

# 羧甲基化、磷酸化薰衣草多糖理化性质和抗氧化活性

边 鹏<sup>1,2</sup>, 杜 刚<sup>2</sup>, 柴雨阳<sup>3</sup>, 王俊龙<sup>1\*</sup>, 蔺永刚<sup>1\*</sup>, 时文盼<sup>1</sup>

(1. 伊犁师范大学 新疆薰衣草资源保护与利用重点实验室, 新疆 伊犁 835000; 2. 川宁生物技术股份有限公司, 新疆 伊犁 835000; 3. 重庆医科大学 儿科学院, 重庆 400016)

**摘要:** 采用氯乙酸法、磷酸钠法对薰衣草多糖 (LAP) 分别进行羧甲基化、磷酸化修饰, 制备了羧甲基化薰衣草多糖 (CM-LAP)、磷酸化薰衣草多糖 (P-LAP)。采用 GPC、SEM、XRD、NMR、FTIR、TGA 对 LAP、CM-LAP 和 P-LAP 进行了表征, 测试了其物性。通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基、羟基自由基清除实验, 考察了 LAP、CM-LAP 和 P-LAP 的体外抗氧化能力, 并探究了 LAP、CM-LAP、P-LAP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导肝细胞抗氧化酶活力的影响。结果表明, 与 LAP 相比, CM-LAP 和 P-LAP 黏度降低, 溶解度提高, 表面形貌发生改变, 热稳定性和 500 °C 残炭率提高; 相对分子量、三螺旋结构和晶体结构未发生明显变化, 但其组成中的 6 种主要单糖 (岩藻糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖) 摩尔分数发生了改变。CM-LAP、P-LAP 比 LAP 具有更强的体外抗氧化能力, 对 DPPH 自由基的最大半抑制质量浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 1.28 和 0.98 和 2.84 g/L; LAP、CM-LAP、P-LAP 能够降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的肝细胞丙二醛 (MDA) 含量, 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力, MDA 含量由 6.768 nmol/mg pro (pro 代表蛋白质, 下同) 分别降至 4.029、3.517、3.772 nmol/mg pro, SOD 活力由 6.086 U/mg pro 分别提高至 6.991、7.474、7.192 U/mg pro, GSH-Px 活力由 7.019 U/mg pro 分别提高至 8.017、8.591、8.227 U/mg pro。

**关键词:** 羧甲基化; 磷酸化; 薰衣草多糖; 理化性质; 抗氧化活性; 中药现代化技术

**中图分类号:** Q539 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 06-1286-09

## Physicochemical properties and antioxidant activity of carboxymethylated and phosphorylated lavandula polysaccharides

BIAN Peng<sup>1,2</sup>, DU Gang<sup>2</sup>, CHAI Yuyang<sup>3</sup>, WANG Junlong<sup>1\*</sup>, LIN Yonggang<sup>1\*</sup>, SHI Wenpan<sup>1</sup>

(1. Xinjiang Key Laboratory of Lavender Conservation and Utilization, Yili Normal University, Yili 835000, Xinjiang, China; 2. Chuanning Biotechnology Co., Ltd., Yili 835000, Xinjiang, China; 3. Department of Pediatrics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Carboxymethylated *Lavandula angustifolia* Mill polysaccharide (CM-LAP) and phosphorylated *Lavandula angustifolia* Mill polysaccharide (P-LAP) were prepared by chloroacetic acid method and sodium phosphate method, respectively. *Lavandula angustifolia* Mill polysaccharide (LAP), CM-LAP and P-LAP were characterized by GPC, SEM, XRD, NMR, FTIR and TGA, and analyzed for their physical properties. The *in vitro* antioxidant capacity of LAP, CM-LAP and P-LAP was evaluated by scavenging experiments of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazyl (DPPH) free radicals and hydroxyl free radicals, while the effects of LAP, CM-LAP and P-LAP on anti-oxidase activity of liver cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were investigated. The results showed that compared with LAP, CM-LAP and P-LAP exhibited lower viscosity, higher solubility, altered surface morphology, and improved thermal stability as well as carbon residue rate

收稿日期: 2024-06-03; 定用日期: 2024-06-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240447

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2022D01C455); 2024 年伊犁师范大学新疆薰衣草资源保护与利用重点实验室项目 (2024XYC0002)

作者简介: 边 鹏 (2001—), 男, 助理实验师, E-mail: 2773223148@qq.com。联系人: 王俊龙 (1992—), 男, 实验师, E-mail: 974881461@qq.com; 蔺永刚 (1983—), 男, 实验师, E-mail: 869294906@qq.com。

at 500 °C, but no change on relative molecular mass, monosaccharide compositions, triple-helical structures, and crystal structures, while change on molar fraction of six main monosaccharides (fucose, mannose, arabinose, xylose, galactose and glucose). CM-LAP and P-LAP displayed stronger antioxidant capacity than LAP, and the maximum inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for DPPH free radicals were 1.28, 0.98 and 2.84 g/L, respectively. LAP, CM-LAP and P-LAP could reduce the content of malondialdehyde (MDA) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced liver cells, and increase the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). MDA content decreased from 6.768 nmol/mg pro to 4.029, 3.517 and 3.772 nmol/mg pro (pro represents protein, the same below), respectively, SOD activity elevated from 6.086 U/mg pro to 6.991, 7.474, and 7.192 U/mg pro, respectively, and GSH-Px activity elevated from 7.019 U/mg pro to 8.017, 8.591, and 8.227 U/mg pro.

**Key words:** carboxymethylation; phosphorylation; *Lavandula angustifolia* Mill polysaccharides; physicochemical properties; antioxidant activities; modernization technology of traditional Chinese medicines

薰衣草 (*Lavandula angustifolia* Mill) 为唇形科薰衣草属植物, 原产于意大利、法国的阿尔卑斯山南麓一带, 现其生长已遍及地中海与黑海等海域的周边国家<sup>[1]</sup>。如今, 天山山脉腹地的伊犁哈萨克自治州是亚洲地区最大的薰衣草种植加工基地。据《中华草本-维吾尔药典》、《注医典》记载, 薰衣草可以用于治疗外伤性头晕, 具有消炎止痛、养经安神、平复心悸、缓解气短等功效<sup>[2]</sup>。薰衣草提取后主要成分为挥发油、黄酮类和多糖类化合物等。药理学研究表明, 薰衣草具有抗氧化、抗炎、抑制中枢神经系统等作用<sup>[3]</sup>。目前, 针对薰衣草的主要研究集中在挥发性成分、种质资源、生物多样性等方面<sup>[4]</sup>, 对其多糖成分研究鲜有报道。

