

文章编号:1001-6880(2015)4-0747-05

植物多糖抗氧化体外实验方法研究进展

张德华*, 邓辉, 乔德亮

皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012

摘要:生物活性多糖具有多种生理活性和特殊保健功能,其抗氧化能力强弱与多糖的来源、组成性质和结构有关。随着多糖市场需求增加,快速、灵敏和实用的抗氧化检测方法尤为重要。目前检测主要在体外化学模拟、细胞水平和个体水平等三个平台上进行。本文简要介绍近年来植物多糖抗氧化体外化学模拟实验的研究方法和原理:包括多糖清除·OH的测定、清除DPPH·的测定、清除O₂·的测定、抗氧化活性的测定、还原力的测定、清除亚硝酸盐的测定和清除R·的测定,并评价各种方法的优缺点和应用范围。

关键词:植物多糖;抗氧化;自由基;清除能力

中图分类号:Q-33

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.04.037

Research Progress on Experimental Methods on Testing in Vitro Antioxidant Activity of Plant Polysaccharides

ZHANG De-hua, DENG Hui, QIAO De-Liang

College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an, 237012, China

Abstract: Biologically active polysaccharide has many kinds of physiological activities and health care functions. The strength of antioxidant capacity of plant polysaccharides is related with its sources, properties and structures. With the increasing demand of polysaccharide market, some test methods of antioxidant activities which are quick, sensitive and practical are particularly important. At present the tests are mainly used in the following three platforms: *in vitro* chemical simulation, cellular level and individual level. This paper briefly reviews the methods and principles of detecting antioxidant activities of plant polysaccharides by *in vitro* chemical simulation experiment, including polysaccharides scavenging free radicals of hydroxyl, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, super-oxide anion and alkyl, reducing power, antioxidant activity and scavenging nitrates. The paper also evaluates the advantages and disadvantages of various test methods and their applications.

Key words: plant polysaccharide; antioxidant; free radical; scavenging capacity

生物活性多糖(Biologically Active Polysaccharides, 简称BAP)是一类具有多种生理活性和特殊保健功能的高分子碳水化合物聚合体。广泛存在于自然界中的动物、植物和微生物体内^[1,2]。

多糖具有提高机体免疫力、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、抗突变、抗辐射、抗凝血、抗菌消炎、降血脂、降血糖和防治心脑血管疾病等一系列特殊保健功能^[3,4]。抗氧化就是任何以低浓度存在就能有效抑制自由基氧化反应的物质,其机理可以是直接作用于自由基,或是间接消耗掉容易生成自由基的物质,防止发生进一步反应。其中多糖抗氧化能力强弱与

多糖的来源、组成性质和结构有关。

随着各类多糖的市场需求量增加,经济效益提高,快速、灵敏和实用的抗氧化检测方法就显得十分重要。目前检测主要在体外化学模拟、细胞水平和个体水平等三个平台上进行。本文简要介绍近年来植物多糖抗氧化体外化学模拟实验的研究方法:包括多糖清除·OH的测定、清除DPPH·的测定、清除O₂·的测定方法、抗氧化活性的测定、还原力的测定、清除亚硝酸盐的测定和清除R·的测定,并评价各种方法的优缺点和应用范围。

1 多糖清除·OH的测定方法

·OH(羟基自由基)化学性质特别活泼,是一种氧化能力很强的自由基,可以发生电子转移、夺取氧原子和羟基化等反应,也是毒性最大的自由基,几

乎与细胞内各类有机物反应，并且有非常高的速度常数，是进攻性最强的化学物质之一。是造成组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质解聚与聚合、多糖解聚的重要活性氧，所以与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬作用等有关^[5]，故·OH清除率可用来反映多糖抗氧化作用的重要指标。

离体·OH可由H₂O₂/Fe²⁺体系通过Fenton反应产生。目前，离体检测·OH有比色法、电子自旋共振法、化学发光法、细胞色素C氧化法等。根据·OH产生方式和检测方法分为以下几种：

