

## 海马多糖提取工艺优化与抗氧化活性研究

王玉, 刘克海

### Optimization of extraction of *Hippocampus mohnikei* polysaccharides and study on antioxidant activity

WANG Yu, LIU Kehai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503448>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

##### 裸藻多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性

Isolation, purification, monosaccharide composition and antioxidant activity analysis of *Euglena gracilis* polysaccharides  
上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 564 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302957>

##### 超声辅助提取大石花菜多糖及其抗氧化研究

Ultrasonic-assisted extraction and anti-oxidation of polysaccharides from *Gelidium pacificum* Okam  
上海海洋大学学报. 2018, 27(5): 797 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180102213>

##### 舌状蜈蚣藻多糖提取工艺及抗氧化活性分析

Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Grateloupia livida*  
上海海洋大学学报. 2020, 29(1): 153 <https://doi.org/10.12024/jsou.20181002415>

##### 笼目海带多酚的分离纯化及其抗氧化活性研究

Separation, purification and antioxidant activity of polyphenols from brown alga *Kjellmaniella crassifolia* Miyabe  
上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 922 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-316>

##### 辽宁地区中华绒螯蟹“牛奶病”的病原分离与鉴定

Isolation and identification of pathogen in milky disease of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* in Liaoning Province  
上海海洋大学学报. 2020, 35(5): 714 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-314>

文章编号: 1674-5566(2022)05-1295-09

DOI:10.12024/jsou.20210503448

## 海马多糖提取工艺优化与抗氧化活性研究

王 玉<sup>1</sup>, 刘克海<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 以日本海马(*Hippocampus mohnikei*)为原料,采用响应面法优化超声辅助提取粗多糖工艺条件,通过柱层析进行纯化,测定海马多糖的单糖组成,并评价其抗氧化活性。结果表明:超声时间 47 min、浸提温度 87 °C、液料比 23 mL/g 为最佳提取条件,粗多糖 HP 得率为 9.91%;通过柱色谱分级纯化得到 2 种多糖 HP-1 和 HP-2,HP-1 主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖以摩尔比 11.32:6.39:5.64 组成,并含有少量阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、鼠李糖,HP-2 主要由氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、甘露糖以摩尔比 29.03:18.18:8.48:6.30:4.88:2.70 组成,并含有少量岩藻糖和木糖;HP-1、HP-2 具有良好 DPPH 自由基清除能力,且 HP-2 最强,同时 HP、HP-1 及 HP-2 均具有还原力,表明海马多糖具有良好抗氧化活性。

**关键词:** 日本海马; 多糖; 超声提取; 响应面优化; 单糖组成; 抗氧化

**中图分类号:** TS 254.1 **文献标志码:** A

海马(*Hippocampus*)属于海龙目(Syngnathiformes)海龙科(Syngnathidae),主要分布于 50°N 到 50°S 的温带和热带沿海区域,常栖息于藻体,世界范围内已发现隶属于海马属的动物 48 种<sup>[1]</sup>。目前海马除用作观赏鱼类及部分应用于传统医药外,对其精深加工报道较少。研究表明,海马具有一系列功能性作用,如抗氧化<sup>[2-5]</sup>、抗炎<sup>[6-9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10-11]</sup>、激素样作用<sup>[12-13]</sup>等,且对高血压、血栓、阳痿及某些神经退行性疾病具有良好缓解作用<sup>[12,14]</sup>。目前对海马的研究多集中在甾体<sup>[15-16]</sup>、脂肪酸<sup>[17-18]</sup>、多肽<sup>[19]</sup>等组分,对海马多糖研究尚不深入,相关报道较少。多糖是天然大分子物质,生物活性多样<sup>[20-22]</sup>,在医药、保健品、食品及化妆品等领域的产品开发具有广泛应用前景。本文以日本海马(*Hippocampus mohnikei*)为原料,通过响应面法优化超声辅助提取海马多糖工艺,并经分级纯化得到均一多糖,初步研究其单糖组成及抗氧化活性,可为海马多糖的产业化应用提供科学依据和技术支撑,有助于提升海马加工的技术水平与附加值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

日本海马(体长 3~5 cm,体质量 10~20 mg,月龄 3~10 个月)取自山东省日照市;氯化钠、纯化填料,上海兰拓生物科技有限公司;硫酸、三氯甲烷、二氯甲烷,上海柯灵斯有限公司;95%乙醇、乙酸酐、三氯乙酸、抗坏血酸、DPPH,国药集团化学试剂有限公司;盐酸羟胺,北京化工厂;苯酚、三氟乙酸,阿达玛斯试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

主要仪器:恒流泵,上海沪西分析仪器厂;电热恒温鼓风干燥箱(DH6-907385-III),上海讯博实业有限公司医疗设备厂;80-2 离心机,金坛荣华仪器厂;旋转蒸发仪(RE3000-D),上海亚荣生化仪器厂;气质联用仪,美国 Agilent 公司;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 海马粗多糖的提取

恒温鼓风干燥箱 60 °C 海马干燥至恒重,粉

收稿日期: 2021-05-19 修回日期: 2021-06-01

基金项目: 国家自然科学基金(81572989)