多糖具有显著的生物活性、良好的生物相容性和可降解性等优势, 在生物医药、工程材料、食品、膳食补充剂以及化妆品等领域有广阔的应用前景<sup>[5]</sup>。近年来, 为了优化多糖的理化性质, 提高其生物活性, 多种多糖修饰方法被相继开发出来, 如羧甲基化、磷酸化、硒化、硫酸化以及乙酰化等<sup>[6]</sup>。多糖的羧甲基化和磷酸化修饰可以改变多糖结构, 进而改变其理化性质和生物活性。ZHANG 等<sup>[7]</sup>研究发现, 芦笋叶多糖经羧甲基化修饰后, 体外抗氧化活性显著升高, 并且与羧甲基取代度呈正相关。同时, 修饰后的芦笋叶多糖还通过抑制 A549 细胞增殖发挥良好的抑制小细胞肺癌活力的功效。李瑶等<sup>[8]</sup>研究发现, 裙带菜多糖经磷酸化修饰后的热稳定性升高, 并且其抗氧化、降糖活性也有明显提升。慈璐雨等<sup>[9]</sup>对比了凝胶多糖经羧甲基化和磷酸化修饰后的理化性质和体外抗氧化活性, 结果发现, 其水溶性分别提高 5.48 倍和 6.75 倍, 对活性氧自由基清除能力显著提高。

人工合成的抗氧化剂在人体内不易分解, 容易对机体造成一定程度的损伤。因此, 从天然产物中寻找优异的抗氧化剂受到人们的广泛关注<sup>[10]</sup>。本文

拟采用羧甲基化、磷酸化两种修饰方法对薰衣草多糖进行改性, 分析改性前后薰衣草多糖的理化性质和初步结构, 评价其体外抗氧化活性和对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤保护作用。以期为薰衣草多糖研究提供数据支撑, 也为多糖改性修饰提供科学依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

薰衣草, 采自新疆伊宁市霍城县薰衣草种植基地, 经新疆薰衣草资源保护与利用重点实验室焦子伟教授鉴定为唇形科, 薰衣草属植物薰衣草 (*Lavandula angustifolia* Mill.) 的花。

石油醚、无水乙醇、NaOH、三聚磷酸钠、三偏磷酸钠、磷酸钠、溴化钾、氯乙酸、浓硫酸 (质量分数 98%)、二氯甲烷、甲醇、钼酸铵 (质量分数 10%)、盐酸羟胺、吡啶、乙酸酐、三氟乙酸、浓盐酸 (质量分数 36%)、分析纯, 伊犁万隆化工有限责任公司; 葡萄糖标准品、刚果红、抗坏血酸 (V<sub>C</sub>)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-Px) 试剂盒, 北京生物工程研究所; 透析袋 (截留相对分子质量 3500 Da), 上海源叶生物科技有限公司; 实验用水为蒸馏水, 自制。

Waters 1515 型凝胶渗透色谱仪 (GPC), 美国 Waters 公司; Spectra Max M5 型多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; SQ 7000 型单四极杆 GC-MS 联用仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; UV 2500 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis)、Cary 630 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR), 美国 Agilent 公司; Discovery SDT 650 型同步热分析仪 (TGA), 美国 TA Instruments 公司; JSM-7500F 型场发射扫描电子显微镜 (SEM), 日本 JEOL; D8 Advance 型

X 射线衍射仪 (XRD)、AV600 型核磁共振波谱仪 (NMR), 德国 Bruker 公司; I-300 型旋转蒸发器, 瑞士 Buchi 公司; 5430 R 型高速台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; UP-15 TNZ 型实验室超纯水机, 默克化工技术(上海)有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 薰衣草多糖提取

将新鲜薰衣草自然阴干, 粉碎过 30 目筛。依次用石油醚、体积分数 95%乙醇于索氏提取器中脱脂、脱色素 24 h 后, 过滤, 得到去除脂质、色素及其他小分子的预处理薰衣草粉末, 于  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存, 备用。

称取预处理薰衣草粉末 20.0 g, 以水为溶剂, 在料液比为 1:40 g/mL、超声功率 500 W、提取温度  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 提取时间 1 h 的条件下提取薰衣草多糖, 提取结束后, 沉浸放置 12 h, 弃去下层沉淀后, 采用三氯乙酸法除去溶液中的蛋白<sup>[11]</sup>, 反复多次处理直至用紫外-可见分光光度计测定溶液在 280 nm 处无明显吸收峰后, 旋转浓缩至原溶液体积的 1/3, 最后经无水乙醇醇沉 ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 h)、透析袋透析 (截留相对分子质量 3500 Da, 72 h)、冷冻干燥 ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 48 h) 后得到 1.21 g 白色棉花状薰衣草多糖 (LAP)。

### 1.2.2 羧甲基化薰衣草多糖制备

参考文献[11]方法并稍作修改。称取 1.0 g 的 LAP 溶于 50 mL 异丙醇中, 室温下磁力搅拌 1 h, 加入 10 mL 质量分数 20%的 NaOH 水溶液, 随后加入 1.5 g 氯乙酸 (分 3 次, 每次 0.5 g), 室温反应 6 h 后, 用 50 mL 无水乙醇和 50 mL 丙酮分别淋洗 5 次, 离心后的沉淀加入蒸馏水复溶后置于透析袋透析 (截留相对分子质量 3500 Da, 72 h), 冷冻干燥 ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 48 h) 后得 432 mg 白色棉絮状的羧甲基化薰衣草多糖 (CM-LAP)。

### 1.2.3 磷酸化薰衣草多糖制备

参考文献[12]方法稍作修改。称取 2 g 三聚磷酸钠、2 g 三偏磷酸钠溶于 50 mL 水, 磁力搅拌下加入 1.5 g 硫酸钠和 1 g 的 LAP, 使用浓度 0.01 mol/L 的 NaOH 水溶液调节反应溶液 pH=9, 随后于  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 5 h, 待反应结束后加入 200 mL 无水乙醇沉淀 ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 h), 最后经透析袋透析 (截留相对分子质量 3500 Da, 72 h)、冷冻干燥 ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 48 h) 后得到 372 mg 淡黄色棉絮状的磷酸化薰衣草多糖 (P-LAP)。

## 1.3 表征和测试

### 1.3.1 羧甲基化取代度、磷酸根含量测定

采用滴定法测定 CM-LAP 羧甲基取代度<sup>[11]</sup>。称取 10 mg 的 CM-LAP 置于烧杯中, 加入 5 mL 浓度为 10 mmol/L 的盐酸, 室温搅拌 2 h 后离心, 残渣用

无水乙醇冲洗多次, 随后溶于 20 mL ( $V_1$ , mL) 浓度为 0.5 mol/L 的 NaOH 水溶液中, 于  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴反应 1 h, 采用浓度 0.1 mol/L 盐酸滴定, 以酚酞为指示剂, 溶液中红色消失为滴定终点, 记录盐酸消耗体积 ( $V_2$ , mL)。根据公式 (1) 和 (2) 计算羧甲基含量 ( $A$ , mmol/g) 和羧甲基化取代度 (DS)。

$$A=(C_1V_1-C_2V_2)/W \quad (1)$$

$$DS=0.162A/(1-0.058A) \quad (2)$$

式中:  $W$  为样品质量, g;  $C_1$  为 NaOH 浓度, mol/L;  $C_2$  为盐酸浓度, mol/L;  $V_1$ 、 $V_2$  单位为 mL。