1.1 邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测·OH

邻二氮菲-Fe²⁺是一常用的氧化还原指示剂，其颜色变化可敏锐地反映溶液氧化还原状态的改变。邻二氮菲-Fe²⁺水溶液被·OH氧化为邻二氮菲-Fe³⁺后，其536nm最大吸收峰消失。据此，可建立以A₅₃₆变化反映·OH氧化作用的比色测定法^[6]。邻二氮菲-Fe²⁺氧化法简单价廉，稳定可靠，在筛选多糖抗氧化研究检测离体实验体系中·OH的氧化效应有重要的价值。相比之下，化学发光法，高效液相法及顺磁共振法则需要特殊设备，细胞色素C氧化法所用试剂则较昂贵。

方飞等人^[7]用此法测定海蒿子多糖清除·OH的能力。

1.2 水杨酸比色法

H₂O₂与Fe²⁺混合后通过Fenton反应产生·OH，·OH存活时间短，但在反应体系中加入水杨酸，·OH进攻水杨酸分子上的苯环，产生的2,3-羟基苯甲酸（有色产物）在510 nm处的吸光值与·OH的量成正比。反应体系中若加入具有清除·OH功能的被测物，便会与水杨酸竞争，从而使有色产物的生成量减少，采用固定反应时间法，在510 nm处测量含被测物反应液的吸光度，并与空白液比较，便能测定被测物对其的清除作用。

胡一鸿^[1]、王新风^[8]和马厉芳^[9]等人通过此方法分别测定了番荔枝种子粗多糖、葎草多糖和黄花软紫草多糖在体外对·OH清除率。胡一鸿把提取的番荔枝种子多糖配制浓度为8 mg/mL时，对·OH的清除能力最大，为此时维生素C对羟基自由基清除能力的81.26%。王新风用8月份采集的葎草嫩头提取的多糖配制成的5 mg/mL测试液，清除羟自由基能力达97.36%。马厉芳以水为溶剂提取的紫草多糖的得率为2.53%，且此粗多糖清除·OH的能力与其浓度呈线性关系。

上述实验中不同类型多糖清除·OH能力有差异，可能原因有：首先多糖来自不同种植物、植物不同部位、不同时间上的差异；其次使用不同提取工艺和提取溶剂，提取出的多糖表现在聚合度、分子量大小、极性大小、溶解度上可能有差异^[10]；再者上述不同多糖可能在单糖组成、各单糖比例上有差异。正是因为这些因素导致不同多糖抗氧化能力上表现出差异。

1.3 溴邻苯三酚比色法

Co²⁺与H₂O₂作用产生·OH，且产率是铁离子与H₂O₂通过Fenton反应的10倍以上，再利用·OH氧化溴邻苯三酚使其褪色，所以根据褪色程度用比色法测定羟自由基含量。葛霞等人^[11]利用这种反应测定青钱柳多糖对·OH的清除能力。

1.4 蕊红花红T比色法

·OH也可由EDTA-Na-Fe(II)-H₂O₂体系产生，由于·OH可使蕊红花红T褪色，根据褪色程度用比色法来衡量·OH的含量。乌兰格日乐^[12]和孙晓春^[13]等人用此法分别测定了冬葵果多糖和牛奶子树多糖对·OH的清除能力。

1.5 脱氧核糖-铁体系法

因为H₂O₂被Fe²⁺催化分解可产生·OH，由于·OH可以使脱氧核糖氧化降解，降解物又可以与硫代巴比妥酸(TBA)反应显色，生成物在波长532 nm有最大吸收峰，因此，体系中加入多糖样品后，可以通过测定A₅₃₂值的变化间接反映多糖样品对·OH介导的脱氧核糖降解的保护作用或对·OH的清除作用。原江锋等人^[14]采用此法测定了川芎多糖清除·OH能力。