作者简介: 王 玉(1996—),女,硕士研究生,研究方向为基于多糖的功能性食品的开发利用。E-mail:WY08051005@163.com

通信作者: 刘克海,E-mail:khliu@shou.edu.cn

碎成粉末。乙醇回流法脱脂:液料比 10 mL/g、温度 80 ℃、水浴 3 h、重复 3 次,过滤得到脱脂海马粉,烘干。按 30 mL/g 液料比向脱脂海马粉内加入蒸馏水超声辅助提取、过滤、浓缩、乙醇沉淀、离心(4 000 r/min, 4 ℃, 20 min)去除上清液,冷冻干燥,即得海马粗多糖 HP<sup>[23]</sup>。

### 1.3.2 单因素实验

按照 1.3.1 节所述方法,以液料比 20 mL/g、超声 30 min、80 ℃浸提 3 h 设定为基本实验条件,测定超声时间(20、30、40、50、60 min)、浸提温度(50、60、70、80、90 ℃)、液料比(10、20、30、40、

50 mL/g)对多糖得率的影响<sup>[24]</sup>。海马粗多糖得率按下式计算:

$$W = \frac{m}{M} \times 100 \quad (1)$$

式中:W 为多糖得率,% ;m 为粗多糖质量,mg ;M 为称取的海马质量,mg。

### 1.3.3 响应面试验

以单因素试验结果为依据,选择三因素三水平进行响应面试验(表 1),测定各试验条件对多糖得率的影响,利用 Design-Expert 11 软件进行回归分析,确定海马多糖最佳提取工艺条件<sup>[25-26]</sup>。

表 1 响应面试验的因素及水平  
Tab. 1 Factors and levels of response surface text

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	+1
A 超声时间 Ultrasonic time/min	40	50	60
B 浸提温度 Extraction temperature/℃	70	80	90
C 液料比 Solvent-to-solid ratio/(mL/g)	20	30	40

### 1.3.4 粗多糖分离纯化

#### (1) 脱蛋白

取适量海马粗多糖溶于蒸馏水中,离心(4 000 r/min, 4 ℃, 20 min),取上清液加入适量三氯乙酸,使其终浓度为 3%,搅拌均匀放置过夜,离心(4 000 r/min, 4 ℃, 20 min),取上清液旋蒸浓缩后,透析(截留分子量 3 500 u),收集透析液,备用<sup>[23]</sup>。

#### (2) DEAE-52 离子纤维素交换柱纯化

充分溶胀 DEAE-52 填料 1 h,去除杂质,玻棒引流缓慢装柱,防止产生气泡,待填料不再下降,超纯水平衡过夜。取适量透析液上样,0、0.1、0.3、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液作为洗脱液,苯酚-硫酸检测吸光值,绘制曲线,收集出峰管,浓缩、透析进行下一步纯化。

#### (3) Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱纯化

充分溶胀葡聚糖凝胶填料 24 h,去除上层凝胶碎片颗粒,进行装柱,超纯水平衡 3~5 个柱体积,备用。取适量经 DEAE-52 纤维素离子交换柱纯化后的多糖溶液进行上样,分别用 0.1 和 0.3 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,收集,苯酚-硫酸检测吸光度值,绘制洗脱曲线,收集出峰管,透析浓缩,冻干即得海马纯化多糖。

### 1.3.5 HP-1 和 HP-2 单糖组成测定

参考文献[25]的方法对标准品、海马多糖进

行水解及乙酰化,随后上机分析,氦气作为载气,流速为 1 mL/min。温度程序:发射能量为 70 eV;离子源温度为 150 ℃;柱温在 165 ℃下保持 7 min,以 5 ℃/min 上升至 185 ℃;5 min 后,以 4 ℃/min 速度上升至 200 ℃;设定升温速度为 20 ℃/min,上升至 280 ℃,保持 2 min,进行 GC-MS 分析。

### 1.3.6 抗氧化活性评价

#### (1) DPPH 自由基清除能力<sup>[27]</sup>

Vc 为对照组,测定 HP、HP-1、HP-2 对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)的清除能力。配置不同质量浓度 HP、HP-1、HP-2(1、2、3、4、5 mg/mL)溶液,取同体积多糖和 DPPH 溶液于 96 孔板,反应 30 min(避光),测定 517 nm 吸光度值,根据公式(2)计算 HP、HP-1、HP-2 对 DPPH·的清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中:C 为 DPPH·清除率,% ;A<sub>0</sub> 为空白对照吸光度;A<sub>1</sub> 为样品吸光度;A<sub>2</sub> 为样品本底吸光度。

#### (2) 总还原力测定

配置 0.2 mol/L PBS(pH 6.6)、1% 六氰铁酸钾溶液、10% 三氯乙酸和 0.1% 三氯化铁,按文献[28]方法测定不同浓度 HP、HP-1、HP-2 溶液的还原力。

## 1.4 数据处理

分别采用 Origin 9.0、SPSS 17.0、Design expert 11.0 软件分析实验相关图表、单因素实验数据与响应面试验及其显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声时间、浸提温度及液料比对海马粗多糖得率的影响

如图 1a 所示,随着超声时间延长,多糖得率逐渐提高,当达到 50 min 时,达到最大值 11.30%,随后多糖得率降低,这是由于超声时间增加有利于海马的细胞组织破碎,加速多糖溶出,但随着时间继续增加,杂质溶出增多,且超声

