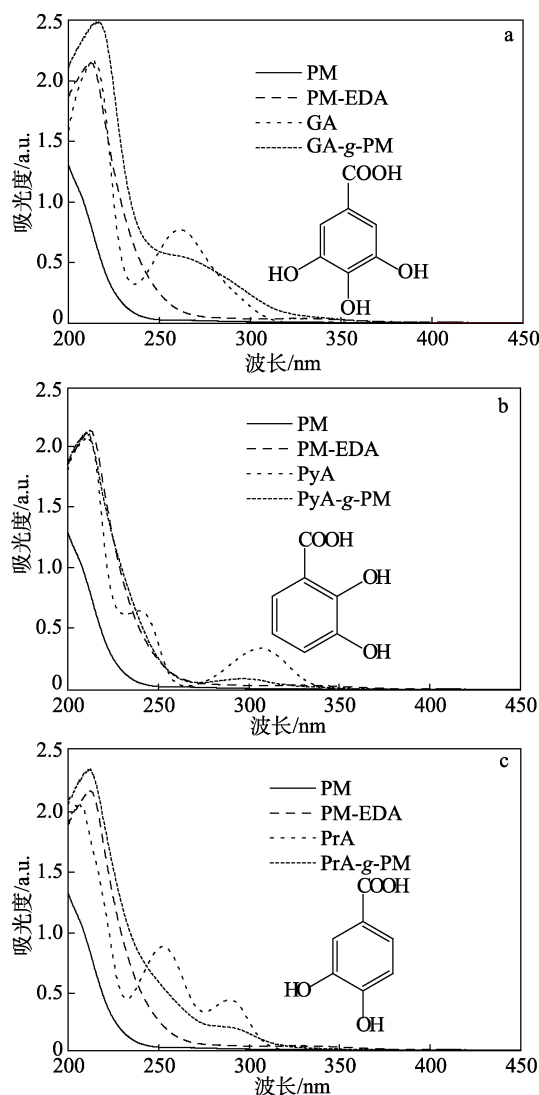
表 1 PA-g-PM 的接枝率  
Table 1 Grafting rate of PA-g-PM

样品名称	接枝率/(mg GA/g)	样品名称	接枝率/(mg GA/g)
GA-g-PM	8.880±0.32	SyA-g-PM	6.170±0.22
PyA-g-PM	5.628±0.21	VA-g-PM	5.701±0.23
PrA-g-PM	8.658±0.27	IsA-g-PM	6.380±0.17
GtA-g-PM	6.536±0.27	SA-g-PM	4.171±0.16

## 2.3 PM-EDA 和 PA-g-PM 的表征

### 2.3.1 UV-Vis 吸收光谱分析

图 3 为 PM、PM-EDA、PA-g-PM 的 UV-Vis 图谱。由图 3 可知, 在波长 200~450 nm 范围内, PM 的 UV-Vis 图谱中没有出现吸收峰, 在 PM-EDA 的 UV-Vis 图谱中, 212 nm 处出现酰胺键的最大吸收峰。说明 PM 与 EDA 反应生成了 PM-EDA。PM-EDA 接枝了酚酸 GA、IsA、PyA、PrA、GtA、SyA、VA、SA 后, 所得 PA-g-PM 的吸收峰与相应游离酚酸的吸收峰一致, 这与 LIU 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。PrA-g-PM、PyA-g-PM 和 GtA-g-PM 在 212 nm 处的最大吸收峰没发生位移, 但 PyA-g-PM 和 GtA-g-PM 分别在 296 和 302 nm 处出现一个新的较宽的吸收峰, PrA-g-PM 在 274 nm 处出现一个较宽的拖尾峰。GA-g-PM、SyA-g-PM、VA-g-PM、SA-g-PM 相对 PM-EDA 212 nm 处的吸收峰均发生了红移, 且 GA-g-PM 从 255 nm 开始出现一个大的拖尾峰, SyA-g-PM、VA-g-PM 分别在 273 和 291 nm 处出现一个新峰。