采用钼蓝比色法测定 P-LAP 磷酸根含量<sup>[12]</sup>。移取 1 mL 不同含量 (20~100  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) 的磷酸根标准溶液, 分别加入 5 mL 定磷试剂 (由 3 mL 质量分数 20%抗坏血酸水溶液、3 mL 浓度为 3 mol/L 稀硫酸和 6 mL 质量分数为 10%的钼酸铵溶液配制而成), 于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 1 h, 冷却至室温后, 用紫外-可见分光光度计测定溶液在 580 nm 处的吸光度。以磷酸根含量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 制作标准曲线并拟合得标准曲线方程:  $y=0.328x+0.0254$  ( $R^2=0.995$ )。

称取 0.5 g 的 P-LAP 于坩埚中, 于  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$  灰化 2 h, 随后加入 1 mL 浓盐酸和 1 mL 蒸馏水溶解残渣, 用蒸馏水定容至 10 mL 容量瓶中, 用紫外-可见分光光度计测定溶液在 580 nm 处的吸光度。将吸光度代入标准曲线方程计算样品的磷酸根含量。

### 1.3.2 物性测定

黏度参照 GB/T 30515—2014《透明和不透明液体石油产品运动黏度测定法及动力黏度计算法》测定<sup>[6]</sup>; 溶解度采用平衡法测定<sup>[6]</sup>; 相对分子质量采用高效凝胶渗透色谱法测定<sup>[6]</sup>, Ultrahydrogel 2000 色谱柱 (7.8 mm $\times$ 300 mm), 检测器为示差折光, 流动相为超纯水, 流速 0.5 mL/min, 柱温和检测器温度均为  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样量 25  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3.3 单糖组成测定

LAP、CM-LAP、P-LAP 衍生化处理: 称取 5 mg 样品置于 20 mL 顶口瓶中, 加入 4 mL 浓度为 2 mol/L 三氟乙酸, 于  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  水解 4 h, 冷却至室温; 加入 4 mL 甲醇, 旋蒸除去三氟乙酸 (重复 5~6 次), 随后加入 8 mg 盐酸羟胺、0.5 mL 吡啶于  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 1 h。待反应结束后, 加入 0.5 mL 乙酸酐于  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 1 h, 冷却至室温, 再加入 1 mL 二氯甲烷、1 mL 蒸馏水萃取, 弃去水相 (重复 5~6 次), 将二氯甲烷相经有机膜过滤后置于 GC-MS 联用仪分析的气相小瓶中供分析。单糖标准品无需酸解, 其余步骤与样品的处理相同, 采用单四极杆 GC-MS 联用仪分析单糖组成<sup>[5]</sup>。GC 条件: Agilent DB-17001 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 起始温度  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保留 3 min, 以  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保持 4 min,

载气 (He) 流速 4 mL/min, 进样量 1  $\mu$ L, 分流比 40 : 1。MS 条件: EI 源电离模式, 离子源温度 220  $^{\circ}$ C, 电子能量 70 eV。

#### 1.3.4 XRD 测定

扫描范围  $5^{\circ}$ ~ $80^{\circ}$ , 扫描速率 6 ( $^{\circ}$ )/min。

#### 1.3.5 SEM 测定

用导电胶将 LAP、CM-LAP、P-LAP 样品固定在样品架, 离子溅射仪喷金, 在加速电压为 15.0 kV, 放大  $2 \times 10^4$  倍下观察样品的形貌结构。

#### 1.3.6 TGA 测定

分别取 10 mg 的 LAP、CM-LAP、P-LAP 置于铂坩埚中, 氮气保护下, 以 10  $^{\circ}$ C/min 从 25  $^{\circ}$ C 升温至 600  $^{\circ}$ C, 测定样品的 TGA、DTG 曲线。

#### 1.3.7 刚果红螺旋结构表征

采用刚果红法检测<sup>[5]</sup>LAP、CM-LAP、P-LAP 的三螺旋构象。分别移取 1 mL 质量浓度为 3 g/L 的 LAP、CM-LAP、P-LAP 水溶液, 依次加入 1 mL 浓度为 0.2 mmol/L 的刚果红溶液、3 mL 不同浓度 (0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L) 的 NaOH 水溶液, 混匀后避光反应 10 min, 用 UV-Vis 测定溶液在 400~600 nm 范围内的吸收峰, 记录最大吸收波长, 以刚果红为对照, 绘制刚果红实验曲线。

#### 1.3.8 FTIR 表征

分别称取 5 mg 的 LAP、CM-LAP、P-LAP 和 250 mg 溴化钾混匀, 压片。扫描波数 4000~800  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 32 次。

#### 1.3.9 NMR 表征

分别称取 10 mg 的 LAP、CM-LAP、P-LAP 溶解于 0.5 mL 的  $\text{D}_2\text{O}$  中, 移至核磁管中采用 NMR 测定。

### 1.4 抗氧化活性测定

#### 1.4.1 体外抗氧化活性测定

分别配制质量浓度为 0.5、1、2、3、4、5、6 g/L 的 LAP、CM-LAP、P-LAP 多糖水溶液,  $V_c$  作阳性对照。参考文献[13]方法分别测定 LAP、CM-LAP、P-LAP 对 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力, 并计算其最大半抑制质量浓度 ( $\text{IC}_{50}$ , g/L)。

#### 1.4.2 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导肝细胞抗氧化酶活力测定

参考文献[14]方法探究 LAP、CM-LAP、P-LAP 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导肝细胞抗氧化酶活力影响。将处于生长期的 HepG2 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔培养板中, 于 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 h。将不加受试物组定为阴性对照组 (空白组); 将加入 300  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  组定为模型组; 将加入 300  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和不同质量浓度的白藜芦醇组 (2~40  $\mu\text{g/mL}$ ) 定为阳性对照组; 实验组 (LAP 组、CM-LAP 组、P-LAP 组) 为加入质量浓度为 2、8、10、30、40  $\mu\text{g/mL}$  的 LAP、CM-LAP、P-LAP。将阴性对照组、模型组、阳性对

照组、实验组预处理 24 h 后, 再加入 300  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应 12 h, 置于培养箱中培养 (24 h, 38  $^{\circ}$ C, 体积分数 5% 的  $\text{CO}_2$ )。待培养结束后, 用浓度 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=6.8) 清洗 3 次, 随后加入 0.5 mL 质量分数 1% 的 Triton100 缓冲液, 最后将细胞裂解液裂解细胞后的产物离心 (2200 r/min, 8 min), 取上清液, 参照试剂盒说明, 测定细胞中 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力指标。