时间延长可能会引发多糖降解,导致乙醇沉淀时多糖得率有所降低<sup>[29]</sup>,因此确定超声时间为 50 min。如图 1b 所示,随着浸提温度升高,多糖得率逐渐增大,当达到 80 °C 时,达到最大值 11.07%,温度进一步升高,多糖得率下降,表明在一定范围内温度升高可加快多糖溶出,但超过一定温度,则不利于多糖溶出。如图 1c 所示,随着溶剂量增大,多糖得率逐渐上升,当液料比为 30 mL/g 时,达到最大值 9.47%,表明在一定范围内,增加液料比可提高海马多糖产率,这源于溶剂量的增加会提高多糖在水边界层的浓度差,从而促进其扩散<sup>[30]</sup>。

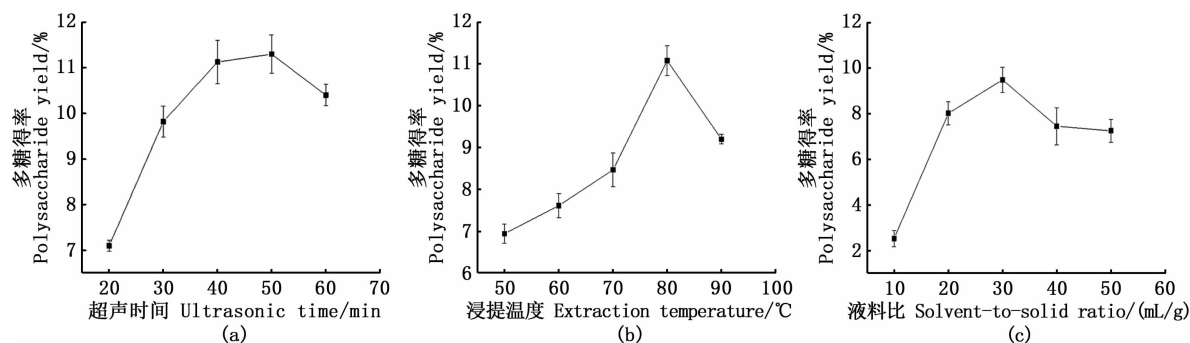


图 1 超声时间、浸提温度、液料比对海马多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic treatment time, extraction temperature, solvent-to-solid ratio on the yield of *Hippocampus mohnikei* polysaccharide

### 2.2 响应面法优化海马多糖提取条件

#### 2.2.1 响应面试验设计及结果

在单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计进行了 17 组试验,如表 2 所示,多糖得率波动范围较大,最小为 4.93%,最大为 11.32%,表明相同试验因素的不同水平对多糖得率有较大影响,因此进一步对其进行回归方程的方差分析。

#### 2.2.2 模型的建立及显著性检验

采用 Design-Expert 11.0 软件对试验结果进行拟合分析得到二次多项式回归模型:  $Y = 8.78 - 0.7480 A + 1.14 B - 0.6420 C - 0.0170 AB + 0.9460 AC - 1.30 BC + 0.6838 A^2 - 1.31 B^2 - 0.6032 C^2$ 。

如表 3 所示,对该回归方程进行方差分析,得到模型  $P < 0.01$ ,具有显著性,表明模型具有较高可信度;失拟项不显著  $P > 0.05$ 、相关系数  $R^2 =$

0.987 9,表明模型拟合良好;且信噪比 Adeq precision = 30.501 4 > 4,综合以上结果表明该回归二次模型成立,可用于分析和预测海马多糖的提取工艺<sup>[26]</sup>。根据  $F$  值大小可以得到 3 个因素对于海马多糖得率影响的主次顺序依次为浸提温度(B)、超声时间(A)、液料比(C)。其中除了交互项 AB 对多糖得率的影响不显著外,其余项对多糖得率均具有极显著影响( $P < 0.01$ )。

#### 2.2.3 海马多糖提取工艺的响应曲面分析

图 2 为液料比、浸提温度、超声时间之间交互作用对多糖得率的影响,其中浸提温度与液料比、超声时间与液料比的交互作用对海马多糖得率影响极显著,而浸提温度与超声时间的交互作用不明显。通过对实验模型的分析,得到最优工艺条件为超声时间 47.37 min、浸提温度 86.73 °C、液料比 22.86 mL/g,多糖得率为 10.16%。考虑到实验可操作性,将最佳提取工艺更正为超声

时间 47 min、浸提温度 87 °C、液料比 23 mL/g,测得其得率为 9.91%,与响应面试验结果相近,表明该最佳提取工艺可行。

表 2 响应面试验设计及结果

Tab. 2 Design and results for response surface analysis

试验号 Number	A 超声时间 Ultrasonic time/min	B 浸提温度 Extraction temperature/ °C	C 液料比 Solvent- to-solid ratio/(mL/g)	多糖得率 Polysaccharide yield/%
1	60	80	20	7.63
2	50	90	40	6.20
3	60	80	40	8.29
4	40	90	30	9.75
5	50	80	30	8.69
6	50	70	20	4.93
7	40	70	30	7.75
8	60	90	30	8.52
9	50	80	30	8.86
10	50	70	40	6.20
11	50	80	30	8.85
12	60	70	30	6.59
13	50	80	30	8.57
14	40	80	40	8.20
15	50	90	20	10.14
16	40	80	20	11.32
17	50	80	30	8.95