2 多糖清除DPPH·的测定

1,1-二苯基-2-苦味酰肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH·))是一种以氮为中心的自由基，在有机溶剂中非常稳定^[12]，其稳定性主要来自共振稳定作用的3个苯环的空间障碍，使夹在中间的氮原子上不成对的电子不能发挥其应有的电子成对作用，其孤对电子在波长517 nm附近有强吸收峰（深紫色，其乙醇溶液显紫色）。当DPPH·溶液中加入自由基清除剂时，其孤对电子被配对时，吸收消失或减弱，导致溶液颜色变浅，从紫色逐渐变成黄色或淡黄色^[15]，在517 nm处的吸光度变小，其变化程度与自由基清除程度呈线性关系。

所以,通过加入多糖溶液测定吸收减弱的程度,可间接评价该多糖对 DPPH[·]清除能力的大小。王艳丽^[16]、杨锋^[17]、葛霞^[11]和萨仁高娃^[18]等人用此方法分别测定了白术多糖、火棘多糖、青钱柳多糖和辣椒多糖清除 DPPH[·]能力。上述不同种多糖在清除 DPPH[·]能力上也表现出一定差异,原因分析见 1.2。

3 多糖清除 O₂[·] 的测定方法

O₂[·](超氧阴离子自由基)是一种体内很易产生的自由基,O₂[·]是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基,可以经过一系列的反应生成其它的氧自由基,人体内存在着一系列酶和非酶系统可清除这些自由基^[19]。

因多糖分子上均有还原性的半缩醛羟基,能与 O₂[·]发生氧化还原反应,从而终止自由基链式反应。常见的植物多糖 O₂[·]测定方法有化学发光法、细胞色素法、NBT 法、邻苯三酚法、核黄素法、肾上腺素法和羟胺氧化法。

3.1 邻苯三酚法

邻苯三酚在弱碱性介质(pH8.2)中自身氧化分解产生 O₂[·],随着反应的进行,因 O₂[·]不断积累,导致反应液的吸光度(325 nm 波长处)在反应开始后 5 min 之内随反应时间而线性增大^[20]。当体系中加入 O₂[·]清除剂后,清除 O₂[·],阻止中间产物的积累,吸光度降低。利用多糖能清除 O₂[·],使邻苯三酚自氧化产物在 325 nm 处的吸收峰受到抑制这一特点,进行光化学方法测定。

严奉伟^[20]、李贵荣^[21]、Li Q^[22] 和吴广枫^[23] 等人利用该法分别测定了菜籽多糖、党参多糖、木榄多糖和芦荟多糖清除 O₂[·]的能力。上述不同种多糖在清除 O₂[·]能力上也表现出一定差异,原因分析见 1.2。

3.2 邻苯三酚-NBT 法

邻苯三酚在碱性条件下易氧化产生超氧阴离子自由基,O₂[·]与 NBT(氯化硝基四氮唑蓝)作用形成紫色化合物,在波长为 530 nm 处测定吸光度,吸光度值能间接反映 O₂[·]的含量。多糖具有清除 O₂[·]可使其吸光值降低,乌兰格日乐^[12]利用以法验证冬葵果多糖的抗氧化作用。

3.3 核黄素-NBT 法

在还原剂甲硫氨酸(Met)的存在下,核黄素分子(RFV)吸收一个光子被还原成半醌形式,后者在

有 O₂ 条件下,自氧化产生 O₂[·],O₂[·]可将四氮唑蓝还原成为蓝色产物,其最大光吸收在 560 nm 处,O₂[·]的清除剂可使 OD₅₆₀ 的值降低。聂凌鸿^[24]、张文娜^[25]等利用以法研究淮山多糖和桑椹多糖清除 O₂[·]的能力。

4 多糖抗氧化活性的测定

4.1 磷钼络合物的测定方法

原理是 Mo(VI) 被抗氧化物质还原成绿色的 Mo(V) 络合物,其最大吸收波长为 695 nm。抗氧化物质活性越强,测定的吸光度值越大,此方法操作简单,所用试剂(硫酸、磷酸钠、钼酸铵)低廉、方法重现性好,适合多糖溶液抗氧化活性的测定,一般常用于多糖总抗氧化能力的测定。