## 2 结果与讨论

### 2.1 物性测定结果分析

表 1 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 的羧甲基化取代度、磷酸根含量、黏度、溶解度和相对分子质量测定结果。

表 1 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 DS、磷酸根含量、黏度、溶解度和相对分子质量

Table 1 DS, phosphate content, viscosity, solubility, and relative molecular weight of LAP, CM-LAP, P-LAP

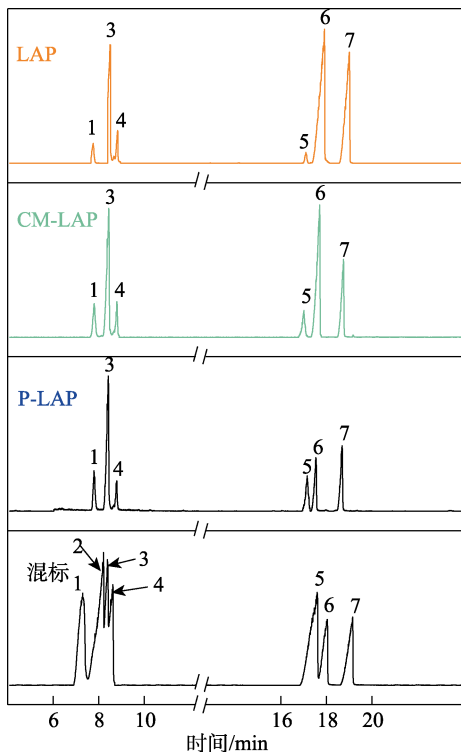
样品	DS	磷酸根含量/ ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	黏度/ ( $\text{mPa}\cdot\text{s}$ )	溶解度/ ( $\text{g}/\text{L}$ )	相对分子质量/ kDa
LAP	—	—	1925 $\pm$ 38.5	97.28 $\pm$ 0.27	24.61
CM-LAP	0.87	—	1224 $\pm$ 43.2	105.38 $\pm$ 0.34	24.72
P-LAP	—	88.7	1537 $\pm$ 27.8	112.17 $\pm$ 0.59	24.72

注: “—”代表无此项目检测。

从表 1 可以看出, 通过羧甲基化、磷酸化修饰, 成功制备出 DS 为 0.87 的 CM-LAP 和磷酸根含量为 88.7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  的 P-LAP。CM-LAP、P-LAP 与 LAP 相比, 黏度分别降低了 36.4% 和 20.2%, 这可能是因为, LAP 经羧甲基化、磷酸化修饰后, CM-LAP、P-LAP 分子更容易受到溶剂的包围和分散, 导致黏度降低<sup>[15]</sup>; 与 LAP 对比, CM-LAP 和 P-LAP 的溶解度分别提高了 8.3% 和 15.3%, 这可能是因为, 羧甲基、磷酸根分别取代了 LAP 原本的氢键, 从而增强了 CM-LAP、P-LAP 的水溶胀能力<sup>[15]</sup>。P-LAP 的黏度和溶解度较 CM-LAP 更大, 这是由于羧甲基化和磷酸化取代度的差异引起的, 这些结果与曹磊等<sup>[16]</sup>报道一致。CM-LAP、P-LAP 的相对分子质量均为 24.72 kDa, 较 LAP 的 24.61 kDa 大, 这可能是因为, 引入的羧甲基和磷酸根基团与 LAP 形成共价键, 导致相对分子质量增加, 也间接证实羧甲基化、磷酸化修饰成功。

### 2.2 单糖组成测定结果

图 1 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 的单糖组成测定结果。



1—岩藻糖；2—鼠李糖；3—甘露糖；4—阿拉伯糖；5—木糖；6—半乳糖；7—葡萄糖

图 1 LAP、CM-LAP、P-LAP 单糖的组成测定结果  
Fig. 1 Determination of monosaccharide composition of LAP, CM-LAP and P-LAP

从图 1 可以看出，LAP 主要是由岩藻糖 (Fuc)、甘露糖 (Man)、阿拉伯糖 (Ara)、木糖 (Xyl)、半乳糖 (Gal) 和葡萄糖 (Glu) 6 种单糖组成的杂多糖，其摩尔分数分别为 2.32%、33.48%、6.23%、1.85%、31.91%、24.21%；CM-LAP、P-LAP 的单糖组成没有发生变化，但各单糖摩尔分数发生显著变化，其中，CM-LAP 中 6 种单糖摩尔分数分别为 7.91%、27.81%、9.63%、6.21%、30.37%、18.07%，P-LAP 中 6 种单糖摩尔分数分别为 12.45%、34.47%、7.16%、9.41%、15.38%、21.13%。这表明，羧甲基化、磷酸化修饰引起的多糖降解可能未发生在 LAP 的主链上，而是主要发生在支链上。这是因为，多糖支链通常拥有更多的修饰位点，与主链相比，支链上的多糖更容易受到外界基团的攻击，导致其羟基更容易被取代<sup>[10]</sup>。

2.3 XRD 分析

图 2 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 XRD 谱图。

从图 2 可以看出，LAP、CM-LAP、P-LAP 在  $2\theta=16^\circ$ 、 $31^\circ$ 、 $42^\circ$  均出现一个较宽的弥散峰，这是多糖的特征衍射峰，表明 3 种多糖均存在晶体结构。但相比 LAP，CM-LAP 和 P-LAP 在  $2\theta=16^\circ$  处的衍射峰强度明显降低，这可能是因为，引入的羧甲基和磷酸根基团降低了 LAP 的有序性，导致原本具有较

强结晶性的多糖分子在修饰后失去部分结晶性，因此衍射峰强度降低。LAP、CM-LAP、P-LAP 其余部分表现得较为平缓，说明这 3 种多糖也存在非晶体结构。这是因为，LAP、CM-LAP、P-LAP 中的糖基在聚合过程中，部分区域呈现有序排列，形成了晶体结构，而其他区域则可能没有明显的有序性，呈现非晶体结构<sup>[17]</sup>。

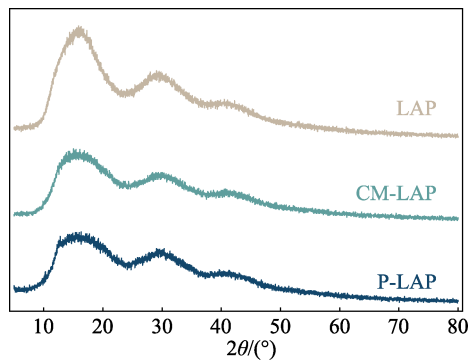


图 2 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 XRD 谱图  
Fig. 2 XRD patterns of LAP, CM-LAP and P-LAP