### 2.3 海马多糖的纯化

HP 首先通过 DEAE-52 离子交换柱纯化,如

图 3a 所示,洗脱液为不同浓度 NaCl 溶液(0、0.1、0.3、0.5 mol/L),收集 0.1 mol/L(27~29)和 0.3 mol/L(52~54) NaCl 溶液洗脱下的多糖溶液,经 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱进一步纯化,得到单一对称的曲线图,表明其为均一多糖,如图 3b 所示,收集出峰管,浓缩、透析、冷冻干燥得到纯化多糖,命名为 HP-1 和 HP-2。

### 2.4 单糖组成

经 GC-MS 分析,HP-1 和 HP-2 均是杂多糖,其中 HP-1 中含有葡萄糖、阿拉伯糖和鼠李糖,且葡萄糖含量最多,而 HP-2 中含有较多的氨基葡萄糖及糖醛酸。见表 4。

### 2.5 HP、HP-1、HP-2 对 DPPH 自由基清除能力

如图 4 所示,质量浓度为 0~5 mg/mL 时,HP 对 DPPH 自由基无清除作用,纯化后的海马多糖 HP-1 和 HP-2 其清除效果明显增强,尤其是 HP-2,在浓度为 5 mg/mL 时,其 DPPH 自由基清除率为 72.48%,虽与 Vc 有差距,但依然展示了较强的抗氧化能力。黄素华等<sup>[31]</sup>对枇杷叶多糖的研究表明,纯化后的多糖对 DPPH 自由基的清除效果更好,也说明纯化的多糖抗氧化活性得到提升。

表 3 回归模型的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance in regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	39.18	9	4.35	63.26	<0.0001 **
A	4.48	1	4.48	65.04	<0.0001 **
B	10.44	1	10.44	151.74	<0.0001 **
C	3.30	1	3.30	47.91	0.0002 **
AB	0.0012	1	0.0012	0.0168	0.9005
AC	3.58	1	3.58	52.01	0.0002 **
BC	6.80	1	6.80	98.83	<0.0001 **
A <sup>2</sup>	1.97	1	1.97	28.61	0.0011 **
B <sup>2</sup>	7.26	1	7.26	105.51	<0.0001 **
C <sup>2</sup>	1.53	1	1.53	22.26	0.0022 **
残差 Residual	0.4817	7	0.0688		
失拟 Lack of fit	0.3913	3	0.1304	5.77	0.0617
误差 Error	0.0904	4	0.0226		
总和 Sum	39.66	16			

注: \* 表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Notes: \* indicates there was a significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\* indicates there was a very significant difference ( $P < 0.01$ ).