4.2 试剂盒法

抗氧化物质能将 Fe³⁺还原为 Fe²⁺,而 Fe²⁺能使菲琳类物质形成稳固的络合物,在 520 nm 下通过比色测出其抗氧化能力的高低,李勇^[26]等人使用按此原理设计的试剂盒测定了草苁蓉多糖的总抗氧能力。

4.3 采用硫氰酸铁法

硫氰酸铁盐(FTC)比色法是基于在酸性条件下,脂质氧化形成的过氧化物可将 Fe²⁺ 氧化成 Fe³⁺,然后 Fe³⁺ 与硫氰酸根离子形成在 480 ~ 515 nm 内有最大吸收的红色络合物。通常用 500 nm 处吸光值的高低表示物质抗脂质过氧化的能力,吸光值越小,表明物质的抗脂质过氧化能力越强。

例李勇^[26]和聂凌鸿^[24]等人应用此法测定了草苁蓉和广东淮山多糖的抗氧化活性。

5 还原力的测定

物质的还原能力与其抗氧化活性之间有着明显的关系,故可采用普鲁士蓝法测定多糖的还原能力间接反映其抗氧化能力。以普鲁士蓝 [Fe₄(Fe(CN)₆)₃] 之生成量作为指标,将六氰合铁酸钾 [K₃Fe(CN)₆] 还原成 K₄Fe(CN)₆,再利用 Fe³⁺ 形成 Fe₄(Fe(CN)₆)₃,由 700 nm 处吸光值变化检测还原力大小。吸光值愈高表示样品的还原力也就越强。

严奉伟^[20]、陈卫云^[27]、原江锋^[14] 和孙晓春^[13] 等人采用此法分别测定了菜籽、荔枝、川芎和牛奶子树多糖的还原能力。

6 多糖清除亚硝酸盐的测定

6.1 多糖对亚硝胺合成阻断率的测定

在模拟人体胃液(37 °C, pH3.0)的条件下,二甲胺与亚硝酸钠可生成二甲基亚硝胺,当往植物多糖溶液中依次加入二甲胺与亚硝酸钠时,植物多糖首先同亚硝酸钠反应,使得二甲胺不能与亚硝酸钠反应,达到阻断亚硝胺生成的目的。据此比较相同条件下生成亚硝胺量的多少来反映植物多糖阻断亚硝胺合成能力的强弱。亚硝胺的测定采用紫外光解法。亚硝胺在紫外光照射下能分解释放出亚硝酸根,与对氨基苯磺酸发生重氮作用形成重氮盐,再与1-萘胺偶合生成红色络合物(最大吸收波长525 nm)。用分光光度计测出该化合物的吸光值,就可知反应液中的亚硝胺含量。

马森^[28]、李志英^[29]和郭小鹏^[30]用此法测定竹叶、黄芪和黄参多糖阻断亚硝酸胺的能力。

6.2 多糖对亚硝酸钠清除率的测定

亚硝酸盐在弱酸性的条件下,与对氨基苯磺酸重氮化后,再与N-1-萘基乙二胺盐酸盐偶合生成红色络合物,用分光光度计测出该化合物的吸光值,就可知反应液中亚硝酸盐含量多少。根据这一原理比较同一条件下亚硝酸盐含量的多少来反映植物多糖清除亚硝酸盐能力的大小,亚硝酸盐含量少,其清除能力就强,反之则弱。

马森^[28]、李志英^[29]和郭小鹏^[30]用此法测定竹叶、黄芪和黄参多糖清除亚硝酸盐的能力。

7 多糖清除R·的测定

利用浓乙醇在碱性有氧环境中,强紫外线下光解产生CH₃CHOH,CH₃C为自由基引发剂直接作用于大豆植物油分中的多不饱和脂肪酸形成R·,经共轭和氧化形成脂过氧自由基(ROO·),再分解为丙二醛(MDA),它可以与硫代巴比妥酸(TBA)反应产生红色物质,该物质在532nm处有最大吸收峰。聂凌鸿^[24]、田晓艳^[31]和刘春兰^[32]等人用此法测定了淮山、沙棘和香椿叶多糖对R·的清除作用。