2.4 SEM 分析

图 3 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 SEM 图。

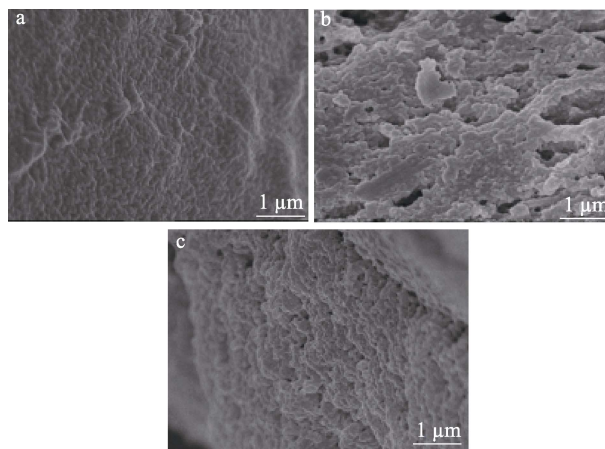


图 3 LAP (a)、CM-LAP (b)、P-LAP (c) 的 SEM 图  
Fig. 3 SEM images of LAP (a), CM-LAP (b) and P-LAP (c)

从图 3 可以看出，LAP 表面较为光滑，无孔隙，以结构紧密的球状堆积结构为主 (图 3a)。经过羧甲基化和磷酸化修饰的 CM-LAP、P-LAP 表面较为松散，出现大小不一的空隙 (图 3b、c)，大空隙可能是由于冷冻干燥时游离水蒸发，小空隙可能因为羧甲基 (或磷酸根) 基团间相互排斥，分子间距变大，分子间作用力发生改变<sup>[18]</sup>。这表明，羧甲基化和磷酸化修饰改变了 LAP 的表面形貌。

2.5 TGA 分析

图 4 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 TGA、DTG 曲线。

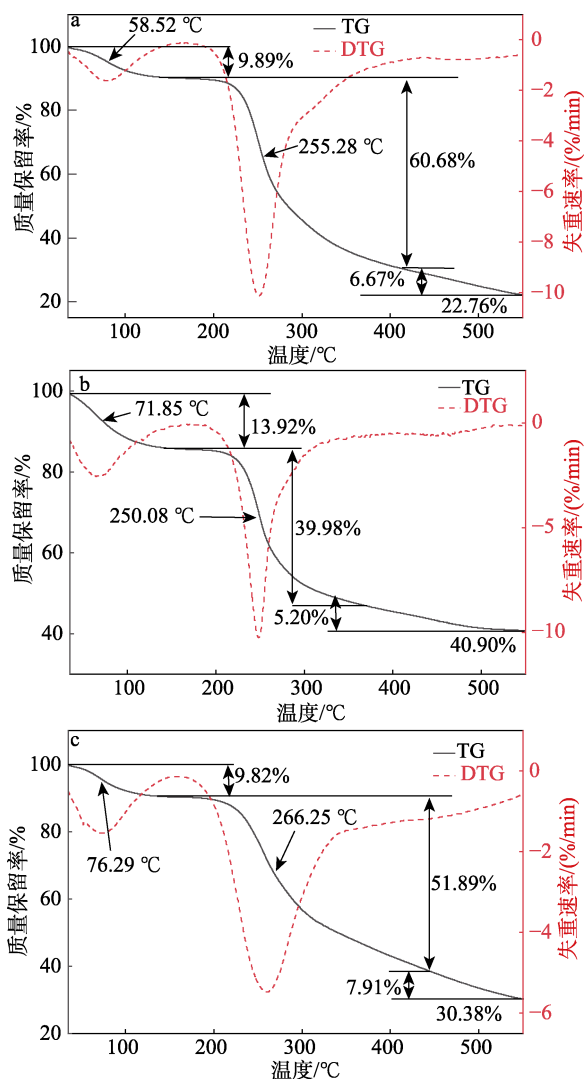


图4 LAP (a)、CM-LAP (b)、P-LAP (c) 的 TGA、DTG 曲线  
Fig. 4 TGA and DTG curves of LAP (a), CM-LAP (b) and P-LAP (c)

从图4可以看出,LAP、CM-LAP、P-LAP的TGA曲线(或DTG曲线)呈现相似的形状,并且均显示出3个明显的失重阶段。初始阶段在65~170℃之间,三者的质量损失分别为9.89%、13.92%和9.82%,这主要是多糖样品中结合水和游离水的蒸发所致<sup>[19]</sup>;第二阶段发生在210~340℃之间,三者的质量损失分别为60.68%、39.98%以及51.89%,这主要是因为,此温度下,多糖分子间的碳链和氢链发生断链,导致多糖分解<sup>[19]</sup>;第三阶段发生在450~550℃,LAP、CM-LAP、P-LAP降解速率均较为缓慢,此阶段多糖样品变为碳化结构,最终残炭率分别为22.76%、40.90%以及30.38%。表明LAP经羧甲基化、磷酸化修饰后,CM-LAP、P-LAP热稳定性得到提高,其中,CM-LAP热稳定性提升更为明显。这可能是因为,LAP的羟基更容易暴露,LAP

末端氢被羟甲基、磷酸根基团取代后,基团结构更加稳定<sup>[20]</sup>。

## 2.6 三螺旋结构分析

图5为LAP、CM-LAP、P-LAP的刚果红实验结果。

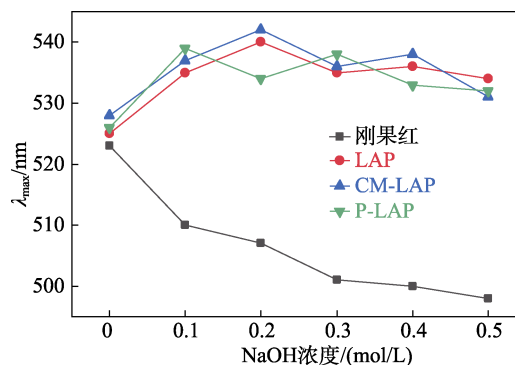


图5 LAP、CM-LAP、P-LAP在不同浓度NaOH溶液中的最大吸收波长  
Fig. 5 Maximum absorption wavelengths of LAP, CM-LAP and P-LAP in NaOH solutions with different concentrations

多糖的生物活性与其三螺旋结构密不可分。通常情况下,具有三螺旋结构的多糖溶液在低浓度NaOH溶液中,最大吸收波长( $\lambda_{\max}$ )增大并发生红移现象;而在高浓度NaOH溶液中,三螺旋结构中的氢键断裂,三螺旋结构可能发生解旋、无规则弯曲等结构变化,此时 $\lambda_{\max}$ 降低发生蓝移现象<sup>[21]</sup>。从图5可以看出,LAP、CM-LAP、P-LAP在NaOH浓度为0.1~0.5 mol/L的范围内 $\lambda_{\max}$ 都有波动,说明此时三者都发生了三螺旋→单螺旋→无规则弯曲的结构变化。这表明,经羧甲基化和磷酸化修饰后的CM-LAP、P-LAP的三股螺旋结构并未发生变化。