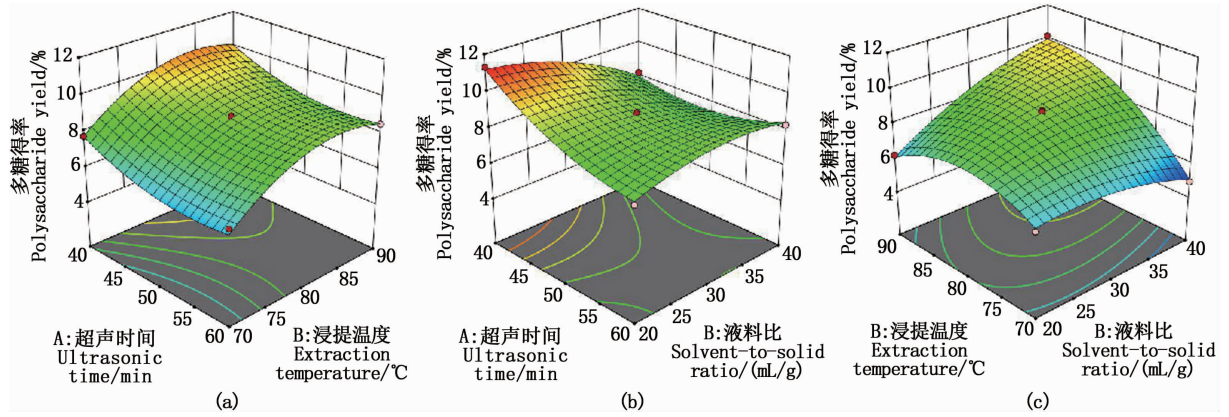


图 2 各因素相互作用对海马多糖得率影响

Fig. 2 Interactive effects of various factors on polysaccharide yield

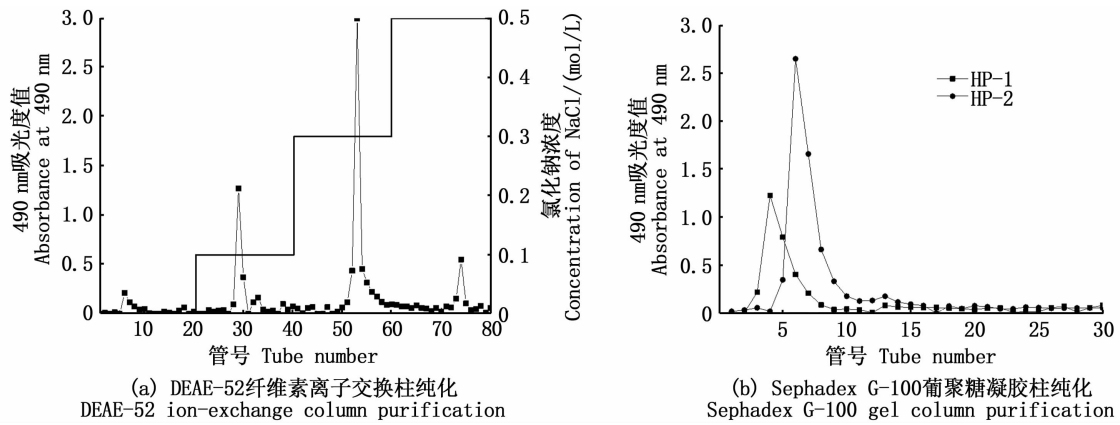


图 3 海马多糖洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of *Hippocampus mohnikei* polysaccharides

表 4 HP-1 和 HP-2 单糖组成

Tab.4 Monosaccharide composition of HP-1 and HP-2

种类 Type	名称 Name	保留时间 Retention time/min	摩尔比 Molar ratio
HP-1	葡萄糖	16.38	11.32
	半乳糖	16.53	6.39
	甘露糖	16.31	5.64
	阿拉伯糖	14.98	1.45
	木糖	15.07	1.34
	岩藻糖	15.05	1.15
	鼠李糖	14.86	1.00
HP-2	氨基葡萄糖	9.89	29.03
	葡萄糖醛酸	37.93	18.18
	半乳糖醛酸	38.23	8.48
	半乳糖	11.08	6.30
	葡萄糖	12.80	4.88
	甘露糖	16.03	2.70
	岩藻糖	4.23	1.88
	木糖	15.23	1.00

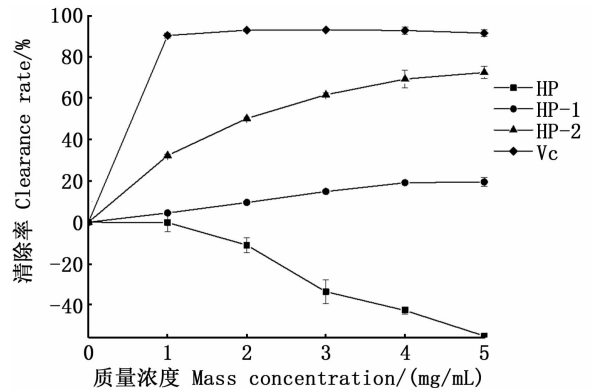


图 4 HP、HP-1、HP-2 对 DPPH 自由基清除能力  
Fig. 4 Scavenging effect of HP, HP-1, HP-2 on DPPH free radical

2.6 HP、HP-1、HP-2 的还原力

铁氰化钾中的三价铁可被具有抗氧化功能的多糖还原成二价亚铁,与三氯化铁反应生成在

700 nm 处有最大紫外吸收值的普鲁士蓝。如图 5 所示,随着多糖浓度增加,吸光度值逐渐增大,表明 HP、HP-1、HP-2 的还原力随着浓度增加而逐渐增强,且在相同浓度下,HP-2 的还原力最强,而由于粗多糖成分复杂,因素影响众多<sup>[32-34]</sup>,使 HP 还原力高于 HP-1。在 0 ~ 5 mg/mL 浓度范围内,HP、HP-1、HP-2 的线性拟合方程分别为  $y_{HP} = 0.026 + 0.030x, R^2 = 0.967$ ;  $y_{HP-1} = 0.021 + 0.024x, R^2 = 0.983$ ;  $y_{HP-2} = 0.047 + 0.030x, R^2 = 0.973$ 。如图 6 所示,HP-1、HP-2 清除 DPPH 自由基能力和还原力间具有相关性,其相关系数  $R^2$  均大于 0.9,由于 HP 只有还原力,但对 DPPH 没有清除力,所以不存在 HP 的还原力与 DPPH·清除率的相关性。

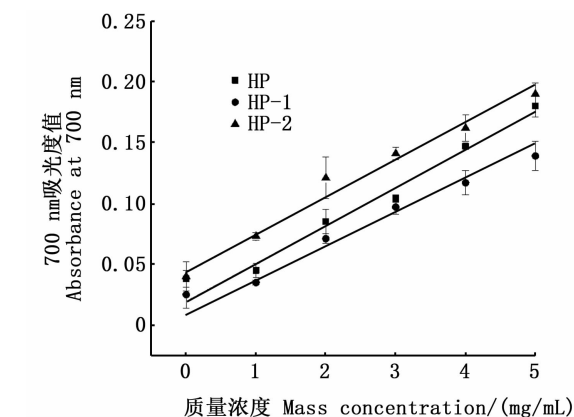
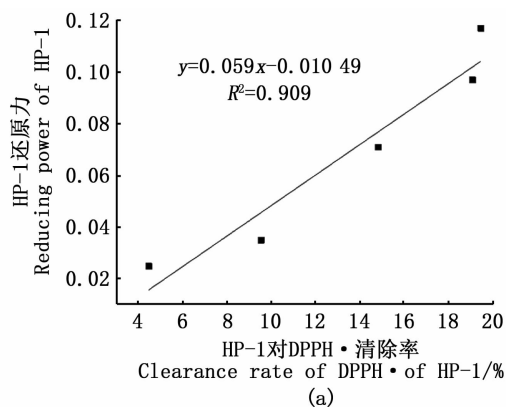