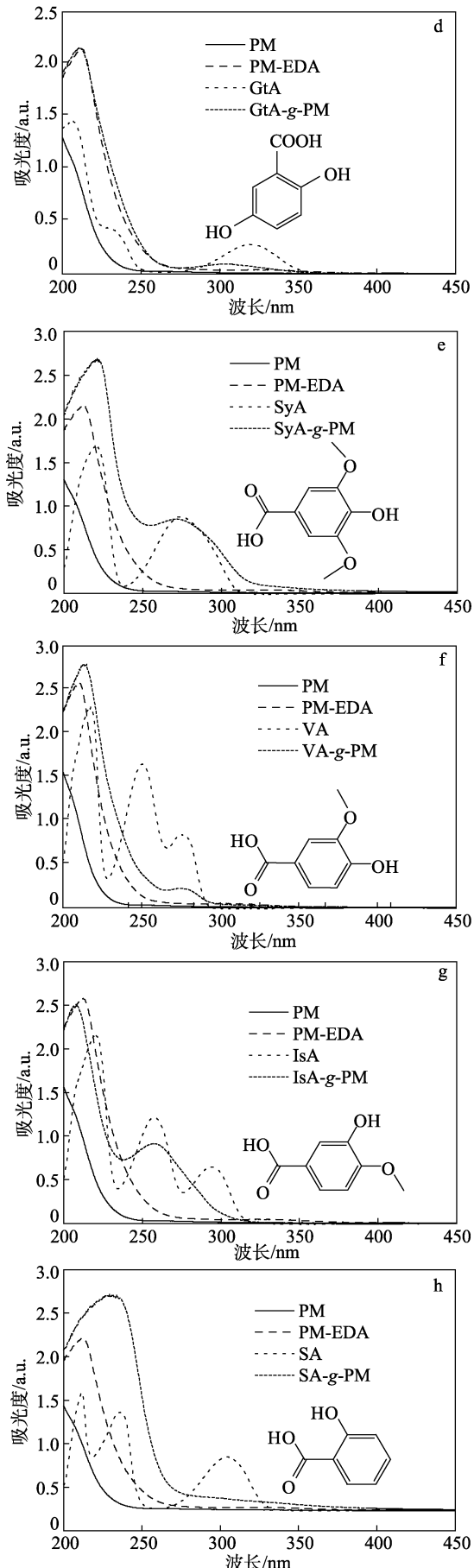


图 3 PM、PM-EDA 及 PA-g-PM 的 UV-Vis 吸收光谱  
Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of PM, PM-EDA and PA-g-PM

IsA-g-PM 相对 PM-EDA 212 nm 处的吸收峰发生了蓝移,且在 257 nm 处出现一个新峰。这些实验结果说明,8 种酚酸已经分别接枝到 PM-EDA 分子上,成功制备了 8 种 PM 的酚酸接枝共聚物。WANG 等<sup>[15]</sup>在研究 4 种壳聚糖酚酸衍生物的抗氧化性和抗菌性时发现,壳聚糖接枝 GA 和 GtA 后,紫外-可见吸收光谱发生红移和出现新峰,这可能是由于接枝共聚物中的羟基、酚酸残基<sup>[23]</sup>以及  $n-\pi^*$  跃迁引起的能量差变化<sup>[14]</sup>所致。

### 2.3.2 FTIR 谱图分析

图 4A 是 PM、PM-EDA 及 PA-g-PM 的 FTIR 谱图。由图 4A 可知,与 PM 的 FTIR 图谱相比,在 PM-EDA 的 FTIR 图谱中,1604  $\text{cm}^{-1}$  处羰基 ( $\text{C}=\text{O}$ ) 的特征吸收峰信号减弱,且在 1657 和 1560  $\text{cm}^{-1}$  处分别出现了酰胺 ( $\text{—NH—C}=\text{O}$ , 酰胺 I 带) 和伯胺 ( $\text{—NH}_2$ ) 的特征伸缩振动峰,说明 PM 的羧基与 EDA 的氨基发生了酰胺缩合反应,成功制备了 PM-EDA,且引入了端氨基。当 PM-EDA 分别与 8 种酚酸接枝共聚反应后,相比 PM-EDA 的 FTIR 图谱,在 PA-g-PM 的 FTIR 图谱中,1604  $\text{cm}^{-1}$  处(归于  $\text{C}=\text{O}$  和苯环骨架的伸缩振动峰)吸收峰的信号增强,且 1560  $\text{cm}^{-1}$  处的 ( $\text{—NH}_2$ ) 信号减弱。WU 等<sup>[24]</sup>将 GA 接枝到壳聚糖上后所得接枝物的 FTIR 图谱相对于壳聚糖的 FTIR 图谱,壳聚糖中伯胺 ( $\text{—NH}_2$ ) 的特征吸收峰的信号也减弱,与本研究结果一致。说明 PM-EDA 的端氨基与 8 种酚酸的羧基发生反应,成功制备了 GA-g-PM、PyA-g-PM、PrA-g-PM、GtA-g-PM、SyA-g-PM、VA-g-PM、IsA-g-PM、SA-g-PM。