## 2.7 FTIR 分析

图6为LAP、CM-LAP、P-LAP的FTIR谱图。

从图6可以看出,LAP修饰前后主体结构并未发生改变。其中,3420  $\text{cm}^{-1}$ 左右出现的较宽吸收峰为多糖分子链上的—OH的伸缩振动;2926  $\text{cm}^{-1}$ 左右出现的峰为多糖分子链上的—CH的伸缩振动,这两个吸收峰也是多糖的特征吸收峰<sup>[22]</sup>。CM-LAP在1600、1417  $\text{cm}^{-1}$ 处出现较强的吸收峰,这是由于LAP经羧甲基修饰后,出现羧基的不对称伸缩振动峰和对称伸缩振动峰<sup>[20]</sup>。P-LAP在1225  $\text{cm}^{-1}$ 处为P=O键的伸缩振动峰;在1094、894  $\text{cm}^{-1}$ 处出现较强的吸收峰分别是由P—OH、P—O—C键伸缩振动引起的<sup>[8]</sup>。QI等<sup>[23]</sup>研究发现,依据FTIR谱图的特征吸收峰强弱可以判断羧甲基化、磷酸化程度的大小,结果表明,成功制备了CM-LAP和P-LAP。

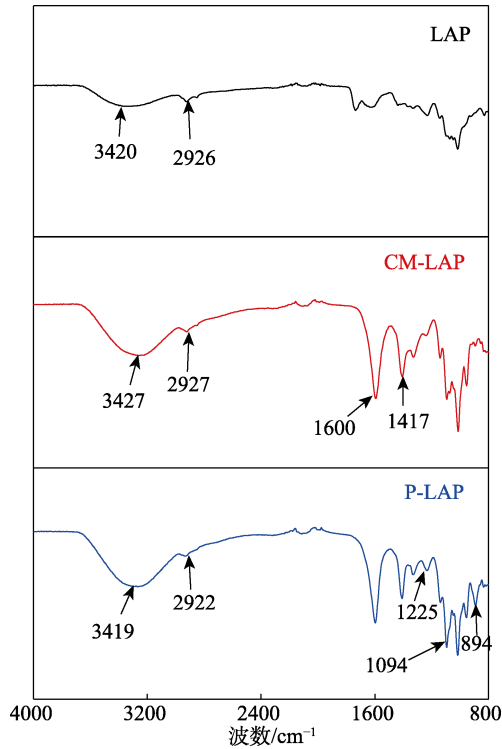


图 6 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 FTIR 谱图  
Fig. 6 FTIR spectra of LAP, CM-LAP and P-LAP

## 2.8 NMR 分析

图 7 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 <sup>1</sup>HNMR、<sup>31</sup>PNMR 谱图。

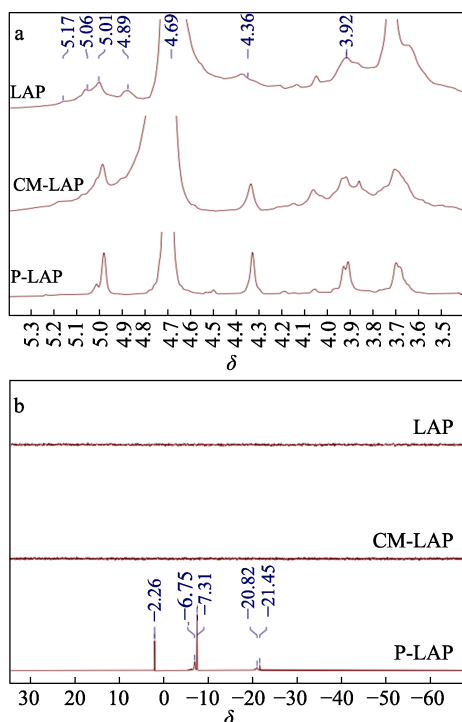


图 7 LAP、CM-LAP、P-LAP 的 <sup>1</sup>HNMR (a) 和 <sup>31</sup>PNMR (b) 谱图  
Fig. 7 <sup>1</sup>HNMR (a) and <sup>31</sup>PNMR (b) spectra of LAP, CM-LAP and P-LAP

通常，<sup>1</sup>HNMR 中  $\delta$  3.10~5.90 出现的信号是多

糖糖环上的特征信号峰<sup>[24]</sup>。从图 7a 的 <sup>1</sup>HNMR 谱图可以看出， $\delta$  4.69 为 D<sub>2</sub>O 的特征信号峰； $\delta$  4.30~5.40 内出现的信号是多糖异头氢引起的， $\delta$  3.10~4.60 内的信号是由 H-2 和 H-6 质子峰引起的， $\delta$  4.36 出现的信号峰说明 3 种糖都存在  $\beta$  构型<sup>[10]</sup>；LAP 在  $\delta$  3.92 出现—CH<sub>2</sub> 中的氢信号峰，而 CM-LAP 在此处信号峰消失，可能是因为—OCH<sub>2</sub>COO 取代了该位置上的氢；与 LAP 相比，CM-LAP、P-LAP 在  $\delta$  4.89 处的信号峰均消失，猜测此处为新的官能团连接部位<sup>[25]</sup>；P-LAP 在  $\delta$  5.05 处出现强的信号峰，而在  $\delta$  3.73 处的—OH 中氢信号峰消失，猜测 P-LAP 在此处发生磷酸化<sup>[8]</sup>；CM-LAP、P-LAP 在  $\delta$  3.60~4.40 内的信号峰分别是由羧甲基和磷酸根基团引起的<sup>[9]</sup>，并且与 LAP 相比，CM-LAP、P-LAP 在同一信号峰处强度不同，表明 LAP、CM-LAP、P-LAP 存在一定差异。

从图 7b 的 <sup>31</sup>PNMR 谱图可以看出，与 LAP、CM-LAP 相比，P-LAP 在  $\delta$  2.26、-6.75、-7.31、-20.82、-21.45 处出现新的信号峰，再一次证实磷酸化修饰成功。

## 2.9 抗氧化活性评价

### 2.9.1 体外抗氧化活性分析

图 8 为 LAP、CM-LAP、P-LAP 对 DPPH 自由基、羟基自由基清除率结果。

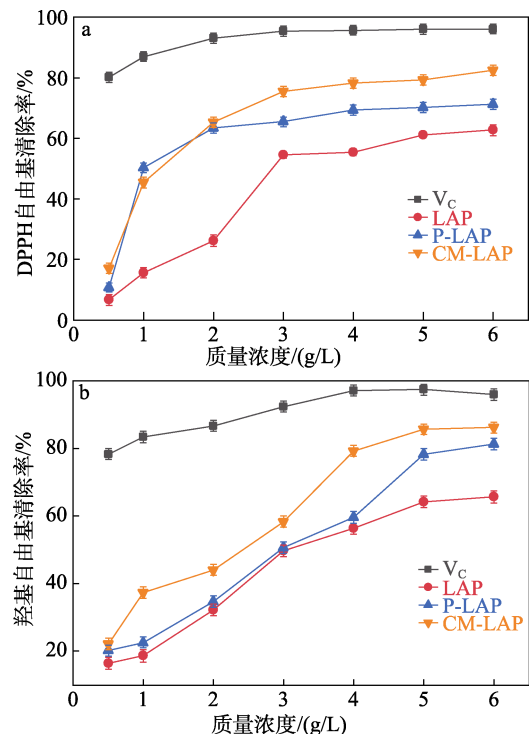


图 8 LAP、CM-LAP、P-LAP 对 DPPH 自由基 (a) 和羟基自由基 (b) 的清除率  
Fig. 8 Scavenging rate of DPPH free radical (a) and hydroxyl free radical (b) of LAP, CM-LAP and P-LAP