图 5 HP、HP-1、HP-2 还原力

Fig. 5 Reducing power of HP, HP-1, HP-2

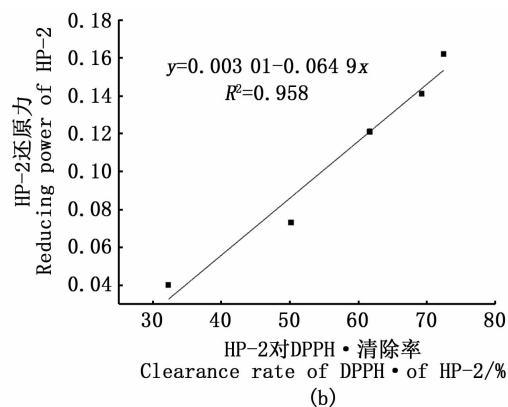


图 6 HP-1、HP-2 的还原力与 DPPH·清除率的相关性

Fig. 6 Correlation between the reducing power and DPPH· clearance of HP-1 and HP-2

### 3 讨论

多糖提取主要有水提法、酸提法、碱提法和酶提法等<sup>[35]</sup>,其中水提法因其工艺简单、无污染而最常用,在传统水提法基础上,引入超声辅助提取可缩短提取时间,提高提取效率,降低多糖损失<sup>[36]</sup>,本研究采用响应面法优化了超声辅助提取海马粗多糖工艺,得到最佳提取条件,多糖得率达到 9.91%。粗多糖组分及结构复杂多样,限制了其进一步应用,因此将其制备为均一多糖,是当前国内外多糖研究的重点,也是提高其附加值的关键,目前多糖纯化方法有沉淀法、柱层析法和超滤法等<sup>[37]</sup>,其中柱层析法较常用,本文采用柱层析分级纯化得到 2 种均一多糖 HP-1 及 HP-2,整体而言,HP-2 相比粗多糖具有更好的抗氧化活性,表明多糖纯化与否对其生物活性有较

大影响,这与文献<sup>[32]</sup>报道一致。

单糖组成是多糖最基本的结构特征,是影响其生物活性的重要因素<sup>[38-39]</sup>,HP-1 及 HP-2 单糖组成较为复杂,经 GC-MS 分析,HP-1 主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖组成,HP-2 主要由氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、甘露糖组成,这为其进一步结构表征和活性分析奠定了基础。多糖生物活性多样,研究<sup>[40]</sup>发现,多糖的抗氧化性是其抗肿瘤、抗炎、降血糖、降血脂等功效的作用机制之一,国内外非常关注多糖的抗氧化活性,已成为食品、生物等领域的研究热点。自由基具有高度化学活性,是人体代谢产物,产生过多会引起脂质过氧化作用、DNA 氧化破坏或交联,进一步损伤机体细胞和器官组织,诱发多种疾病<sup>[22]</sup>。多糖的抗氧化作用可通过转移电子给 DPPH·,中和自身自由基而实现,另外

还原力是多糖抗氧化性的直接体现<sup>[41]</sup>,因此本文以 DPPH 自由基清除力和还原力为指标,评价了海马多糖的抗氧化活性,以期为海马多糖的功能研究打下基础,也为开发海洋动物来源的抗氧化剂提供实验依据。