### 2.3.3 XRD 分析

图 4B 为 PM、PM-EDA 及 PA-g-PM 的 XRD 图谱。由图 4B 可以看出,PM 在  $2\theta \approx 31.67^\circ$  和  $39.21^\circ$  处出现两个主要的衍射峰,为 PM 的特征非晶型衍射峰。相比 PM,PM-EDA 在  $2\theta \approx 31.67^\circ$  和  $39.21^\circ$  两处的衍射峰强度变弱,且在  $2\theta \approx 21.28^\circ$  处出现较弱衍射峰,说明 PM 与 EDA 反应后,PM 分子间的氢键作用减弱,使得 PM 的非晶型结构被破坏,结晶度降低,溶解性增加<sup>[25]</sup>。PM-EDA 与酚酸接枝共聚后,相比 PM-EDA,GA-g-PM、PyA-g-PM、PrA-g-PM、GtA-g-PM 在  $2\theta \approx 31.67^\circ$  和  $39.21^\circ$  表现出较宽、较弱的衍射峰。另外,SyA-g-PM、VA-g-PM、IsA-g-PM、SA-g-PM 分别在  $2\theta \approx 11.31^\circ$ 、 $11.25^\circ$ 、 $11.48^\circ$ 、 $11.16^\circ$  处出现新的衍射峰,并且分别在  $2\theta \approx 41.04^\circ$ 、 $40.42^\circ$ 、 $40.57^\circ$ 、 $40.95^\circ$  处的衍射峰强度增强,这可能是 GA、PyA、PrA、GtA、SyA、VA、IsA、SA 与 PM-EDA 之间共聚产生较强作用力的结果<sup>[26]</sup>。