自由基的产生和消除始终处于动态平衡，当自由基过多时会攻击其他分子产生新的自由基，从而

导致细胞的氧化损伤并引发疾病。多糖分子中含有一定的酚羟基,能够清除体内氧自由基,从而发挥抗氧化活性<sup>[5]</sup>。从图8可以看出,在质量浓度0.5~6 g/L范围内,LAP、CM-LAP、P-LAP对DPPH自由基(图8a)、羟基自由基(图8b)清除能力均呈现一定的剂量依赖性。其中,当LAP、CM-LAP、P-LAP质量浓度为6 g/L时,对DPPH自由基清除率分别为61.46%、82.43%和71.25%, $IC_{50}$ 分别为2.84、1.28和0.98 g/L(图8a);对羟基自由基清除率分别为65.68%、86.24%和81.32%, $IC_{50}$ 分别为3.02、2.49和2.99 g/L(图8b)。

### 2.9.2 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导肝细胞抗氧化酶活力的影响

图9为LAP、CM-LAP、P-LAP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HepG2肝细胞中MDA含量、SOD活力、GSH-Px活力影响结果。

从图9可以看出,与空白组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的模型组细胞悬液中的MDA含量升高,SOD活力和GSH-Px活力明显下降。阳性对照组、LAP组、CM-LAP组、P-LAP组的MDA含量较模型组均下降,SOD活力、GSH-Px活力较模型组均上升,并呈现一定的剂量依赖性。

从图9a可以看出,与模型组相比,LAP、CM-LAP、P-LAP作用于HepG2肝细胞后,当质量浓度为40 μg/mL时,LAP组、CM-LAP组、P-LAP组的MDA含量分别由6.768 nmol/mg pro(单位代表每毫克蛋白质中MDA纳摩尔量,下同)下降到4.029、3.517、3.772 nmol/mg pro,阳性对照组MDA含量由6.768 nmol/mg pro下降到3.357 nmol/mg pro。

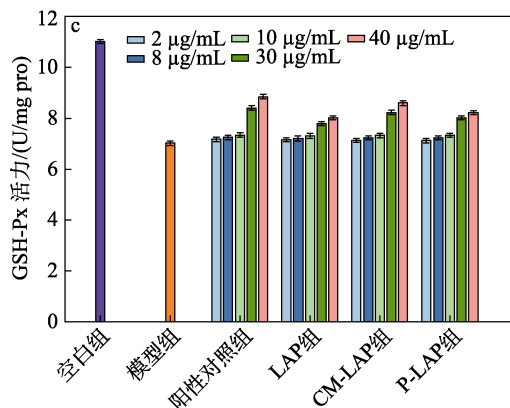
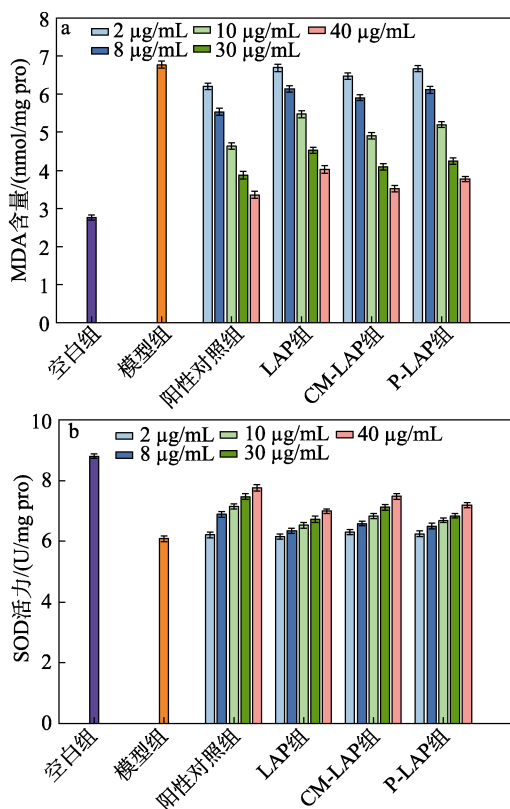


图9 不同质量浓度的LAP、CM-LAP、P-LAP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HepG2细胞MDA含量(a)、SOD活力(b)、GSH-Px活力(c)的影响

Fig. 9 Effects of LAP, CM-LAP and P-LAP with different mass concentrations on MDA content (a), SOD activity (b) and GSH-Px activity (c) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells

从图9b可以看出,与模型组相比,LAP、CM-LAP、P-LAP作用于HepG2肝细胞后,当质量浓度为40 μg/mL时,LAP组、CM-LAP组、P-LAP组的SOD活力分别由6.086 U/mg pro提升至6.991、7.474、7.192 U/mg pro,阳性对照组SOD活力由6.086 U/mg pro提升至7.761 U/mg pro。

从图9c可以看出,与模型组相比,LAP、CM-LAP、P-LAP作用于HepG2肝细胞后,当质量浓度为40 μg/mL时,LAP组、CM-LAP组、P-LAP组的GSH-Px活力分别由7.019 U/mg pro提升至8.017、8.591、8.227 U/mg pro,阳性对照组GSH-Px活力由7.019 U/mg pro上升至8.8417 U/mg pro。

结果表明,LAP、CM-LAP、P-LAP对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HepG2肝细胞氧化损伤具有保护作用,并且羧甲基化、磷酸化修饰能够提升LAP的保护能力<sup>[26]</sup>。

### 3 结论

(1)分别采用氯乙酸法、磷酸钠法对LAP进行羧甲基化、磷酸化修饰,成功制备了CM-LAP、P-LAP。

(2)与LAP相比,CM-LAP、P-LAP黏度降低、溶解度提高,表面形貌发生变化,相对分子量无明显变化,并依然保持三螺旋结构;CM-LAP、P-LAP均为晶体和非晶体结构共存。

(3)LAP是由岩藻糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖6种主要单糖组成的杂多糖。经羧甲基化、磷酸化修饰后,CM-LAP、P-LAP单糖组成没有发生变化,但各单糖的摩尔分数略微改变。羧甲基、磷酸化修饰引起的多糖降解可能未发生在LAP的主链上,而是主要发生在支链上。