#### 参考文献:

- [1] KOLDEWEY H J, MARTIN-SMITH K M. A global review of seahorse aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(3/4): 131-152.
- [2] KIM H S, JE J G, RYU B, et al. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from *Hippocampus abdominalis*[J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(2): 479-487.
- [3] SANAYE S V, PISE N M, PAWAR A P, et al. Evaluation of antioxidant activities in captive-bred cultured yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852) [J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 100-107.
- [4] QIAN Z J, KANG K H, KIM S K. Isolation and antioxidant activity evaluation of two new phthalate derivatives from seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(5): 1031-1040.
- [5] PERERA N C N, GODAHEWA G I, LEE J. Copper-zinc-superoxide dismutase (CuZnSOD), an antioxidant gene from seahorse (*Hippocampus abdominalis*); molecular cloning, sequence characterization, antioxidant activity and potential peroxidation function of its recombinant protein[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 386-399.
- [6] LI H D, SUN H S, BAI X F, et al. HC2 of *Pseudomonas* sp. induced enteritis in *Hippocampus japonicus* [J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(6): 2027-2030.
- [7] HIMAYA S W A, RYU B M, QIAN Z J, et al. Paeonol from *Hippocampus kuda* Bleeker suppressed the neuro-inflammatory responses in vitro via NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *Toxicology in Vitro*, 2012, 26(6): 878-887.
- [8] PANGESTUTI R, KIM S K. Peptide-derived from seahorse exerts a protective effect against cholinergic neuronal death in *in vitro* model of Alzheimer's disease [J]. *Procedia Chemistry*, 2015, 14: 343-352.
- [9] 陈莉萍, 申铨日, 陈国华. 三斑海马脂溶性组分对脂多糖刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 体外抗炎作用的研究[C]//2015 年中国水产学会学术年会论文摘要集. 杭州: 中国水产学会, 2015.  
CHEN L P, SHEN X R, CHEN G H. Study on the effect upon lipopolysaccharide induced murine monocyte macrophages RAW264.7 inflammation *in vitro* of lipid soluble components from three-spot seahorse [C]//Proceedings of 2015 Chinese Fisheries Society Academic Annual Conference Paper Abstract Collection. Hangzhou: Chinese Fisheries Society, 2015.
- [10] 朱爱民. 海马乙醇提取物药理作用的研究[J]. *中国药事*, 2005, 19(1): 23-24.  
ZHU A M. Pharmacologic researches on ethanol extracts from hippocampus[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2005, 19(1): 23-24.
- [11] 于曼曼. 三斑海马长链碱的制备及体外抗肿瘤作用的研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.  
YU M M. Study on preparation on anti-tumor activity of sphingoid bases from *Hippocampus trimaculatus* leach [D]. Haikou: Hainan University, 2018.
- [12] 陆茵, 陈文星, 华永庆, 等. 海马壮阳软胶囊温肾壮阳的实验药理学研究[J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 2001, 17(2): 99-101.  
LU Y, CHEN W X, HUA Y Q, et al. Pharmacological research on effect of Haima Zhuangyang capsule in warming kidney and strengthening Yang [J]. *Journal of Nanjing University (Natural Science)*, 2001, 17(2): 99-101.
- [13] 张洪, 罗毅, 罗顺德. 日本海马对雄性大鼠附性器官及垂体——性腺轴的影响[J]. *中国海洋药物*, 2001(2): 39-41, 35.  
ZHANG H, LUO Y, LUO S D. Affect of the sea horse *Hippocampus japonicus* on pituitary- gonadal axis in male rats [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2001(2): 39-41, 35.
- [14] 陈梦, 陈建真, 葛宇清, 等. 海马化学成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(19): 4089-4099.  
CHEN M, CHEN J Z, GE Y Q, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Hippocampus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(19): 4089-4099.
- [15] 杨毅, 王真, 顾艳玲, 等. 短刺海马的化学成分研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(19): 1780-1782.  
YANG Y, WANG Z, GU Y P, et al. Study on chemical constituents of *Hippocampus erinaceus*[J]. *China Pharmacy*, 2014, 25(19): 1780-1782.
- [16] WU J N, LIU Z Y, SU J, et al. Anti-inflammatory activity of 3 $\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one isolated from *Hippocampus trimaculatus* leach via inhibiting iNOS, TNF- $\alpha$ , and 1L-1 $\beta$  of LPS induced RAW 264.7 macrophage cells[J]. *Food & Function*, 2017, 8(2): 788-795.
- [17] RYU B M, QIAN Z J, KIM S K. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- $\kappa$ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 184(3): 413-422.
- [18] RYU B M, QIAN Z J, KIM S K. SHP-1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF- $\kappa$ B/p38 kinase [J]. *Peptides*, 2010, 31(1): 79-87.
- [19] PANGESTUTI R, RYU B M, HIMAYA S W A, et al.