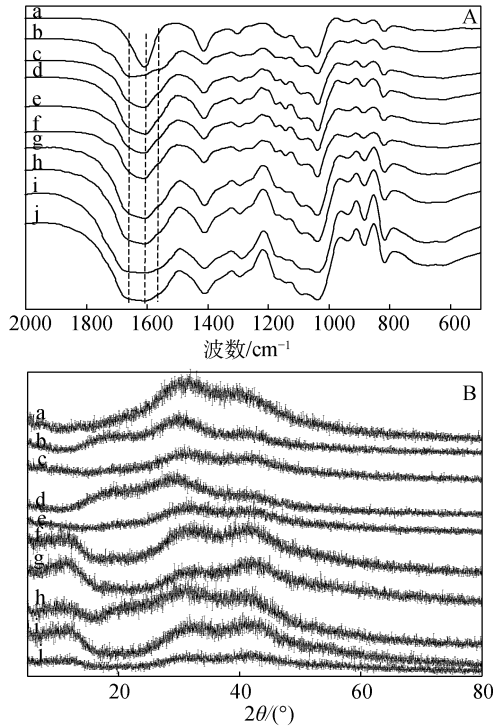


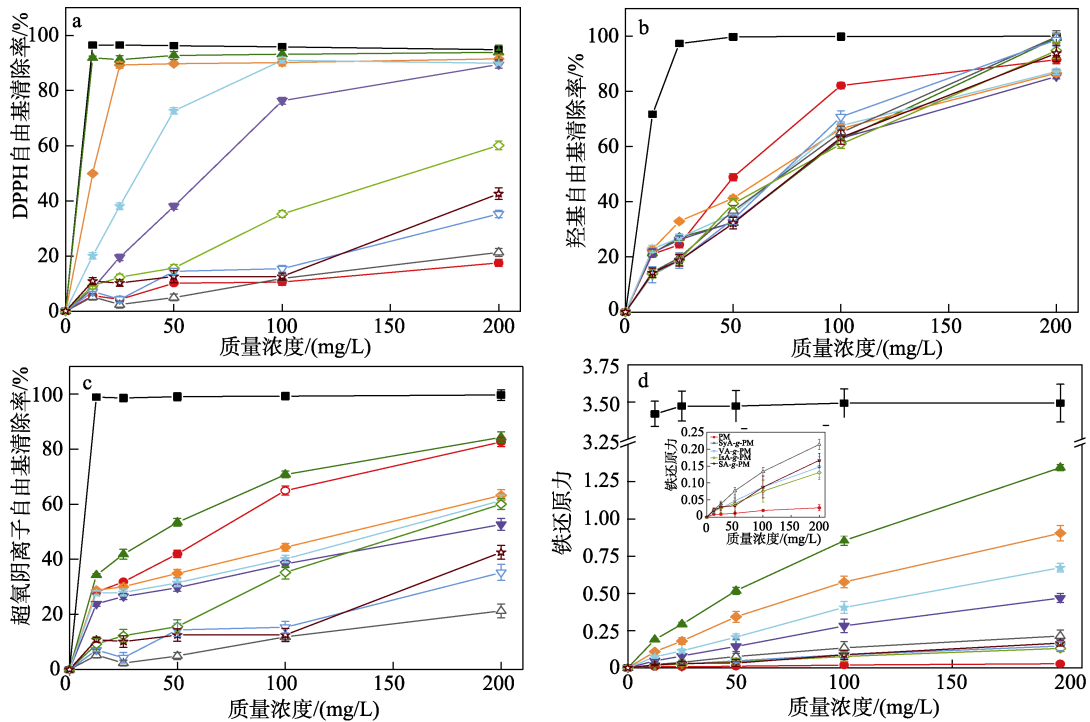
图 4 PM (a)、PM-EDA (b)、GA-g-PM (c)、PyA-g-PM (d)、PrA-g-PM (e)、GtA-g-PM (f)、SyA-g-PM (g)、VA-g-PM (h)、IsA-g-PM (i)、SA-g-PM (j) 的 FTIR 谱图 (A) 和 XRD 谱图 (B)

Fig. 4 FTIR spectra(A) and XRD patterns(B) of PM (a), PM-EDA (b), GA-g-PM (c), PyA-g-PM (d), PrA-g-PM (e), GtA-g-PM (f), SyA-g-PM (g), VA-g-PM (h), IsA-g-PM (i), SA-g-PM (j)

### 2.4 抗氧化性能的测定

为了考察 PA-g-PM 的抗氧化性能, 本研究测定了 8 种 PA-g-PM 对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除能力及对铁的还原能力。图 5 为 8 种 PA-g-PM 对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除率及对铁的还原力, 8 种 PA-g-PM 清除 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 见表 2。

图 5a 为 PM 及 PA-g-PM 对 DPPH 自由基的清除率。从图 5a 可知, 在质量浓度为 200 mg/L 时, PM 对 DPPH 自由基的清除率为 17.5%, GA-g-PM、PyA-g-PM、PrA-g-PM、GtA-g-PM、SyA-g-PM、VA-g-PM、IsA-g-PM、SA-g-PM 对 DPPH 自由基的清除率分别为 93.8%、89.4%、91.4%、89.9%、21.3%、35.2%、60.1%、45.6%, 均高于 PM 对 DPPH 自由基的清除率, 特别是 GA-g-PM、PyA-g-PM、PrA-g-PM、GtA-g-PM 对 DPPH 自由基的清除率接近  $V_C$  对 DPPH 自由基的清除率。从表 2 的  $IC_{50}$  也可以看出, 对 DPPH 自由基清除率较高的 GA-g-PM、PyA-g-PM、PrA-g-PM、GtA-g-PM 对 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  均较小, 分别为 6.3、65.6、12.6、34.2 mg/L。已有报道证明, 壳聚糖接枝 GA 后对 DPPH 自由基的清除率也显著提高<sup>[27]</sup>。PA-g-PM 能清除 DPPH 自由基可能是由于 PA-g-PM 提供的氢原子与 DPPH 自由基反应形成稳定的 DPPH-H 和 PA-g-PM 自由基, 而 PA-g-PM 自由基会进一步形成稳定的醌。



注: ■:  $V_C$ , ●: PM, ▲: GA-g-PM, ▼: PyA-g-PM, ◆: PrA-g-PM, ☆: GtA-g-PM, △: SyA-g-PM, ▽: VA-g-PM, ◇: IsA-g-PM, ★: SA-g-PM

图 5 PA-g-PM 对 DPPH 自由基 (a)、羟基自由基 (b)、超氧阴离子自由基的清除率 (c) 及对铁的还原能力 (d)