多糖抗氧化活性的研究目前主要停留在体外实验中,由于体外和体内环境存在差异,一些在体外表现较强抗氧化活性的植物多糖在体内试验未必会表现出较强的活性,在后续的研究中应同时进行体外和体内抗氧化研究才能确保全面客观的评估植物多糖的抗氧化活性^[33]。

虽然多糖类物质的研究取得很大进展,但还存在一些问题。如植物多糖结构和功能的关系至今尚

不十分清楚,植物多糖的结构测定方法未达到自动化、微量量化和标准化,植物多糖样品的制取、合成比较困难,植物多糖在体内的作用机制还不是很清楚。

参考文献

- Hu YH(胡一鸿), et al. Antioxidant Ability of Crude Polysaccharides from Sugar Apple(*Annona squamosa* L.) Seeds. *Chin J Tropical Crops*(热带作物学报), 2011, 32: 1051-1054.
- Shuai Z, et al. Separation and structural elucidation of a polysaccharide CC30w-1 from the fruiting body of *Coprinus comatus*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2013, 1: 99-104.
- Xiang YW, et al. Isolation, purification and *in vitro* anti-tumor activity of polysaccharide from *Ginkgo biloba* sarcotesta. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86: 1073-1076.
- Song Z, et al. Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia-reperfusion rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46: 363-366.
- Zhang H(张昊), Ren HZ(任发政). Advances in determination of hydroxyl and superoxide radicals. *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2009, 29: 1093-1099.
- Jin M(金鸣), et al. 1,10-Phenanthroline-Fe²⁺ Oxidative Assay of Hydroxyl Radical Produced by H₂O₂/Fe²⁺. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 1996, 23: 553-555.
- Fang F(方飞), Tang ZH(唐志红). Study on the Antioxidant Activity of Polysaccharide from *S. pallidum*. *Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 2011, 39: 9590-9591.
- Wang XF(王新风), et al. Content and antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Humulus scandens*. *Guibaia*(广西植物), 2009, 29: 413-416.
- Ma LF(马厉芳), et al. Studies on extraction technology and effects of scavenging free radicals by *Arnebia guttata* Bge. polysaccharides. *Food and Fermentation industries*(食品与发酵工业), 2008, 34: 147-148.
- Jun LW, et al. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserine* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80: 84-93.
- Ge X(葛霞), et al. Studies on the anti-oxidant activity of polysaccharide from *Cyclocarya Paliurus* (Batal.) Iljin. *J Chin Institute Food Sci Tech*(中国食品学报), 2011, 11(5): 59-64.