- Optimization of hydrolysis conditions, isolation, and identification of neuroprotective peptides derived from seahorse *Hippocampus trimaculatus*[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(2): 369-381.
- [20] FAGGIO C, PAGANO M, DOTTORE A, et al. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides [J]. *Natural Product Research*, 2016, 30(17): 1934-1937.
- [21] FAGGIO C, MORABITO M, MINICANTE S A, et al. Potential use of polysaccharides from the brown alga *Undaria pinnatifida* as anticoagulants [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2015, 58(5): 798-804.
- [22] 梁云. 几种天然抗氧化剂抗氧化性能比较研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.  
LIANG Y. A comparative study on the antioxidant activities of some natural antioxidants[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
- [23] 崔明晓. 大石花菜多糖的分离、结构表征及其抗炎活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.  
CUI M X. Isolation, characterization and anti-inflammatory activity of *Gelidium pacificum* *Okamura polysaccharide*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [24] 李玲玉, 邱志常, 朱姗姗, 等. 响应面法优化牛蒡多糖超声辅助提取工艺与抗氧化活性评价[J]. *食品科技*, 2020, 45(11): 197-204, 211.  
LI L Y, QIU Z C, ZHU S S, et al. Optimization of polysaccharides from *Arctium Lappa* L. by ultrasound-assisted extraction using response surface methodology and its antioxidant activities [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(11): 197-204, 211.
- [25] 芮光伟, 李维, 蒙英. 川芎多糖提取及 GC-MS 法测定其单糖含量及结构分析[J]. *食品科技*, 2013, 38(9): 150-152.  
RUI G W, LI W, MENG Y. Determination of content on monosaccharide and structure of *Ligusticum wallichii* polysaccharide extraction by GC-MS method [J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(9): 150-152.
- [26] 史晓宇, 高珍珍, 张超, 等. 蓝刺头多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 137-142.  
SHI X Y, GAO Z Z, ZHANG C, et al. Optimization of extraction of *Echinops lotifolis* tausch polysaccharides and its antioxidant activity [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(24): 137-142.
- [27] SULAIMAN M, FAZILAH A M. Analysis of total phenolics, tannins and flavonoids from *Moringa oleifera* seed extract[J]. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(1): 132-135.
- [28] 龚文静, 王磊, 邱玥, 等. 甜橙油抗氧化活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(35): 21783-21784, 22131.  
GONG W J, WANG L, QIU Y, et al. Study on the antioxidant activity of sweet orange oil[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(35): 21783-21784, 22131.
- [29] 崔蕊静, 赵玉华, 常学东. 微波辅助提取安梨皮渣中多酚类物质工艺优化[J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 16-19.  
CUI R J, ZHAO Y H, CHANG X D. Optimization for the processes of extracting polyphenols from Ann pears assisted with microwave[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(9): 16-19.
- [30] 邱涛涛, 王华, 毛世红. 石榴叶总酚测定及提取工艺研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(10): 131-134.  
QIU T T, WANG H, MAO S H. Study on determination and extraction of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L. [J]. *Food Science*, 2009, 30(10): 131-134.
- [31] 黄素华, 邱丰艳, 戴婉妹, 等. 枇杷叶多糖纯化工艺及抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(5): 205-209.  
HUANG S H, QIU F Y, DAI W M, et al. Purification process and antioxidant activity of loquat polysaccharide[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(5): 205-209.
- [32] 刘玉婷, 李井雷. 多糖体外抗氧化活性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(6): 214-219.  
LIU Y T, LI J L. Advances in research on Antioxidant activity of polysaccharides in vitro[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(6): 214-219.
- [33] GUO Y J, DENG G F, XU X R, et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi [J]. *Food & Function*, 2012, 3(11): 1195-1205.
- [34] 高静. 天然抗氧化剂及其协同作用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1859-1864.  
GAO J. Natural antioxidants and synergistic effects [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(6): 1859-1864.
- [35] 朱春晓. 太平洋侧花海葵多糖营养成分分析及多糖提取分离[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.  
ZHU C X. Studies on the nutritional components extraction, isolation, structure of polysaccharides from *Anthopleura nirescens* (Verrill) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [36] 崔明晓, 王晓晨, 王玉, 等. 超声辅助提取大石花菜多糖及其抗氧化研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(5): 797-804.  
CUI M X, WANG X C, WANG Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction and anti-oxidation of polysaccharides from *Gelidium pacificum* Okam [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(5): 797-804.
- [37] 郭军文. 中华仙影海葵多糖的分离及抗炎活性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.  
WU J W. Isolation and anti-inflammatory activities of polysaccharide from *Cereus sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [38] ZHANG X R, QI C H, GUO Y, et al. Toll-like receptor 4-

- related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 149: 186-206.
- [39] 王倩文,程春露,秦霞,等. 羊栖菜多糖生物活性及其构效关系研究进展[J]. *广东化工*, 2021, 48(9): 164-165. WANG Q W, CHENG C L, QIN X, et al. Progress in bioactivity and structure-activity relationship of *Sargassum fusiforme* polysaccharides[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2021, 48(9): 164-165.
- [40] 邢爽,方颂平,姚洪礼,等. 基于中药、菌菇及茶多糖的研究进展[J]. *北方园艺*, 2020(18): 144-151.
- XING S, FANG S P, YAO H L, et al. Research progress on polysaccharides from Chinese herbs, mushroom and tea[J]. *Northern Horticulture*, 2020(18): 144-151.
- [41] 吴丰鹏,李芹英,吴彦超,等. 九蒸九制对黄精多糖单糖组成及其抗氧化性的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(2): 42-46. WU F P, LI Q Y, WU Y C, et al. Effects of nine-steam-nine-bask on the monosaccharide composition and antioxidant activities of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(2): 42-46.

## Optimization of extraction of *Hippocampus mohnikei* polysaccharides and study on antioxidant activity

WANG Yu<sup>1</sup>, LIU Kehai<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study, the extraction conditions of polysaccharides from *Hippocampus mohnikei* were optimized by single factor test and response surface test, and the monosaccharide composition and antioxidant activity of *Hippocampus mohnikei* polysaccharides were determined. The results showed that the optimum extraction condition were ultrasonic time 47 min, extraction temperature 87 °C, and solvent-to-solid ratio of 23 mL/g. Under these conditions, the extraction yield of crude polysaccharide HP was 9.91%. Two kinds of polysaccharides, HP-1 and HP-2, were obtained after being purified by column chromatography. HP-1 was mainly composed of glucose, galactose, mannose in a molar ratio of 11.32:6.39:5.64, with a small amount of arabinose, xylose, fucose and rhamnose. HP-2 was mainly composed of glucosamine, glucuronic acid, galacturonic acid, galactose, glucose, mannose in a molar ratio of 29.03:18.18:8.48:6.30:4.88:2.70, with a small amount of fucose, and xylose. HP-1, HP-2 had the ability of scavenging DPPH free radical, among which HP-2 had the best effect. Furthermore, HP, HP-1 and HP-2 had reducing power, indicating that *Hippocampus mohnikei* polysaccharides had better antioxidant activity.

**Key words:** *Hippocampus mohnikei*; polysaccharide; ultrasonic extraction; response surface optimization; monosaccharide composition; antioxidant activity