Fig. 5 Scavenging rates of PA-g-PM to DPPH (a), hydroxyl (b), superoxide anion (c) radicals and reducing power for iron (d)



图 5b 为 PM 及 PA-g-PM 对羟基自由基的清除率。由图 5b 可知, 质量浓度低于 150 mg/L 时, 相比 PM, PM 接枝酚酸后所得 PA-g-PM 对羟基自由基的清除率反而降低, 从表 2 的  $IC_{50}$  也可知, PM 对羟基自由基有较强的清除性能,  $IC_{50}$  较低, 为 77.6 mg/L, 而接枝酚酸后, 所得 PA-g-PM 对羟基自由基的  $IC_{50}$  均高于 77.6 mg/L。当质量浓度增加到 200 mg/L, PM 对羟基自由基的清除率增加较平缓, 但 GA-g-PM、SyA-g-PM、VA-g-PM、IsA-g-PM、SA-g-PM 对羟基自由基的清除率显著增加, 分别达到 99.3%、99.7%、98.7%、94.8%、93.8%, 高于 PM 对羟基自由基的清除率 (91.5%)。

表 2 PA-g-PM 清除 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的  $IC_{50}$

Table 2  $IC_{50}$  of PA-g-PM to DPPH, hydroxyl, superoxide anion radicals

样品	$IC_{50}$ / (mg/L)		
	DPPH 自由基	羟基自由基	超氧阴离子自由基
Vc	6.5	8.5	6.5
PM	>200	77.6	88.0
GA-g-PM	6.3	85.4	72.0
PyA-g-PM	65.6	94.6	169.9
PrA-g-PM	12.6	85.9	131.5
GtA-g-PM	34.2	89.3	142.7
SyA-g-PM	>200	86.6	>200
VA-g-PM	>200	86.5	>200
IsA-g-PM	160.5	90.9	161.0
SA-g-PM	>200	92.7	>200

图 5c 为 PM 及 PA-g-PM 对超氧阴离子自由基的清除率。由图 5c 和表 2 的  $IC_{50}$  可知, PM 接枝 GA 后所得 GA-g-PM 对超氧阴离子自由基的清除率显著增加,  $IC_{50}$  降低, 但接枝了 PyA、PrA、GtA、SyA、VA、IsA、SA 7 种酚酸后对超氧阴离子自由基的清除率显著降低,  $IC_{50}$  也显著增加。

图 5d 为 PM 及 PA-g-PM 对铁的还原力。由图 5d 可知, 相比 PM, 8 种 PA-g-PM 对铁的还原力都显著增加, 特别是 GA-g-PM、PyA-g-PM、PrA-g-PM、GtA-g-PM 对铁还原力大幅度增加。说明 PM 接枝 8 种酚酸后对铁还原力增强。本研究结果与 HU 等<sup>[28]</sup>和 WU 等<sup>[29]</sup>在研究壳聚糖接枝 GA 后对铁还原力增强的结果一致。

由图 5 和表 2 可知, PM 接枝酚酸所得 PA-g-PM 在不同抗氧化模型中的抗氧化性能有差异。另外, PM 接枝不同酚酸后其抗氧化性能增强, 但增加幅度有差异。质量浓度为 200 mg/L 时, PM 和 PA-g-PM 对 DPPH 自由基清除率强弱顺序为: GA-g-PM>PrA-