(4) 羧甲基化、磷酸化修饰提升了 LAP 的热稳定性, 550 °C 时, LAP、CM-LAP、P-LAP 的残炭率分别为 22.76%、40.90%、30.38%。

(5) LAP、CM-LAP、P-LAP 对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 2.84、1.28 和 0.98 g/L, 对羟基自由基自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 3.02、2.49 和 2.99 g/L。LAP、CM-LAP、P-LAP 均能够降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HepG2 肝细胞的 MDA 含量, 提升 SOD 和 GSH-Px 的活力, 从而发挥抗氧化活性。

#### 参考文献:

- [1] DOBROS N, ZAWADA K, PARADOWSKA K. Phytochemical profile and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia* cultivars extracted with different methods[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(4): 711-720.
- [2] EDINA P, ALEX B, GIUSEPPE M, et al. Anti-inflammatory effect of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil prepared during different plant phenophases on THP-1 macrophages[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 287-296.
- [3] CLAUDIO C, FRANCESCA F, FABIO D, et al. Chemical profile, *in vitro* biological activity and comparison of essential oils from fresh and dried flowers of *Lavandula angustifolia* L.[J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5317-5328.
- [4] MICHALINE A S, DZIECIOL M, DANUTE S. *Lavandula angustifolia* essential oils as effective enhancers of fluconazole antifungal activity against candida albicans[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1176-1189.
- [5] WANG J L (王俊龙), LIN Y G (蔺永刚), SHI W P (时文盼), et al. Extraction process, structural characterization and biological activity of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata*[J/OL]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2024, 1-17[2024-05-22]. <https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20240178>. DOI: 10.13550/j.jxhg.20240178.
- [6] WANG J L (王俊龙), SHI W P (时文盼), LIN Y G (蔺永刚), et al. Carboxymethyl modification, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of *Inonotus obliquus* polysaccharides[J/OL]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2024, 1-14[2024-05-22]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.039134>. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.039134.
- [7] ZHANG Y, NIE R N, LIU W X, et al. Sulfation on polysaccharides from *Zizania latifolia* extracted using ultrasound: Characterization, antioxidant and anti-non-small cell lung cancer activities[J]. *Ultrason Sonochem*, 2024, 29(4): 1350-1359.
- [8] LI Y (李瑶), XIONG C M (熊彩明), ZHANG J L (张佳乐), et al. Preparation, structural characterization and biological activity of phosphorylated polysaccharide from *Undaria pinnatifida* suringar[J]. *Food Science (食品科学)*, 2024, 45(7): 35-42.
- [9] CI L Y (慈璐雨), NI T Y (倪天颖), LAN W B (蓝蔚冰). Comparative analysis of preparation, structure, and antioxidant activity of carboxymethylated and phosphorylated curdlan[J/OL]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2024, 1-10 [2024-05-22]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036884>. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036884.
- [10] JIANG S, WANG Q B, WANG Z B, et al. Ultrasound-assisted polysaccharide extraction from *Fritillaria ussuriensis* Maxim. and its structural characterization, antioxidant and immunological activity[J]. *Ultrason Sonochem*, 2024, 23(16): 1350-1362.
- [11] YANG J X (杨嘉欣), LI Y (李瑶), HUANG X J (黄显健), et al. Optimization of carboxymethylation modification process and study on biological activity of *Laminaria japonica* polysaccharide[J/OL]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2024, 1-12 [2024-05-22]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037176>. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037176.
- [12] YU F Y (于方圆), HU M (胡淼), MEN Y W (门雨薇), et al. Phosphorylation modification process of *Inonotus obliquus* polysaccharides[J]. *Food Research and Development (食品研究与开发)*, 2022, 43(12): 133-138.
- [13] HE M Y (和梦瑶), DONG Z Y (董泽宇), ZHANG L L (张兰兰), et al. Structure characterization and biological activity of polysaccharides from different parts of *Houttuynia cordata* Thunb[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (食品科学技术学报)*, 2024, 24(3): 276-286.
- [14] XU Y B (徐永斌), FENG S X (冯帅霞), CHEN J (陈洁), et al. Structural characterization of a homogeneous polysaccharide isolated from the flower of *Carthamus Tinctorius* L. and its inhibitory activity on HepG2 proliferation[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2023, 44(4): 60-69.
- [15] LIU H Z, LI F P, LUO P. Effect of carboxymethylation and phosphorylation on the properties of polysaccharides from *Sepia esculenta* ink: Antioxidation and anticoagulation *in vitro*[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(4): 626-637.
- [16] CAO L (曹磊), LIU W (刘伟), WANG J L (王俊龙), et al. Preparation of low viscosity polysaccharide from *Plantago ovata* Forsk by sulfation method and its structural characterization and antioxidant activities[J]. *Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发)*, 2024, 36(1): 26-36.
- [17] LIU C Y, ZHANG T T, ZHAO P, et al. Purification and structural analysis of a novel polysaccharide from *Rehmannia Radix Praeparata*[J]. *Chemical Biology and Drug Design*, 2023, 24(10): 514-522.
- [18] JING Y S, ZHANG Y W, LI P Y, et al. Optimization of technology, structural characterization, derivatization, antioxidant and immunomodulatory activities of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022, 16(2): 1754-1767.
- [19] AYSURSUM A W, REHEBATI N X, PAIHEER M, et al. Isolation, structural modification, characterization, and bioactivity of polysaccharides from *Folium Isatidis*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 176: 1-14.
- [20] SHANG H M, LI R, WU H X, et al. polysaccharides from *Trifolium repens* L. extracted by different methods and extraction condition optimization[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6353-6362.
- [21] BENVIDI S M H B, KAMBIZ J B. A newwater-soluble polysaccharide from *Echinops pungens* Trautv roots. Part I . Isolation, purification, characterization and antioxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 16(1): 909-916.
- [22] YANG M Y, TARUN B W, LI L, et al. Trends of Utilizing mushroom polysaccharides as potent nutraceutical components in food and medicine: A comprehensive review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 9(2): 94-110.
- [23] QI K, XIA G D, HUANG G L, et al. Extraction, chemical modification, and antioxidant activities of *Daucus carota* polysaccharide[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2021, 98(6): 1098-1103.
- [24] LUO Y, FANG Q, LAI Y, et al. Polysaccharides from the leaves of *Polygonatum Sibiricum* Red. regulate the gut microbiota and affect the production of short-chain fatty acids in mice[J]. *AMB Express*, 2022, 12(1): 35-46.
- [25] FENG X T, GAO Y, QIN Y T, et al. Triphase dynamic extraction system involved with ionic liquid and deep eutectic solvent for various bioactive constituents from *Tartary buckwheat* simultaneously[J]. *Food Chemistry*, 2023, 4(5): 134-145.
- [26] GAO Y (高原), WANG F L (王福玲), JIA Q (贾琦), et al. Protective effect of an endophytic fungus from *Dalbergia odorifera* T. Chen against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells[J]. *Food Science (食品科学)*, 2018, 39(11): 196-200.