- 12 Wu LGRL(乌兰格日乐), et al. Antioxidant effect of fructus *Malvae polysaccharides*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:536-538.
- 13 Sun XC(孙晓春), Yan GQ(闫桂琴). Comparisons of antioxidant activity of the polysaccharide from different parts of *Elaeagnus umbellata* Thunb. *Plant Science Journal*(植物科学学报), 2011, 29:734-737.
- 14 Yuan JF(原江锋), Wang DH(王大红). Antioxidant effects and cytotoxicity of crude polysaccharide from *Ligusticum Chuanxiong* Hort. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:877-881.
- 15 Duh PD, et al. Actin of methanolic extract of mung BEAN hulls as inhibitons of peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food Chem Toxicology*, 1999, 37:1055-1061.
- 16 Wang YL(王艳丽), et al. Effect of ultrasonic parameters on anti-oxidative activity of polysaccharides from *Atractylodes Chin J Bioprocess Engineering*(生物加工过程), 2012, 10:7-12.
- 17 Yang F(杨峰), et al. Isolation, purification and anti-oxidation of polysaccharides in *Pyracantha fortuneana*. *Acta Bot Borea-Occident Sin*(西北植物学报), 2004, 24:2126-2130.
- 18 Sa RGW(萨仁高娃), et al. Study on the antioxidant activities of water-soluble polysaccharides from chilli and chilli food. *Sci Technology Food In*(食品工业科技), 2012, 33:127-129.
- 19 Song SH(宋曙辉), Xue Y(薛颖). Research on the anti-oxidation effect of sixty vegetables. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2000, 28:655-656.
- 20 Yan FW(严奉伟), et al. Study on the anti-oxidative effect and mechanism of polysaccharide from rapeseed(RSPS). *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 2005, 38:157-162.
- 21 Li GR(李贵荣), Yang SY(杨胜圆). Extraction of codonopsis pilosula polysaccharide and its effects of anti-active oxygen free radicals. *Chem World*(化学世界), 2001:421-423.
- 22 Li Q, et al. Extraction optimization of *Bruguiera gymnorhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. *Carbohyd Polym*, 2013, 96:148-155.
- 23 Wu GF(吴广枫), Tang J(汤坚). Study on the purification of aloepolysaccharide and its antioxidation *in vitro*. *J Zhengzhou Institute of Techn*(郑州工程学院学报), 2002, 23(2):75-78.
- 24 Nie LH(聂凌鸿), Ning ZX(宁正祥). Study on the isolation, purification and antioxidative activity of water soluble polysaccharide of *D. fordii* Prainet Burkill. *Food Sci*(食品科学), 2003, 24:129-133.
- 25 Zhang WN(张文娜), et al. Study on the antioxidative activity of polysaccharides from *Fructus Mor. J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2012, 40:156-157.
- 26 Li Y(李勇), et al. Antioxidative effect of polysaccharides from *Boschniakia rossica*. *Food Sci Techn*(食品科技), 2011, 36:246-248.
- 27 Chen WY(陈卫云), et al. The comparison of antioxidant activity of polysaccharides extracted from Litchi by different ways. *Sci Techn Food Industry*(食品工业科技), 2012, 33:192-194.
- 28 Ma S(马森). Function of clearing on flavone and polysaccharide from bamboo leaf. *Journal of WuYi University*(武夷学院学报), 2012, 31(5):31-34.
- 29 Li ZY(李志英), Cheng LL(程丽丽). The effect of astragalus polysaccharides extracted from β -cyclodextrin derivatives on the removing of nitrite. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 2011, 37(2):70-72.
- 30 Guo XP(郭小鹏), et al. Study on removal process of proteins from crude *Sphallerocarpus gracilis* polysaccharides and its scavenging capability to nitrite. *Sci Techn Food Industry*(食品工业科技), 2011, 32:274-276.
- 31 Tian XY(田晓艳), et al. Determination of polysaccharide HRP Ia biological activity from *Hippophae rhamnoides* L. *J Food Sci Biotechnology*(食品与生物技术学报), 2010, 29:294-294.
- 32 Lu CL(刘春兰), et al. A study of preliminary purification and scavenging free radical activity of polysaccharide of *Toona sinensis* Roem. *Nat J Hai Nan Univ*(海南大学学报自然科学版), 2008, 26:63-67.
- 33 A Y(阿燕). Research progress of antioxidant activities of fungal polysaccharides. *J Microbiology*(微生物学杂志), 2012, 32(4):83-86.
- 34 Xu DR(徐德然), Wang KC(王康才), Wang ZT(王峥涛), et al. Primary study on the original problems of Danshensu and protocatechuic aldehyde of *Salvia miltiorrhiza*. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2005, 3:148-150.

(上接第 719 页)

- 10 Mao SJ(毛声俊), Hou SX(侯世祥), Tang CJ(唐昌炯), et al. Studies on variation of Danshensu content in accelerated stability tests. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2003, 28:220-222.