g-PM>GtA-g-PM>PyA-g-PM>IsA-g-PM>SA-g-PM>VA-g-PM>SyA-g-PM>PM; 对铁的还原力强弱顺序为: GA-g-PM>PrA-g-PM>GtA-g-PM>PyA-g-PM>SyA-g-PM>SA-g-PM>VA-g-PM>IsA-g-PM>PM; PM 只有接枝 GA 所得的 GA-g-PM 才对超氧阴离子自由基清除性能增强。另外, 具有 3 个酚羟基的 GA-g-PM 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基的清除率和铁还原力最强, 其次是具有两个酚羟基的 PrA-g-PM、GtA-g-PM、PyA-g-PM, 再次是具有一个酚羟基的 SA-g-PM。说明 PA-g-PM 的抗氧化性能与接枝的酚酸中酚羟基个数呈正相关关系<sup>[30-31]</sup>。另外, GA-g-PM 和 PrA-g-PM 的抗氧化性能比其他 PA-g-PM 的抗氧化性能强还可能是因为 GA-g-PM 和 PrA-g-PM 的接枝率 (见表 1) 高于其他 6 种 PA-g-PM 的接枝率。在具有两个酚羟基的 PA-g-PM 中, 具有对位和间位酚羟基的 PrA-g-PM 的抗氧化性比具有邻位和间位酚羟基的 GtA-g-PM 和 PyA-g-PM 的抗氧化性能强, 而叶小琴<sup>[32]</sup>的研究结果为具有邻位酚羟基酚酸的抗氧化性能比具有对位酚羟基酚酸的抗氧化性能强。这可能是因为酚酸中的羧基与 PM-EDA 中端氨基反应后, 影响了羧基邻位酚羟基的给氢能力, 从而影响 GtA-g-PM 和 PyA-g-PM 的抗氧化性能。另外, PrA-g-PM 的抗氧化性能比 VA-g-PM 和 IsA-g-PM 的抗氧化性能强, 说明酚酸对位或间位的羟基被甲氧基 ( $-OCH_3$ ) 取代后, PA-g-PM 的抗氧化性能减弱。这与 PrA 的抗氧化性能比 VA 和 IsA 的抗氧化性能强的变化规律一致<sup>[32]</sup>。

### 3 结论

海藻酸钠水解物 PM 接枝 8 种酚酸后制得 8 种 PA-g-PM, 这 8 种 PA-g-PM 的抗氧化性能比 PM 的抗氧化性能有不同程度增加。PA-g-PM 的抗氧化性能与接枝的酚酸中酚羟基个数和结构相关。PA-g-PM 抗氧化性能强弱顺序为: 三个酚羟基的 PA-g-PM>两个酚羟基的 PA-g-PM>一个酚羟基的 PA-g-PM。在具有两个酚羟基的 PA-g-PM 中, 对位和间位酚羟基 PA-g-PM (PrA-g-PM) 的抗氧化性能比邻位和间位酚羟基 PA-g-PM (PyA-g-PM) 的抗氧化性能强, PA-g-PM 中对位或间位上羟基被  $-OCH_3$  取代后抗氧化性能减弱。本研究结果为进一步开发海藻酸钠制备较强抗氧化剂应用于食品、化妆品、医药等行业奠定了理论基础。

### 参考文献:

- [1] LIU J, YANG S Q, LI X T, *et al.* Alginate oligosaccharides: Production, biological activities, and potential applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(6): 1859-1881.

- [2] RAMOS P E, SILVA P, ALARIO M M, *et al.* Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77: 8-16.
- [3] AKIYAMA H, ENDO T, NAKAKITA R, *et al.* Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1992, 56(2): 355-356.
- [4] TOMODA Y, UMEMURA K, ADACHI T. Promotion of barley root elongation under hypoxic conditions by alginate lyase-lysate (A.L.L.)[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(1): 202-203.
- [5] LIU H, ZHANG Y H, YIN H, *et al.* Alginate oligosaccharides enhanced *Triticum aestivum* L. tolerance to drought stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 62: 33-40.
- [6] LIU J, KENNEDY J F, ZHANG X F, *et al.* Preparation of alginate oligosaccharide and its effects on decay control and quality maintenance of harvested kiwifruit[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 242: 116462.
- [7] FALKEBORG M, CHEONG L Z, TAN C P, *et al.* Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation[J]. *Food Chemistry*, 2014, 164: 185-194.
- [8] YUE W, ZHANG H H, YANG Z N, *et al.* Preparation of low-molecular-weight sodium alginate by ozonation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117104-117109.
- [9] LIU J, MENG C G, LIU S, *et al.* Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 457-466.
- [10] HUANG Y G, WANG Z Q. Preparation of composite aerogels based on sodium alginate, and its application in removal of Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> from water[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 741-747.
- [11] WEN Q Y, HUANG J H, TANG H Y, *et al.* Fabricating network-link acetamidiprid-loading micelles based on dopamine-functionalized alginate and alkyl polyglucoside to enhance folia deposition and retention[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(12): 3596-3607.
- [12] WANG H X (王浩贤). Purification and activity of polymannouronic acid and polyguluronic acid[D]. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), 2012.
- [13] ABULATEEF S R, KHANFAR M A K, AI BAKAIN R Z, *et al.* Synthesis and characterization of new derivatives of alginic acid and evaluation of their iron (III)-crosslinked beads as potential controlled release matrices[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2014, 19(7): 856-867.
- [14] XIE M H, HU B, WANG Y, *et al.* Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(37): 9128-9136.
- [15] WANG Y Y, XIE M H, MA G X, *et al.* The antioxidant and antimicrobial activities of different phenolic acids grafted onto chitosan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 225: 115238-115244.
- [16] ZHANG X F (张喜峰), CUI J (崔晶), WANG W Q (王文琴), *et al.* Preparation, antioxidant and lymphocyte proliferation activities of spirulina polysaccharide iron (III) complex[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2019, 36(6): 1097-1103.
- [17] TANG Y F (唐裕芳), LIANG F (梁帆), SHI Y (石宇), *et al.* Preparation of antioxidative peptides from *Hydrilla verticillata* (Linn.f.) Royle and its activity[J]. *Journal of Xiangtan University (Natural Science Edition) (湘潭大学学报: 自然科学版)*, 2021, 43(6): 24-35.
- [18] LI Y J (李一佳), WANG H D (王浩东), FAN G L (樊广龙), *et al.* Preparation and physicochemical properties of sodium alginate film modified by normal octylamine[J]. *Packaging Engineering (包装工程)*, 2022, 43(11): 62-69.
- [19] TAN W Q, ZHANG J J, MI Y Q, *et al.* Synthesis and characterization of  $\alpha$ -lipoic acid grafted chitosan derivatives with antioxidant activity[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2022, 172: 105205-105214.
- [20] OPANASOPIT P, TECHAARPORNKUL S, ROJANARATA T, *et al.* Nucleic acid delivery with chitosan hydroxybenzotriazole[J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20: 127-136.
- [21] FANGKANGWANWONG J, AKASHI M, KIDA T, *et al.* One-pot synthesis in aqueous system for water-soluble chitosan-graftpoly (ethylene glycol) methyl ether[J]. *Biopolymers*, 2006, 82: 580-586.
- [22] LIU L X (刘丽香), LIANG X F (梁兴飞), SUN Y (孙怡), *et al.* Determination of the total content of polyphenols in kudincha by folin-ciocalteu colorimetry[J]. *Journal of Tea Science (茶叶科学)*, 2019, 28(2): 101-106.
- [23] LIU J, MENG C G, YAN Y, *et al.* Protocatechuic acid grafted onto chitosan: Characterization and antioxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89: 518-526.
- [24] WU C H, TIAN J H, LI S, *et al.* Structural properties of films and rheology of film-forming solutions of chitosan gallate for food packaging[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 146: 10-19.
- [25] LIU C Y (刘翠云), GAO X P (高喜平), HUANG Y (黄宇), *et al.* Preparation and property of nanocrystalline cellulose/modified alginate based biodegradable composite film[J]. *New Chemical Material (化工新型材料)*, 2015, 43(6): 80-82.
- [26] BEKIN S, SARMAD S, GÜRKAN K, *et al.* Synthesis, characterization and bending behavior of electroresponsive sodium alginate/poly (acrylic acid) interpenetrating network films under an electric field stimulus[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 202: 878-892.
- [27] BAI R, YONG H, ZHANG X, *et al.* Structural characterization and protective effect of gallic acid grafted *O*-carboxymethyl chitosan against hydrogen peroxide-induced oxidative damage[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 49-59.
- [28] HU Q B, WANG T R, ZHOU M Y, *et al.* *In vitro* antioxidant-activity evaluation of gallic-acid-grafted chitosan conjugate synthesized by free-radical-induced grafting method[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, 64: 5893-5900.
- [29] WU C H, WANG L P, FANG Z X, *et al.* The effect of the molecular architecture on the antioxidant properties of chitosan gallate[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14: 95-113.
- [30] ABBASI A M, GUO X B, XIONG F, *et al.* Comparative assessment of phenolic content and *in vitro* antioxidant capacity in the pulp and peel of mango cultivars[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 13507-13527.
- [31] CHEN Y, XU K Z, SONG J R, *et al.* Theoretical study on antioxidant activity of five phenolic acids[J]. *Food Science*, 2011, 32(9): 36-39.
- [32] YE X Q (叶小琴). Influence of phenolic acids and flavonols with different structures on their antioxidant effects[D]. Nanchang: Nanchang University (南昌大学), 2019.